

01673

6
2ef



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

DIVISION DE ESTUDIOS DE POSGRADO E INVESTIGACION
FACULTAD DE MEDICINA VETERINARIA Y ZOOTECNIA

DETERMINACION DE LA PATOGENICIDAD DE DIFERENTES AISLAMIENTOS DE *Escherichia coli* A PARTIR DE HUEVO FERTIL Y AVES CON INFECCION DEL SACO VITELINO MEDIANTE SEROLOGIA E HIBRIDACION DE ADN

T E S I S
PARA OBTENER EL GRADO DE
MAESTRO EN PRODUCCION ANIMAL: AVES
PRESENTADA POR:
MVZ. CECILIA ROSARIO CORTES

ASESORES: MVZ., MSc., DR. CARLOS LOPEZ COELLO
MVZ., MPA. MA. DEL PILAR CASTAÑEDA SERRANO
MVZ., MSc., PhD. GUILLERMO TELLEZ ISAIAS
MVZ. GERARDO PEÑALBA GARCIA
M., PhD. CARLOS ESLAVA CAMPOS



MEXICO, D. F.

MARZO 1999.

TESIS CON
FALLA DE GRAN

I

271377



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

**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 LUCHO.

Antonio Plaza

(Fragmento)

DECLARACIÓN

Doy mi consentimiento a la División de Estudios de Posgrado e Investigación de la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia de la Universidad Nacional Autónoma de México para que esta sea disponible para cualquier tipo de reproducción e intercambio bibliotecario.



MVZ. Cecilia Rosario Cortés

DEDICATORIA

A DIOS

Por darme la vida y a los mejores padres. Gracias por la oportunidad de concluir esta etapa y hacer realidad mis sueños. Por guiarme y estar siempre junto a mi; además, de darme la oportunidad de conocer gente maravillosa, y sobre todo, por permitirme disfrutar de lo hermoso que es estar vivo y conocerte.

A MIS PADRES

Por ser la base de todos mis logros y estar siempre junto a mi, pero sobre todo por amarme a pesar de todos mis defectos y mis errores. Gracias por el tesoro más grande que nos han dado, su ejemplo de honradez, rectitud, honestidad y deseos de superación. Esta tesis marca el final de una etapa, y gracias a Dios, puedo compartirlo con ustedes, las dos personas que más amo en el mundo. Espero poder corresponder a su cariño, confianza y dedicación de tantos años, y jamás defraudarlos. Los Amo.

A MI HERMANO LUIS MANUEL

A mi único y muy querido hermano, por estar siempre a mi lado cuando te necesito y porque a pesar de todo lo que nos separa, nos une un gran cariño. Espero nunca defraudar tu confianza. Este triunfo también es tuyo.

También quiero dedicar este trabajo a Mary, mi cuñada, por el cariño que aunque a veces es difícil demostrar, sentimos por ti. Gracias por formar parte de nuestra familia y por todo lo que nos has dado.

A MIS SOBRINOS JOSÉ MANUEL, LUIS DANIEL Y MARIANA

Ustedes han dado un nuevo sentido a la vida de nuestra familia. Gracias por todo su cariño, y por alegrar mi vida con sus sonrisas y sus juegos. A pesar de que cada uno es diferente, los tres forman una parte muy importante de mi vida y de mi corazón. Espero que se sientan tan orgullosos de mi como yo lo estoy de ustedes.

A MIS TÍOS Y PRIMOS

Al igual que en la tesis de licenciatura quiero agradecer a todos ustedes porque somos una gran familia, pero especialmente a mis tíos Queta y Diego pues han sido para mi como unos segundos padres, los quiero mucho y les agradezco todo lo que nos han dado a Luis Manuel y a mi, pero sobre todo su cariño.

A MARU Y EDUARDO

Mis dos grandes y queridísimos amigos, quiero compartir, como siempre, esta alegría con ustedes. A pesar de que no nos vemos muy seguido quiero decirles que siempre están en mi mente y en mi corazón. Gracias por compartir conmigo las alegrías y las tristezas y por escucharme cuando los necesito.

A LUISITA Y JORGE

Hay veces que no se puede expresar todo el cariño y agradecimiento que sentimos; creo que este es uno de esos casos. De cualquier forma quiero que sepan que les agradezco su cariño, confianza y amabilidad. Nunca olvidaré todas las atenciones que tuvieron

conmigo durante la estancia en su hogar, me hicieron sentir parte de su familia. Los quiero mucho y les deseo la mayor felicidad.

A MIS AMIGOS

Greta, Pilar Eguía, Rosalía, Luis, Sergio, Alejandro, Pilar Castañeda, Blanca, Krimilda, Chucho, Angélica, Edgar, Odette, Rubén, Alinne, Daniel Marrufo, Daniel Ortega, Gerardo Nava, Rosy, José, Julio, Felipa y Mireya. Algunas veces nos es difícil hacerle saber a los amigos que se les quiere y lo importantes que son para nosotros, creo que este es un buen momento para expresar todo el cariño que les tengo. Un agradecimiento muy especial por estar ahí cuando los he necesitado.

A MIS AMIGOS DE MEDICINA

Delia, Pepe, Gabriel, Francis, Maritona, Luis Antonio, Juan Manuel, Martha, Eva, Teresita, Ruth, Carlos Loredo, Dra. Ana María Castro, Dr. Angel Manjarrez, Dr. Margarito, Don Beto, Lulú y Sr. Modesto. Llegar a un lugar nuevo siempre es difícil, pero cuando uno encuentra a personas tan amables como ustedes todo es más fácil. Gracias por compartir y formar parte de su grupo por algún tiempo. Especialmente quiero dedicar este trabajo a Pepe y Delia que siempre estuvieron conmigo, y por ser verdaderos amigos. Los quiero mucho.

CON CARIÑO

A todos aquellos que a lo largo de mi vida han confiado en mi y me han apoyado para poder llegar hasta este momento. Gracias por el cariño y la fe que han depositado en mi. Es imposible recordar a todos en este momento, sin embargo a ustedes todo mi cariño y eterna gratitud. El llegar a esta meta fue trabajo de equipo, y quiero que lo disfruten conmigo.

AGRADECIMIENTOS

A la Universidad Nacional Autónoma de México

Por brindarme la oportunidad de formar parte de ella; es un orgullo y una gran responsabilidad.

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT)

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

Al Consejo Interno de Investigación de la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia

Por otorgarme la Beca de Apoyo a Proyectos de Posgrado, para la realización de este trabajo.

Al Departamento de Producción Animal: Aves

Por darme la oportunidad formar parte de su equipo y crecer profesionalmente; siempre lo llevaré en mi corazón, pues en el que he conocido gente maravillosa y he pasado una de las mejores épocas de mi vida. Pero especialmente al **Dr. Guillermo Téllez Isaías**, gracias por toda su confianza y por brindarme la oportunidad de trabajar con usted.

Al Departamento de Salud Pública de la Facultad de Medicina

Especialmente al **Dr. Carlos Eslava**, quien sin conocerme, me brindo la oportunidad de trabajar con él. Muchas gracias por el gran apoyo que recibí de su parte en los momentos en que más lo necesite; además de su gran preocupación porque todo saliera bien. Ha sido una gran experiencia trabajar junto a usted.

Al Dr. Armando Navarro

Gracias por su gran ayuda, su buena disposición y por compartir conmigo sus conocimientos, fue muy agradable trabajar con usted. Me llevo un gran recuerdo del tiempo que pasé en el laboratorio.

A la Empresa Bachoco S.A. de C.V.

En especial al **Dr. José Manuel Arriola**, gracias por su apoyo y las facilidades otorgadas para la realización de este trabajo. Además quiero agradecer a todo el personal de esa empresa que amablemente colaboró conmigo en granja de reproductoras, incubadora y granja experimental. ¡Muchas Gracias!

Al Dr. Ismael Hernández

Por brindarme la oportunidad, no solo de realizar parte de este trabajo, sino por su gran calidad humana y su generosidad, aprendí mucho de usted.

Al Dr. Jorge Zurita

Por el apoyo y la confianza que depositó en mi para poder hacer uso de las instalaciones del laboratorio. Además un agradecimiento a las chicas del laboratorio, especialmente a Blanca pues sin conocerme me brindo su ayuda y su amistad.

A mis asesores

Dr. Carlos López Coello, Dra. Ma. del Pilar Castañeda Serrano, Dr. Guillermo Téllez Isaías, Dr. Gerardo Peñalba y Dr. Carlos Eslava Campos

Gracias por haber dedicado parte de su tiempo en la revisión de esta tesis, y por la confianza que depositaron en mi.

A los miembros del jurado

Dr. Ernesto Ávila González, Dr. Tamas Fehervari, Dr. Daniel Camacho Fernández, Ma. del Pilar Castañeda Serrano y Dr. Carlos Vega Saldaña.

Por enriquecer con sus conocimientos y comentarios esta tesis, por su gran confianza y gran calidad humana.

En especial

A todos los que en este momento olvido, pero que los llevo en mi corazón y que de una u otra manera colaboraron para hacer que ese sueño, hoy, al concluir este trabajo, sea una realidad.

CONTENIDO

I.	LISTADO DE ABREVIATURAS	XI
II.	RESUMEN	XII
III.	SUMMARY	XIII
IV.	INTRODUCCIÓN	1
A.	LA AVICULTURA	1
B.	INFECCIÓN DEL SACO VITELINO	2
C.	<i>Escherichia coli</i>	4
D.	SEROTIPIFICACIÓN	5
E.	<i>Escherichia coli</i> ENTEROPATÓGENA (EPEC)	6
F.	<i>Escherichia coli</i> ENTEROTOXIGÉNICA (ETEC)	8
G.	<i>Escherichia coli</i> ENTEROHEMORRÁGICA (EHEC)	9
H.	<i>Escherichia coli</i> ENTEROAGREGATIVA (EAEC)	10
I.	<i>Escherichia coli</i> ENTEROINVASIVA (EIEC)	11
J.	TOXINA CITOLETAL DISTENCIONANTE (CDT)	13
V.	JUSTIFICACIÓN	14
VI.	OBJETIVOS	15
VII.	HIPÓTESIS	15
VIII.	MATERIAL Y MÉTODOS	16
A.	OBTENCIÓN DE LAS MUESTRAS	16
1.	Granja de Reproductoras	16
2.	Planta Incubadora	17
3.	Granja de Pollo de Engorda	17
B.	AISLAMIENTO MICROBIANO	18
1.	Aserrín de Nidos	18
2.	Huevos	18
3.	Mortalidad	19
C.	IDENTIFICACIÓN BACTERIANA	19
1.	Identificación General	19

2.	Identificación de <i>Escherichia coli</i>	20
3.	Identificación Serológica	21
4.	Determinación de Genes de Virulencia	22
IX.	RESULTADOS	26
A.	AISLAMIENTO DE MICROORGANISMOS	26
B.	FRECUENCIA DE AISLAMIENTO DE <i>Escherichia coli</i>	27
C.	TIPIFICACIÓN SEROLÓGICA DE <i>Escherichia coli</i>	27
D.	DETECCIÓN DE GENES DE VIRULENCIA	29
X.	DISCUSIÓN	31
XI.	CONCLUSIONES	37
XII.	LITERATURA CITADA	38

CUADROS Y FIGURAS

	PÁGINA
CUADROS	
Cuadro 1. Cepas utilizadas como testigo en la prueba de hibridación de ADN.	44
Cuadro 2. Frecuencia de aislamiento de los microorganismos encontrados en diferentes muestras tomadas en granja de reproductoras.	45
Cuadro 3. Frecuencia de aislamientos de <i>Escherichia coli</i> de las diferentes áreas de muestreo.	46
Cuadro 4. Relación entre serotipos de <i>Escherichia coli</i> y el sitio de aislamiento.	47
Cuadro 4. (Continuación) Relación entre serotipos de <i>Escherichia coli</i> y el sitio de aislamiento.	48
Cuadro 5. Serogrupos aislados en granja de reproductoras, incubadora y pollo de engorda.	49
Cuadro 6. Número de aislamientos de los diferentes serotipos de <i>Escherichia coli</i> no móviles en granja de reproductoras, incubadora y pollo de engorda.	50
Cuadro 7. Relación entre el momento de aislamiento y la presencia de genes de virulencia en cepas de <i>Escherichia coli</i> .	51
FIGURAS	
Figura 1. Metodología utilizada para el manejo de las muestras y cepas.	52
Figura 2. Porcentaje de mortalidad y aislamientos de <i>Escherichia coli</i> en pollos de engorda durante la primera semana a partir de la mortalidad.	53
Figura 3. Relación del número de aislamientos y el porcentaje de cepas de <i>Escherichia coli</i> que presentaron genes de virulencia en la incubadora a los 19 y 21 días.	54
Figura 4. Relación del porcentaje de mortalidad con la presencia de genes de virulencia en cepas de <i>Escherichia coli</i> aisladas a partir de pollo de engorda durante la primera semana	55

ABREVIATURAS

UNA	Unión Nacional de Avicultores
PIB	Producto Interno Bruto
ISV	Infección del Saco Vitelino
ETEC	<i>Escherichia coli</i> Enterotoxigénica
EIEC	<i>Escherichia coli</i> Enteroinvasiva
EPEC	<i>Escherichia coli</i> Enteropatógena
EAEC	<i>Escherichia coli</i> Enteroagregativa
EHEC	<i>Escherichia coli</i> Enterohemorrágica
A/E	Adherencia y esfacelamiento
BFP	Bundle Forming Pilus
EAF	Factor de Adherencia de <i>Escherichia coli</i>
ST	Toxina Termoestable
LT	Toxina Termolábil
CFA	Antígenos de Factor de Colonización
SLT	Shiga Like Toxin o Verotoxina
AAF	Fimbria de Adherencia Agregativa
CDT	Toxina Citoletal Distencionante
CHO	Células de Ovario de Hámster Chino
PBS	Solución Amortiguadora de Fosfatos
McC	Agar MacConkey
TSA	Agar de Soya Trypticaseína
TSI	Agar de Hierro Tres Azúcares
LIA	Agar de Hierro Lisina
O/F	Prueba de Oxidación / Fermentación
ONPG	O-nitrofenil- β -galactopiranosido
RM-VP	Prueba de Rojo de Metilo Voges-Proskauer
SSF	Solución Salina Fisiológica
BHI	Caldo Infusión Cerebro Corazón

RESUMEN

ROSARIO CORTES, CECILIA: Determinación de la patogenicidad de diferentes aislamientos de *Escherichia coli* a partir de huevo fértil y aves con infección del saco vitelino mediante serología e hibridación de ADN. (Bajo la dirección de: MVZ, MSc, PhD Carlos López Coello, MVZ, MPA. Ma. del Pilar Castañeda Serrano, MVZ, MSc, PhD Guillermo Téllez Isaías, MVZ. Gerardo Peñalba García, M PhD Carlos Eslava Campos).

La Infección del Saco Vitelino es uno de los procesos más importantes en la mortalidad del pollo durante la primera semana de vida, siendo el principal agente causal de dicha enfermedad *Escherichia coli*. En este trabajo se realizó la caracterización serológica y la detección de genes de virulencia en cepas de *E. coli* aisladas en granja de reproductoras, incubadora y pollo de engorda. El aislamiento bacteriano se realizó a partir de muestras de cama de nido, huevo de nido, huevo infértil a los 19 días y huevo picado a los 21 días, así como de hígado y saco vitelino de pollos muertos durante la primera semana de vida. Se tomaron 60 muestras de cada sitio y del pollo de engorda se colectaron muestras de 216 aves. De las diferentes muestras se aislaron 267 cepas identificadas como *E. coli*, de las cuales la mayor parte se aislaron de incubadora y pollo de engorda, mientras que en la granja de reproductoras solo se aislaron 4. Los serogrupos aislados con mayor frecuencia fueron O19 (12.36%), cepas rugosas (10.86%), O84 (8.99%) y O8 (6.37%). Algunos de los serotipos identificados solo se encontraron en granja de reproductoras y en pollo de engorda, pero no en la incubadora (O6, O9 y O152). La mayor parte de los serogrupos encontrados en incubadora fueron diferentes tanto a los 19 como a los 21 días. En el 41.2% (110 cepas) se encontró por lo menos un gen de virulencia. El gen predominante entre estas cepas fue *IPAH*, seguido por *eae* y *cdt*, se identificaron algunas cepas que portaban más de un gen de virulencia. Los resultados obtenidos sugieren que contrario a lo que se piensa, la contaminación del huevo no ocurre en la granja de reproductoras, sino en la incubadora y en el pollo de engorda. Los serotipos aislados no coinciden en su mayoría con los reportados como patógenos para las aves; sin embargo, se pudo observar que gran parte de las cepas causantes de la Infección del Saco Vitelino presentaban al menos un gen de virulencia.

Palabras Clave: Infección del Saco Vitelino, *Escherichia coli*, Serotipificación, Genes de Virulencia.

SUMMARY

ROSARIO CORTES, CECILIA: Determination of pathogenicity in different strains of *Escherichia coli* isolated from fertile eggs and chicks with yolk sac infection through serotyping and hibridization of ADN. (Advisors: MVZ, MSc, Dr. Carlos López Coello, MVZ, MPA. Ma. del Pilar Castañeda Serrano, MVZ, MSc, PhD Guillermo Téllez Isaías, MVZ. Gerardo Peñalba García, M PhD Carlos Eslava Campos).

Yolk Sac Infection is one of the most important cause of mortality during the first week in chicks, *Escherichia coli* is the main cause of this disease. In the present study serotyping and detection of virulence genes in some strains of *E. coli* isolated in the breeders farm, hatchery and broiler farm is reported. Bacteriological isolation from samples of material of nest, egg from nest, infertile eggs at 19th day of incubation, dead in shell at 21st day, and liver and yolk sac from chicks dead during the firs week was performed. Sixty samples from each place and from 216 broilers was taken. Two hundred and sixty seven strains of *E. coli* were isolated. The majority of this strains were isolated in hatchery and broiler farm, whereas in the breeders farm only four strains were isolated. O19 (12.36%), rough strains (10.86%), O84 (8.99%) y O8 (6.37%) were the most frequently isolated strains. Some serotypes only were found in breeders farm or broilers farm, but not in the hatchery (O6, O9 y O152). A number of serotypes from hatchery were different at 19th and 21st day. In 41.2% (110 strains) at least one gene of virulence was found. The most frequent gene of virulence was *IPAH*, followed by *eae* and *cdt*, Carrier strains with more than one gene of virulence were also detected. Results in this study suggest that contamination of fertile eggs does not occur in breeders farm, and it could happen in hatchery or broiler farm. Isolated serotypes in this study disagree with serotypes known as pathogens for chickens which were previously reported, moreover, the most of the causative strains of yolk sac infection carried at least one gene of virulence.

Key Words: Yolk sac infection, *Escherichia coli*, Serotyping, virulence genes.

DETERMINACIÓN DE LA PATOGENICIDAD DE DIFERENTES AISLAMIENTOS DE *Escherichia coli* A PARTIR DE HUEVO FÉRTIL Y AVES CON INFECCIÓN DEL SACO VITELINO MEDIANTE SEROLOGÍA E HIBRIDACIÓN DE ADN

INTRODUCCIÓN

La Avicultura

En los últimos años la avicultura se ha convertido en un ejemplo de eficiencia productiva, esto debido en gran parte a la rapidez del ciclo de vida de las aves y a la facilidad de manejar un gran número de estas en un espacio reducido (1). Según datos de la Unión Nacional de Avicultores (2), correspondientes al año de 1996, la avicultura tuvo una participación porcentual de 0.566% en el producto interno bruto total (PIB), y del 24.44% dentro del PIB Pecuario.

Sin lugar a dudas, las aves son el instrumento más eficiente de transformación de proteínas vegetales a proteína animal en el sector pecuario, obteniendo conversiones alimentarias menores a los 2 kg de alimento por kg de carne producida y pesos corporales de 2.5 kg a las 7 semanas de edad. Lo anterior permite a la avicultura poner al alcance de la población proteínas de origen animal a un bajo costo. La U.N.A. estima que el consumo per capita de carne de pollo aumentará de 15.8 kg en 1997 a 16.3 en 1998, mientras que el de huevo tendrá un incremento de 16.8 a 17.3 kg en el mismo período de tiempo (2).

Para alcanzar las metas de producción que se tienen hoy en día, el organismo de las aves se ha forzado constantemente, lo que las predispone a adquirir nuevas enfermedades; estas han dejado de ser entidades causadas por un agente etiológico definido y se han transformado en complejos multifactoriales (1).

De hecho, para que en este momento un programa de sanidad sea efectivo, es necesario que sea planeado en forma vertical, por lo que debe contemplar cada uno de los eslabones de la producción como son: progenitoras, reproductoras, incubadoras, y granjas comerciales de engorda (1).

Infeción del Saco Vitelino

La infección del saco vitelino (ISV) es una de las principales causas de mortalidad en pollos durante la primera semana de vida (3, 4, 5). Puede considerarse como una enfermedad de gran importancia económica causada por la falta de higiene en las granjas de reproductoras y/o el manejo inadecuado del huevo en la incubadora (5). Se presenta en todas las parvadas causando disminución de la incubabilidad, reducción de los nacimientos, mortalidad durante los primeros 10 días de vida del pollito, así como un incremento en el número de pollos desechados por retraso en el crecimiento (4, 6, 7).

Aunque todas las aves son susceptibles a este padecimiento, se observa con mayor frecuencia en pollos y pavos debido a las condiciones intensivas de incubación (6). La transmisión de la ISV ocurre principalmente por la contaminación bacteriana del cascarón, en la granja de reproductores poco después de la postura cuando la cutícula todavía se encuentra húmeda. Esta se ve favorecida por la falta de higiene en los nidos, la postura en el piso, la incubación de huevo sucio o con defectos en el cascarón; así como, la recolección de huevos sucios y limpios al mismo tiempo (4, 5, 6).

Las malas condiciones en el almacenaje de huevo fértil, inadecuada desinfección del mismo, así como una humedad elevada durante la incubación también pueden favorecer la aparición de la ISV. Otra vía importante de contaminación del saco vitelino es la penetración de bacterias a través del ombligo mal cicatrizado (4, 6).

Se considera que algunas bacterias pueden migrar desde el tracto intestinal o respiratorio hacia el saco vitelino; sin embargo, se considera que la ruta más importante es la penetración de bacterias a través del cascarón (4, 8).

Las aves que padecen esta enfermedad se localizan bajo la criadora, son pollos débiles, deshidratados, deprimidos y el abdomen se encuentra flácido; los pollitos presentan retraso en el crecimiento y en algunas ocasiones se puede presentar diarrea. Cuando la ISV se presenta como consecuencia de onfalitis, la cicatriz umbilical esta abierta, inflamada y húmeda (6, 9, 10).

A la necropsia las aves se observan emaciadas, pequeñas y con los músculos abdominales enrojecidos; el saco vitelino no se ha absorbido y aunque puede tener apariencia normal, generalmente hay un cambio de coloración desde amarillo verdoso hasta café oscuro. El contenido puede ser más líquido o de consistencia pastosa, con un olor putrefacto; algunas veces se encuentra roto, por lo que se presenta como consecuencia una peritonitis. El hígado se encuentra pálido, y algunas veces la vesícula biliar se encuentra distendida (6, 9, 10).

Cuando la bacteria causal llega al saco vitelino comienza a multiplicarse, provocando deterioro y descomposición de este, lo que va a privar al pollito de nutrientes esenciales. Ciertas bacterias producen toxinas, por lo que la muerte ocurre por toxemia; sin embargo, cuando se encuentran involucradas bacterias como *Escherichia coli*, las aves mueren por septicemia (4, 5).

En algunas ocasiones cuando la infección ocurre durante la incubación, la muerte de los pollitos puede presentarse antes del nacimiento, provocando un incremento en el número de embriones muertos en el cascarón; sin embargo, si el crecimiento bacteriano es lento, el pollito nacerá, pero la muerte se presentará algunos días después (4, 5).

Las aves que llegan a sobrevivir generalmente sufren un retraso en el crecimiento, o bien desarrollan artritis secundaria, los principales agentes etiológicos de esta pueden ser *Staphylococcus spp.* o *Pseudomonas spp.* (5, 6).

Las bacterias que son capaces de crecer en el saco vitelino poseen enzimas capaces de digerir las proteínas de este, mientras que otras sin embargo son destruidas

por las enzimas que se encuentran en él. La infección se inicia por la invasión de una bacteria que normalmente no es patógena, pero que posee enzimas capaces de digerir las proteínas del saco vitelino, esto facilita que bacterias como *E. coli*, encuentren condiciones ideales para su crecimiento en el vitelo digerido, provocando la muerte del pollito (4, 11).

Otras bacterias como *Proteus* spp., *Enterobacter* spp., *Pseudomonas* spp., *Klebsiella* spp., *Staphylococcus* spp., *Streptococcus* spp., *Clostridium* spp., *Bacillus cereus* y enterococos se han aislado a partir de aves con ISV; sin embargo, la bacteria que se aísla con mayor frecuencia es *E. coli* (3, 4, 5, 6). Harry (1957), encontró que en el 82% de las aves que mostraban cambios en el saco vitelino, así como en el 52% de los que no mostraban cambios se lograba aislar *E. coli*.

Escherichia coli

E. coli pertenece a la familia Enterobacteriaceae, en la tribu Escherichiae. Es un bacilo gram negativo móvil o inmóvil de 2 a 3 micras de largo por 0.6 micras de diámetro, aerobio o anaerobio facultativo y no esporulado. Forma ácido y gas a partir de lactosa, es indol positivo. Crece a temperaturas entre 15 y 45°C, el pH óptimo para su crecimiento es 7.0; en agar McConkey (McC) produce colonias brillantes circulares rosadas (12, 13, 14, 15).

A diferencia de otras bacterias que sólo pueden producir un tipo de enfermedad, *E. coli* es capaz de producir una gran variedad de padecimientos. En el hombre se le ha encontrado como causante de diarrea, disenteria, síndrome urémico hemolítico, infecciones renales y vesicales, septicemia, neumonía y meningitis; mientras que en las aves se le ha relacionado con infecciones respiratorias, dermatitis, infección del saco vitelino y onfalitis. Sin embargo, las cepas de *E. coli* que causan diarrea, no son las responsables de producir infecciones urinarias o meningeaas. Esta versatilidad se debe al hecho de que algunas cepas han adquirido diferentes grupos de genes de virulencia,

debido a esto, *E. coli* se ha convertido en el modelo que ilustra como una bacteria es patógena, debido a los genes que posee y no por pertenecer a un determinado género o especie (16).

Serotipificación

En general, la clasificación serológica de *E. coli* es muy similar al esquema de Kauffman-White para *Salmonella* spp.(17). De manera que la nomenclatura utilizada para la identificación serológica de *E. coli* es la siguiente:

Antígenos somáticos u "O": Se designan por números arábigos. Estos no pueden distinguirse de la fracción antigénica de la endotoxina y se encuentran ubicados en la pared celular, constituyendo parte del complejo lipopolisacárido. Son termoestables, resisten el calentamiento a 100 ó 121° C. Actualmente se reconocen al menos 175 grupos de antígenos O.

Antígenos capsulares o "K" : Son antígenos termolábiles que se designan con las letras L, B o A y con un número arábigo. Rodean a la célula como cápsula rudimentaria, a excepción del antígeno K88 en forma de pili o fimbria, este antígeno debe ser eliminado por calor cuando se trata de determinar el antígeno O. Existen 70 antígenos K reconocidos internacionalmente .

Antígenos Flagelares o "H" : Se designan con la letra H, seguido un número arábigo. Se reconocen internacionalmente 56 grupos (18, 19).

La denominación serotipo se reserva para la expresión de los tres grupos de antígenos presentes en una cepa; cuando no se reflejen los antígenos K y H se utiliza el término serogrupo (19).

Afortunadamente no se dan las 10^6 posibles combinaciones de todos estos antígenos, en un estudio de 14 000 aislamientos solo se identificaron 708 distintas

posibles combinaciones de los antígenos O/H y solo un número limitado de 162 serogrupos O de *E. coli* han estado implicados en algún brote (20, 21).

El desarrollo de métodos serológicos confiables, han permitido identificar un gran número de cepas de *E. coli*, sin embargo, la serotipificación no es un método rutinario en los laboratorios de diagnóstico. Algunos estudios en los que se ha realizado la serotipificación de *E. coli* aislada de aves muestran entre 12.62 y 39% de cepas no serotificables (19, 22, 23, 24).

La confirmación serológica es esencial para la identificación de *Salmonella* spp. y *Shigella* spp, y en algunos casos de cepas de *E. coli*, esta se realiza por la técnica de aglutinación en placa o tubo con sueros polivalentes o específicos de antígenos somáticos (O) de grupo (14, 15, 21).

Los serogrupos más comunmente identificados en pollos son: O1, O2, O8, O11, O22, y O78. Y estos son igualmente patógenos para aves jóvenes que para adultas (17, 19).

Se han descrito hasta el momento 5 grupos patógenos de *E.coli* productores de diarrea; enterotoxigénica (ETEC), enteroinvasiva (EIEC), enteropatógena (EPEC), enteroagregativa (EAEC), y enterohemorrágica (EHEC). Estas categorías están basadas en distintas propiedades de virulencia, diferentes interacciones con la mucosa intestinal y distintas combinaciones O:H. Sin embargo, algunas cepas poseen propiedades asociadas con más de un virotipo (3, 4, 12, 16, 18, 22)

3.2 *Escherichia coli* Enteropatógena (EPEC)

Dentro de las categorías de cepas productoras de diarrea las EPEC se han asociado a diarreas infantiles en países en desarrollo (26).

Las infecciones debidas a cepas EPEC, se caracterizan por producir grandes cambios en la ultraestructura de las células de la mucosa, en estos sitios las microvellosidades sufren vesiculaciones y en la superficie donde se encuentran adheridas las bacterias, las microvellosidades son destruidas, dicho efecto es conocido como adherencia y esfacelamiento (attaching-effacing) (A/E); este fenómeno puede apreciarse en biopsias de intestino de animales y humanos, y puede ser reproducido en cultivos celulares. La adherencia a las células epiteliales del intestino, es muy semejante al que producen las cepas enteroagregativas (EAEC), pero su patrón de adherencia es distinto (16).

Se han reportado tres probables estadios en el proceso de adherencia de EPEC. El primer estadio es una asociación no íntima entre la célula bacteriana y la célula de la mucosa intestinal; durante el segundo estadio, las bacterias se adhieren más firmemente a la célula y comienza la transducción de señales; en el tercer estadio, la bacteria se asocia a la célula epitelial de manera más cercana (contacto íntimo), en este momento hay un arreglo de la actina en la célula epitelial para provocar el efecto A/E (26).

La unión inicial (no íntima) parece ser mediada por haces de fimbrias (bundle-forming pilus o *bfp*), las cuales son muy similares a los que elabora *Vibrio cholerae*, pero es diferente del pili *bfp* de las ETEC, probablemente el *bfp* es responsable de que las cepas EPEC formen agregados durante su crecimiento, es decir, este pili actúa de manera más directa en la relación bacteria-bacteria que en la de bacteria-célula epitelial. Los genes que codifican para la subunidad *bfp* se localizan en el plásmido, llamado factor de adherencia *EPEC* o *EAF* (16).

Además de las cepas EPEC y EHEC, se han identificado una gran variedad de cepas de *E. coli* a partir de conejos, becerros, cerdos y perros que pueden producir el efecto A/E (16).

***Escherichia coli* Enterotoxigénica (ETEC)**

A este grupo pertenecen las cepas de *E. coli* que producen al menos uno de los dos grupos definidos de enterotoxina, ST (toxina termoestable) y LT (toxina termolabil). Estas cepas fueron reconocidas por primera vez como causantes de diarrea en lechones (26).

La enterotoxina ST, conserva su actividad tóxica después de la incubación a 100°C durante 30 minutos, mientras que la LT, pierde dicha actividad cuando se somete a las mismas condiciones (16).

Con lo que respecta a la LT, es una toxina relacionada tanto estructural como funcionalmente, con la enterotoxina producida por *Vibrio cholerae*. Existen dos variedades de LT, las cuales no presentan reacción cruzada: LTI y LTII; la primera de ellas, se ha encontrado en cepas aisladas a partir de animales y del hombre; mientras que la LTII, se ha encontrado principalmente en cepas aisladas a partir de animales y escasamente en las cepas de origen humano, además no se ha observado que induzca enfermedad; por lo que cuando se habla de LT generalmente es para referirse a LTI. Los genes que codifican para LT, residen en plásmidos que también pueden contener genes codificadores para ST y los Antígenos de Factor de Colonización o CFA's (26).

Existen dos tipos de ST que difieren tanto en estructura como en el mecanismo de acción. y pueden pertenecer a dos subgrupos: las solubles en metanol (STa), y las insolubles en metanol (STb). La STa (o STI) es producida por otras bacterias Gram (-) como *Yersinia enterocolica* o *Vibrio cholerae* no-O1, y es similar a la ST producida por las EAEC, mientras que la STb (o STII) solo ha sido encontrada en cepas ETEC y se asocia principalmente a cepas aisladas a partir de cerdos, aunque algunos aislamientos de origen humano, también la expresan. Los genes que codifican para ambos tipos de ST se encuentran predominantemente en plásmidos y algunos en transposones (26).

Las cepas ETEC, cuentan con factores de colonización para adherirse y colonizar la mucosa intestinal. Sin embargo, hay una gran variedad de antígenos fimbriales, por ejemplo K99 que son patógenos para becerros, corderos y cerdos, mientras que los organismos que expresan K88 solo son patógenos para los cerdos (16, 26).

En las cepas de origen humano, se han encontrado dos tipos de antígenos, el Pili tipo I y los llamados CFA's; sin embargo, se cree que estos últimos, son más importantes en la colonización, ya que el pili tipo I se ha encontrado comúnmente en cepas de la microflora residente y no se limita únicamente a las cepas virulentas, mientras que los CFA's se encuentran únicamente en las cepas productoras de diarrea. Los genes que codifican para estos antígenos, se encuentran en plásmidos que también codifican para ST (16, 26).

Recientemente, se ha encontrado un nuevo grupo de adhesinas del tipo *BFP*, las cuales debido a su longitud se les ha llamado "longus", y se han encontrado únicamente en un extremo de la célula bacteriana (16).

En humanos, las cepas ETEC se han asociado principalmente con diarreas infantiles en países en desarrollo, estas mismas en adultos son la principal causa de la diarrea del viajero; en este padecimiento se ha podido observar que entre el 20 y 40% de los casos, se han aislado cepas ETEC productoras de ST (26).

La primera prueba utilizada para el diagnóstico de las cepas ETEC fue la de asa ligada en conejo, además estos fueron los primeros microorganismos patógenos en los que se elaboró una sonda para la detección de genes que codificaran para LT y ST (16, 26).

***Escherichia coli* Enterohemorrágica (EHEC)**

Las cepas EHEC poseen el gen conocido como *eaeA* que se encuentra también en las cepas EPEC. Este gen codifica para la producción de una proteína llamada

intimina, la cual es la responsable de la unión de las bacterias a los cultivos celulares de mamíferos produciendo el mismo fenómeno A/E que se observa en cepas EPEC (16).

Las cepas EHEC producen una toxina que es virtualmente idéntica a la toxina de Shiga (SLT), la cual es parcialmente responsable de la diarrea hemorrágica y del síndrome urémico hemolítico asociado con cepas EHEC, aunque se piensa que existen otros factores que actúan en este tipo de diarrea (16, 26).

Konowalchuk *et al.* (1977) encontraron una sustancia tóxica para las células Vero; sin embargo, O'Brien (1983) menciona que la SLT y la verotoxina son la misma sustancia producida principalmente por cepas del serotipo O157:H7.

Una característica de las cepas EHEC considerada como un factor de diseminación, más que un factor de virulencia es que el serotipo O157:H7 coloniza fácilmente el tracto intestinal del ganado y otros animales domésticos, lo que eventualmente provoca la contaminación de la carne de consumo humano. Los genes que codifican para SLT se encuentra en un fago temperado (16).

***Escherichia coli* Enteroagregativa (EAEC)**

Nataro y Kaper (1998) mencionan que las observaciones de Cravioto *et al.*, en 1979, fueron de gran importancia para el descubrimiento de las cepas EAEC, las cuales se definen como cepas de *E. coli* que no secretan enterotoxinas LT o ST y que se adhieren a las células HEp-2 en un patrón de adherencia agregativa. Estas cepas se caracterizan por aumentar la secreción de moco por parte de las células de la mucosa y porque las bacterias quedan atrapadas en el capa formada por bacterias y moco en el intestino (16, 26).

Las cepas de este grupo son similares a las cepas ETEC por su unión a las células intestinales, sin invadirlas; además de que no ocasionan grandes cambios histológicos evidentes en las células a los cuales se adhieren. Sin embargo, se ha

observado que en algunos casos la lesión que caracteriza a este tipo de cepas es el acortamiento de las microvellosidades, además de necrosis hemorrágica de las puntas de las vellosidades (16, 26).

Se ha observado que las bacterias pertenecientes a este grupo, se encuentran rodeadas por una capa delgada de estructuras fibrilares, que pudieran ser pilis adhesivos, ya que son muy semejantes a los filamentos de adhesión encontrados en cepas de *Salmonella* spp. Nataro *et al.* (1994), identificaron una estructura fimbrial designada Fimbria de adherencia agregativa I (AAF/I), los genes que codifican para esta fimbria se encuentran en un plásmido. También se ha descrito un segundo tipo de fimbria llamado (AAF/II), el cual es distinto tanto morfológica como genéticamente a AAF/I. (16, 26).

El efecto tóxico observado en modelos animales, sugiere que las cepas EAEC producen algún tipo de enterotoxina. Eslava *et al.* (1993) identificaron una citotoxina que provoca una lesión destructiva en el asa del íleon de rata.

Los datos que se tienen de las cepas EAEC no permiten realizar una descripción completa de la patogénesis; sin embargo, Nataro y Kaper (1998) proponen tres fases: (i) involucra una adherencia inicial a la mucosa intestinal y/o a la capa de moco; se cree que en esta fase es donde actúan tanto AAF/I como AAF/II facilitando la colonización; (ii) existe un incremento en la producción de moco lo cual podría permitir a las cepas EAEC incrustarse en esta capa espesa; y (iii) debido a las evidencias histológicas y moleculares, se sugiere que en esta fase hay una elaboración de una citotoxina, la cual trae como consecuencia el daño a las células intestinales.

***Escherichia coli* Enteroinvasiva (EIEC)**

Las cepas EIEC están genética y bioquímicamente relacionadas a *Shigella* spp., ambas son lisina descarboxilasa negativas, no móviles, y lactosa negativas, además de

que ambas invaden las células epiteliales y elaboran una o más enterotoxinas, las cuales juegan un papel muy importante en la patogénesis de la (16, 26)

El modelo de patogénesis de *Shigella* spp. y de las cepas EIEC comprenden 5 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 (26).

Los genes necesarios para la invasividad, se encuentran localizados en un plásmido designado como *pInv*, que posee entre otros genes a los conocidos como *spa* y *mxi*, los cuales codifican a un aparato de secreción tipo III, el cual es requerido para la producción de algunas proteínas necesarias para una patogenicidad completa, conocidos como IpaA, IpaB, IpaC e IpaD (26).

Las proteínas Ipa (de IpaA hasta IpaD) son secretadas por la bacteria; de ellas, IpaB, IpaC e IpaD son efectores del fenotipo de invasión. IpaC promueve la captación de las bacterias por las células eucariotas. Se piensa que IpaB actúa en la lisis de la vacuola fagocítica; así como, en la inducción de apoptosis en los macrófagos. El gen IpaH codifica para la producción de un antígeno, sin embargo se desconoce el papel que juega este en la patogénesis (26).

A pesar de que el IpaC es altamente específico y de que hay una sola copia de este en los genes que codifican para la virulencia, se ha utilizado para la elaboración de sondas utilizadas en la hibridación *in situ*; dichas sondas hibridizan exclusivamente con los genes codificados en un gran plásmido relacionado con la virulencia y no se detecta en cepas que han perdido dicho plásmido. Con este fin, se ha desarrollado una sonda de oligonucleótidos para detectar el gen IpaH del que existen múltiples copias tanto en el plásmido relacionado con la invasividad como en el cromosoma de *Shigella* spp. y EIEC. Diversos estudios, han confirmado que el gen IpaH es un marcador más sensible, ya que solo se ha encontrado en cepas de *Shigella* spp y cepas EIEC, y no se ha encontrado en ninguna otra bacteria que no pertenezca a estos grupos (26, 32).

Toxina Citoletal Distensionante (CDT)

En 1987, Johnson y Lior usando una cepa de *E. coli* O128 aislada a partir de niños con diarrea, describieron un nuevo tipo de actividad en células de ovario de hámster chino (CHO), que consistía en la elongación de estas células a las 24 horas, seguido de un proceso de distensión y citotoxicidad a las 96 horas y la muerte a las 120 hrs.; al factor causante de esta actividad le llamaron toxina citoletal distensionante (CDT).

Scot y Kaper (1994) han clonado genes (*cdt*) que codifican para la toxina citoletal distensionante.

Se han realizado estudios con respecto a la actividad diarreogénica de las cepas productoras de CDT, y se ha observado que se aíslan más cepas con esta toxina en niños con diarrea que a partir de niños sanos, sin embargo esto no ha sido concluyente para aceptar el papel de estas cepas en problemas diarreicos, ya que las cepas aisladas a partir de estos niños, presentaban otras propiedades de virulencia (26)

Justificación

A pesar de que la Infección del Saco Vitelino tiene gran importancia económica, la información con la que se cuenta en relación a la etiología, es escasa.

E. coli es un habitante normal del intestino de diferentes especies animales y del hombre, así mismo, ciertos serotipos se asocian a diversos estados patológicos especialmente en animales recién nacidos. En muchos casos se ha demostrado el papel primario de ciertas cepas de *E. coli* como agentes etiológicos de enfermedad, pero en otros aún no existen evidencias convincentes de que pueda desempeñar un papel importante (19).

Aunque la serotipificación de la bacteria es difícil y no proporciona información etiológica definitiva, ha sido de gran importancia para identificar al pequeño número de cepas que pueden causar enfermedad (20, 21).

En relación a la identificación serológica de *E. coli*, se han realizado diversos estudios en diferentes países; sin embargo, en México se desconocen los serotipos predominantes (22, 23, 24, 35, 36).

Se ha observado que la patogenicidad varía no sólo entre los distintos serotipos, sino entre cepas del mismo serotipo. Por lo que se hace necesario recurrir a otros métodos, como la hibridación del ADN, por medio de la cual se pueden identificar los genes de virulencia que se han caracterizado para esta bacteria y determinar la patogenicidad de una cepa en particular.

En las cepas de *E. coli* que afectan al humano se han estudiado ampliamente los genes de virulencia; sin embargo, no se han realizado estudios de la presencia de estos genes en cepas aviares, el hacerlo, nos ayudaría a incrementar nuestro conocimiento acerca de este padecimiento, y de este modo crear nuevas herramientas para su prevención y control, lo que redundaría en importantes beneficios económicos.

Objetivo General

Conocer la participación de diversos serotipos de *E. coli* en la Infección del Saco Vitelino y determinar si las cepas aisladas, son portadoras de genes de virulencia con los cuales se podría explicar el proceso patológico.

Objetivos Particulares

Determinar las especies bacterianas presentes en nido y huevo incubable; así como en pollito a partir de saco vitelino e hígado durante la primera semana de vida.

Caracterizar bioquímica y serológicamente las cepas de *Escherichia coli* aisladas.

Determinar la presencia de genes de virulencia mediante la técnica de hibridación del ADN.

Hipótesis

E. coli, portadora de genes de virulencia y de serotipos diferentes a O1, O2 y O78, son agentes causales de la infección del saco vitelino.

MATERIAL Y MÉTODOS

La metodología que se utilizó para el manejo de las muestras y cepas obtenidas para la realización de este trabajo, se encuentra esquematizada en la Figura 1.

OBTENCIÓN DE LAS MUESTRAS

Granja de Reproductoras

La granja de reproductoras donde se llevó a cabo la primera toma de muestra, se encuentra localizada en el municipio de Dolores Hidalgo, Gto., ubicado entre las coordenadas $100^{\circ} 138.9'$ y $101^{\circ} 11.3'$ de longitud oeste y $21^{\circ} 21.3'$ y $20^{\circ} 50'$ de latitud norte y a una altura promedio sobre el nivel del mar de 1,980 metros (37). Se llevaron a cabo dos muestreos en un lote de reproductoras de la estirpe Hybro, las cuales contaban en el momento de la toma de las muestras con 38 y 39 semanas de edad, respectivamente.

Se recolectaron de manera aséptica aproximadamente 10 gramos de material de cama de nidos (aserrín) a partir de 60 nidos elegidos al azar; cada muestra fue colocada por separado dentro de bolsas de plástico estériles, las cuales fueron identificadas para su posterior procesamiento.

De igual forma, se recolectaron de la misma caseta 60 huevos puestos en nido, los cuales fueron seleccionados al azar y colocados asépticamente dentro de bolsas de plástico para posteriormente realizar el muestreo bacteriológico.

Con el fin de identificar en la planta incubadora los huevos del lote de reproductoras muestreado, se marcaron 100 huevos que se encontraban en el cuarto frío en la granja de reproductoras.

Planta Incubadora

La planta incubadora a la que se transportaron los huevos del lote de reproductoras muestreado, se localiza en la ciudad de Celaya, Gto., situada a los $100^{\circ} 48' 55''$ de longitud oeste del meridiano de Greenwich y $20^{\circ} 31' 24''$ de latitud norte, a una altura de 1,800 metros sobre el nivel del mar (37). Se realizaron dos muestreos de huevos para dar seguimiento y poder tomar muestras a partir de los mismos lotes de huevo que se trabajaron en la granja de reproductoras. Cada uno de estos muestreos consistió en 2 fases.

La primera, se realizó a los 19 días de incubación, momento en el cual se realiza el ovoscopiado y la transferencia del huevo de la incubadora a la máquina nacedora. Durante este período, fueron seleccionados 60 huevos clasificados como infértiles; los cuales fueron colocados de manera individual en bolsas de plástico estériles, para su posterior estudio bacteriológico.

La segunda se llevó a cabo a los 21 días de incubación (día del nacimiento). En el momento de la selección, se tomaron de manera aleatoria 60 huevos, cuyos pollitos picaron el cascarón pero murieron antes de eclosionar. Estos se colocaron al igual que los huevos muestreados anteriormente, en bolsas de plástico estériles e individualmente para poderlas transportar al laboratorio y realizar el muestreo bacteriológico.

Granja de Pollo de Engorda.

La granja de pollo de engorda a la cual fueron transportados los pollitos nacidos del lote de reproductoras seleccionado, se localiza en el municipio de Comonfort, Gto., ubicado a los $100^{\circ} 45' 51''$ de longitud oeste del meridiano de Greenwich y a los $20^{\circ} 43' 15''$ de latitud norte, y a una altura sobre el nivel del mar de 1,795 metros (37).

Durante la primera semana de vida del pollito, diariamente se evaluó la mortalidad. Cada ave muerta se colocó dentro de una bolsa de plástico, de manera

individual, para posteriormente en el laboratorio realizar la necropsia y obtener las muestras de hígado y saco vitelino para el estudio bacteriológico.

Todas las muestras tomadas en granja de reproductoras, planta incubadora y pollo de engorda, fueron mantenidas en refrigeración durante su transporte (aproximadamente 60 min.) hasta el laboratorio de diagnóstico de la misma empresa ubicado en la ciudad de Celaya Gto., para realizar el aislamiento bacteriano, a partir de las diferentes muestras tomadas en cada uno de los sitios visitados.

AISLAMIENTO MICROBIANO

Aserrín de Nidos

A partir de cada muestra, se pesó 1 gramo de aserrín, el cual fue macerado y colocado en solución amortiguadora de fosfatos (PBS) estéril, a partir de ésta, se inocularon, estriando hasta agotamiento cajas de Petri que contenían McC y Agar de Soya Trypticaseína (TSA), ambos de DIFCO Laboratories, Detroit MI 48232-7058 USA.

Huevos

Los huevos obtenidos en granja de reproductoras y planta incubadora, fueron trabajados de manera similar. Para realizar el muestreo externo, los huevos fueron lavados en 10 ml de PBS durante 3 minutos; a partir de esta solución, se sembró 1 ml en los medios de cultivo bacteriológico ya descritos (McC y TSA).

Para realizar el muestreo interno en los huevos procedentes de la granja de reproductores y de la incubadora a los 19 días, se retiró el exceso de agua del cascarón con una toalla de papel, posteriormente se limpió con alcohol al 70% y se abrió con unas tijeras estériles, se tomó parte del contenido con un asa y se sembró en los medios McC y TSA.

En el caso de las muestras obtenidas el día 21, el muestreo externo, se llevó a cabo de la misma manera que en los huevos del día 19. Sin embargo, para el muestreo interno, se extrajo al embrión del cascarón, se realizó la necropsia y se tomó una muestra del saco vitelino, la cual fue inoculada en cajas de Petri con McC y TSA.

Mortalidad

A las aves que murieron durante la primera semana en la granja de pollo de engorda, se les realizó la necropsia y se obtuvieron muestras de hígado y saco vitelino, las cuales fueron sembradas en los medios ya mencionados.

Todas las muestras fueron incubadas durante 24 horas a 37.5°C en una estufa bacteriológica. De cada una de las muestras, se identificaron las diferentes colonias bacterianas, para posteriormente ser resembradas en los medios McC y TSA, con el fin de obtener cultivos puros para su posterior identificación.

IDENTIFICACIÓN BACTERIANA

Identificación General

La identificación de cada uno de los aislamientos, se llevó a cabo en el laboratorio de Bacteriología del Departamento de Producción Animal: Aves de la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia de la UNAM. Se realizó el aislamiento en cultivo puro para su posterior identificación, mediante pruebas bioquímicas tales como Agar de Hierro Tres Azúcares (TSI), Citrato, Urea, Agar de Hierro y Lisina (LIA) y la Prueba de SIM donde se evalúa la producción de ácido sulfhídrico (H₂S), indol y movilidad. En algunos casos, cuando no se lograba la identificación bacteriana con estas pruebas, se procedía a la utilización de pruebas adicionales como catalasa, coagulasa, fermentación de carbohidratos, prueba de oxidación/fermentación (O/F) dependiendo del microorganismo en cuestión.

Identificación de *Escherichia coli*

Las 267 cepas aisladas e identificadas como *E. coli* fueron remitidas al Laboratorio de Bacteriología del Departamento de Salud Pública de la Facultad de Medicina de la UNAM, donde se realizaron nuevamente las pruebas bioquímicas para corroborar la identificación realizada previamente.

Para realizar dicha caracterización, las cepas de *E. coli* se sembraron previamente en placas de agar sangre, agar MacConkey con lactosa y agar MacConkey con sorbitol, con el fin de establecer la pureza de las mismas, después de lo cual, se incubaron a 37°C por 24 horas. De estas cepas, se seleccionó una colonia característica del cultivo para sembrarlas en un tubo con agar casoy, el cual fue incubado bajo las mismas condiciones. Este tubo sirvió para mantener el cultivo y realizar las resiembras posteriores para la caracterización serológica y molecular de las cepas.

Del cultivo en agar casoy se sembró en agua peptonada al 1%, pH 7.2 y se incubó a 37°C durante 24 horas. Transcurrida la incubación, se tomaron alícuotas para inocular cada uno de los sustratos de las pruebas bioquímicas. Las lecturas de las pruebas bioquímicas se realizaron a diferentes tiempos (desde lecturas inmediatas hasta a los 7 días, revisando diariamente si existía algún cambio) dependiendo del sustrato; así mismo, se utilizaron los reactivos necesarios, según las especificaciones particulares de cada prueba.

Las pruebas bioquímicas utilizadas fueron: producción de H₂S, ornitina, arginina y lisina descarboxilasas, fenilalanina desaminasa, urea, fermentación de glucosa, lactosa, sorbitol y celobiosa, ONPG (o-nitrofenil-β-D-galactopiranosido), rojo de metilo y voges-proskauer (RM-VP), citrato de Simmons, malonato, gluconato, movilidad e indol.

Identificación Serológica

La serotipificación de las cepas de *E. coli* se realizó siguiendo el procedimiento empleado en el Laboratorio de Bacteriología del departamento de Salud Pública, de la Facultad de Medicina de la UNAM de acuerdo con Orskov y Orskov (1984), mediante la utilización de sueros específicos (SERUNAM) que fueron obtenidos de conejo Nueva Zelanda blanco.

Las reacciones de aglutinación fueron efectuadas en microplacas de 96 pozos de fondo redondo. Se analizó el antígeno somático de cada cepa, empleando una batería con 173 sueros monovalentes obtenidos de los antígenos somáticos conocidos, además de 47 para diferentes especies de *Shigella*, más tres obtenidos a partir de cepas aisladas en el propio laboratorio (090457, 074324/0 y 049766). En el caso de los antígenos flagelares, se utilizaron 56 sueros específicos correspondientes a los antígenos flagelares conocidos, en este caso, los sueros se encontraban diluidos 1:100.

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

Una vez obtenido el antígeno, se prepararon las microplacas colocando en cada pozo 100 µl del suero monovalente con un dispensador Quick Spense Controller Mod. QSIIe y Reservoir Model 96-200 DYNATECH LABORATORIES. Una vez listas las microplacas, se procedió a colocar 50 µl del antígeno somático preparado con antelación. Las placas fueron envueltas con un papel adherente para evitar la evaporación durante la incubación que se realizó a 50°C durante 24 horas, y se procedió

a realizar la interpretación de los resultados. Se consideró como positivo cuando se presentaba una reacción de aglutinación, observada con la ayuda de un aglutinoscopio. Siguiendo este mismo procedimiento, se identificaron los sueros que reconocían el antígeno bacteriano y se hicieron diluciones de estos desde 1:100 hasta 1:12800, para determinar el serogrupo al que pertenecían. Cuando se presentaban reacciones cruzadas, el antígeno se enfrentó con sueros absorbidos y diluidos 1:50. El serogrupo se definió, al determinar el mayor grado de aglutinación con la mayor dilución del suero y comparando esta aglutinación con la que se presenta con el antígeno homólogo. Se considerará como aglutinación negativa, las que presenten un botón de antígeno en el fondo del pozo.

Antígeno Flagelar. Para la determinación del antígeno flagelar H, se sembraron tubos de 16 x 150 mm con tapón de rosca conteniendo un medio semisólido con pH 6.9 que en su interior tenía un tubo de Craigie, con el fin de evaluar la movilidad. Estos tubos fueron incubados a 30°C durante varios días (15 o más), hasta observar el enturbiamiento del medio de cultivo. Cuando el cultivo bacteriano es móvil, se observa un crecimiento no sólo dentro del tubo, sino también en el exterior de este. De esta parte, se tomó una muestra del cultivo con una asa bacteriológica estéril, para sembrarlo en 10 ml de caldo peptona de biotriptasa al 2% (pH 7.2), el cual fue incubado a 30°C por 24 horas, finalmente se inactivó el cultivo con SSF formalinizada al 0.6%. En el caso de los tubos donde no se observó turbidez, se consideró a las cepas como no móviles.

Para la determinación del antígeno flagelar, se siguió el mismo procedimiento descrito anteriormente para el antígeno somático, con una variante: el tiempo de incubación que fue de 2 horas a 50°C.

DETERMINACIÓN DE GENES DE VIRULENCIA

Esta se realizó utilizando la técnica de hibridación de ADN en colonia, reportada previamente por Hill y Payne en 1984. Para lo cual se emplearon nueve sondas (STH, eae1, AGG1, AGG2, SLT, IPA, BFP, LTH y Cdt) que contienen secuencias de ADN,

provenientes de genes que codifican para diferentes factores de virulencia y reportados para distintas cepas patogénicas de *E. coli*. Todas las sondas usadas fueron oligonucleótidos sintéticos (GIBCO BRL Custom Primers) adquiridas de la compañía LIFE TECHNOLOGIES.

El procedimiento consistió en cuatro pasos básicos:

A) Crecimiento de las cepas y lisis de las células en un filtro: En 1 ml de caldo infusión cerebro corazón (BHI), se sembraron las 267 cepas puras de *E. coli*, además de algunas cepas como testigos positivos y negativos, las cuales pueden observarse en el Cuadro 1.

Todas las cepas de *E. coli* fueron incubadas durante 18 a 24 horas a 37°C con agitación. A partir de estos cultivos, se inocularon por picadura con asa recta, cajas de Petri con agar MacConkey. Se colocaron 25 colonias por caja y tres cepas testigo, estas cajas fueron incubadas a 37°C por 18 a 24 horas. Una vez transcurrida la incubación, fueron colocadas sobre filtros Whatman No. 541, previamente esterilizados y marcados para su futura identificación. Se ejerció una ligera presión sobre los filtros, con el objeto de que las colonias fueran transferidas del agar hacia el filtro, evitando la formación de burbujas de aire. Después de 5 a 10 minutos, los filtros de las cajas fueron retirados y colocados sobre papeles filtro (Whatman No. 3) previamente acomodados en cajas de Petri que contenían de 5 a 10 ml de buffer de lisis A, cuidando que las colonias quedaran en contacto directo con la solución durante 10 minutos para posteriormente colocar estas cajas sobre un baño María de agua hirviendo por 15 minutos. Los filtros con las colonias lisadas fueron transferidas a otra caja de Petri que contenía papel filtro Whatman No. 3 humedecido con el buffer de lisis B, teniendo cuidado de que los filtros con las colonias, estuvieran horizontales para evitar que las colonias lisadas se corrieran, donde permanecieron de 10 a 15 minutos, después de lo cual se retiraron y secaron al aire para usarlos posteriormente en el proceso de hibridación.

B) Marcaje de la Sonda con radiactividad: El procedimiento empleado para marcar las sondas es conocido como end-labeling (United States Biochemical Corporation, Tested User Friendly T4 Polynucleotide Kinase 5' End Labeling Protocol), y consiste en rehidratar los oligonucleótidos sintéticos a 5-10 unidades A_{260} (entre 150-350 $\mu\text{g/ml}$) para tener una solución stock. Una unidad A_{260} equivale a 33 $\mu\text{g/ml}$ de ADN de cadena sencilla. Si la sonda sintética tiene 22 bases de longitud, su peso molecular es de 7260 (22 X 330 daltones/base). Para esta, se prepararon soluciones de 10 pmoles/ μl (72.6 $\mu\text{g/ml}$ para sondas de 22 bases). Para marcar la sonda, fue preparada en un tubo Ependorff la siguiente mezcla de reacción: 5 μl de la sonda, 5 μl de buffer de cinasa, 50 μl de agua, 3 μl de ^{32}P ATP y 2 μl de cinasa polinucleótido T4. La cual fue centrifugada por 2-3 seg e incubó a 37°C por 30 minutos. Para detener la reacción se incubó durante 5 min a 65°C, añadiendo 5 μl de EDTA 0.5 M pH 8. Seguidamente se procedió a agregar 4.5 ml de acetato de amonio 4 M antes de cargar la mezcla sobre columnas NACS PREPAC utilizadas para retirar el ^{32}P ATP no incorporado. Para tal fin, la columna fue equilibrada mediante la saturación de la matriz con acetato de amonio 0.25 M por una hora, antes de cargar la mezcla de reacción a la columna, despues de lo cual fue lavada con 4 ml de la solución de acetato de amonio 0.25 M para que saliera todo el ^{32}P no incorporado. Se eluyó el ADN unido a la columna usando 200 μl de acetato de amonio 4 M, y fueron colectados 3 fracciones de 200 μl cada una y se colocaron 2 μl del eluido sobre un papel filtro, se dejó secar, y fue colocado en un vial, adicionando 5 ml de líquido de centelleo para contar la radiactividad. Se calculó la cantidad total de radiactividad recuperada. Si la actividad específica del ATP es de 3000 a 7000 Ci/mmol, generalmente la obtenida en una sonda es de $1-2 \times 10^8$ cpm/ μg . Las fracciones marcadas fueron almacenadas a -20°C hasta su uso.

C) Hibridación del ADN: Para realizar la hibridación fue preparada la siguiente mezcla: agua 115.6 ml, 20X SSC 60 ml, solución Denhardt's 50X 20 ml, EDTA 0.5 M, pH 8 0.4 ml y ADN hervido de esperma de salmón 4 ml. Se añadió 5-10 ml de esta mezcla en cajas de Petri desechables que contenían los filtros con las colonias lisadas y fue

calculado el volumen requerido de la sonda para tener 1×10^6 cpm. La mezcla con los filtros se agitaron suavemente e incubaron a 41°C toda la noche.

Después de la incubación la mezcla de hibridación fue removida y los filtros lavados durante 5-10 segundos con una solución 6X SSC (previamente incubada a 54°C). Para retirar la sonda que no se unió específicamente en las colonias lisadas, el líquido fue desechado y se volvieron a incubar las cajas con 10 ml de la misma solución a 54°C por una hora. Nuevamente fueron enjuagados con una solución 2X SSC por 5-10 segundos y secados a temperatura ambiente.

D) Detección de las colonias positivas por autorradiografía: La autorradiografía se llevó a cabo colocando los filtros en un chasis, donde previamente se había colocado un Film X-ray Kodak XAR-2 en 8 X 10 in. con pantalla intensificadora Kodak regular o Dupont Cromex, e incubaron a -70°C por 48 horas. Después de ese tiempo, se reveló la película con X-ray film revelador (Kodak) y se fijo utilizando un fijador (X-ray film Kodak) en cuarto oscuro.

E) Interpretación de los Resultados: Las colonias que tuvieron el gen que la sonda reconoce específicamente aparecieron como manchas oscuras en la película.

RESULTADOS

AISLAMIENTO DE MICROORGANISMOS

En el Cuadro 2, se muestra la frecuencia de aislamiento, los géneros y especies de microorganismos de las muestras colectadas en granja de reproductoras, incubadoras y granja de pollo de engorda. Se aislaron 588 cepas de diferentes géneros bacterianos, entre estos los que predominaron fueron *Enterobacter aerogenes* y *Escherichia coli*.

En la granja de reproductoras a partir de las muestras de aserrín del nido se aislaron 22 cepas que representaron el 3.74% del total de los aislamientos, de estos, la mayoría se identificaron como *Staph. aureus* (77%). Por otro lado la frecuencia de aislamiento en huevo de nido fue de solo 8 cepas (1.36% del total obtenido), cuatro de estos microorganismos fueron identificados como *E. coli* (50%).

La colecta de muestras a los 19 días, al momento de la transferencia del huevo hacia la nacedora, condujo al aislamiento de 58 cepas (9.86% del total). En esta fase del estudio además del incremento en el número de aislamientos, mostró mayor diversidad de géneros, sin embargo, la mayoría de estos fueron *E. coli* con un total de 28 aislamientos (48%) y *Staph. aureus* con 12 (21%).

En el día 21 (al nacimiento), el número de aislamientos se incrementó a 105 (17.86%). Al igual que en el muestreo de 19 días, se observó que el principal microorganismo identificado era *E. coli* con 47 aislamientos, seguido por *Staph. aureus* con 20. En esta etapa se observó además un incremento en la frecuencia de identificación de *Streptococcus* sp. (16 cepas), así como, el aislamiento de levaduras (14 cepas) las cuales no pudieron ser identificadas.

Un total de 395 (67%) bacterias fueron aisladas del pollo de engorda, de estas se identificaron 188 cepas de *E. coli*, 97 de *Enterobacter aerogenes* y 56 de *Klebsiella pneumoniae*.

FRECUENCIA DE AISLAMIENTOS DE *Escherichia coli*

En el Cuadro 3, se presentan los resultados referentes al aislamiento de *E. coli* a partir de diferentes muestras, en este se puede apreciar que se identificaron 267 cepas, de estas, 4 se aislaron en la granja de reproductoras (1.5%), 2 del muestreo interno y 2 la superficie del cascarón. En la planta incubadora a los 19 días se aislaron 28 cepas (10.48%), de estas, 16 se obtuvieron a partir del muestreo interno y 12 del externo.

Del pollo de engorda se aislaron la mayor parte de las cepas de *E. coli* (188) representando el 70.41% del total de cepas aisladas en el trabajo. De estas, 102 se aislaron de hígado y 86 del saco vitelino.

La Figura 2, muestra la distribución de la mortalidad durante la primera semana, así como el porcentaje de aislamientos de *E. coli*. Como se puede observar la mortalidad y la frecuencia de aislamiento se van incrementando con el tiempo. La máxima mortalidad¹ (25%) se alcanzó al 5º día, siendo ese mismo día donde se registro el mayor porcentaje de aislamientos de *E. coli* (37%), para posteriormente comenzar el descenso.

TIPIFICACIÓN SEROLÓGICA DE *Escherichia coli*

La serotipificación permitió establecer con mayor especificidad la identidad de las cepas de *E. coli* aisladas.

¹ Este porcentaje fue obtenido tomando como el 100% la cantidad de aves muertas durante la primera semana.

En el Cuadro 4, se presenta la relación entre los serogrupos identificados y el lugar de aislamiento de las cepas de *E. coli*; como se puede observar, algunos serotipos se presentaron tanto en la granja de reproductoras como en el pollo de engorda, pero no en la incubadora. Sin embargo, en otros casos como fue con las cepas O125, estas se presentaron solo en nido e incubadoras a los 19 días.

Es importante señalar que muchos de los serogrupos encontrados en incubadora a los 19 días (O², O69, O70, O122, O125, O153, O167 y O168), no se aislaron a los 21 días, y viceversa, serogrupos que se aislaron a los 21 días no se identificaron a los 19 (O8, 19, O41, O85, O118, O120 y O149).

Por otro lado, serogrupos como O4, O12, O15, O21, O22, O23, O44, O53, O73, O77, O78, O81, O83, O84, O91, O118, O124, O132 y O155 se presentaron únicamente en los pollos de engorda, observándose en algunos casos solo una sola cepa de cada serogrupo (O4, O23 O77, O124 y O132).

El Cuadro 5, muestra el número y porcentaje de serogrupos identificados, se observa que el más frecuente fue O19 (12%), seguido por las cepas rugosas (OR) con el 10.86% del total. Las cepas pertenecientes al serogrupo O84 fueron aisladas en el 8.99% de los casos, mientras que el 6.37% correspondió a cepas del serogrupo O8.

La identificación de antígenos flagelares de las cepas de *E. coli* también mostró una gran variedad antigénica; sin embargo, un porcentaje importante de las cepas fueron no móviles. Los serotipos más comunes en esta categoría se presentan en el Cuadro 6, donde se puede apreciar que un total de 82 cepas que no fueron móviles, siendo el serotipo más común en estos el O19 NM, seguido por OR NM.

² Cepas que no aglutinaron con ningún suero.

DETECCIÓN DE GENES DE VIRULENCIA

Los resultados correspondientes al origen del aislamiento y la presencia de genes de virulencia de las cepas de *E. coli*, se muestran en el Cuadro 7. Como se puede observar, 41% (110 / 267) de las cepas presentaron genes de virulencia, siendo el gen *IPAH* el más común (46%). Otro gen encontrado con relativa frecuencia fue el de *eae* (15 cepas). En catorce de las cepas aisladas, se encontró la presencia de genes *IPAH* y *eae* juntos, este grupo de cepas fue el tercero en frecuencia, en cuarto lugar se encontraron las cepas con el gen *Cdt*; mientras que en nueve cepas se encontraron los tres tipos de genes (*IPAH-Cdt-eae*).

Las cepas que hibridaron con el gen *IPAH*, fueron aisladas desde la granja de reproductoras, y fue a partir del día 19 en la incubadora que se observó un incremento en el número de cepas que presentaban otros genes.

La relación del aislamiento y la presencia de genes de virulencia en cepas de *E. coli* en la incubadora, se presentan en la Figura 3; en esta, se aprecia que la mayor cantidad de aislamientos se observó el día 21, sin embargo la mayor cantidad de cepas que tenían algún gen de virulencia se aislaron el día 19. Las cepas obtenidas en este día, presentaron los genes *IPAH*, *Cdt*, *eae*, *IPAH-Cdt* e *IPAH-eae*. Por otro lado, en el día 21 se encontraron con mayor frecuencia cepas con el gen *Cdt*, seguido por las que portaban *IPAH*.

En la Figura 4, se muestra la relación entre el porcentaje de mortalidad durante la primera semana y el aislamiento de cepas de *E. coli* con diferentes genes de virulencia en el pollo de engorda. Los mayores porcentajes de mortalidad se presentaron en los días 3 (21.30%) y 5 (25%), coincidiendo con el mayor número de aislamientos de cepas que presentaban genes de virulencia.

Por otro lado en la misma Figura 4 se puede observar que 6% de las cepas que tuvieron algún gen, presentaron los genes *IPAH-Cdt* las cuales se aislaron únicamente el día tres, una situación similar ocurrió con las cepas que codificaban para los genes *IPAH-Cdt-eae* (11%).

Las cepas que presentaron los genes *Cdt-eae* (2.35%) se aislaron el cuarto día. En el día cinco, como se mencionó anteriormente, se presentó la mayor mortalidad, observándose también el mayor aislamiento de cepas con genes *IPAH* (20.00%), *eae* (14.12%), y la combinación *IPAH-eae* (11.76%).

En ninguna de las cepas encontradas en este estudio, se detectaron los genes *STH*, *AGG1*, *AGG2*, *SLT*, *BFP* y *LTH*.

DISCUSIÓN

La ISV es una enfermedad importante, no solo por la mortalidad que provoca durante la primera semana de vida, sino también por la pobre ganancia de peso y la baja calidad de la canal de las aves que sobreviven a un brote de esta enfermedad (25).

La contaminación en la granja de reproductoras a partir de la cama, representó el 3.74% del total de aislamientos, sin embargo, en este sitio no se encontró *E. coli*, principal agente causante de ISV. Por otro lado, en los huevos tomados de nido solo se aislaron 4 cepas de *E. coli*, estos hallazgos sugieren, que la contaminación del huevo ocurre en una etapa posterior, probablemente durante el transporte o bien en la incubadora. Estos datos son contrarios a los expuestos por Gordon y Jordan (1985), Mosqueda y Lucio (1985) y Rojo (1987), quienes mencionan que la infección del saco vitelino se debe principalmente a la contaminación del huevo fértil en la granja de reproductoras, y que dentro de estas instalaciones el principal lugar en el que ocurre la contaminación, es el nido. Los datos obtenidos en nuestro trabajo pueden ser apoyados por el estudio realizado por Reid (7) en el que sumergía huevos fértiles en una suspensión de bacterias, para después incubarlos, dicho autor observó que la mortalidad se presentaba desde la incubadora y durante los primeros 9 días de vida del pollito, pero que el efecto era más pronunciado cuando los huevos se sumergían el día 18 de incubación que cuando se hacía al primer día.

Hungerford (1969), menciona que la ISV mostró un incremento después de 1930 cuando comenzaron a utilizarse las incubadoras comerciales, lo que apoya en cierta forma la teoría de la contaminación del huevo fértil en una etapa posterior a la granja de reproductoras. Sin embargo, el mismo autor señala que algunos estudios realizados por Harry mostraban que la contaminación del huevo ocurría antes de llegar a la incubadora. Nuestras observaciones, concuerdan con lo propuesto por Hungerford (8), ya que el mayor número de aislamientos se obtuvo en incubación y en la granja de pollo de engorda.

En lo referente a la causa de ISV, diferentes autores mencionan que la principal bacteria responsable de esta, es *E. coli*; sin embargo se han descrito distintos porcentajes de aislamiento de la bacteria, Hungerford en 1969 señala que en el 82% de las aves que morían y mostraban algún cambio en el saco vitelino, se podía aislar *E. coli*. Sotelo (1993), menciona que *E. coli* se ha aislado en el 45% de los casos de mortalidad temprana y del 70% de las aves con infección del saco vitelino, Coutts (1981), menciona que la ISV representa entre el 30 y 50% de la mortalidad durante la primera semana. En el presente estudio se observó que de las 216 aves muestreadas se lograron aislar 188 cepas de *E. coli*, lo que representó el 87%, porcentaje aunque ligeramente superior, concuerda con lo observado por otros autores.

Coutts (1981) y Mosqueda y Lucio (1985), indican que la mortalidad por ISV puede presentarse desde la incubadora, lo que va a aumentar el número de los llamados "muertos en cascarón" (aves que mueren antes de poder eclosionar), esta situación pudo observarse en este trabajo, donde los aislamientos a partir de este tipo de aves representó el 17.86% de las cuales casi el 50% correspondieron a *E. coli*.

Sin embargo, Sotelo (1993), también menciona que la presencia de coliformes en los embriones y los pollitos esta relacionada directamente con la concentración de bacterias en la caseta, en este estudio, sin embargo, se pudo apreciar que la presencia de coliformes tanto en nido como en huevo de nido fue muy baja, incluso nula en el caso de los nidos, y la presencia de estas bacterias fue muy elevada tanto en la incubadora como en los pollitos.

En este estudio se lograron aislar bacterias como: *Aeromonas salmonicida*, *Alcaligenes faecalis*, *Chromobacterium* sp., *Citrobacter freundii*, *Klebsiella pneumoniae* y *K. oxytoca*, *Providencia retgerii*, *Pseudomonas fluorescens*, que no se habían reportado como causantes de la ISV; sin embargo, el hecho de su aislamiento de saco vitelino o de hígado no es definitivo para considerarlas como agentes causales de la ISV, ni de la muerte del ave, ya que en la mayoría de los casos se aisló más de un microorganismo.

En contraste, bacterias del género *Proteus*, que han sido reportadas como causantes de la ISV, solo se aislaron de huevos a los 19 días de incubación (4, 6, 8, 40).

Se ha publicado que cuando los huevos son desinfectados con un método húmedo, aunque se reduce el nivel de recuperación bacteriana del cascarón, se puede encontrar una población de *Staphylococcus* sp. y *Streptococcus* sp. en este sitio. Lo anterior contrasta con lo observado en el presente estudio, ya que aún en los huevos de nido no desinfectados, la contaminación fue muy baja, no obstante que la mayor parte de la contaminación en el material de cama de los nidos se debió a los géneros bacterianos referidos anteriormente (42).

En este estudio se pudo apreciar que *K. pneumoniae* sólo se aisló de pollos de engorda, aunque no se demostró que estos tuvieran algún papel en la ISV. Abd-El-Motelib *et al.* (1993), mencionan que los aislamientos de *K. pneumoniae*, a partir de pollitos muertos son patógenos; lo anterior contrasta con los resultados obtenidos por Ashgan en su tesis doctoral quien encontró que los aislamientos de *K. pneumoniae* no fueron patógenos para las aves.

Mosqueda y Lucio (1985), señalan que la curva de mortalidad de la ISV dura de 7 a 10 días y que alcanza su máximo entre el 4º y 5º día, disminuyendo en los siguientes 3 a 5 días. Lo anterior coincide con lo encontrado por Keirs (1987), quien menciona que en un experimento realizado para revisar los patrones de mortalidad en las granjas con mortalidades promedio o con un 10% arriba del promedio, mostraban un incremento en la mortalidad el día 5 y posteriormente había un descenso hasta llegar a la normalidad el día 10. En este trabajo se encontró que el patrón de mortalidad coincide con lo expuesto por ambos autores, ya que se observó que la mayor mortalidad se presentó entre el día 3 y 5 de edad y comenzó a descender hacia el séptimo día.

El-Sukhon (1989), serotipificó el 89.6% de las cepas de *E. coli* que aisló, en el presente estudio se pudo determinar el serotipo del 85.3% de las *E. coli* aisladas, las cepas que no pudieron ser tipificadas se clasificaron como OR o bien como O?. Sin

embargo, en otros estudios el porcentaje de cepas no tipificables va del 33.5% (45), hasta el 39%, por otro lado, Allan *et al.* (1993), mencionan que un gran porcentaje de cepas no tipificables es una característica de los aislamientos de *E. coli* en las aves.

Phukan *et al.* (1990), encontraron que el 22.33% de las cepas aisladas eran rugosas, lo que coincide con lo obtenido en este estudio, donde después del serogrupo O19, las cepas rugosas fueron las que se identificaron con mayor frecuencia.

Whiteman *et al.* (1983) y White *et al.* (1993), reportan que los serotipos aislados con mayor frecuencia como causa de enfermedad en aves son O1, O2 y O78, sin embargo en este trabajo no se logró el aislamiento de cepas pertenecientes al serogrupo O1, posiblemente esto se deba a que la mayoría de los estudios de serotipificación se han realizado en cepas aisladas a partir de aves con infecciones respiratorias y no de aves con ISV. Sojka (1965), menciona que los serotipos más comunes aislados en casos de Enfermedad Respiratoria Crónica y pericarditis eran O1, O2 y O78. Aunque Cloud *et al.* (1985), realizaron aislamientos de *E. coli* a partir de articulaciones, piel, corazón, pulmones sacos aéreos, bazo, senos nasales, sangre e hisopos de saco vitelino, encontraron solo 2 cepas del serogrupo O1.

La presencia de ciertos serotipos depende del área de aislamiento, país o período de aislamiento (23, 24), esta puede ser la razón de que los serotipos más comunes encontrados en este trabajo, no coinciden con los reportados por estos autores, como, Takahashi y Miura (1968), quienes mencionan que Mikami realizó un trabajo en la región de Hokkaido Japón, donde los serogrupos más aislados fueron O60, O53 y O1, sin embargo, en esta misma región ellos encontraron que los serotipos predominantes fueron O1, O2, O8 y O78.

Existen pocos reportes en los que se haya encontrado que cepas de *E. coli* causantes de alguna enfermedad en aves no pertenezcan a los serotipos O1, O2 y O78, entre ellos, Gross (1964), encontró que una cepa causante de ISV pertenecía al serogrupo O103 y por lo tanto la utilizó en un trabajo posterior para inocular huevos.

En el presente estudio se encontró que el 30.71% de las cepas de *E. coli* fueron no móviles, lo que representa un alto porcentaje, este hallazgo coincide con Cloud *et al* (1985), quienes al caracterizar cepas de *E. coli* encontraron que el 41.6% de estas no presentaban antígeno flagelar.

White *et al.* (1983), demostraron que existe una divergencia en el perfil electroforético de proteínas de membrana externa en los serotipos O2 y O78, es decir existen cepas clasificadas como serogrupo O2 más relacionadas genéticamente a cepas O78 que con otras del mismo serogrupo, y viceversa, esto puede explicar en cierta medida la gran cantidad de cepas clasificadas como OR, las cuales durante este estudio aglutinaban con diversos sueros entre ellos O2 y O78. Incluso, se menciona que cuando la identificación se basa únicamente en la clasificación serológica, es muy probable que dentro de un mismo serotipo exista una gran diversidad de genotipos, cromosomales (47).

Se ha mencionado que las bacterias causantes de ISV, son en su gran mayoría, bacterias ambientales o habitantes normales del tracto gastrointestinal de las aves (4, 8) y que la mayoría de los serotipos son potencialmente patógenos para aves jóvenes y adultas (24). Sin embargo, Edwards y Ewing (1954), mencionan que el serotipo más aislado a partir de órganos internos fue O2 H5 y reporta que dicho serotipo no fue encontrado en tracto gastrointestinal de animales, humanos con diarrea o utensilios de cocina; estos datos coinciden con lo encontrado en este trabajo, en el que a pesar de haberse observado que no todas las bacterias poseían genes de virulencia, una gran parte de ellas y principalmente la mayoría de las cepas aisladas durante los días de mayor mortalidad, contenían al menos un gen de virulencia.

A diferencia de lo expuesto por White *et al.* (1983), quienes mencionan que fuera de los serotipos comúnmente relacionados con enfermedades aviares, tales como O1, O2 y O78, se desconoce si existen otros serogrupos patógenos u oportunistas en las aves. En este trabajo los serotipos que poseían la mayor cantidad de genes de virulencia, no pertenecían a los serogrupos O2 y O78.

Phukan *et al.* (1993), mencionan que la patogenicidad varía entre los diferentes serotipos y frecuentemente entre cepas del mismo serotipo, lo cual pudo observarse en este estudio en el cual algunas cepas poseían genes de virulencia, mientras que en otras del mismo serotipo no se encontraron, lo anterior probablemente está relacionado con el origen plasmídico y fágico de estos genes de virulencia (26).

Es importante mencionar, que para asegurar que las cepas de *E. coli* aisladas no presentan ningún gen de virulencia se necesita un estudio más amplio, ya que existen una gran cantidad de factores que se ha observado que confieren virulencia en las cepas aviares.

El-Sukhon (1989), menciona que el 7.4% de las cepas que aisló producían un efecto enterotóxico en ratones, sin embargo, de las cepas que se aislaron en este trabajo, ninguna presentaba genes para *ST* o *LT*, es decir, las toxinas de las cepas ETEC. Lo cual puede ser explicado por los resultados obtenidos por Emery *et al.* (1992), quienes encontraron que un porcentaje muy bajo (7.5%) de cepas de *E. coli* aisladas de aves producían *LT*.

Carter y Cole (1990), indican que la invasividad es un mecanismo de patogenicidad poco común, sin embargo, en las cepas aisladas en este trabajo el gen predominante fue el *IPAH*, el cual estuvo presente en 80 cepas ya sea como único gen o bien junto con otros, lo que representa el 29.9% del total de cepas de *E. coli* aisladas.

En lo que respecta a las cepas con gen *eae*, Bratoeva *et al.* (1994), encontraron que existen pocas cepas clásicas EPEC que conservan el gen *eae* y que pierden el plásmido EAF, pero que aún así provocan la agregación de actina.

CONCLUSIONES

Los resultados de este trabajo sugieren que la contaminación bacteriana causante de la infección del saco vitelino, no ocurre en la granja de reproductoras y que puede presentarse en una etapa posterior.

Se encontró que la principal causa de infección del saco vitelino fueron cepas de *E. coli*, ya que, la curva de mortalidad por ISV coincidió con la de aislamientos de *E. coli*; y ambas presentan el pico entre el día 3 y 5 de vida del pollito.

Los serogrupos aislados con mayor frecuencia fueron O19, OR, O84 y O8, los cuales no se habían reportado como patógenos para las aves.

Los genes encontrados en cepas aviares causantes de infección del saco vitelino fueron el gen de invasividad (*IPAH*), el relacionado con el efecto attaching-effacement (*eae*) y el de la toxina citoletal distensionante (*cdt*). Estos se encontraron de manera única o en combinaciones en las cepas de *E. coli* aisladas en este estudio.

Este es el primer trabajo que muestra los probables serotipos causantes de ISV en nuestro país, marcando la posible epidemiología del padecimiento.

Literatura Citada

- 1) Estudillo, LJ. Prefacio. En Examen general de calidad profesional para medicina veterinaria y zootecnia: Material de estudio área: aves. Editor Isidro Castro Mendoza. México (D.F.), 1996.
- 2) Unión Nacional de Avicultores: Compendio de Indicadores Económicos del Sector Avícola 1997. Ed. Dirección de Estudios Económicos. México (D.F.), 1998.
- 3) Bains BS. A Manual of poultry diseases. Switzerland: Editions "Roche", 1979.
- 4) Coutts GS. Poultry diseases under modern management. 2nd ed. London: Saiga Publishing Co. LTD., 1981.
- 5) Gordon RF, Jordan FTW. Enfermedades de las aves 2a. ed. México: El Manual Moderno., 1985.
- 6) Mosqueda TA y Lucio MB. Enfermedades comunes de las aves domésticas. México: Universidad Nacional Autónoma de México, 1985.
- 7) Gross WB. Retained caseous yolk sacs caused by *Escherichia coli*. Avian Dis 1964; 8:438-441.
- 8) Hungerford TG. Diseases of poultry: Including cage birds and pigeons. 4th ed. Australia: Angus and Robertson, 1969.
- 9) Barger EH, Card LE, and Pomeroy, B.S.: Diseases and parasites of poultry. 5th ed. USA: Lea &Febiger, 1958.
- 10) Biester HE, Schwarte LM. Diseases of poultry. Ames: Iowa State University Press., 1959.

- 11) Harry EG. The effect on embryonic and chick mortality of yolk contamination with bacteria from hen. Vet Rec 1957; 69: 1433-1439.
- 12) Collins CH, Lyne PM. Métodos microbiológicos. España: Editorial Acribia, Zaragoza, 1989.
- 13) Freeman BA. Microbiología de Burrows. 22 ed. México: Ed. Interamericana McGraw-Hill, 1989.
- 14) Suárez GF. Mecanismos de patogenicidad bacteriana. En: Pérez MJ, Suárez GF, Flores CR, editores. Bacteriología general: Principios químicos biológicos. México: Fac. de Med. Vet y Zoot., UNAM, 1990.
- 15) Zegarra VJR. Serotipificación, determinación de perfiles de hemoaglutinación y toxina termolábil en cepas de *Escherichia coli* provenientes de lechones destetados en granjas tecnificadas del Valle de Toluca, México (tesis de maestría). Toluca, México Universidad Autónoma del Estado de México, 1996.
- 16) Salyers AA, Whitt DD. Bacterial pathogenesis: A molecular approach. USA: American Society Microbiology Press, 1994.
- 17) Chengappa MM. Diagnostic procedures in veterinary bacteriology and mycology. 5th ed. USA: Carter G.R. Cole J.R. Academic Press Inc., 1990.
- 18) Levine MM. *Escherichia coli* that cause diarrhea: enterotoxigen, enteropathogenic, enteroinvasive, enterohemorrhagic, and enteroadherent. J Infect Dis 1987; 155: 377-389.
- 19) López AJ. *Escherichia coli*: Mecanismos de patogenicidad. En: Moreno CR editor. Ciencia Veterinaria Vol. 1. México: FMVZ, UNAM, 1976.

- 20) Davis BD, Dulbecco R, Eisen HN, Ginsberg HS. Microbiology. 4th ed. USA: J.B. Lippincott Company, 1990.
- 21) Lennette EH, Balows A, Hausler WJ, Shadomy HJ. Manual of clinical microbiology. 4th ed. Washington D.C: American Society for Microbiology, 1985.
- 22) 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.
- 23) 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.
- 24) Phukan A, Kalita CC, Dutta GN. Isolation, identification and serotyping of *Escherichia coli* from poultry. Indian J of Animal Science 1990; 60: 556-557.
- 25) Sojka WJ. *Escherichia coli* in domestic animals and poultry. London: Commonwealth Agricultural Bureaux, 1965.
- 26) Nataro JP, Kaper JB. Diarrheagenic *Escherichia coli*. Clin Microbiol Rev 1998; 11: 142-201.
- 27) Konowalchuk J, Speir JI, Stavric S. Vero response to a cytotoxin of *Escherichia coli*. Infect Immun 1977; 18: 775-779.
- 28) O'Brien AD, Lively TA, Chen ME, Rothman SW, Formal SB. *Escherichia coli* O157: H7 strains associated with haemorrhagic colitis in the United States produce a *Shigella dysenteriae* 1 (Shiga) like cytotoxin. Lancet 1983; i:702.

- 29) Cravioto A, Gross RJ, Scotland SM, Rowe B. An adhesive factor found in strains of *Escherichia coli* belonging to the traditional infantile enteropathogenic serotype. *Curr Microbiol* 1979; 3:95-99.
- 30) Nataro JP, Yikang D, Yingkang D, Walker K. AggR a transcriptional activator of aggregative adherence fimbria I expression in enteroaggregative *Escherichia coli*. *J Bacteriol* 1994; 176:4691-4699.
- 31) Eslava C, Villaseca J, Morales R, Navarro A, Cravioto A: Identification of a protein with toxigenic activity produced by enteroaggregative *Escherichia coli*. Abstracts of the 93rd General Meeting of the American Society for Microbiology; 1993 Washington, D.C. American Society for Microbiology 1993: 43 B-105.
- 32) Oberhelman, RA, Kopecko DJ, Venkatesan MM, Salazar-Lindo E, Gotuzzo E, Yi A, Chea-Woo E, Ruiz R, Fernandez-Prada C, León-Barúa R, Sack RB. Evaluation of alkaline phosphatase-labelled *ipaH* probe for diagnosis of *Shigella* infections. *J Clin Microbiol* 1993; 31:2101-2104.
- 33) Johnson WM, Lior H. Response of chinese hamster ovary cell to cytolethal distending toxin (CDT) of *Escherichia coli* and possible misinterpretation as heat-labile (LT) enterotoxin. *FEMS Microbiology Letters* 1987; 48: 235-238.
- 34) Scott DA, Kaper JB. Cloning and sequencing of the genes encoding *Escherichia coli* cytolethal distending toxin. *Infect Immun* 1994; 62: 244-251.
- 35) El-Sukhon SN. Incidence of *Escherichia coli* in chicken affections. *Indian J An Sci* 1989; 60: 263-266.
- 36) 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.

- 37) Secretaría de Gobernación y Gobierno del Estado de Guanajuato. Los municipios de Guanajuato. De la colección: Enciclopedia de los municipios de México. México (D.F.): Secretaria de Gobernación, 1988.
- 38) Orskov F, Orskov I. Serotyping of *Escherichia coli*. En: Methods of microbiology . Vol. 14. London: T. Bergan. Academic Press, 1984: 43-112.
- 39) Hill WE, Payne WL. Genetic methods for the detection of microbial pathogens . Identification of enterotoxigenic *Echerichia coli* by DNA colony hybridization: collaborative study. Jurnal of the Association of Official Analytical Chemists 1984; 67: 801-807.
- 40) Rojo ME. Enfermedades de las aves. 2a. ed. México: Trillas, 1987.
- 41) Sotelo SH. Contaminación bacteriana del huevo incubable. Tecnología Aviepecuaria, 1993, Año 6:31.
- 42) Anónimo. Sanitising Hatching Eggs. Poultry International 1993; 32: 10-12.
- 43) Abd-El-Motelib TY, El-Zanaty K. *Staphylococcus* and *Klebsiella* infections in Broiler Chickens. Assiut Vet Med J 1993; 29: 270-278.
- 44) Keirs, RW. Excesiva mortalidad: preguntas y respuestas. Industria Avícola 1987: Agosto: 27-32.
- 45) 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.
- 46) Whiteman CE, Bickford AA. Avian disease manual. 2nd. ed. USA: American Association of Avian Pathologists, 1983.

- 47) White DG, Dho-Moulin M, Wilson RA, Whittam TS. Clonal relationships and variation in virulence among *Escherichia coli* strains of avian origin. *Microb Pathogen* 1993; 14:399-409.
- 48) Takahashi K, Miura S. O groups and antibiotic sensitivity of *Escherichia coli* isolated from diseased chickens. *Jap J Vet Res* 1968; 16: 65-72.
- 49) Edwards PR, Ewing WH. Studies on coliform type isolated from the organs of fowls. *Cornell Vet* 1954; 44: 50-56.
- 50) Emery DA, Nagaraja KV, Shaw DP, Newman JA, White DG. Virulence factors of *Escherichia coli* associated with colisepticemia in chickens and turkeys. *Avian Dis* 1992; 36: 504-511.
- 51) Carter GR, Cole JR. Diagnostic procedures in veterinary bacteriology and mycology. 5th. ed. USA : Academic Press, Inc. Hancourt Brace Jovanovich, Publishers, 1990.
- 52) Bratoeva MP, Wolf MK, Marks JK, Cantey JR. A case of diarrhea, bacteremia, and fever caused by a novel strain of *Escherichia coli*. *J Clin Microbiol* 1994; 32: 1383-1386.

Cuadro 1. Cepas utilizadas como testigo en la prueba de hibridación del ADN.

Número de la Cepa	Bacteria	Serotipo	Genes
E3787	<i>E. coli</i>	O26:H11	VT1 +ve
E32511	<i>E. coli</i>	O157:H-	VT2 +ve
E2347	<i>E. coli</i>	O127:H6	HEp-2 +ve, eae +ve
E60725	<i>E. coli</i>	O92:H33	AA +ve
E66438	<i>E. coli</i>	O75:H-	DA +ve
E7476	<i>E. coli</i>	O166:H27	ST +ve
E5798	<i>E. coli</i>	O7:H18	LT +ve
E35990	<i>E. coli</i>	O143:H-	EIEC +ve
14R519	<i>E. coli</i>	K12	testigo negativo

Cuadro 2. Frecuencia de aislamiento de los microorganismos encontrados en diferentes muestras tomadas en granja de reproductoras, incubadora y granja de pollo de engorda.

LUGAR	MUESTRA	ESPECIES BACTERIANAS																		
		<i>Aeromonas salmonicida</i>	<i>Alcaligenes faecalis</i>	<i>Bacillus sp.</i>	<i>Chromobacterium sp</i>	<i>Citrobacter freundii</i>	<i>Enterobacter aerogenes</i>	<i>Enterobacter cloacae</i>	<i>Escherichia coli</i>	<i>Klebsiella oxytoca</i>	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	<i>Klebsiella sp.</i>	Levaduras	<i>Proteus mirabilis</i>	<i>Providencia rettgeri</i>	<i>Pseudomonas fluorescens</i>	<i>Serratia sp</i>	<i>Staphylococcus aureus</i>	<i>Streptococcus</i>	TOTAL
REPRODUCTORAS	NIDO	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	2	17	3	22	
	HUEVO	0	2	0	0	0	0	0	4	0	0	0	0	0	0	0	2	0	8	
INCUBADORA	19DIAS	0	1	0	2	1	2	0	28	0	0	0	10	0	0	0	12	2	58	
	21DIAS	0	2	0	0	0	6	0	47	0	0	14	0	0	0	0	20	16	105	
POLLO DE ENGORDA	MORTALIDAD	3	3	2	9	4	97	8	188	2	56	1	13	0	1	2	0	1	5	395
TOTAL		3	8	2	11	5	105	8	267	2	56	1	27	10	1	2	2	52	26	588

Cuadro 3. Frecuencia de aislamientos de *Escherichia coli* de las diferentes áreas de muestreo.

LUGAR	MUESTRA	ÁREA DE MUESTREO	<i>Escherichia coli</i>
REPRODUCTORAS	NIDO	ASERRÍN	0
		INTERNO	2
	HUEVO	EXTERNO	2
INCUBADORA	19DIAS	INTERNO	16
		EXTERNO	12
	21DIAS	EXTERNO	29
		SACO VITELINO	18
POLLO DE ENGORDA	MORTALIDAD	HIGADO	102
		SACO VITELINO	86
TOTAL			267

Cuadro 4. Relación entre serotipos de *Escherichia coli* y el sitio de aislamiento.

SITIO DE AISLAMIENTO	SEROTIPOS ENCONTRADOS																		SUBTOTAL						
	O?	O103	O108	O112	O118	O12	O120	O124	O125	O132	O146	O149	O15	O152	O153	O155	O167	O168		O19	O2	O21	O22	O23	
CAMA DE NIDO																									0
HUEVO DE NIDO INTERNO														1											1
HUEVO DE NIDO EXTERNO									1																1
19DIAS INTERNO		1		1					1		1						2	1		1					8
19 DIAS EXTERNO	1	1		1					1		3				1		1	1							10
21 DIAS SACO VITELINO			1					5											8						14
21 DIAS EXTERNO		1						3			1	1							12	1					19
POLLO SACO VITELINO	4	2	1	2	4	1	2					1	5	1		6		2	6	1	1	3	1		43
POLLO HIGADO	5	5	1	2	3	2	1	1		1			1	2		4		2	7	3	1	2			43
TOTAL	10	10	3	6	7	3	11	1	3	1	5	2	6	4	1	10	3	6	33	6	2	5	1		139

Cuadro 4 (Continuación). Relación entre serotipos de *Escherichia coli* y el sitio de aislamiento.

SITIO DE AISLAMIENTO	SEROTIPOS ENCONTRADOS																			TOTAL		
	O24	O3	O4	O41	O44	O53	O6	O69	O7	O70	O73	O77	O78	O8	O81	O83	O84	O85	O9		O91	OR
CAMA DE NIDO																						0
HUEVO DE NIDO INTERNO																			1			2
HUEVO DE NIDO EXTERNO							1															2
19DIAS INTERNO	2	1						1													4	16
19 DIAS EXTERNO								1		1												12
21 DIAS SACO VITELINO														3				1				18
21 DIAS EXTERNO	1	1		3										4				1				29
POLLO SACO VITELINO			1		1	2					1		5	6	1	2	11		2	1	10	86
POLLO HIGADO					4	1	1		2		2	1	8	4	1	1	13		3	3	15	102
TOTAL	3	2	1	3	5	3	2	2	2	1	3	1	13	17	2	3	24	2	6	4	29	267

Cuadro 5. Serogrupos aislados en granja de reproductoras, incubadora y pollo de engorda.

SEROGRUPOS	AISLAMIENTO	
	NUMERO	PORCENTAJE (%)
O19	33	12.36
OR	29	10.86
O84	24	8.99
O8	17	6.37
O78	13	4.87
O120	11	4.12
O?	10	3.75
O103	10	3.75
O155	10	3.75
O118	7	2.62
O112	6	2.25
O15	6	2.25
O168	6	2.25
O2	6	2.25
O9	6	2.25
O146	5	1.87
O22	5	1.87
O44	5	1.87
O152	4	1.50
O91	4	1.50
O108	3	1.12
O12	3	1.12
O125	3	1.12
O167	3	1.12
O24	3	1.12
O41	3	1.12
O53	3	1.12
O73	3	1.12
O83	3	1.12
O149	2	0.75
O21	2	0.75
O3	2	0.75
O6	2	0.75
O69	2	0.75
O7	2	0.75
O81	2	0.75
O85	2	0.75
O124	1	0.37
O132	1	0.37
O153	1	0.37
O23	1	0.37
O4	1	0.37
O70	1	0.37
O77	1	0.37
TOTAL	267	100.00

Cuadro 6. Número de aislamientos de los diferentes serotipos de *Escherichia coli* No Móviles en granja de reproductoras, incubadora y pollo de engorda.

Serotipo	Número de Cepas
O7 NM	4
O103 NM	2
O108 NM	1
O120 NM	1
O153 NM	1
O168 NM	3
O19 NM	31
O2 NM	4
O21 NM	2
O24 NM	1
O3 NM	1
O44 NM	5
O53 NM	1
O73 NM	2
O8 NM	5
O85 NM	2
OR NM	16
TOTAL	82

Cuadro 7. Relación entre el momento de aislamiento y la presencia de genes de virulencia en cepas de *Escherichia coli*.

LUGAR	MUESTRA	ÁREA DE MUESTREO	NUMERO DE CEPAS CON GENES							Ninguno	<i>Escherichia coli</i>
			IPAH	Cdt	eae	IPAH-Cdt	IPAH-eae	Cdt-eae	IPAH-Cdt-eae		
REPRODUCTORAS	NIDO	ASERRÍN									
	HUEVO	INTERNO	1							1	2
		EXTERNO	1							1	2
INCUBADORA	19DIAS	INTERNO	7		1	1	4			3	16
		EXTERNO	1	1						10	12
	21DIAS	EXTERNO	2	2						25	29
		SACO VITELINO	1	3						14	18
POLLO DE ENGORDA	MORTALIDAD	HIGADO	21	5	7	2	3	1	6	57	102
		SACO VITELINO	17	2	7	3	7	1	3	46	86
TOTAL			51	13	15	6	14	2	9	157	267

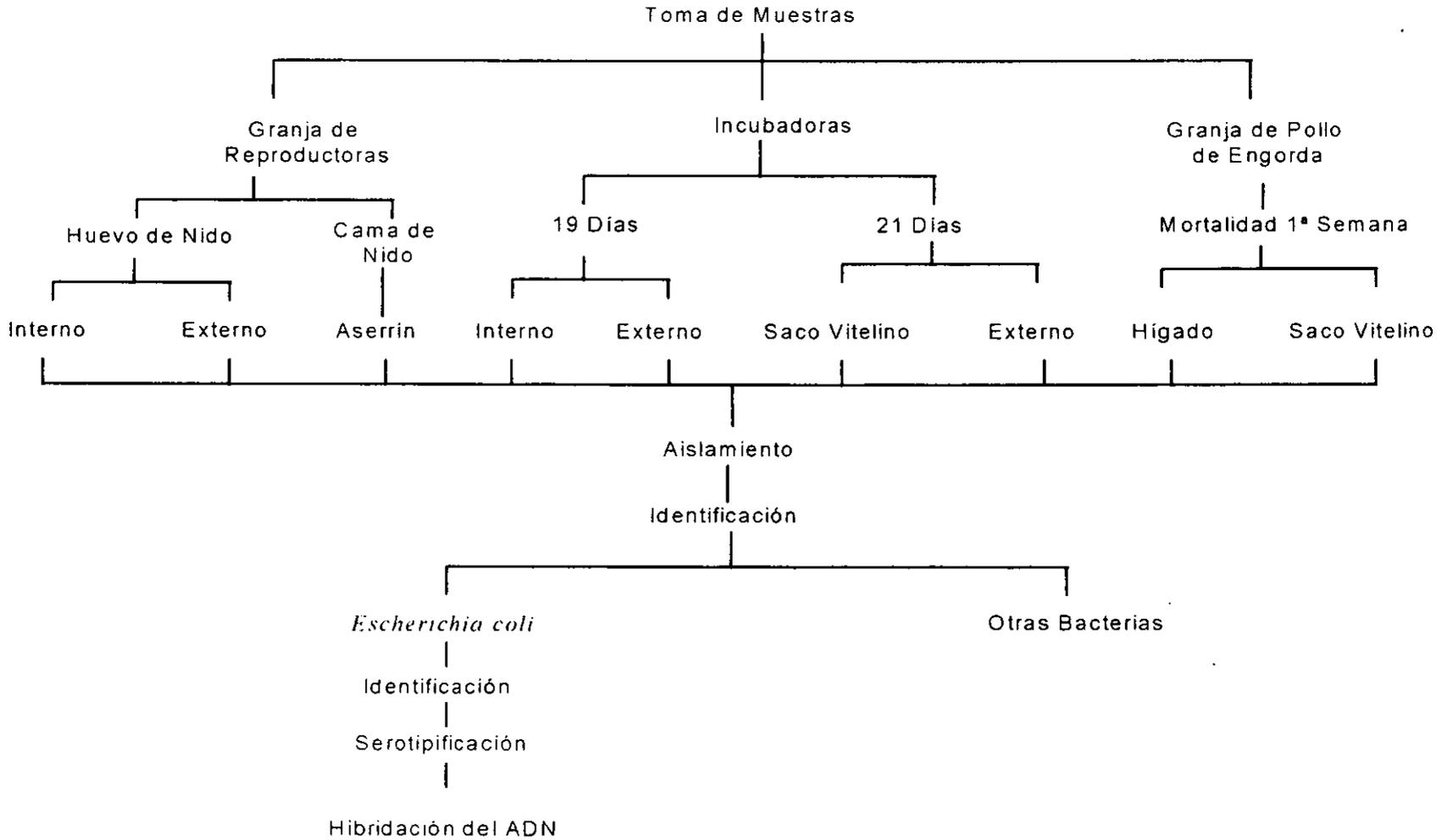


Figura 1. Metodología utilizada para el manejo de las muestras y cepas.

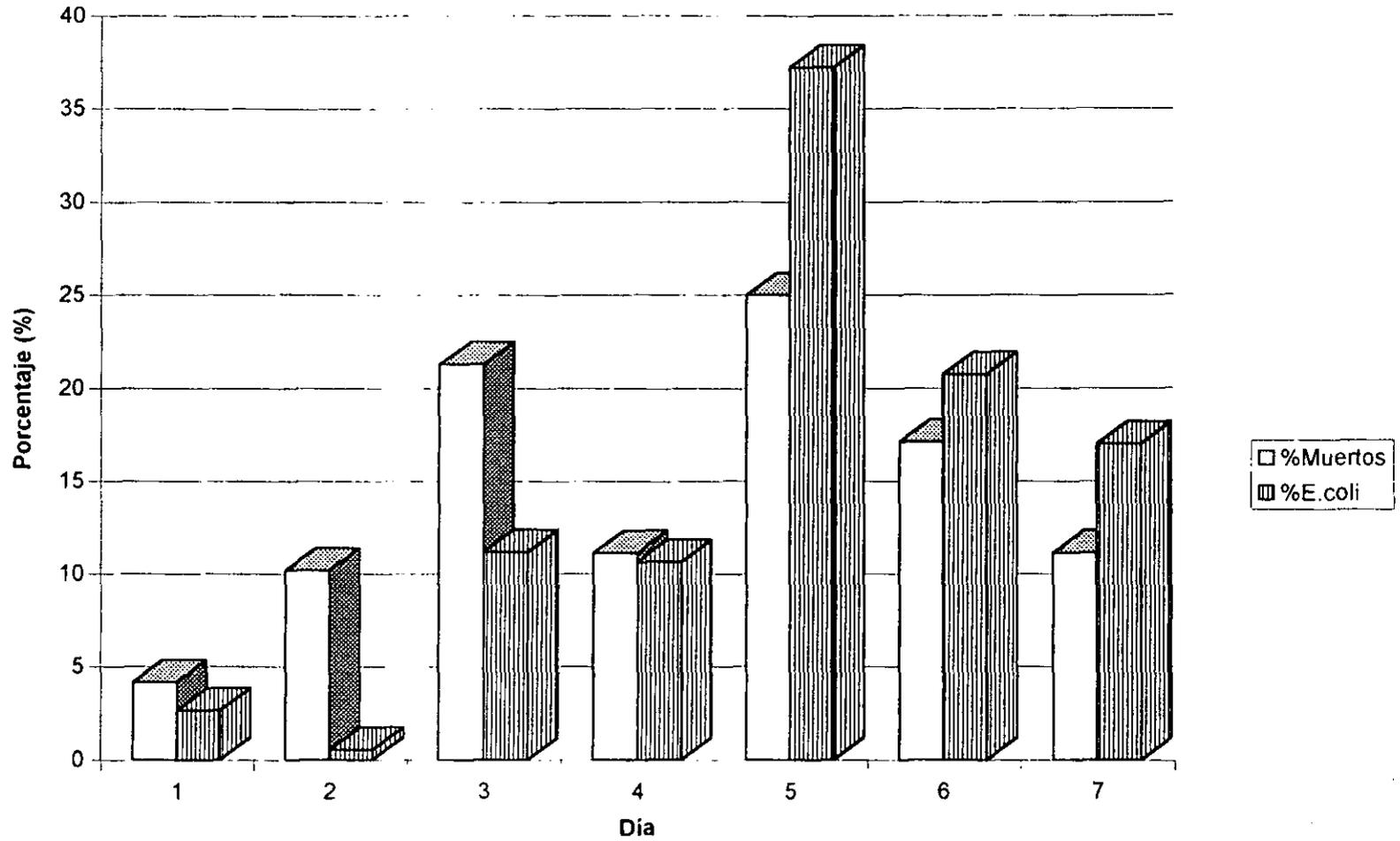


Figura 2. Porcentaje de mortalidad y aislamiento de *Escherichia coli* en pollo de engorda durante la primera semana a partir de la mortalidad.

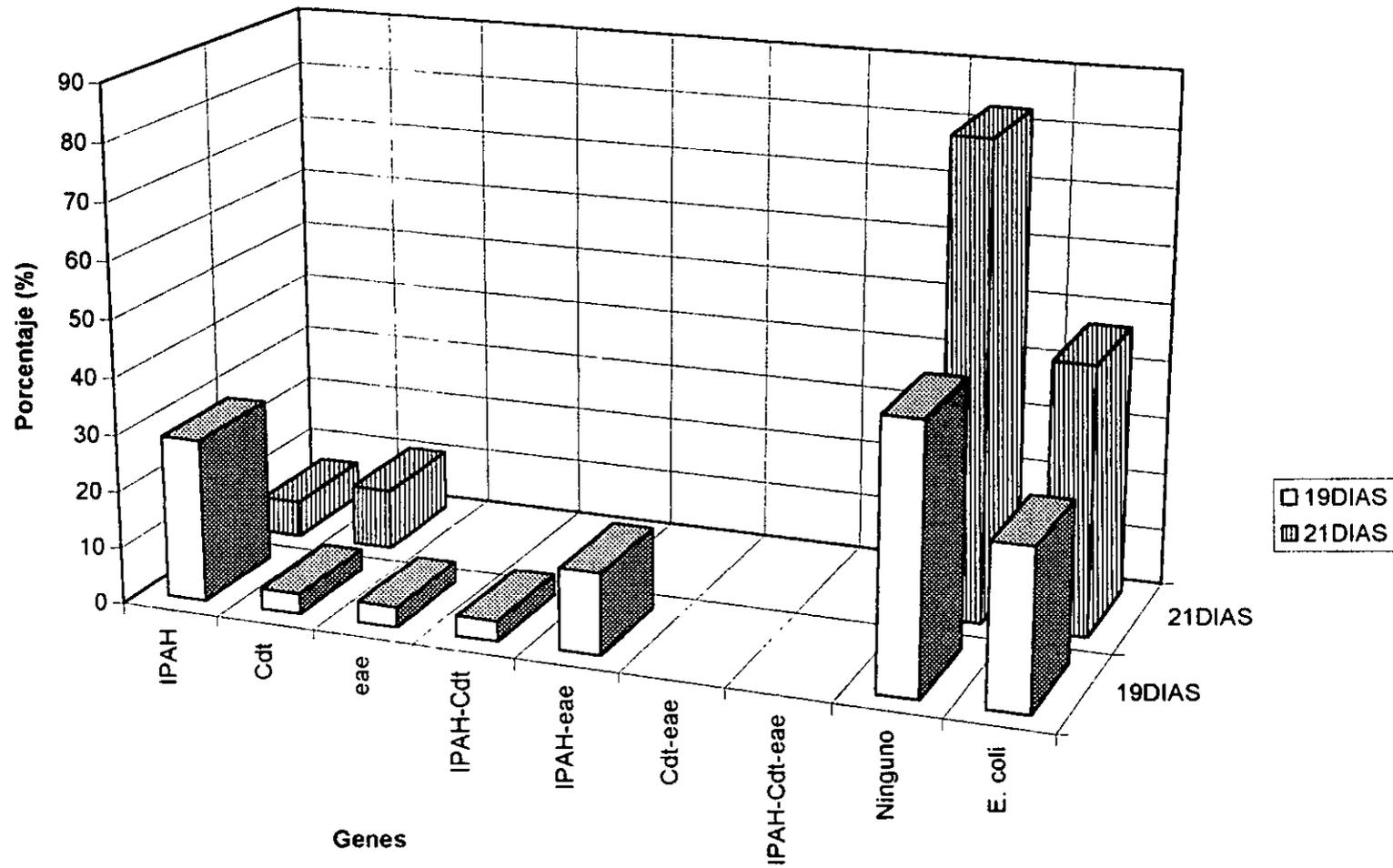


Figura 3. Relación del número de aislamientos y el porcentaje de cepas de *Escherichia coli* que presentaron genes de virulencia en la incubadora a los 19 y 21 días.

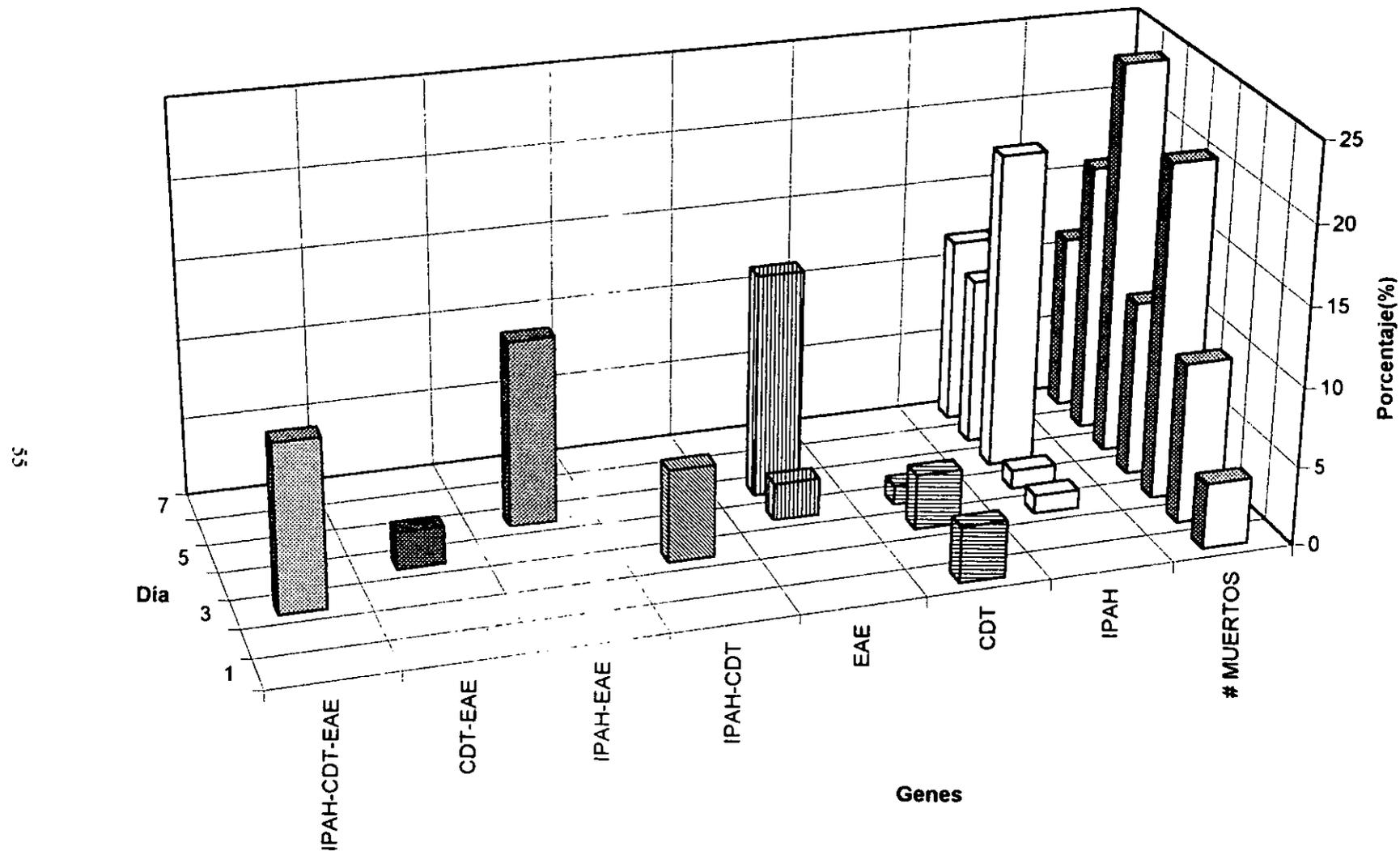


Figura 4. Relación del porcentaje de mortalidad con la presencia de genes de virulencia en cepas de *Escherichia coli* aisladas a partir de pollo de engorda durante la primera semana de vida.