



UNIVERSIDAD DE CUENCA
Facultad de Ciencias Agropecuarias
Carrera de Medicina Veterinaria y Zootecnia

Título: “Caracterización molecular de aislados de *Escherichia coli* en pollos de carne (*Gallus gallus domesticus*) de la provincia de Azuay, Ecuador”

Trabajo de titulación previo a la obtención del Título de Médico Veterinario Zootecnista

Autores: Ana Cecilia Pérez Pintado
anna.perez.p@outlook.com
Kevin Fabián Astudillo Vallejo.
kevinastudilloedu@gmail.com

C.I.: 0104503297

C.I.: 0105832042

Director: Dr. Fabián Manuel Astudillo Riera. Mg. Sc.

C.I.: 0102342383

CUENCA – ECUADOR
29 de septiembre del 2020



1. RESUMEN

La bacteria *Escherichia coli* (*E. coli*) puede llegar a generar significativas pérdidas económicas en el sector agropecuario. Esta bacteria cuenta con un alto riesgo de contaminación biológica, resistencia a tratamientos antimicrobianos y alta zoonosis, sin embargo, hasta la fecha, los métodos de diagnóstico revelan únicamente el genotipo de la bacteria, pero no existen reportes en la zona sobre la identificación de los genes portadores de factores de virulencia (GFV). Por lo expuesto, el objetivo de esta investigación fue identificar GFV y la diversidad genotípica de cepas de *E. coli* seleccionadas por su fenotipo. Para conseguir el objetivo se trabajó con 30 cultivos positivos a la bacteria, aislados de pollos con signos clínicos criados en la provincia del Azuay. Las muestras fueron purificadas y posteriormente se realizó la tinción de Gram para cada cultivo. Mediante la técnica de PCR se detectó la presencia del gen *uspA* (específico de *E. coli*), también la presencia de GFV como son: adhesinas (*fimC*), exotoxinas (*cvaA*) y sistemas de captación-transporte de Hierro (*iucD*; *chuA*; *fyuA*). Finalmente, para revelar la diversidad genética se realizó la técnica (GTG)⁵. Se encontró la presencia de 25/30 (75%) cultivos que presentaron el gen *uspA*, permitiendo identificar *E. coli*, de ellos, la frecuencia de GFV positivos fue: *chuA* 12/25 (48%), *cvaA* 5/25 (20%), *fimC* 21/25 (84%), *fyuA* 9/25 (36%) y *iucD* 14/25 (56%). La diversidad genética por (GTG)⁵ manifestó la presencia de 2 grupos que abarcan los 30 cultivos bacterianos de este estudio. Con estos resultados podemos concluir que existen cepas de *E. coli* positivas al gen *uspA*, las mismas que contienen GFV que revelan una importante diversidad genética, de los pollos infectados con Colibacilosis de nuestro estudio.

Palabras clave:

Factores de virulencia, epidemiología molecular, *E. coli*, pollos de carne.



2. ABSTRACT

Escherichia coli (*E. coli*) can cause significant economic losses in agricultural and animal industries. In spite of the high risks that this bacterium poses to food safety, environmental health and human health, as of today, most diagnostic methods focus only in the genotypic characterization of this bacterium's isolates without addressing whether these isolates contain virulence factor genes (VFG). The objective of this work was to identify VFGs in isolates from commercial farms and to describe the genetic diversity of these isolates. Thirty isolates from chickens showing clinical signs of colibacillosis from commercial poultry farms in the province of Azuay (Ecuador) were used in the study. The isolates were purified and confirmed using gram-staining and PCR-amplification of the *E. coli*-specific genetic marker *uspA*. VFGs presence in the isolates DNA were screened using selected markers as follows: adhesins (*fimC*), exotoxins (*cvaA*), and iron uptake and transport systems (*iucD*, *chuA* and *fyuA*). The genetic diversity of the isolates was described using the (GTG)₅ technique. About 75% percent (25/30) of the isolates reported the *uspA* marker confirming *E. coli* identity. Forty-eight percent (12/25) of the isolates reported the presence of the *chuA* marker, 20% (5/25) reported the *cvaA* marker, and 84% (21/25), 36% (9/25) and 56% (14/25) of the isolates reported the *fimC*, *fyuA*, and *iucD* markers, respectively. (GTG)₅ analysis identified segregation of the bacterial isolates in two groups. These results reveal that most of the isolates contained VFGs and an large genetic diversity among the isolates.

Key words:

Virulence factors, molecular epidemiology, *E. coli*, broiler chicken.



INDICE DE CONTENIDO

1. RESUMEN 2

2. ABSTRACT 3

INDICE DE CONTENIDO 4

AGRADECIMIENTO..... 11

AGRADECIMIENTO..... 12

DEDICATORIA..... 13

DEDICATORIA..... 14

3. INTRODUCCIÓN 15

Hipótesis 16

4. OBJETIVOS 17

a. Objetivo general 17

b. Objetivos específicos 17

5. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA 18

5.1 Colibacilosis aviar..... 18

5.2 Diagnóstico en campo 18

5.3 Diagnóstico fenotípico 19

5.4 Diagnóstico genotípico por PCR..... 19

6. MATERIALES Y MÉTODOS 21

6.1 Caracterización fenotípica del cultivo en Agar nutritivo y Tinción de Gram 21

6.4.1. Materiales de trabajo 21

6.4.2. Procedimiento 21

6.2. Obtención de material genético (ADN total) de los aislados de *E. coli*..... 22

6.2.1. Materiales de trabajo 22

6.2.2. Procedimiento 23

6.3. Identificación genética de *E. coli* 23

6.3.1. Materiales de trabajo 24

6.3.2. Procedimiento 24

6.4. Evaluación de la diversidad genética de los aislados de *E. coli*..... 25



UNIVERSIDAD DE CUENCA

6.4.1. Materiales de trabajo	25
6.4.2. Procedimiento	26
6.5. Detección secuencias que codifican para factores de virulencia	27
6.5.1. Materiales de trabajo	27
6.5.2. Procedimiento	28
6.6. Análisis de información.....	30
7. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	31
8. CONCLUSIONES.....	34
9. RECOMENDACIONES	35
10. BIBLIOGRAFÍA	36
11. ANEXOS	39

INDICE DE TABLAS

Tabla 1: Insumos y concentraciones de los reactivos para la preparación de la mezcla del PCR uspA.	20
Tabla 2: Perfil de temperatura para la detección del gen uspA.....	21
Tabla 3: Insumos y concentraciones de los reactivos para la preparación de la mezcla del PCR GTGx5.....	22
Tabla 4: Perfil de temperatura para la detección de la secuencia GTGx5.	23
Tabla 5: Oligonucleótidos para detectar la secuencia de genes portadores de factores de virulencia.....	24
Tabla 6: Insumos y concentraciones de los reactivos para la preparación de la mezcla del PCR para detección de factores de virulencia.....	24
Tabla 7: Perfil de temperatura para la detección del gen iucD.....	25
Tabla 8: Perfil de temperatura del gen cvaA.....	25
Tabla 9: Perfil de temperatura del gen chuA.	25
Tabla 10: Perfil de temperatura del gen fimC.	26
Tabla 11: Perfil de temperatura del gen fyuA.	26
Tabla 12: Cultivos y muestras con resultados positivos al gen uspA.	27
Tabla 13: Prevalencia de los Genes factores de virulencia en los aislados de E. coli.....	27



UNIVERSIDAD DE CUENCA

INDICE DE FIGURAS

Figura 1. Dendograma de (GTG) ₅ -PCR de cepas de <i>E. coli</i>	29
Figura 2. Gel de Electroforesis en Agarosa del producto de PCR del gen <i>uspA</i>	34
Figura 3. Gel de Electroforesis en Agarosa del producto del PCR del gen <i>chuA</i>	34
Figura 4. Gel de Electroforesis en Agarosa del producto del PCR del gen <i>cvaA</i>	35
Figura 5. Gel de Electroforesis en Agarosa del producto del PCR del gen <i>fimC</i>	35
Figura 6. Gel de Electroforesis en Agarosa del producto del PCR del gen <i>fyuA</i>	36
Figura 7. Gel de Electroforesis en Agarosa del producto del PCR del gen <i>iucD</i>	36



UNIVERSIDAD DE CUENCA

Cláusula de licencia y autorización para publicación en el Repositorio Institucional

Ana Cecilia Pérez Pintado, en calidad de autor/a y titular de los derechos morales y patrimoniales del trabajo de titulación "Caracterización molecular de aislados de *Escherichia coli* en pollos de carne (*Gallus gallus domesticus*) de la provincia de Azuay, Ecuador", de conformidad con el Art. 114 del CÓDIGO ORGÁNICO DE LA ECONOMÍA SOCIAL DE LOS CONOCIMIENTOS, CREATIVIDAD E INNOVACIÓN reconozco a favor de la Universidad de Cuenca una licencia gratuita, intransferible y no exclusiva para el uso no comercial de la obra, con fines estrictamente académicos.

Asimismo, autorizo a la Universidad de Cuenca para que realice la publicación de este trabajo de titulación en el repositorio institucional, de conformidad a lo dispuesto en el Art. 144 de la Ley Orgánica de Educación Superior.

Cuenca. 29 de septiembre de 2020

Ana Cecilia Pérez Pintado

C.I: 0104503297



UNIVERSIDAD DE CUENCA

Cláusula de licencia y autorización para publicación en el Repositorio Institucional

Kevin Fabián Astudillo Vallejo, en calidad de autor/a y titular de los derechos morales y patrimoniales del trabajo de titulación "Caracterización molecular de aislados de *Escherichia coli* en pollos de carne (*Gallus gallus domesticus*) de la provincia de Azuay, Ecuador", de conformidad con el Art. 114 del CÓDIGO ORGÁNICO DE LA ECONOMÍA SOCIAL DE LOS CONOCIMIENTOS, CREATIVIDAD E INNOVACIÓN reconozco a favor de la Universidad de Cuenca una licencia gratuita, intransferible y no exclusiva para el uso no comercial de la obra, con fines estrictamente académicos.

Asimismo, autorizo a la Universidad de Cuenca para que realice la publicación de este trabajo de titulación en el repositorio institucional, de conformidad a lo dispuesto en el Art. 144 de la Ley Orgánica de Educación Superior.

Cuenca. 29 de septiembre de 2020

A handwritten signature in blue ink, enclosed in a blue oval, positioned above a horizontal line.

Kevin Fabián Astudillo Vallejo

C.I: 0105832042



UNIVERSIDAD DE CUENCA

Cláusula de Propiedad Intelectual

Ana Cecilia Pérez Pintado, autor/a del trabajo de titulación "Caracterización molecular de aislados de *Escherichia coli* en pollos de carne (*Gallus gallus domesticus*) de la provincia de Azuay, Ecuador", certifico que todas las ideas, opiniones y contenidos expuestos en la presente investigación son de exclusiva responsabilidad de su autor/a.

Cuenca, 29 de septiembre de 2020

A handwritten signature in blue ink, appearing to read 'Ana Cecilia Pérez Pintado', written over a horizontal line.

Ana Cecilia Pérez Pintado

C.I: 0104503297



UNIVERSIDAD DE CUENCA

Cláusula de Propiedad Intelectual

Kevin Fabián Astudillo Vallejo, autor/a del trabajo de titulación "Caracterización molecular de aislados de *Escherichia coli* en pollos de carne (*Gallus gallus domesticus*) de la provincia de Azuay, Ecuador", certifico que todas las ideas, opiniones y contenidos expuestos en la presente investigación son de exclusiva responsabilidad de su autor/a.

Cuenca, 29 de septiembre de 2020

A handwritten signature in blue ink, enclosed in a blue oval, reading 'Kevin Fabián Astudillo Vallejo'.

Kevin Fabián Astudillo Vallejo

C.I: 0105832042



AGRADECIMIENTO

Agradezco a la vida por todo lo que me ha dado, a mi Papá que es y será siempre lo más importante en mi vida, te amo y te extraño.

A mi familia por todo el apoyo y la enorme paciencia que tuvieron todos estos años, gracias por cada momento, sin ustedes no sería nada.

A todos los animales que dieron su vida para que aprenda, a Manchas, el primero que me mostró el camino que debía seguir, a todos los que llenaron mi corazón gracias por cruzarse en mi camino y permitirme ser más humana, los llevaré conmigo siempre.

A mis amigos por todo el cariño y paciencia en todo este proceso, ustedes me recordaron a cada momento lo que soy, y que no debía perderme en el intento.

A los Médicos Veterinarios que me enseñaron con su conocimiento, paciencia e integridad que todo es posible, espero algún día ser tan grande como ustedes.

A ti que lees todo este documento, te esperan cosas grandes en la vida, te admiro y te deseo lo mejor siempre.

Y finalmente a todos quienes aportaron de forma directa e indirecta en la construcción de una Médico Veterinario más en este mundo, espero que su vida trascienda en la historia y alcancen sus metas, gracias por leer todo este discurso, pero los discursos son para campañas, ahora es tiempo de actuar.

Ana Pérez P.



AGRADECIMIENTO

A mi mamá Clarita, por ser la mujer que siempre tuvo las mejores palabras de aliento en cada dificultad. A mi papá Fabián, por ser el ejemplo en mi vida y el motor para realizar este proyecto. A mis hermanos Christian y Jairo, por ser la inspiración y el camino a seguir. A mis mejores amigos Hernán, Sebastián, Kleber y Romina, por todo el apoyo brindado. Al Dr. Antonio Vallecillo, por haber sido incondicional durante este proyecto.

A los profesores de la universidad de Cuenca: Dres.: Patricio Crespo, Daniel Orellana, Diego Rodríguez, Juan Pesantez, Andrés Galarza, Guillermo Guevara y Andrés Mora, porque gracias a su carisma y entrega a la docencia e investigación, aportaron siempre con motivación para encaminarme a la investigación científica

Kevin Astudillo V.



UNIVERSIDAD DE CUENCA

DEDICATORIA

Este trabajo lo dedico a Carlos, Carmita, Luis, María, Lía, Daniel, Sebastián, Isabel, José, Maxi, Isaac, Joaquin, Emilio, Sara y a todos los que vendrán luego, esto es para ustedes.

Ana Pérez P.



UNIVERSIDAD DE CUENCA

DEDICATORIA

A mis padres: Clarita y Fabián, hermanos: Christian y Jairo, abuelitos: Luz †, Arturo †, Armando y de manera especial a mi abuelita Hilda, quien siempre me inspira a servir en mi profesión.

De manera general a toda mi familia y amigos cercanos, para que se motiven siempre a salir adelante y aportar a la comunidad con bondad, ciencia y servicio.

Kevin Astudillo V.



3. INTRODUCCIÓN

En la industria avícola, la Colibacilosis es causada por la bacteria *Escherichia coli* (*E. coli*). Esta enfermedad, produce un complejo síndrome caracterizado por lesiones diversas en las que se incluyen, aerosaculitis, perihepatitis y lesiones pericárdicas que degeneran en septicemia (Calnek, 2000; Espinoza, Salinas, Picón, & Santoyo, 2009; A. Oliveira et al., 2009). Esta patología, ocasiona alta mortalidad y decomisos de órganos en los camales, que se traduce en significativas pérdidas económicas para la industria avícola. Siendo reportada un pérdida de alrededor de 80 millones de dólares en el año 2017 en Estados Unidos (Ewers, Janßen, Kießling, Philipp, & Wieler, 2004; Ozaki, Matsuoka, Nakagawa, & Murase, 2017).

Esta bacteria puede presentar ciertos genes codificantes de toxinas (adhesinas, toxinas, captadoras de hierro), que, les capacitan para causar diversos síndromes, signos y lesiones en diversas especies, entre ellos, los seres humanos. Estas bacterias pueden estar presentes en las aves de consumo, como también pueden ocasionar contaminación cruzada a otros tipos de carne, por contacto en carnicerías y camales, los que al ser consumidos podrían causar enfermedad en el humano (Alonso, Lucchesi, Rodríguez, Parma, & Padola, 2012).

Se han desarrollado metodologías que permiten identificar el origen de las bacterias de *E. coli* que se pueden hospedar en las aves, lo que es importante para evaluar el grado de riesgo en la salud pública, así como también, desarrollar herramientas directas que permitan reducir la contaminación cruzada debido a la colibacilosis aviar (Mohapatra, Broersma, & Mazumder, 2007).

Existen diferentes tipos de *E. coli*: patogénicos (APEC, por sus siglas en inglés: Avian Pathogenic *Escherichia coli*) y no patogénicos, cuyo daño potencial depende de los genes portadores de factores de virulencia que contenga la bacteria., actualmente se han descrito alrededor de 23 tipos potencialmente patogénicos que han sido descubiertos mediante técnicas de PCR (Ewers, Janßen, Kießling, Philipp, & Wieler, 2005; Ewers et al., 2004; Mohapatra et al., 2007; Mohapatra, Broersma, & Mazumder, 2008).

Los diversos grupos de la bacteria que han sido encontrados pueden afectar a diferentes especies como: pavos, pollos, patos, aves silvestres e incluso humanos (WHO, 2003). El Ana Cecilia Pérez Pintado - Kevin Fabián Astudillo Vallejo



UNIVERSIDAD DE CUENCA

conocimiento de las diversas fuentes no específicas de contaminación para el pollo de engorde, permite reforzar las normas de bioseguridad existentes y trabajar bajo un sistema de buenas prácticas de producción avícola.

Hoy en día, mediante biología molecular se pueden detectar los diversos orígenes de contaminación de la bacteria a su hospedador, las rutas de transmisión, así como también los factores de virulencia que causan la aparición de la diversa signología (Ewers et al., 2005; van der Westhuizen & Bragg, 2012).

A partir de los avances generados en el Proyecto Genoma Humano, el cual heredó la ciencia y tecnología que permitió desarrollar técnicas cada vez más específicas que detectan la secuenciación del ADN, que brindan a la comunidad clínica como científica herramientas altamente sensibles y específicas para el diagnóstico de las diversas patologías (National Human Genome Research Institute, 2019; Tolosa, 2017).

La importancia de estas nuevas técnicas radica principalmente en la identificación de genes portadores de resistencia bacteriana, lo cual permite al Médico Veterinario usar las herramientas antimicrobianas existentes y a su vez, el control de los patógenos que ocasionan altas mortalidades en los pollos (Younis, Awad, & Mohamed, 2017).

Es necesario destacar que esta tecnología por el momento está limitada por sus elevados costos, por lo cual, continuamos con el desarrollo de los ensayos de PCR como herramienta fundamental para reconocer los fragmentos de cadenas de ADN de manera accesible y con resultados altamente sensibles.

Actualmente, en Ecuador existe escasa información reportada sobre la presencia o ausencia de los GFV de *E. coli* en aves. A pesar de que la presentación de esta patología a nivel de campo es frecuente, y sus métodos de diagnóstico de laboratorio son el cultivo y el antibiograma para su tratamiento, hemos visto la necesidad de revelar información sobre el microbioma para esta patología de manera específica en nuestra zona, permitiendo al productor lograr eficiencia y bienestar animal.

Hipótesis

¿Existe una relación de la presencia de los factores de virulencia que contribuyen con la patogenia de la colibacilosis aviar con la diversidad genética de los aislados obtenidos de casos clínicos?



4. OBJETIVOS

a. Objetivo general

Identificar la diversidad genética y la presencia de genes portadores de factores de virulencia en cepas de *Escherichia coli* aisladas en casos de colibacilosis en pollos de carne (*Gallus gallus domesticus*) de la provincia del Azuay, Ecuador.

b. Objetivos específicos

Confirmar mediante PCR la presencia de *Escherichia coli* proveniente de cultivos de pollos de carne (*Gallus gallus domesticus*) con signología de colibacilosis.

Identificar la diversidad genética de los aislados de *E. coli* de casos de colibacilosis aviar mediante la técnica de *fingerprinting* con el uso del ensayo de (GTG)₅-PCR.

Identificar la presencia de secuencias codificantes de factores de virulencia, como los de adhesinas (*fimC*), exotoxinas (*cvaA*) y sistemas de captación-transporte de Hierro (*iucD*; *chuA*; *fyuA*) mediante ensayos de PCR en las cepas de *E. coli* portadoras del gen *uspA*, para evidenciar una relación con la diversidad genética de los aislados.



5. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

5.1 Colibacilosis aviar

Se denomina colibacilosis aviar a el conjunto de signos y síntomas que genera la bacteria *E. coli* una vez que la barrera inmunitaria ha sido traspasada, ocasionando lesiones en diferentes órganos, e incluso puede presentarse a nivel sistémico con septicemia colibacilar (14).

Está descrito que la variedad de presentaciones de la enfermedad se debe a su diversidad de antígenos (O, K, H y F) y serotipos (01, 02, 035 y 078), de los cuales el 75% de ellos, presentan factores de virulencia encargados de producir la alta mortalidad característica de esta patología (Calnek, 2000)., sin embargo, últimamente se ha reconocido que existen dos tipos de cepas, una no patogénica y otra patogénica denominada en Ingles: avian pathogenic *E. coli* (APEC), la cual engloba todas las características de virulencia que presentan los diferentes biotipos de esta bacteria (Ozaki et al., 2017).

La principal fuente de transmisión es el medio ambiente contaminado con heces fecales, ya que este microorganismo es parte de la microbiota intestinal común de organismos endotermos y es de fácil cultivo. Recientemente se han desarrollado nuevas técnicas de biología molecular que permiten realizar la trazabilidad de las diferentes fuentes contaminantes, entre ellas el ribotipado, rep-PCR, entre otras., incluyendo la técnica (GTG)₅-PCR que permite revelar la diversidad de los microorganismos (Mohapatra et al., 2007, 2008).

5.2 Diagnóstico en campo

Para un diagnóstico presuntivo de campo, nos basamos en la variedad de tipos y cepas que esta bacteria posee, la misma que se manifiesta con diversa signología. Se observa en la necropsia, entre los signos más comunes: onfalitis, salpingitis, hidrosalpinx, peritonitis, ooforitis, celulitis, enterocolitis, septicemia neonatal y respiratoria, enterohemorragia, cloacitis, panoftalmatitis, artritis, osteomielitis y osteonecrosis, bursitis esternal, entre otras (Calnek, 2000; Dinev, 2011).



5.3 Diagnóstico fenotípico

El diagnóstico fenotípico es necesario para identificar la bacteria y elegir un antibiótico adecuado, basados en los resultados de un cultivo y antibiograma previo que permita conocer la sensibilidad de este patógeno. Ciertos microbios pueden ser cultivados en medios sencillos, con composición de nitrato, nitritos sulfatos y minerales., éstos son denominados como medios definidos o medios sintéticos, ya que simulan de manera artificial el hábitat de crecimiento bacteriano, lo que permite su identificación (Prescott, Harley, & Klein, 2002).

Comúnmente se siembran las muestras en agar: Mac Conkey, EMB, o en medios selectivos indicadores, los cuales incubados a 37°C durante 18 a 24h. muestran características fenotípicas de brillo metálico, sin embargo, estas técnicas presentan menor rendimiento diagnóstico al comparar con técnicas de biología molecular (Rodríguez-Angeles, 2002).

Al tener el diagnóstico fenotípico bacteriano, se hacen necesarias pruebas microbiológicas de confirmación, entre ellas: Catalasa, Oxidasa, Oxido-fermentación, Rojo de Metilo, Coagulasa, que brindan un resultado en un tiempo de 6 a 48h, pero no evidencian la presencia o ausencia de los GFV, que son los responsables del desarrollo de la patología, convirtiendo al diagnóstico genotípico en una herramienta fundamental. (Bou, Fernández-Olmos, García, Sáez-Nieto, & Valdezate, 2011).

5.4 Diagnóstico genotípico por PCR

La técnica de Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR, por sus siglas en inglés: Polymerase Chain Reaction), está basada en la replicación de varias proteínas que sintetizan una determinada cadena de ADN. Este proceso se realiza mediante diferentes actividades como la identificación del sitio de origen, el desenrollamiento de la doble cadena, estabilización, generación de un iniciador de replicación, replicación, la identificación de los sitios de terminación y el nuevo enrollamiento de las moléculas de ADN. Todo esto gracias a la intervención de reactivos/sustratos (taq polimeraza, sustancias amortiguadoras y moldes de secuenciación y Mg), que luego de procesos de termociclación (desnaturalización, alineamiento y extensión) generan productos de amplificación que pueden ser separados por electroforesis y detectados con iluminación



UNIVERSIDAD DE CUENCA

UV, siendo esta, una prueba altamente sensible y específica al primer o secuencia de estudio (Saiki et al., 1987; Serrato, Flores, Aportela, & Sierra, 2017).



6. MATERIALES Y MÉTODOS

Se obtuvo los cultivos de pollos con signología correspondiente a colibacilosis aviar como: aerosaculitis, perihepatitis, lesiones pericárdicas y sinovitis articular. Se trabajó con 30 cultivos de característica Gram (-). Laboratorios particulares entregaron las muestras de cultivos identificadas fenotípicamente como *E. coli* y fueron transportadas en cooler al laboratorio de Biología Molecular de la Facultad de Ciencias Agropecuarias de la Universidad de Cuenca, donde se almacenaron a 4°C, hasta su procesamiento.

Las muestras fueron únicamente de pollos cuyas granjas se encuentran dentro del perímetro de la provincia del Azuay, cuya edad, sexo, condición inmunológica y sanitaria fueron desconocidas.

Actividad Nro. 1

6.1 Caracterización fenotípica del cultivo en Agar nutritivo y Tinción de Gram

Esta caracterización fenotípica se realizó para obtener un aislado de bacterias Gram (-) lo más homogénea posible, esperando que las mismas pertenezcan a un cultivo de *E. coli* altamente purificadas.

6.4.1. Materiales de trabajo

Materiales físicos

Asa de siembra

Porta objetos

Cubre objetos

Microscopio

Materiales químicos

Agar nutritivo

Tinción de Gram

Materiales biológicos

Aislado bacteriano

6.4.2. Procedimiento

Paso 1: Se obtuvo una muestra del aislado bacteriano con el asa de siembra.



UNIVERSIDAD DE CUENCA

Paso 2: Se resembró por la técnica de agotamiento la muestra en agar nutritivo.

Paso 3: Se caracterizó macroscópicamente las muestras homogéneas de acuerdo a: tamaño, color y forma.

Tinción de Gram

Este procedimiento se realizó bajo los conceptos descritos y modificados por: Bostrom y col. (Bostrom, Simu, Hagstrom, & Riemann, 2004)

Paso 4: Se colocó una gota de agua destilada en un porta objetos y se tomó una muestra con el asa de siembra del cultivo seleccionado del paso previo, se secó la placa en una estufa a 37°C, se fijó con calor, flameado 3 veces por 2 ocasiones.

Paso 5: Se colocó violeta cristal por 1 min y se lavó con agua destilada.

Paso 6: Se colocó solución de yodo por 1 min y se lavó con agua destilada.

Paso 7: Se colocó solución de alcohol acetona por 6 s., y se lavó con agua destilada.

Paso 8: Se colocó una solución de fucsina fenicada por 1 min y se lavó con agua destilada y finalmente se dejó secar la placa al ambiente.

Paso 9: Se observó en el microscopio con aceite de inmersión y un lente (100x).

Paso 10: Se diferenció las bacterias Gram (+) por su coloración azul y las Gram (-) por su tinción de color rosado.

Actividad Nro. 2

6.2. Obtención de material genético (ADN total) de los aislados de *E. coli*

Este procedimiento se realizó bajo los protocolos descritos por Clermont y col. (Clermont, Christenson, Denamur, & Gordon, 2013) y se adaptó a nuestro estudio.

6.2.1. Materiales de trabajo

Materiales físicos

Incubadora

Centrífuga

Materiales químicos

Buffer de lisis (400 mM NaCl; 750 mM Sucrosa; 20 mM de EDTA; 50 mM de Tris-HCl, pH 9,0)

Lisozima (1 mg/mL)

Ana Cecilia Pérez Pintado - Kevin Fabián Astudillo Vallejo



Dodecil sulfato de sodio 1% (SDS)

Proteinasa K (100 µg/mL)

Solución fenol, cloroformo y alcohol isoamílico (25:24:1)

Etanol absoluto (95-97%)

Etanol (70%)

Agua grado biología molecular

Materiales biológicos

Cultivo de aislados Gram (-)

6.2.2. Procedimiento

Paso 1: Se centrifugó el caldo nutritivo a (12.000 x g) por 20 min.

Paso 2: Se eliminó el sobrenadante del caldo nutritivo.

Paso 3: Se diluyó la pastilla con 175 µL de buffer de lisis.

Paso 4: Se agregó de 3,5 µL de lisozima e incubó a 37°C por 60 min.

Paso 5: Se adicionó 20 µL de dodecilsulfato de sodio (SDS), 1 µL de proteinasa K, e incubó a 55° C por 90 min, y se obtuvo la solución de lisado (SL).

Paso 4: Se agregó el mismo volumen obtenido en la SL, de una solución de fenol, cloroformo y alcohol isoamílico (25:24:1), se agitó y centrifugó a 12.000 g por 5 min.

Paso 5: Se rescató la fase incolora o sobrenadante de la emulsión obtenida, se colocó en un nuevo tubo y se adicionó 2,5 vol. de etanol absoluto y centrifugó a 14 000 g por 5 min.

Paso 6: Se eliminó el sobrenadante y añadió 1 ml de etanol al 70% y se centrifugó a 14 000 g durante 3 min.

Paso 7: Se eliminó el sobrenadante y se dejó secar la pastilla con ADN obtenida en el fondo del tubo.

Paso 8: A la pastilla se le agregó entre 50 a 100 µL de agua grado biología molecular, y se obtuvo el ADN total (ADNt), mismo que se conservó a -20°C.

Actividad Nro. 3

6.3. Identificación genética de *E. coli*

Se realizó un ensayo de PCR para la detección la secuencia del gen *uspA* lo que permitió la confirmación de que los aislados obtenidos corresponden a *E. coli*.



6.3.1. Materiales de trabajo

Materiales físicos

Vortex

Termociclador (Eppendorf Modelo: Nexus GSX1).

Micropipetas

Tubos de PCR

Materiales químicos

Agua grado biología molecular.

Buffer de PCR.

dNTP´s

MgCl₂

Oligo *uspA* –For: CCGATACGCTGCCAATCAGT

Oligo *uspA* –Rev: ACGCAGACCGTAGGCCAGAT

Enzima *Taq* DNA polimerasa

Foto documentador (BioRad Modelo: Gel Doc XR+).

Materiales biológicos

ADN

6.3.2. Procedimiento

Paso 1: Se preparó una mezcla, con las siguientes características:

Tabla 1: Insumos y concentraciones de los reactivos para la preparación de la mezcla del PCR *uspA*.

Reactivo:	Concentración:	Volumen:	Concentración final:
Agua grado biología molecular.	No aplica.	19,25 µL	No aplica
Buffer de PCR.	10 X	2,5 µL	1X
dNTP´s	10 mM c/u	0,25 µL	0,2 mM c/u
MgCl ₂	50 mM	1 µL	2 mM
Oligo <i>uspA</i> -For	100 µM	0,2 µL	0,8 µM



UNIVERSIDAD DE CUENCA

Oligo uspA -Rev	100 μ M	0,2 μ L	0,8 μ M
Enzima <i>Taq</i> DNA polimerasa	5 U/ μ L	0,2 μ L	0,05 U/ μ L
Muestra de ADN total	25 ng/ μ L	0,5 μ L	5 ng/ μ L
Volumen final	-----	25 μ L	-----

Paso 2: La mezcla se homogenizó en un vortex por 4-6 s y luego centrifugó a 14 000 g por 15-20 s.

Paso 3: En tubos de PCR (200 μ L), se colocó 23 μ L de la mezcla y 2 μ L de ADNt de cada cultivo previamente identificado.

Paso 4: Los tubos con las reacciones de ampliación (25 μ L), se colocó en el termociclador, y fueron sometidos al siguiente perfil de temperatura:

Tabla 2: Perfil de temperatura para la detección del gen *uspA*.

Etapa:	Desnaturalización		35 ciclos			Extensión
	inicial	Desnaturalización	Alineamiento	Extensión	final	
Temperatura	94 °C	94 °C	65 °C	72 °C	72 °C	
Tiempo	4 min	30 s	25 s	45 s	5 min	

Paso 5: Los productos de las reacciones de PCR se resolvieron en un gel de agarosa-TAE al 1.2 % teñido con Bromuro de Etidio.

Paso 6: La visualización de un producto de PCR de aproximadamente 884 bp se consideró positivo, es decir, que él aislado corresponde a *E. coli*.

Actividad Nro. 4

6.4. Evaluación de la diversidad genética de los aislados de *E. coli*

Con los cultivos que dieron positivo a *E. coli*, se realizó un nuevo ensayo de PCR para determinar la diversidad de cepas existentes en los cultivos recolectados, mediante la localización de la secuencia: (GTG)₅.

6.4.1. Materiales de trabajo

Materiales físicos

Ana Cecilia Pérez Pintado - Kevin Fabián Astudillo Vallejo



Vortex

Termociclador (Eppendorf Modelo: Nexus GSX1).

Micropipetas

Tubos de PCR

Materiales químicos

Agua grado biología molecular.

Buffer de PCR.

dNTP´s

MgCl₂

Oligo (GTG)₅: GTGGTGGTGGTGGTG

Enzima Taq DNA polimerasa

Foto documentador (BioRad Modelo: Gel Doc XR+).

Materiales biológicos

ADNt

6.4.2. Procedimiento

Paso 1: Se preparó una mezcla, con las siguientes características:

Tabla 3: Insumos y concentraciones de los reactivos para la preparación de la mezcla del PCR (GTG)₅.

Reactivo:	Concentración:	Volumen:	Concentración final:
Agua grado biología molecular.	No aplica.	19,25 µL	No aplica.
Buffer de PCR.	10X	2,5 µL	1X
dNTP´s	10 mM c/u	0,5 µL	0,2 mM c/u
MgCl ₂	50 mM	1,5 µL	3 mM
Oligo (GTG) ₅	100 µM	0,5 µL	2 µM
Muestra de ADN total	25 ng/ µL	0,5 µL	5 ng/ µL
Enzima Taq DNA polimerasa	5 U/ µL	0,25 µL	0,05 U/ µL
Volumen final	-----	25 µL	25 µL



Paso 2: La mezcla se homogenizó en un vortex por 10 s y luego se centrifugó a 12.000 g por 10 min.

Paso 3: En tubos de PCR (200uL), se colocaron 23 µL de la mezcla y 2 µL de ADNt de cada cultivo previamente identificado.

Paso 4: Los tubos con las reacciones de ampliación (25 µL), se colocaron en el termociclador, y fueron sometidos al siguiente perfil de temperatura:

Tabla 4: Perfil de temperatura para la detección de la secuencia (GTG)5.

Etapa:	Desnaturalización		35 ciclos			Extensión
	inicial	Desnaturalización	Alineamiento	Extensión	final	
Temperatura	95 °C	94 -92 °C	40 °C	65 °C	65 °C	
Tiempo	2 min	3 min 30 s	60 s	8 min	8 min	

Paso 5: Los productos de las reacciones de PCR se resolvieron en un gel de agarosa-TAE al 1,5 % teñido con Bromuro de Etidio (0,5 /ml), acompañado con una cepa de vacuna comercial como control.

Paso 6: La visualización del producto de PCR fue fotografiada y las localizaciones BP, serán consideradas como sepas diversas de *E. coli*.

Actividad Nro. 5

6.5. Detección secuencias que codifican para factores de virulencia

Con los cultivos que darán positivo a *E. coli*, se realizó un nuevo ensayo de PCR para determinar los factores de virulencia existentes en los cultivos recolectados, mediante la localización de las siguientes secuencias codificantes: adhesinas (*fimC*), exotoxinas (*cvaA*) y sistemas de captación-transporte de Hierro (*iucD; chuA; fyuA*).

6.5.1. Materiales de trabajo

Materiales físicos

Vortex

Termociclador

Micropipetas

Tubos de PCR

Ana Cecilia Pérez Pintado - Kevin Fabián Astudillo Vallejo



Foto documentador (BioRad Modelo: Gel Doc XR+).

Materiales químicos

Agua grado biología molecular

Buffer de PCR

dNTP's

MgCl₂

Enzima *Taq* DNA polimerasa

Tabla 5: Oligonucleótidos para detectar la secuencia de genes portadores de factores de virulencia.

Gen	Primer (5´- 3´) F1/R2	Tamaño del producto PCR (bp)	Codifican	Referencia
iucD	F: ACAAAAAGTTCTATCGCTTCC R: CCTGATCCAGATGATGCTC	714	Transporte de hierro	(Ewers et al., 2005)
cvaA	F:GGTAGAATGTGCCAGAGCAAG R: GAGCTGTTTGTAGCGAAGCC	1181	Exotoxinas	
chuA	F: GACGAACCAACGGTCAGGAT R: TGCCGCCAGTACCAAAGACA	279	Transporte de hierro	(Clermont et al., 2013)
fimC	F: GGGTAGAAAATGCCGATGGTG R: CGTCATTTTGGGGGTAAGTGC	497	Adhesinas	(Ewers et al., 2004)
fyuA	F: GCGACGGGGAAGCGATGACTTA R: CGCAGTAGGCACGATGTTGTA	774	Transporte de hierro	

Materiales biológicos

ADN

6.5.2. Procedimiento

Para la detección de los genes mencionados se realizó el siguiente procedimiento:

Paso 1: Se preparó una mezcla con las siguientes características para la detección de cada uno de los genes:

Tabla 6: Insumos y concentraciones de los reactivos para la preparación de la mezcla del PCR para detección de factores de virulencia.

Reactivo:	Concentración:	Volumen:	Concentración final:
Agua grado biología molecular.	No aplica.	19,15 µL	No aplica.
Buffer de PCR.	10 X	2,5 µL	1X



UNIVERSIDAD DE CUENCA

dNTP´s	10 mM c/u	0,25 µL	0,1 mM c/u
MgCl₂	50 mM	1 µL	2 mM
Oligo **	100 µM	0,2 µL	0,8 µM
Oligo **	100 µM	0,2 µL	0,8 µM
Enzima <i>Taq</i> DNA polimerasa	5 U/ µL	0,2 µL	0,04 U/ µL
Muestra de ADN total	25 ng/ µL	1 µL	5 ng/ µL
Volumen final	-----	23 µL	-----

** Los oligonucleótidos fueron incorporados para cada mezcla de acuerdo al gen que se desee realizar la técnica de PCR (Tabla 5).

Paso 2: La mezcla se homogenizó en un vortex por 10 s y luego se centrifugó a 12 000 g por 10 min.

Paso 3: En tubos de PCR (200 uL), se colocó 23 µL de la mezcla y 2 µL de ADNt de cada cultivo previamente identificado.

Paso 4: Los tubos con las reacciones de ampliación (25 µL), se colocaron en el termociclador, y fueron sometidos al siguiente perfil de temperatura, de acuerdo a las necesidades de cada reacción:

Tabla 7: Perfil de temperatura para la detección del gen *iucD*.

Etapa:	Desnaturalización		25 ciclos			Extensión
	inicial	Desnaturalización	Alineamiento	Extensión	final	
Temperatura	94 °C	94 °C	59,4 °C	72 °C	72 °C	
Tiempo	4 min	30 s	25 s	45 s	5 min	

Tabla 8: Perfil de temperatura del gen *cvaA*.

Etapa:	Desnaturalización		25 ciclos			Extensión
	inicial	Desnaturalización	Alineamiento	Extensión	final	
Temperatura	94 °C	94 °C	60,6 °C	72 °C	72 °C	
Tiempo	4 min	40 s	25 s	50 s	5 min	



Tabla 9: Perfil de temperatura del gen *chuA*.

Etapa:	Desnaturalización		25 ciclos			Extensión
	inicial	Desnaturalización	Alineamiento	Extensión	final	
Temperatura	94 °C	94 °C	65 °C	72 °C	72 °C	
Tiempo	4 min	30 s	25 s	30 s	5 min	

Tabla 10: Perfil de temperatura del gen *fimC*.

Etapa:	Desnaturalización		25 ciclos			Extensión
	inicial	Desnaturalización	Alineamiento	Extensión	final	
Temperatura	94 °C	94 °C	60,6 °C	72 °C	72 °C	
Tiempo	4 min	30 s	20 s	30 s	5 min	

Tabla 11: Perfil de temperatura del gen *fyuA*.

Etapa:	Desnaturalización		25 ciclos			Extensión
	inicial	Desnaturalización	Alineamiento	Extensión	final	
Temperatura	94 °C	94 °C	60,6 °C	72 °C	72 °C	
Tiempo	4 min	30 s	25 s	45 s	5 min	

Paso 5: Los productos de las reacciones de PCR se resolvieron en un gel de agarosa-TAE al 1 % teñido con Bromuro de Etidio (0,5 /ml).

Paso 6: La visualización de un producto de PCR con bp aproximadas a las descritas en la *Tabla 5* fueron consideradas con presencia o ausencia del gen.

Actividad Nro. 6

6.6. Análisis de información

Con los resultados de las técnicas realizadas se obtuvieron frecuencias absolutas y relativas (%). Tablas de contingencia entre los valores resultantes de la técnica de PCR para las cadenas codificantes de los GFV. Adicionalmente, se realizó un dendograma generado por el método UPGMA para la técnica (GTG)⁵, para visualizar la diversidad genética de *E. coli* y sus GFV.



7. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

La *E. coli* está presente en la microbiota normal de las aves, en su tracto intestinal. La patogenicidad depende de los factores de virulencia que presente la bacteria, y de la inmunidad del huésped para que se desarrolle la enfermedad, lo que causa grandes pérdidas económicas en la industria avícola (Dziva & Stevens, 2008; Haghighi Khoshkhoo, Pourtaghi, Akbariazad, & Mokhayeri, 2019; A. Oliveira et al., 2009).

Kwaga y col; Guilvout y col; y Paixao y col; Ahmed y col. (Ali, I. Abd El-Mawgoud, M. Dahshan, A. EL-Sawah, & A. Nasef, 2019; Guilvout, Carniel, & Pugsley, 1995; Kwaga, Allan, Hurk, Seida, & Potter, 1994; Paixão et al., 2016) concluyen que la detección de serotipos y cultivos no pueden ser usados como una herramienta única de diagnóstico, ya que son pruebas poco sensibles y específicas., es por eso que en este estudio se reveló la presencia del gen *uspA* que es exclusivo de la bacteria *E. coli*. Se obtuvo la frecuencia del 75% de casos positivos a este gen, como se puede observar en la tabla 12.

Tabla 12: Resultados del gen *uspA* y *GFV* en los cultivos microbiológicos positivos a *E.coli*.

Genes	<i>uspA</i>	<i>chuA</i>	<i>cvaA</i>	<i>fimC</i>	<i>fyuA</i>	<i>iucD</i>
Positivos	25 (75%)	Positivos 12 (48%)	5 (20%)	21 (84%)	9 (36%)	14 (56%)
		Negativos 13 (52%)	20 (80%)	4 (16%)	16 (64%)	11 (44%)
Negativos	5 (25%)	Positivos 2 (40%)	0 (0%)	1 (20%)	1 (20%)	0 (0%)
		Negativos 3 (60%)	5 (100%)	4 (80%)	4 (80%)	5 (100%)

Los factores de virulencia que contiene APEC son diversos, en este estudio se tomaron en cuenta: *fimC*, *cvaA*, *iucD*; *chuA*, *fyuA*. El gen *fimC* está relacionado con la capacidad de adherencia. El gen *cvaA* con la capacidad productora de exotoxinas y los genes *iucD*, *chuA*, *fyuA*, con los sistemas de captación y transporte de Hierro del medio celular (Alonso et al., 2012; Cárdenas-perea, Gándara-ramírez, & Pérez-hernández, 2014; Paixão et al., 2016).

En nuestro estudio tuvimos una frecuencia mayor del gen: *fimC*, moderada de los genes *iucD* y *chuA*, y menor de los genes *cvaA* y *fyuA*, detectados por la técnica de PCR, en los cultivos que resultaron positivos al gen específico de *E. coli uspA*, por el contrario, en el 25% de los cultivos que no resultó positivo para *uspA*, la mayor frecuencia de



UNIVERSIDAD DE CUENCA

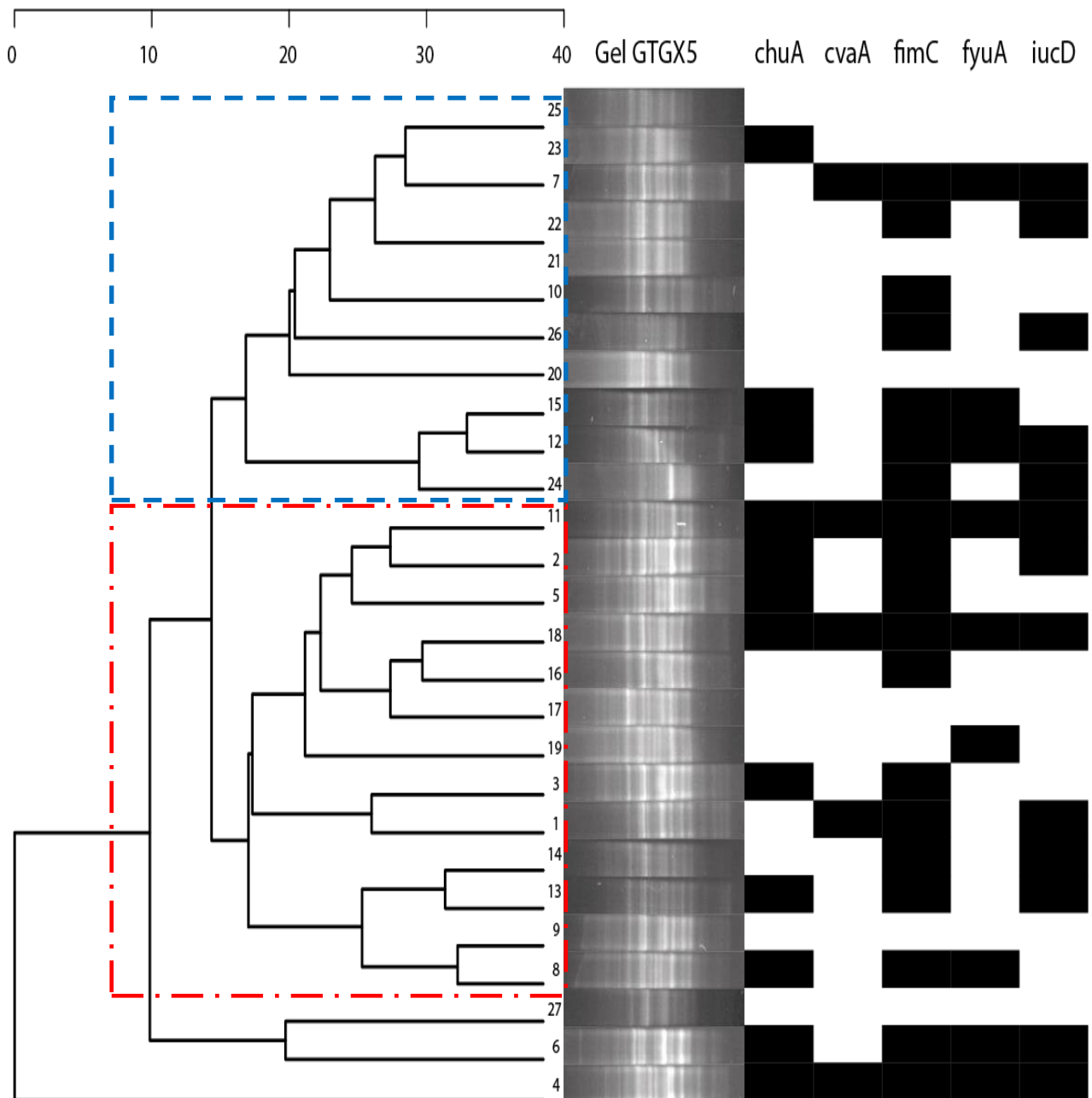
presentación se mostró en el gen *chuA*, frecuencia moderada en los genes *fimC* y *fyuA*; finalmente los genes *iucD* y *cvaA* tuvieron una frecuencia nula, como se observa en la tabla 12.

Se han encontrado diferentes resultados para los distintos genes, en un estudio reciente (Younis et al., 2017), se ha mostrado la prevalencia de 18,55% de genes *fimC*, *cvaA* 14.49%, *iucD* 15.07%, *fyuA* 11.59% y *chuA* 7.83%. Adicionalmente, concluyen que a pesar de ser *fimC* el gen más representativo, la presencia de uno o más genes relacionados con el Hierro, podrían inhabilitar la presencia de APEC en diferentes condiciones ambientales, pues la habilidad de sobrevivir y crecer en suero, en el cual el Hierro es muy bajo parece ser un factor determinante en la patogénesis de la Colibacilosis (Ozaki et al., 2017; Paixão et al., 2016; Younis et al., 2017).

En un estudio realizado para comparar diferentes técnicas para la diferenciación de *E. coli* en humanos, aves y cerdos, concluyeron que la mejor técnica para realizar esta diferenciación es (GTG)⁵, seguida por otros métodos de detección molecular; adicionalmente, concluyeron que ésta técnica es prometedora para ser usada en la vigilancia de la contaminación fecal con *E. coli*, como herramienta diagnóstica de enfermedades en la salud pública, gracias a la capacidad de revelar la diversidad genética (Mohapatra et al., 2007).

En nuestro análisis de diversidad genética se reveló que existen 2 grupos filogenéticos principales, los mismos que en su mayoría tienen al menos un GFV, como se presenta en la figura 1. Basados en los resultados, se infiere que los aislados de *E. coli* obtenidos, tienen un alto grado de patogenicidad o que pertenecen en su mayoría a bacterias APEC, presentan características de virulencia, riesgo de zoonosis y una posible relación de contar con genes portadores de resistencia antimicrobiana e incluso, que podrían ser de diferentes hospedadores (9,30).

Figura 1. Dendograma de (GTG)5-PCR de cepas de *E. coli*



Dendograma realizado mediante el método UPGMA, con la técnica (GTG)5. Se observan dos grupos genéticos identificados con los colores azul y rojo.



8. CONCLUSIONES

- Se confirmó la presencia de la bacteria *E. coli* mediante biología molecular (ensayo de PCR para la secuencia *uspA*) de los cultivos provenientes de pollos de carne que presentaban signología característica de colibacilosis.
- Existe una distribución heterogénea de los genes que se identificaron y que codifican los GFV de los cultivos de *E. coli* de este estudio.
- De los aislados, se obtuvo 2 agrupamientos genéticos revelados por la técnica (GTG)5 de los cultivos de *E. coli* procedentes de los pollos con signología de Colibacilosis.



9. RECOMENDACIONES

- Caracterizar de manera ampliada los factores de virulencia y detectar en las muestras, genes portadores de resistencia bacteriana, para tener datos sobre epidemiología molecular y conocer los antibióticos con efecto nulo ante la colibacilosis.
- Realizar cultivos, antibiogramas y análisis moleculares de los factores de virulencia de las aves infectadas, considerando el lugar anatómico de la toma de muestra, para brindar herramientas con sustento de laboratorio, para la toma de decisiones mientras se espera un resultado del antimicrobiano específico de cada caso.
- Ampliar el número de muestras del estudio.



10. BIBLIOGRAFÍA

- Ali, A., I. Abd El-Mawgoud, A., M. Dahshan, A.-H., A. EL-Sawah, A., & A. Nasef, S. (2019). Escherichia coli in broiler chickens in Egypt, its virulence traits and vaccination as an intervention strategy. *Novel Research in Microbiology Journal*, 3(4), 415-427. <https://doi.org/10.21608/nrmj.2019.44950>
- Alonso, M. Z., Lucchesi, P. M. A., Rodríguez, E. M., Parma, A. E., & Padola, N. L. (2012). Multiplex polymerase chain reaction for screening avian pathogenic Escherichia coli for virulence genes. *Food Control*, 23(2), 351-355. <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2011.07.030>
- Bostrom, K., Simu, K., Hagstrom, A., & Riemann, L. (2004). Optimization of DNA extraction for quantitative marine bacterioplankton community analysis. *Limnology and Oceanography: Methods*, 2, 365-373.
- Bou, G., Fernández-Olmos, A., García, C., Sáez-Nieto, J. A., & Valdezate, S. (2011). *Métodos de identificación bacteriana en el laboratorio de microbiología. Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica* (Vol. 29). <https://doi.org/10.1016/j.eimc.2011.03.012>
- Calnek, B. (2000). *Enfermedades de las Aves*. (E. M. Moderno, Ed.). Mexico.
- Cárdenas-perea, M. E., Gándara-ramírez, J. L., & Pérez-hernández, M. A. (2014). virulencia bacteriana :, 94, 35-43.
- Clermont, O., Christenson, J. K., Denamur, E., & Gordon, D. M. (2013). The Clermont Escherichia coli phylo-typing method revisited: improvement of specificity and detection of new phylo-groups. *Environmental Microbiology Reports*, 5(1), 58-65. <https://doi.org/10.1111/1758-2229.12019>
- Dinev, I. (2011). *Enfermedades de las Aves Atlas a color* (2da Ed.). Perú: Ceva.
- Dziva, F., & Stevens, M. P. (2008). Colibacillosis in poultry: Unravelling the molecular basis of virulence of avian pathogenic Escherichia coli in their natural hosts. *Avian Pathology*, 37(4), 355-366. <https://doi.org/10.1080/03079450802216652>
- Espinoza, R., Salinas, J., Picón, F., & Santoyo, F. (2009). *Manual de Clínica de las Aves* (3ra.). Mexico: UANL.
- Ewers, C., Janßen, T., Kießling, S., Philipp, H.-C., & Wieler, L. H. (2005). Rapid Detection of Virulence-Associated Genes in Avian Pathogenic Escherichia coli by Multiplex Polymerase Chain Reaction. *Avian Diseases*, 49(2), 269-273. <https://doi.org/10.1637/7293-102604R>
- Ewers, C., Janßen, T., Kießling, S., Philipp, H. C., & Wieler, L. H. (2004). Molecular epidemiology of avian pathogenic Escherichia coli (APEC) isolated from colisepticemia in poultry. *Veterinary Microbiology*, 104(1-2), 91-101. <https://doi.org/10.1016/j.vetmic.2004.09.008>
- Guilvout, I., Carniel, E., & Pugsley, P. (1995). Yesinia spp. IIMWP2, a cytosolic protein



- with a cryptic internal signal sequence which can promote alkaline phosphatase export. *J. Bacteriol*, 177, 1780-1787.
- Haghighi Khoshkhou, P., Pourtaghi, H., Akbariazad, G., & Mokhayeri, S. (2019). Virulence-Associated Gene Profiles of Avian Pathogenic *Escherichia coli* Isolated From Broilers With Colibacillosis: A Pilot Study in Iran. *International Journal of Enteric Pathogens*, 7(1), 4-8. <https://doi.org/10.15171/ijep.2019.02>
- Kwaga, J., Allan, J., Hurk, V., Seida, H., & Potter, A. (1994). A *carAB* mutant of avian pathogenic *Escherichia coli* serogroup O2 is attenuated and effective as live oral vaccine against colibacillosis in turkeys. *Infect. Immun*, 62, 3766-3772.
- Mohapatra, B. R., Broersma, K., & Mazumder, A. (2007). Comparison of five rep-PCR genomic fingerprinting methods for differentiation of fecal *Escherichia coli* from humans, poultry and wild birds. *FEMS Microbiology Letters*, 277(1), 98-106. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6968.2007.00948.x>
- Mohapatra, B. R., Broersma, K., & Mazumder, A. (2008). Differentiation of fecal *Escherichia coli* from poultry and free-living birds by (GTG)₅-PCR genomic fingerprinting. *International Journal of Medical Microbiology*, 298(3-4), 245-252. <https://doi.org/10.1016/j.ijmm.2007.03.019>
- National Human Genome Research Institute. (2019). Secuenciación del ADN | NHGRI. Recuperado 17 de noviembre de 2019, de <https://www.genome.gov/es/about-genomics/fact-sheets/Secuenciacion-del-ADN>
- Oliveira, A., Sillankorva, S., Quinta, R., Henriques, A., Sereno, R., & Azeredo, J. (2009). Isolation and characterization of bacteriophages for avian pathogenic *E. coli* strains. *Journal of Applied Microbiology*, 106(6), 1919-1927. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2672.2009.04145.x>
- Oliveira, E., MV, C., Borzi, M., Borgues, C., Guastalli, E., & Avila, F. (2018). Highly Pathogenic and multidrug Resistant Avian Pathogenic *Escherichia coli* in Free-Range Chickens from Brazil. *Brazilian Journal of Poultry Science*, 21(1), 1-8. <https://doi.org/10.1590/1806-9061-2018-0876>
- Ozaki, H., Matsuoka, Y., Nakagawa, E., & Murase, T. (2017). Characteristics of *Escherichia coli* isolated from broiler chickens with colibacillosis in commercial farms from a common hatchery. *Poultry Science*, 10, 1-8. Recuperado de <http://dx.doi.org/10.3382/ps/pex167>
- Paixão, A. C., Ferreira, A. C., Fontes, M., Themudo, P., Albuquerque, T., Soares, M. C., ... Corrêa De Sá, M. I. (2016). Detection of virulence-associated genes in pathogenic and commensal avian *Escherichia coli* isolates. *Poultry Science*, 95(7), 1646-1652. <https://doi.org/10.3382/ps/pew087>
- Prescott, L., Harley, J., & Klein, D. (2002). *Microbiología* (5ta. Ed.). Madrid: Mc Graw Hill.
- Rodríguez-Angeles, M. G. (2002). Principales características y diagnóstico de los grupos patógenos de *Escherichia coli*. *Salud Pública de México*, 44(5), 464-475. <https://doi.org/10.1590/s0036-36342002000500011>
- Saiki, R. K., Gelfand, D. H., Stoffel, S., Scharf, S. J., Higuchi, R., Horn, G. T., ... Erlich, H. Ana Cecilia Pérez Pintado - Kevin Fabián Astudillo Vallejo



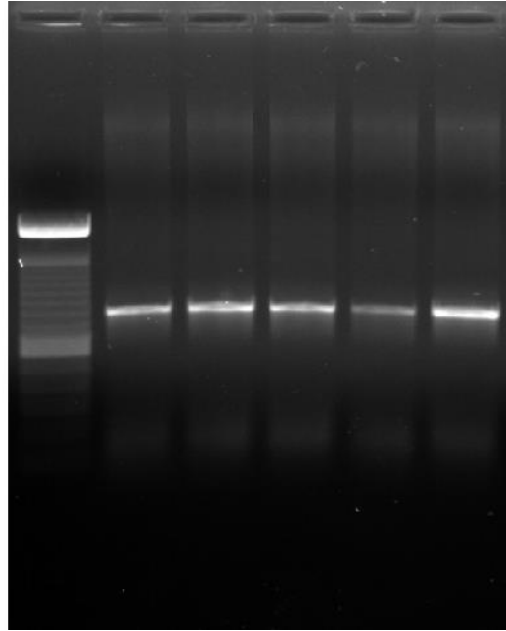
UNIVERSIDAD DE CUENCA

- A. (1987). *PCR The Polymerase Chain Reaction Polymerase Chain Reaction Amplification of a Short DNA Stretch by Repeated Cycles of In Vitro DNA Polymerization Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase. Methods Enzymol* (Vol. 239).
- Serrato, A., Flores, L., Aportela, J., & Sierra, E. (2017). Reaccion en cadena de la Polimerasa. En *Herramientas moleculares aplicadas en ecología: aspectos teóricos y prácticos* (Vol. 1, pp. 35-74). Iztapalapa: Semarnat.
- Tolosa, M. P. y A. (2017). *Genómica En Medicina*. (T. A. Pérez Manuel, Ed.). Valencia: Medigene Press SL.
- van der Westhuizen, W. A., & Bragg, R. R. (2012). Multiplex polymerase chain reaction for screening avian pathogenic *Escherichia coli* for virulence genes. *Avian Pathology*, 41(1), 33-40. <https://doi.org/10.1080/03079457.2011.631982>
- WHO. (2003). Emerging issues in water and infectious diseases. *World Health Organization*. Geneva.
- Younis, G., Awad, A., & Mohamed, N. (2017). Phenotypic and genotypic characterization of antimicrobial susceptibility of avian pathogenic *Escherichia coli* isolated from broiler chickens. *Veterinary World*, 10(10), 1167-1172. <https://doi.org/10.14202/vetworld.2017.1167-1172>



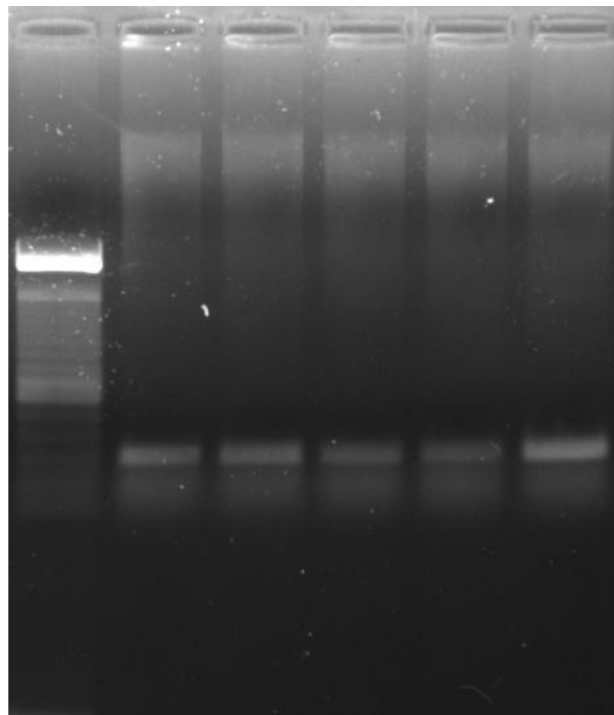
11. ANEXOS

Figura 2. Gel de Electroforesis en Agarosa del producto de PCR del gen *uspA*.



Carril1 (1z): marcador de peso molecular (mpm); carriles 2 al 6 producto de PCR en 884 bp.

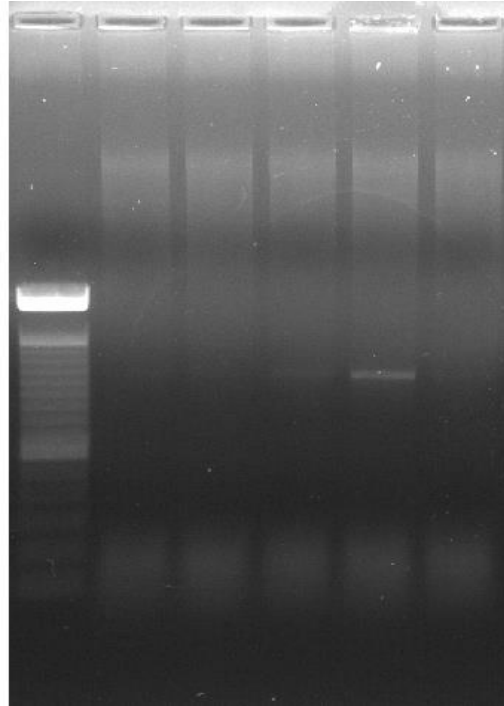
Figura 3. Gel de Electroforesis en Agarosa del producto del PCR del gen *chuA*.



Carril1(1z): marcador de peso molecular (mpm); carriles 2 al 6 producto de PCR en 279 bp.

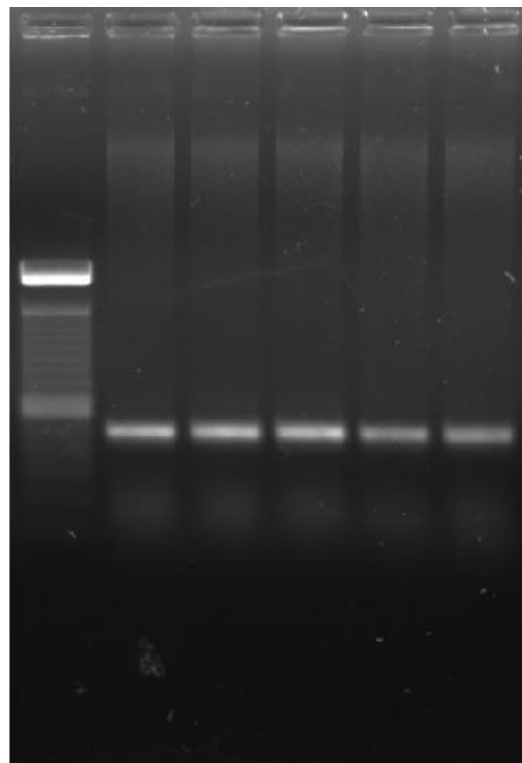


Figura 4. Gel de Electroforesis en Agarosa del producto del PCR del gen *cvaA*.



Carril1 (Iz): marcador de peso molecular (mpm); carriles 2 al 6 producto de PCR en 1181 bp.

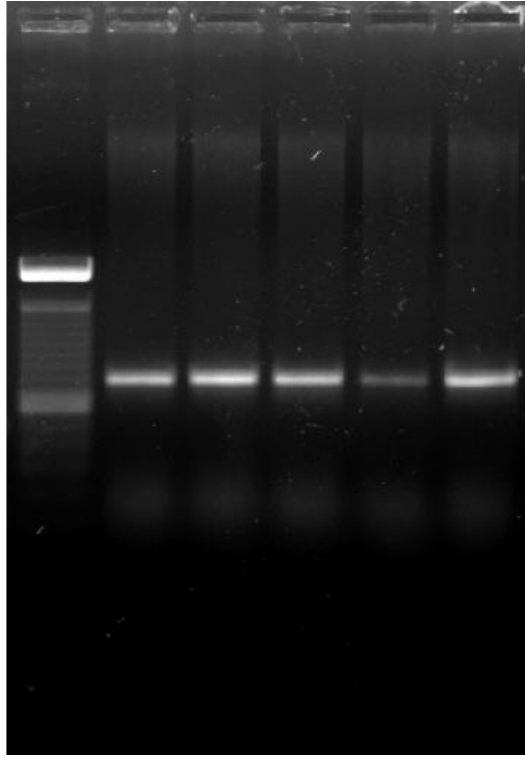
Figura 5. Gel de Electroforesis en Agarosa del producto del PCR del gen *fimC*.



Carril1 (Iz): marcador de peso molecular (mpm); carriles 2 al 6 producto de PCR en 497 bp.

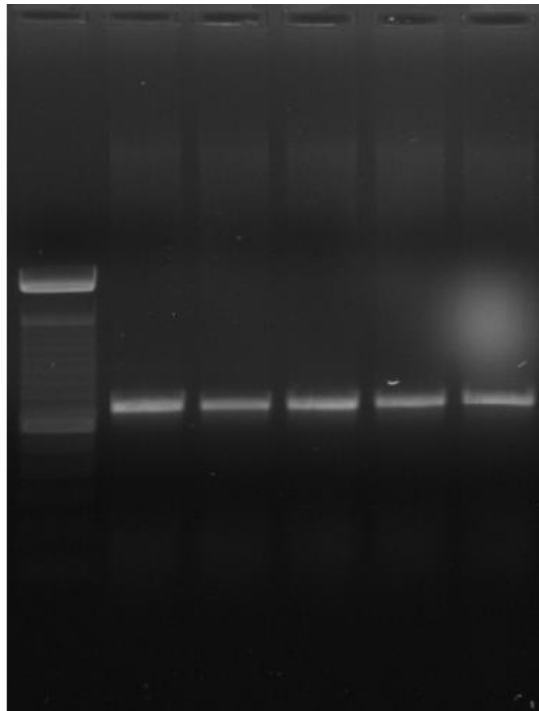


Figura 6. Gel de Electroforesis en Agarosa del producto del PCR del gen *fyuA*



Carril1(lz): marcador de peso molecular (mpm); carriles 2 al 6 producto de PCR en 774 bp.

Figura 7. Gel de Electroforesis en Agarosa del producto del PCR del gen *iucD*.



Carril1(lz): marcador de peso molecular (mpm); carriles 2 al 6 producto de PCR en 714 bp.