

Determinación de la diversidad genética y caracterización de genes de patogenicidad en aislados de *Escherichia coli* en pollos de engorde (*Gallus gallus domesticus*), Azuay, Ecuador

Determination of genetic diversity and characterization of genes associated with virulence from *Escherichia coli* isolates in poultry (*Gallus gallus domesticus*), Azuay, Ecuador

Fabián Manuel Astudillo-Riera^{1*}, Kevin Fabian Astudillo-Vallejo², Ana Cecilia Pérez-Pintado¹, Antonio Javier Vallecillo¹, Sergio Emiro Rivera-Pirela³ y Juan Patricio Pesántez-Vallejo⁴

¹Universidad de Cuenca, Facultad de Ciencias Agropecuarias. Cuenca, Ecuador.

²CEMEVET. Cuenca, Ecuador.

³Universidad de Zulia, Facultad de Ciencias Veterinarias. Maracaibo, Venezuela.

⁴Universidad de Cuenca, Departamento de Recursos Hídricos y Ciencias Ambientales. Cuenca, Ecuador.

*Autor correspondencia: fabian.astudillo@ucuenca.edu.ec

RESUMEN

En la industria avícola, existen diferentes tipos de *Escherichia coli* patógenos y no patógenos, según los genes asociados a virulencia (VAG) presentes en la bacteria. Sin embargo, los reportes sobre la identificación de los VAG de *E. coli* en pollos de engorde son limitados, especialmente en comunidades andinas ecuatorianas. El objetivo principal de este estudio consistió en identificar la diversidad genética y la presencia de VAG en cepas de *E. coli*. Se caracterizaron los VAG en varias granjas de la provincia del Azuay (sur del Ecuador) a partir de 30 aislados de cultivos bacteriológicos provenientes de pollos con signos clínicos de colibacilosis. Se utilizó la técnica de PCR para detectar el gen *uspA* específico de *E. coli* e igualmente los VAG que incluyen adhesinas (*fimC*), exotoxinas (*cvaA*) y sistemas de captación-transporte de hierro (*iucD*; *chuA*; *fyuA*), en cada aislamiento bacteriano. Se tipificaron molecularmente los *E. coli* patógenos mediante la evaluación de las secuencias de politrinucleótidos (GTG)₅. El 83,33 % de los cultivos presentaron el gen *uspA* de *E. coli*. Las frecuencias de VAG positivos fue de 48 % para el gen *chuA*, 20 % para el gen *cvaA*, 84 % para el gen *fimC*, 36 % para el gen *fyuA* y 56 % para el gen *iucD*. La evaluación de las secuencias (GTG)₅ reveló dos grupos filogenéticos principales de *E. coli*, los cuales, en su mayoría portan al menos un gen VAG. Estos resultados contribuyen a un diagnóstico preciso de la colibacilosis, su control y tratamiento eficaz por parte de los avicultores.

Palabras clave: Colibacilosis aviar; cultivos bacteriológicos; politrinucleótidos (GTG)₅; filogenéticos; VAG

ABSTRACT

In the poultry industry there are different types of pathogenic and non-pathogenic *Escherichia coli*, depending on the virulence associated genes (VAG) present in the bacteria. However, there are no reports for the area on the identification of *E. coli* VAG in broiler chickens especially in Ecuadorian andean communities. The main objective of this study was to identify the genetic diversity and the presence of VAG in *E. coli* strains. In this study, *E. coli* VAG were characterized in the Azuay Province (Ecuador) using isolates from 30 bacteriological cultures from chickens with clinical signs of colibacillosis. The PCR technique was used to detect the *uspA* gene (specific from *E. coli*) and also the GAV of adhesins (*fimC*), exotoxins (*cvaA*) and iron uptake-transport systems (*iucD*; *chuA*; *fyuA*) in each bacteria isolate. Pathogenic *E. coli* were molecularly typed by evaluating polytrinucleotide (GTG)₅ sequences. The 83.33 % of the cultures presented the *uspA* gene from *E. coli*. The frequencies of positive VAG were 48 % for the *chuA* gene, 20 % for the *cvaA* gene, 84 % for the *fimC* gene, 36 % for the *fyuA* gene and 56 % for the *iucD* gene. Sequence evaluation (GTG)₅ revealed two main phylogenetic groups of *E. coli* most of which carried at least one VAG gene. These results contribute to a more precise diagnosis of colibacillosis, as well as to its control and treatment by poultry farmers.

Key words: Avian colibacillosis; bacteriological cultures; politrinucleotides (GTG)₅; phylogenetic; VAG

INTRODUCCIÓN

En la industria avícola, la colibacilosis causada por la bacteria *Escherichia coli*, es considerada la afección más frecuente en avicultura causante de importantes pérdidas económicas [23], pudiéndose presentar además como septicemia colibacilar [33, 34]. La gran variedad de formas de presentación de la enfermedad se debe a las distintas variantes antigénicas de *E. coli* patogénica aviar (APEC, por sus siglas en inglés Avian Pathogenic *Escherichia coli*) dada la diversidad de antígenos (O, K, H y F) que posee serotipos (O1; O2; O35 y O78) identificados, presentes en el 75 % de las cepas APEC [3, 18].

El daño potencial de las APEC depende de la expresión de genes codificantes de factores de virulencia (VAG). Los VAG pueden codificar adhesinas, diferentes toxinas, proteínas captadoras de hierro, que constituyen factores de virulencia para varias especies animales incluyendo los seres humanos [18, 31]. Las bacterias poseen medios para fijarse a un tejido, lo cual se denomina adherencia, necesitan captar hierro para su crecimiento y pueden producir algunas toxinas cuando captan concentraciones bajas de hierro [3]. Estos factores de virulencia producen alta mortalidad característica de esta entidad nosológica.

Los VAG son diversos: *astA* (codifica arginina succiniltransferasa A), *chuA* (codifica la proteína A de hemeutilización de *E. coli*), *cvaA/B* (codifica colicina VA/B), *fimC* (codifica para fimbrias de unión a manosa tipo 1), *fyuA* (codifica proteínas para la captación A de yersiniabactina férrica), *irp2* (codifica para proteínas de alto peso molecular reprimibles con Hierro 2), aumento de la supervivencia sérica (*iss*), sistemas de absorción de hierro de *E. coli* D (*iucD*), pielonefritis asociada a pili C (*papC*), hemaglutinina sensible a la temperatura (*TSH*) y toxina vacuolante autotransporter (*IVA*). De los anteriores, los más prevalentes en las APEC son los genes *fimC*, *cvaA*, *iucD*; *chuA*, *fyuA* [6, 8, 27]. En general, para que un aislado bacteriano sea considerado patógeno es necesaria la presencia de al menos un factor de adhesión, uno de adquisición de hierro y otro de resistencia sérica. [8]. Actualmente se han descrito alrededor de 23 tipos potencialmente patógenos de *E. coli*, identificados mediante técnicas de Reacción en Cadena a la Polimerasa (PCR) [9, 10, 20], lo cual, podría permitir desarrollar nuevas alternativas de tratamiento, tomando en cuenta los VAG específicos [4, 7].

Para desarrollar estos diagnósticos moleculares adecuados de la incidencia de variantes patógenas de *E. coli* en la industria aviar, se requiere la identificación de marcadores moleculares adecuados. En primer lugar, una prueba basada en la PCR para diferenciar *E. coli* de otras bacterias Gram negativas emplea cebadores derivados de las secuencias de nucleótidos que flanquean el gen que codifica la proteína *uspA* y es altamente específico para *E. coli* [5]. La proteína *uspA* en *E. coli* K-12 ha sido identificada como una proteína de estrés universal y su síntesis por la bacteria se induce en respuesta a un gran número de fuentes de estrés [24]. En segundo lugar, para el análisis de la diversidad genética de las diferentes cepas de *E. coli* se ha determinado que el método (GTG)₅-PCR posee mayor potencial para la diferenciación de *E. coli* fecal aislada de humanos, aves de corral y silvestres lo que lo hace el más adecuado para la tipificación molecular de estas cepas [20].

En particular, en Ecuador se ha observado que los manejos de las granjas avícolas no se ajustan a las mejores prácticas de bioseguridad establecidas por los entes estatales reguladores [22]. Esto incrementa las probabilidades de proliferación de *E. coli* y que el control de la misma por parte de los avicultores se vea comprometida,

aumentando incluso su resistencia a antibióticos por el uso empírico de los mismos, subdosificaciones, empleo de antibióticos como profilácticos [32].

En países altamente industrializados, esta patología puede llevar a pérdidas millonarias, con impactos económicos altamente negativos [25]. Hasta la presente fecha en Ecuador, la información se limita a estudios que analizan la resistencia de la bacteria a antibióticos [22] o su prevalencia [13], sin profundizar el estudio de los VAG y el potencial patógeno de las cepas aisladas. El análisis de los VAG debe aportar información valiosa al productor, que conlleve a un mejor control de la colibacilosis aviar y proporcionar una mejoría en el bienestar animal [21].

El objetivo principal de este estudio consistió en identificar la diversidad genética y la presencia VAG en cepas de *E. coli* aisladas de casos de colibacilosis en pollos (*Gallus gallus domesticus*) de engorde en la provincia del Azuay (Ecuador).

MATERIALES Y MÉTODOS

Material biológico

Se colectaron 50 muestras con hisopos estériles de exudados de órganos de pollos de engorde con signos clínicos de colibacilosis aviar como aerosaculitis, perihepatitis, pericarditis y sinovitis articular, de granjas localizadas en la provincia del Azuay (Ecuador), transportadas en medios apropiados como el Stuart, procesadas y almacenadas a 4°C en el laboratorio de Biología Molecular de la Facultad de Ciencias Agropecuarias de la Universidad de Cuenca (Ecuador). Se trabajó con 30 aislados de *E. coli*, identificados fenotípicamente en dicho laboratorio; para ello se sembró por la técnica de agotamiento la muestra en agar nutritivo, se caracterizó macroscópicamente las muestras homogéneas de acuerdo a tamaño, color y forma: colonias pequeñas, circulares, blanquecinas y de consistencia cremosa. Las muestras también fueron sometidas a la Tinción de Gram.

Extracción de ADN de las cepas de *E. coli*

Cada aislado de *E. coli* se inoculó (50 microlitros - μ L-) en 5 mililitros -mL- de caldo nutritivo y fue incubado por 24 horas a 37°C. Finalizado el periodo de incubación, se centrifugó los caldos con crecimiento bacteriano, a 12.000 G por 20 minutos -min-) (Centrífuga Eppendorf 5430 R, Eppendorf, Alemania) en tubos de 1,5 mL, se eliminó el sobrenadante y el sedimento (paquete celular) se mezcló con 175 μ L de solución tampón de lisis [5 mL de NaCl (1 M), 5 mL de Sucrosa (1 M), 5 mL de Tris (1 M), 2,5 mL de EDTA (1 M) y 2,5 mL de SDS (10%)]. Se agregaron 3,5 μ L de lisozima y se incubó a 37°C por 60 min. Posteriormente, se añadieron 20 μ L de dodecilsulfato de sodio y 1 μ L de proteinasa K, se incubó a 55°C por 90 min (Incubadora bacteriológica Selecta, 3000957, Selecta, España) obteniéndose de esta manera la solución de lisado (SL). Para llevar a cabo, propiamente, la extracción del Ácido desoxirribonucleico -ADN- total, a la SL se le agregó el mismo volumen, de una solución de fenol, cloroformo y alcohol isoamílico (25:24:1), se agitó (Agitador Vortex TP - Laboratorio México) y centrifugó a 14.000 G por 5 min a temperatura ambiente. Se rescató el sobrenadante de la emulsión obtenida, se colocó en un nuevo tubo, se añadió 2,5 volúmenes de etanol absoluto y centrifugó a 14.000 G por 5 min se eliminó el sobrenadante, se añadió 1 mL de etanol al 70 % y se centrifugó a 14.000 G por 3 min. Se eliminó el sobrenadante y se dejó secar en el fondo del tubo el sedimento con el ADN. Se le agregaron entre 50 y 100 μ L de agua ultra pura, desionizada, para aplicaciones en biología molecular y se obtuvo el ADN total (ADNt) y se almacenó a -20°C (Congelador Indurama, Dos P, Indurama, Ecuador) hasta su uso.

Ensayo de PCR para la detección del gen *uspA* de *E. coli*

Se realizó un ensayo de PCR para la detección del gen *uspA* con el fin de confirmar molecularmente la identificación de *E. coli*. Se preparó la mezcla de reacción para la PCR con 19,25 µL de agua ultra pura, desionizada, 2,5 µL de solución tampón (10X) para PCR, [200 milímetros -mm- de Tris HCl (con un pH de 8,4) y 500 milimolar -mM- de KCl, 0,25 µL de 10 mM dNTP's c/u, 1 µL de 50 mM MgCl₂, 0,2 µL de 100 micromolar -µM- Oligo *uspA*-For: 5'-CCGATACGCTGCCAATCAGT-3', 0,2 µL (100 µM) Oligo *uspA*-Rev: 5'-ACGCAGACCGTAGGCCAGAT-3' [5], 0,2 µL de enzima Taq DNA polimerasa de 5 unidades por microlitros (U·µL⁻¹) y 2 µL de muestra de ADN, 25 nanogramos por microlitro (ng·µL⁻¹) para un volumen total de 25,6 µL [25].

La mezcla se homogenizó en un vórtex por 4-6 segundos (seg) y luego se centrifugó a 14.000 G por 15-20 seg. Los tubos con las mezclas de reacción correspondiente a cada muestra se colocaron en un termociclador Eppendorf (Modelo: Nexus GSX1) y fueron sometidos al siguiente perfil de temperatura: desnaturalización inicial 94°C por 4 min, 35 ciclos de: desnaturalización por 30 seg a 94°C, alineamiento por 25 seg a 65°C, extensión por 45 seg a 72°C y extensión final por 5 min a 72°C. Los productos de las reacciones de PCR se resolvieron en un gel de agarosa-TAE al 1,2 % teñido con bromuro de etidio, entre 20 a 100 voltios -V- Para la detección del gen *uspA* de *E. coli* la visualización en el fotodocumentador (Bio Rad, Modelo: Gel Doc XR+, EUA) de un producto de PCR de aproximadamente 884 pares de bases -pb- se consideró positivo (FIG. 1) [25]. Se utilizó como control positivo material genético de la cepa *E. coli* Top10F⁺ y agua como control negativo.

Detección de genes codificantes de factores de virulencia de *E. coli*

Con los ADN positivos de los cultivos al gen *uspA* de *E. coli* se realizó un nuevo ensayo de PCR para identificar los genes de virulencia existentes en las cepas aisladas. Se buscaron cinco genes codificantes de factores de virulencia: *fimC* (adhesinas), *cvaA* (exotoxinas) y *iucD*, *chuA* y *fyuA* (proteínas del sistema de captación-transporte de hierro).

Se preparó la mezcla de PCR según la descripción en el apartado anterior, más los oligonucleótidos para cada mezcla de acuerdo al gen que se desee realizar la técnica de PCR. Los cebadores incorporados para cada mezcla se detallan en la TABLA I.

La mezcla se homogenizó en un vórtex por 10 seg y luego se centrifugó en una nanocentrífuga para colectar el contenido de la mezcla de los tubos con las mezclas a amplificar, se colocaron en el termociclador (Eppendorf Modelo: Nexus GSX1, Bio Lab, España) y fueron sometidos al perfil de temperatura presentados en la TABLA II, de acuerdo a las necesidades de cada reacción.

Los productos de las reacciones de PCR se resolvieron en un gel de agarosa-TAE al 1 % teñido con bromuro de etidio (0,3 µg·mL⁻¹). La visualización de las bandas electroforéticas producto de la amplificación PCR, cuyos tamaños (pb) esperados están indicadas en la TABLA I, fueron consideradas como presencia del gen que codifican para factores de virulencia de *E. coli*, usando un marcador de peso molecular con catálogo número 15628050 (FIG. 1).

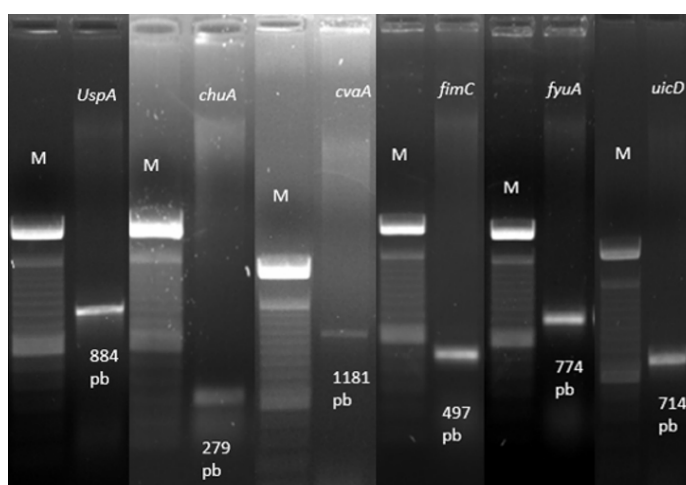


FIGURA 1. Análisis a través de electroforesis en gel agarosa de los productos amplificados por PCR de los genes *uspA*, *chuA*, *cvaA*, *fimC*, *fyuA* e *iucD*. con un marcador de peso molecular (M: 100bp DNA Ladder, Invitrogen, N°. Cat. 15628050)

**TABLA I
CEBADORES EMPLEADOS PARA DETECTAR LA SECUENCIA DE LOS CINCO
GENES PORTADORES DE FACTORES DE VIRULENCIA PARA *E. coli***

Gen	Cebador (5'-3') F1/R2*	Tamaño del producto PCR (pb)**	Genes Codificados	Referencia
<i>iucD</i>	F: ACAAAAAGTTCTATCGCTTCC R: CCTGATCCAGATGATGCTC	714	Transporte de hierro	Ewers y col. (2005)
<i>cvaA</i>	F: GGTAGAATGTGCCAGAGCAAG R: GAGCTGTTTGTAGCGAAGCC	1181	Exotoxinas	
<i>chuA</i>	F: GACGAACCAACGGTCAGGAT R: TGCCGCCAGTACCAAAGACA	279	Transporte de hierro	Saiki y col. (1987)
<i>fimC</i>	F: GGGTAGAAAATGCCGATGGTG R: CGTCATTTTGGGGTAAGTGC	497	Adhesinas	Ozaki y col. (2004)
<i>fyuA</i>	F: GCGACGGGAAGCGATGACTTA R: CGCAGTAGGCACGATGTTGTA	774	Transporte de hierro	

* F: forward, R: reverse. **pb: pares de bases

TABLA II
PERFILES DE TIEMPO Y TEMPERATURA USADOS EN LA AMPLIFICACIÓN DE
LOS CINCO GENES ASOCIADOS A VIRULENCIA DE *E. coli*

Etapas y Genes	Desnaturalización		25 ciclos		Extensión Final
	Inicial	Desnaturalización	Alineamiento	Extensión	
Gen <i>iucD</i>					
Temperatura	94°C	94°C	59,4°C	72°C	72°C
Tiempo	4 min	30 seg	25 seg	45 seg	5 min
Gen <i>cvaA</i>					
Temperatura	94°C	94°C	60,6°C	72°C	72°C
Tiempo	4 min	40 seg	25 seg	50 seg	5 min
Gen <i>chuA</i>					
Temperatura	94°C	94°C	65°C	72°C	72°C
Tiempo	4 min	30 seg	25 seg	30 seg	5 min
Gen <i>fimC</i>					
Temperatura	94°C	94°C	60,6°C	72°C	72°C
Tiempo	4 min	30 seg	20 seg	30 seg	5 min
Gen <i>fyuA</i>					
Temperatura	94°C	94°C	60,6°C	72°C	72°C
Tiempo	4 min	30 seg	25 seg	45 seg	5 min

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

Con los ADN de *E. coli*, se realizó un nuevo ensayo de (GTG)₅-PCR para determinar la diversidad de cepas existentes en los cultivos recolectados, mediante la localización de la secuencia politrinucleotídica (GTG)₅.

Se preparó una mezcla, con las siguientes características: 19,25 µL agua ultra pura desionizada, 2,5 µL (10X) de tampón de PCR, 0,5 µL de dNTP's [10 mM c/u], 1,5 µL de MgCl₂ (50 mM), 0,5 µL de Oligo (GTG)₅: 5'-GTG GTG GTG-3' (100 µM), 0,25 µL de enzima Taq DNA polimerasa (5 U·µL⁻¹) y 2 µL de muestra de ADN (25 ng·µL⁻¹) para un volumen total de 25 µL. La mezcla se homogenizó en un vórtex por 10 seg y luego se centrifugó a 12.000 G por 10 min.

Los tubos con las muestras a amplificar, se colocaron en el termociclador y fueron sometidos al siguiente perfil de temperatura: desnaturalización inicial 95°C por 2 min, 35 ciclos de desnaturalización por 3 min 30 seg a 92-94°C, alineamiento por 60 seg a 40°C extensión por 8 min a 65°C y extensión final por 8 min a 65°C.

Los productos de las reacciones de PCR se resolvieron mediante electroforesis en un gel de agarosa-TAE al 1,5 % teñido con bromuro de etidio (0,3 µg·mL⁻¹), entre 20 a 100 V, acompañado con una cepa de vacuna comercial como control. La visualización del producto de PCR fue fotodocumentada y las localizaciones de cada banda (pb) fueron consideradas como expresión de diversidad de las cepas de *E. coli*. evaluadas. El dendograma de (GTG)₅-PCR de cepas de *E. coli* se realizó mediante el método UPGMA (Unweighted Pair-group Method with Arithmetic) del programa PyElph (sistema de aplicación de software para análisis de imágenes de gel y filogenética con la técnica (GTG)₅ [21, 31].

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

En 25 de los 30 aislamientos (83.33 %) se observó la banda electroforética correspondiente a la detección del gen *uspA* exclusivo de la bacteria *E. coli*, significa que la caracterización fenotípica puede conllevar a la identificación de falsos positivos para *E. coli*. De los factores de virulencia (VAG) objeto de estudio, TABLA III, el gen *fimC*, relacionado con la capacidad de adherencia de la bacteria, se visualizó en el 84 % de los aislamientos (21/25), en concordancia con Kvint y col. [16], quienes encontraron que el gen *fimC* constituye el perfil más común que caracteriza a APEC. Los genes relacionados con la adquisición de hierro se encontraron en los siguientes porcentajes *iucD* 56 % (14/25), *chuA* 48 % (12/25), *fyuA* 36 % (9/25), en contra posición a la mayor prevalencia reportada por Márquez-Quiroz y col. [18] con un 95.6 % presentes en más del 60 % de APEC, y el gen *cvaA*, con una presencia del 20 % (5/25), mientras que De Carli y col. [8] detectaron en aislamientos de *E. coli* un 42 % del mismo gen.

El análisis de diversidad genética (GTG)₅ reveló que existen 2 grupos filogenéticos principales (FIG. 2), los cuales en su mayoría tienen al menos un VAG, También se determinó la relación filogenética existente entre los VAG de las cepas de *E. coli* como lo demuestra la FIG. 3.

Este estudio indica que los aislados de *E. coli* de casos de colibacilosis en pollos de engorde en la Provincia de Azuay (Ecuador)

TABLA III
RESULTADOS DEL GEN *uspA* Y VAG 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 (83,33 %)	12 (48 %)	5 (20 %)	21 (84 %)	9 (36 %)	14 (56 %)

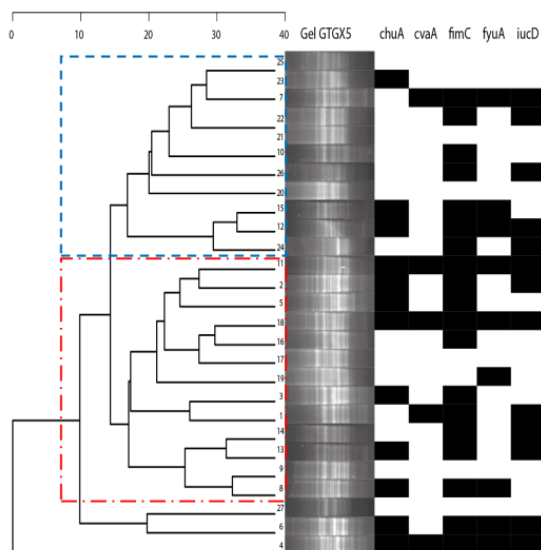


FIGURA 2. Dendrograma de (GTG)₅-PCR de las 25 cepas de *E. coli* estudiadas en función de su similitud en el patrón de bandas (GTG)₅. Se observan dos grupos genéticos, 1 y 2, identificados con barras verticales. A la derecha se indica para cada cepa la presencia de cada factor de virulencia, mediante un rectángulo negro

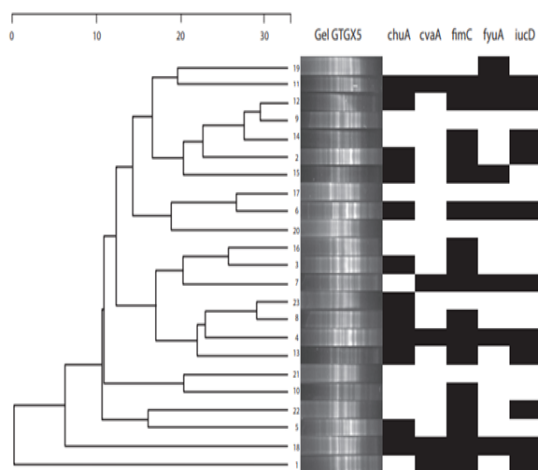


FIGURA 3. Dendrograma de (GTG)₅-PCR demostrando la relación filogenética de los VAG

tuvieron un alto grado de patogenicidad con características de bacterias APEC. Existe una relación entre los serotipos y la virulencia que expresan, unos presentan todos los VAG, otros dos o tres, incluso algunos no manifiestan su presencia. Los tratamientos actuales en la región, están basados en su mayoría en el diagnóstico de infección por *E. coli* mediante la detección de serotipos y cultivos, lo cual está desaconsejado, ya que son pruebas poco sensibles y específicas [1, 2, 12, 16, 17, 27]. En este estudio, el uso de la técnica de PCR podría suponer una mejora sustancial en el diagnóstico, pues permitió identificar con éxito la presencia del gen *uspA* exclusivo de la bacteria *E. coli*.

Mediante la técnica de PCR se detectó además el gen *fimC*, relacionado con la capacidad de adherencia de la *E. coli*, el cual estuvo presente con el mayor porcentaje de los aislamientos positivos de este estudio. Estos resultados se correlacionan con otras evaluaciones genotípicas de los VAG de *E. coli* patógena en pollos de engorde, que también identifican el gen *fimC* como el más frecuente [27].

La presencia de uno o más genes *iucD*, *chuA*, *fyuA* relacionados con los sistemas de captación y transporte de hierro del medio celular, podría anular la presencia de APEC en diferentes condiciones ambientales. Esto debido a que la capacidad 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 [25, 33].

La mayoría de los estudios de seguimiento de la fuente microbiana (MST) para la identificación de la procedencia de los aislados de *E. coli* han utilizado los cebadores rep-PCR junto con el cebador (GTG)₅ [(GTG)₅-PCR] producen patrones de huellas genéticas más discriminativas y complejos que los cebadores REP, ERIC y BOX A1R durante la tipificación molecular de las especies de *Enterococcus* [30], *Lactobacillus* [11] y *Salmonella* [28]. Se reportó que el índice de discriminación de Simpson para *E. coli* [14] fue más alto (93,68 %) con (GTG)₅-PCR, seguido de BOX-PCR (91,23 %), REP-PCR (89,33 %), ERIC-PCR (84,69 %) y ERIC2-PCR (79,38 %) y que, la (GTG)₅-PCR produjo números de banda de 10 a 25 [20]. Se confirma la mayor precisión de (GTG)₅-PCR, en comparación con BOX-PCR [15]. También hay que resaltar el método de diagnóstico como es el uso de sondas para la hibridación en fase sólidas, estas sondas son fragmentos pequeños de ADN que contienen parte de los genes que codifican para algún factor de virulencia [29].

El análisis de conglomerados basado en el coeficiente de similitud de Pearson con las huellas genéticas de ADN (GTG)₅-PCR de aislados de *E. coli* fecal de aves de corral y aves de vida libre después de la exclusión de los aislados clonales mostró un dendrograma agrupando 417 aislamientos en dos grupos principales que separan los aislamientos del grupo de aves de corral (pollo, pato y pavo) de los aislamientos del grupo de aves silvestres (ganso, gaviota, halcón, urraca y pájaro cantor). Un grupo definido con un nivel de similitud > 80 % podría producir una buena diferenciación entre las fuentes de hospedadores [19, 26].

En un estudio realizado por Mohapatra y col. [18] para comparar diferentes técnicas para la diferenciación de *E. coli* en humanos, aves y cerdos (*Sus scrofa domestica*), concluyeron que la mejor técnica para realizar esta diferenciación era (GTG)₅, seguida por otros métodos de detección molecular. Adicionalmente, los autores concluyeron que esta 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 [19].

El análisis (GTG)₅-PCR de este grupo de 25 aislamientos de *E. coli* en pollos de carne con signología de colibacilosis, reveló la existencia de dos grupos filogenéticos principales, los cuales en su mayoría tienen al menos un gen VAG, pudiendo tener su origen en diferentes hospedadores principalmente pollos de corral y aves silvestres.

CONCLUSIONES

La presencia de secuencias del gen *uspA* y de los VAG en los cultivos de hiposados provenientes de pollos de engorde con signología característica de colibacilosis, en granjas avícolas de Azuay, Ecuador, confirman la presencia de *E. coli* patógena.

Se diferenciaron dos grupos filogenéticos con una distribución heterogénea de cinco de los genes que codifican los VAG en cultivos de *E. coli*. de los aislados, en función de su similitud de bandas (GTG)₅, correspondientes probablemente a cepas bacterianas de orígenes distintos, procedentes de aves silvestres u otros reservorios de la bacteria.

AGRADECIMIENTOS

La identificación molecular de *E. coli* patógenas se realizó gracias al apoyo del laboratorio de Biología Molecular de la Facultad de Ciencias Agropecuarias de la Universidad de Cuenca, Ecuador.

Conflictos de intereses

No existen conflictos de intereses.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- [1] AHMED, A.M.; SHIMAMOTO, T. Molecular analysis of multidrug resistance in Shiga toxin-producing *Escherichia coli* O157:H7 isolated from meat and dairy products. **Internat. J. Food Microbiol.** 193: 68-73. 2015. <https://doi.org/f6vqsn>.
- [2] ALI, A.; ABDEL-MAWGOUD, A.; DAHSHAN, A.; ELSAWAH, A.; NASSEF, S. *Escherichia coli* in broiler chickens in Egypt, its virulence traits and vaccination as an intervention strategy. **Novel Res. Microbiol. J.** 3: 415-427. 2019. <https://doi.org/j697>.
- [3] CALNEK, B.W.; BARNES, H.J.; BEARD, C.W.; REID, W.M.; YODER Jr, H.W. Micoplasmosis. **Enfermedades de las Aves**. 2ª Ed. Manual Moderno. México, DF, México. Pp 198-230. 2000.
- [4] CÁRDENAS-PEREA, M. E.; CRUZ Y LÓPEZ, O.R.; GÁNDARA-RAMÍREZ, J.L.; PÉREZ-HERNÁNDEZ, M.A. Factores de virulencia bacteriana: la "inteligencia" de las bacterias. **Elementos**. 21(94): 35-43. 2014.
- [5] CARRANZA, C.; LEÓN, R.; FALCON, N.; NEUMANN, A.; KROMM, C. Caracterización y distribución de cepas de *Escherichia coli* potencialmente patógenas aisladas de pollos broiler de explotaciones avícolas en el Perú. **Rev. Invest. Vet. Perú**. 23(2): 209-219. 2012.
- [6] CHEN, J.; GRIFFITHS, M. W. PCR differentiation of *Escherichia coli* from other gram-negative bacteria using primers derived from the nucleotide sequences flanking the gene encoding the universal stress protein. **Lett. in Appl. Microbiol.** 27(6): 369-371. 1998. <https://doi.org/j7b4>
- [7] CLERMONT, O.; BONACORSI, S.; BINGEN, E. Rapid and simple determination of the *Escherichia coli* phylogenetic group. **Appl. Environ. Microbiol.** 66(10): 4555-4558. 2000. <https://doi.org/ckvvd2>.
- [8] DE CARLI, S.; IKUTA, N.; LEHMANN, F.K.; DA SILVEIRA, V.P.; DE MELO-PREDEBON, G.; FONSECA, A.S.; LUNGE, V.R. Virulence gene content in *Escherichia coli* isolates from poultry flocks with clinical signs of colibacillosis in Brazil. **Poult. Sci.** 94(11): 2635-2640. 2015. <https://doi.org/j7b7>.
- [9] EWERS, C.; LI, G.; WILKING, H.; KIESSLING, S.; ALT, K.; ANTÃO, E.M.; LATURNUS, C.; DIEHL, I.; GLODDE, S.; HOMEIER, T.; BÖHNKE, U.; STEINRÜCK, H.; PHILIPP, H.C.; WIELER, L.H. Avian pathogenic, uropathogenic, and newborn meningitis-causing *Escherichia coli*: how closely related are they? **Int. J. Med. Microbiol.** 297(3): 163-176. 2007. <https://doi.org/dt5mjp>.
- [10] EWERS, C.; JANSSEN, T.; KIESSLING, S.; PHILIPP, H.C.; WIELER, L.H. Molecular epidemiology of avian pathogenic *Escherichia coli* (APEC) isolated from colisepticemia in poultry. **Vet. Microbiol.** 104(1-2): 91-101. 2004. <https://doi.org/crj85b>.
- [11] EWERS, C.; JANSSEN, T.; KIESSLING, S.; PHILIPP, H.C.; WIELER, L.H. Rapid detection of virulence-associated genes in avian pathogenic *Escherichia coli* by multiplex polymerase chain reaction. **Avian Dis.** 49(2): 269-273. 2005. <https://doi.org/ftdh7c>.
- [12] GEVERS, D.; HUYS, G.; SWINGS, J. Applicability of rep-PCR fingerprinting for identification of *Lactobacillus* species. **F.E.M.S. Microbiol. Lett.** 205: 31-36. 2001. En línea. <https://doi.org/dxjm34>.
- [13] GUILVOU, I.; CARNIEL, E.; PUGSLEY, A.P. *Yersinia* spp. HMWP2, a cytosolic protein with a cryptic internal signal sequence which can promote alkaline phosphatase export. **J. Bacteriol.** 177(7): 1780-1787. 1995. En línea. <https://doi.org/j7cd>.
- [14] HUNTER, P.R.; GASTON, M.A. Numerical index of the discriminatory ability of typing systems: an application of Simpson's index of diversity. **J. Clin. Microbiol.** 26: 2465-2466. 1998.
- [15] KHEIRI, R.; AKHTARI, L. Clonal Heterogeneity and Efficacy of BOX and (GTG)₅ Fingerprinting Methods for Molecular Typing of *Escherichia coli* Isolated from Chickens in IRI. **Kafkas Univ. Vet. Fakultesi Dergisi**. 23(2): 219-225. 2016. <https://doi.org/j7cf>.
- [16] KVINT, K.; NACHIN, L.; DIEZ, A.; NYSTRÖM, T. The bacterial universal stress protein: function and regulation. **Curr. Opin. Microbiol.** 6(2): 140-145. 2003. <https://doi.org/brwr4v>.
- [17] KWAGA, J.K.; ALLAN, B.J.; VAN DER HURK, J.V.; SEIDA, H.; POTTER, A. A carAB mutant of avian pathogenic *Escherichia coli* serogroup O2 is attenuated and effective as a live oral vaccine against colibacillosis in turkeys. **Infect. Immun.** 62(9): 3766-3772. 1994. <https://doi.org/j7cg>.
- [18] MÁRQUEZ-LÓPEZ, V.H.; QUIROZ-SERRANO, I.; MIRANDA-DELGADO, P.; VIDALES-RODRÍGUEZ, L.E.; SÁNCHEZ-RODRÍGUEZ, S.H.; LÓPEZ-LUNA, M.A.; FLORES DE LA T., A.; RAMÍREZ-SANTOYO, R.M. Genes de virulencia y grupo filogenético en aislados de *Escherichia coli* patogénica aviar. **Arch. Med** 14(1-2): 1-5. 2018.
- [19] MOHAMED, L.; GE, Z.; YUEHUA, L.; YUBIN, G.; RACHID, K.; MUSTAPHA, O.; JUNWEI, W.; KARINE, O. Virulence traits of avian pathogenic (APEC) and fecal (AFEC) *E. coli* isolated from broiler chickens in Algeria. **Trop. Anim. Health Prod.** 50(3): 547-553. 2018. <https://doi.org/gc4tzj>.
- [20] MOHAPATRA, B.R.; BROERSMA, K.; MAZUMDER, A. Comparison of five rep-PCR genomic fingerprinting methods for differentiation of fecal *Escherichia coli* from humans, poultry and wild birds. **F.E.M.S. Microbiol. Lett.** 277(1): 98-106. 2007. <https://doi.org/dnrksq>.
- [21] MOHAPATRA, B.R.; BROERSMA, K.; MAZUMDER, A. Differentiation of fecal *Escherichia coli* from poultry and free-living birds by (GTG)₅-PCR genomic fingerprinting. **Int. J. Med. Microbiol.** 298(3-4): 245-252. 2008. <https://doi.org/bhst6x>.

- [22] MONTORO-DASI, L.; VILLAGRA, A.; SEVILLA-NAVARRO, S.; PÉREZ-GRACIA, M.T.; VEGA, S.; MARIN, C. The dynamic of antibiotic resistance in commensal *Escherichia coli* throughout the growing period in broiler chickens: fast-growing vs. slow-growing breeds. **Poult. Sci.** 99(3): 1591-1597. 2020. <https://doi.org/j7ch>.
- [23] MOSER, K.A.; ZHANG, L.; SPICKNALL, I.; BRAYKOV, N.P.; LEVY, K., MARRS, C.F.; EISENBERG, J.N. The role of mobile genetic elements in the spread of antimicrobial-resistant *Escherichia coli* from chickens to humans in small-scale production poultry operations in rural Ecuador. **Amer. J. Epidemiol.** 187(3): 558-567. 2018. <https://doi.org/gc65wm>.
- [24] NOLAN, L.K.; VAILLANCOURT, J.P.; BARBERIE, N.L.; LOGUE, C. "Colibacillosis". **Diseases of Poultry**, 14th. Ed. Section II, Chapter 18. Pp 770-830. 2020.
- [25] NYSTRÖM, T.; NEIDHARDT, F. C. Cloning, mapping and nucleotide sequencing of a gene encoding a universal stress protein in *Escherichia coli*. **Molec. Microbiol.** 6(21): 3187-3198. 1992. En línea. <https://doi.org/czcmjf>.
- [26] OZAKI, H.; MATSUOKA, Y.; NAKAGAWA, E.; MURASE, T. Characteristics of *Escherichia coli* isolated from broiler chickens with colibacillosis in commercial farms from a common hatchery. **Poult. Sci.** 96(10): 3717-3724. 2017. <https://doi.org/gbh9vh>.
- [27] OLIVEIRA, E.; BORZI, M.; BORGUES, C.; GUASTALLI, E.; AVILA, F. Highly Pathogenic and multidrug Resistant Avian Pathogenic *Escherichia coli* in Free-Range Chickens from Brazil. **Brazilian J. Poult. Sci.** 21: 1-8. 2018. <https://doi.org/j7c9>.
- [28] PAIXÃO, A.C.; FERREIRA, A.C.; FONTES, M.; THEMUDO, P.; ALBUQUERQUE, T.; SOARES, M.C.; FEVEREIRO, M.; MARTINS, L.; DE SÁ, M. Detection of virulence-associated genes in pathogenic and commensal avian *Escherichia coli* isolates. **Poult. Sci.** 95(7): 1646-1652. 2016. <https://doi.org/f8sxfh>.
- [29] RASSCHAERT, G.; HOUF, K.; IMBERECHTS, H.; GRIJSPEERDT, K.; DE ZUTTER, L.; HEYNDRICKX, M. Comparison of five repetitive-sequence-based PCR typing methods for molecular discrimination of *Salmonella enterica* isolates. **J. Clin. Microbiol.** 43(8): 3615-3623. 2005. <https://doi.org/dpk5tb>.
- [30] RODRÍGUEZ-ANGELES, G. Principales características y diagnóstico de los grupos patógenos de *Escherichia coli*. **Salud Públ. México.** 44: 464-475. 2002. <https://bit.ly/3KWyy2l>. 08/01/2023
- [31] SVEC, P., VANCANNEYT, M., SEMAN, M., SNAUWAERT, C., LEFEBVRE, K., SEDLÁČEK, I., SWINGS, J. Evaluation of (GTG)₅-PCR for identification of *Enterococcus* spp. **F.E.M.S. Microbiol. Lett.** 247(1): 59-63. 2005. <https://doi.org/bd2d3t>.
- [32] VAN DER WESTHUIZEN, W.A.; BRAGG, R.R. Multiplex polymerase chain reaction for screening avian pathogenic *Escherichia coli* for virulence genes. **Avian Pathol. J. W.V.P.A.** 41(1): 33-40. 2012. <https://doi.org/j7db>.
- [33] VINUEZA-BURGOS, C.; ORTEGA-PAREDES, D.; NARVÁEZ, C.; DE ZUTTER, L.; ZURITA, J. Characterization of cefotaxime resistant *Escherichia coli* isolated from broiler farms in Ecuador. **PLoS One.** 14(4): e0207567. 2012. <https://doi.org/gqwgqg>.
- [34] YOUNIS, G.; AWAD, A.; MOHAMED, N. Phenotypic and genotypic characterization of antimicrobial susceptibility of avian pathogenic *Escherichia coli* isolated from broiler chickens. **Vet. World.** 10(10): 1167-1172. 2017. <https://doi.org/j7dc>.