



UNIVERSIDAD ALAS PERUANAS
FACULTAD DE CIENCIAS AGROPECUARIAS
ESCUELA PROFESIONAL DE MEDICINA VETERINARIA

TESIS

SUSCEPTIBILIDAD ANTIMICROBIANA DE *Escherichia coli* AISLADA DE MUESTRAS DE AVES COMERCIALES EN UN LABORATORIO DE VILLA MARÍA DEL TRIUNFO 2001-2014. LIMA-PERÚ.

Para optar el Título Profesional de
MEDICO VETERINARIO

LISSETH MAGALY LEIVA HERRERA

Bachiller en Medicina Veterinaria

LIMA- PERU

2016

INDICE

	Pag.
Dedicatoria	i
Agradecimiento.....	ii
Resumen.....	iii
Abstract.....	iv
I. Introducción.....	7
II. Marco teórico.....	9
III. Materiales y métodos.....	39
IV. Resultados.....	42
V. Discusión.....	47
VI. Conclusiones.....	51
VII. Recomendaciones.....	52
VIII. Referencias bibliográficas.....	50
ANEXOS	64

DEDICATORIA

Es un privilegio dedicarle este trabajo a mi madre, por su apoyo incondicional y ser mi ejemplo de perseverancia, valentía y amor. A mi padre, porque desde niña me inculco el amor por los animales y fortaleció mis lazos con la ciencia. A mis queridos docentes de la Universidad Alas Peruanas, por su gran labor como educadores de la nueva generación de profesionales.

AGRADECIMIENTO

Agradezco a Dios porque es mi fuerza y quien provee mi espíritu de vida. A mis padres por su amor incondicional, apoyo y confianza. A mi asesor M.V. Hugo Samame por sus valiosas enseñanzas en el desarrollo de mi tesis. A la M.V Lorena Mori por su paciencia y compartir sus conocimientos; asimismo al laboratorio Bioservice S.A. por brindarme los recursos para mi investigación.

Resumen

El presente trabajo de investigación tuvo como objetivo determinar la frecuencia y susceptibilidad antimicrobiana de cepas de *Escherichia coli* aisladas de muestras de aves en el laboratorio Bioservice del 2001 al 2014. El estudio se realizó entre el mes de marzo y octubre del año 2015. Se analizó los aislamientos de la bacteria y los registros de las pruebas de sensibilidad, encontrándose 1 257 fichas clínicas positivas a *E. coli* de aves comerciales, representado una frecuencia relativa de 42,27 %. De estos, los pollos de carne obtuvieron una frecuencia mayor (50,30%) con relación a las gallinas ponedoras (27,10%) y reproductores (28,75%). De los 2034 órganos trabajados, procedentes del aparato respiratorio (senos infraorbitarios, cornetes nasales, tráquea, pulmón), se aisló una frecuencia mayor de *E. coli* en cornetes nasales (37,59%) y tráquea (31,24%); de 871 órganos del aparato digestivo, se obtuvo moderada frecuencia de *E. coli* en intestinos (25,41%) y saco vitelino (23,87%) y 58 cepas de *E. coli* de otros órganos. Las cepas presentaron sensibilidad antimicrobiana a la espectinomicina (69,93 %), cloranfenicol (49,49%) y colistina (35,06%). La neomicina (38,20%), ceftiofur (30,91%) y furaltadona (20,05%) presentaron sensibilidad intermedia. Entre los antibióticos que reportaron mayor nivel de resistencia se encuentran la clortetraciclina (96,79%), ciprofloxacina - doxiciclina (91,84%), lincomicina (85,71%), amoxicilina (83,89%) y oxitetraciclina (83,53%).

Palabras clave: *Escherichia coli*, aves, susceptibilidad antimicrobiana.

Abstract

The aim of this study was to determine the *E.coli* frequency of avian samples and their antimicrobial susceptibility in Bioservice laboratory from 2001 to 2014. The study was developed during March and October from 2015, analyzing the bacterial isolation and the sensibility test files. 1 257 clinical files were *E.coli* positive to avian samples, representing the 42,27% relative frequency. Chicken had the high frequency (50,30%) in contrast to laying hens (27,10%) and breeders (28,75%). 2 034 organs from the avian respiratory tract (infraorbital sinuses, nasal turbinates, trachea, lung and air sacs) were *E.coli* positive, *E. coli* isolation from the nasal turbinate (37,59%) and trachea (31,24%) had a high frequency. 871 organs from the avian digestive system were *E.coli* positive, *E. coli* isolation from the gut (25,41%) and yolk sacs (23,87%) had a moderate frequency; and 58 strains isolated from other organs. *E.coli* strains were sensitive to spectinomycin (69,93%), chloramphenicol (49,49%) and colistin (35,06%). *E.coli* strains show moderate rates of sensitivity to neomycin (38,20%), ceftiofur (30,91%) and furaltadone (20,05%). The antibiotics with high resistance levels were chlortetracycline (96,79%), ciprofloxacin - doxycycline (91,84%), lincomycin (85,71%), amoxicillin (83,89%) and oxytetracycline (83,53%).

Linked words: *Escherichia.coli*, fowl, antimicrobial susceptibility.

I. INTRODUCCIÓN

Escherichia coli es considerado como un habitante universal del intestino del hombre y los animales. Muchos investigadores han reconocido a la bacteria como patógeno oportunista, debido que algunas cepas desarrollan factores de virulencia y llegan a causar enfermedad intestinal e infecciones extraintestinales.

En los últimos años, las infecciones producidas por *Escherichia coli* en Aves comerciales han aumentado. La infección con *Escherichia coli* patogénica aviar (APEC) generalmente comienza con una infección localizada de los sacos aéreos (aerosaculitis) o la enfermedad de los sacos aéreos en la cual se disemina a otros órganos internos resultando en una infección septicémica.

Esta enfermedad ocasiona un grave problema de salud animal y considerables pérdidas económicas en la avicultura mundial, sobre todo en la producción de pollo de engorda debido a la falta de desarrollo de las aves por decomisos en los rastros, por el uso limitado de vacunas experimentales y por el alto costo del tratamiento.

A nivel mundial se han realizado estudios sobre la caracterización fenotípica y genotípica de los aislamientos de *Escherichiacoli* mediante técnicas inmunológicas, serológicas, bioquímicas y moleculares. Sin embargo, es necesario generar conocimientos sobre la frecuencia de esta bacteria en nuestro país, analizar su presencia y los factores que acompañan a la presentación de la enfermedad, asimismo monitorizar la evolución de la resistencia bacteriana en los últimos años.

Por lo tanto, el presente estudio busca enriquecer el campo de la epidemiología molecular, contribuyendo a proporcionar una visión sobre la susceptibilidad antimicrobiana de *E. coli* en nuestro país.

II. MARCO TEÓRICO

6.1 . Generalidades sobre *Escherichia coli*

Escherichiacoli es uno de los principales habitantes del tracto intestinal del hombre y de la mayoría de las especies animales. Se caracteriza por ser un grupo de bacterias genéticamente heterogéneo, cuyas cepas son no-patógenas. Sin embargo, una pequeña proporción de este grupo lo constituyen importantes patógenos intestinales y extraintestinales, causantes de enfermedades de distribución mundial, tanto para el hombre como para los animales (1).

Es un bacilo gram negativo, anaerobio facultativo, la mayoría de cepas son móviles, ya que poseen flagelos peritricos y a menudo también fimbrias. Pertenece a la familia Enterobacteriaceae, son fermentadores de glucosa, carecen de la enzima citocromo oxidasa y reducen el nitrato a nitrito (2-5).

Tradicionalmente las cepas de *E. coli* son serotipadas sobre la base de sus perfiles de antígeno somático (O), flagelar (H) y capsular (K) (6). Por otro parte, las cepas de *E.coli* patogénicas pueden ser clasificados como *E. coli* diarrogénicas o *E. coli* extraintestinales. Seis patotipos: *E. coli* enterohemorrágica (EHEC), *E. coli* enteropatógena (EPEC), *E. coli* enterotoxigénica (ETEC), *E. coli* enteroinvasiva (EIEC), *E. coli* enteroagregativa (EAEC), *E. coli* de adherencia difusa (DAEC), son diarrogénicas y 2 patotipos: *E. coli* uropatógena (UPEC) y *E. coli* causante de meningitis neonatal (MNEC), son los aislados más comunes de *E. coli* extraintestinales (7).

En animales, los más importantes patotipos son ETEC, EPEC, *E. coli* productora de shigatoxina (STEC) y *E. coli* patogénica extraintestinal (ExPEC) (8). Un patotipo adicional en

animales, conocido como *E. coli* patógeno aviar (APEC), produce infecciones extraintestinales como infección respiratoria, pericarditis y septicemia en aves comerciales(7).

6.2. Métodos de diagnóstico

6.3.1. Técnicas de cultivo

El Agar Mac Conkey es un medio selectivo y diferencial para la recuperación de *Enterobacteriaceae* y otros microorganismos gramnegativos. Contiene sales biliares y cristal violeta que inhiben el crecimiento de bacterias grampositivas y algunas gramnegativas existentes. Tiene a la lactosa como única fuente de carbono, y las bacterias fermentadoras de lactosa producen colonias que tienen distintas tonalidades de color rojo debido a la conversión del colorante rojo neutro (rojo con pH por debajo de 6,8) por la producción de ácidos mixtos. Las colonias de bacterias no fermentadoras de la lactosa aparecen sin color y transparente (5,9).

6.3.2. Pruebas complementarias para la identificación de *Escherichiacoli*

6.3.2.1. Tinción Gram

La coloración o tinción de Gram fue descrita en 1884 por el médico danés Christian Gram, esta es una coloración diferencial de uso común en bacteriología. Las bacterias según esta tinción pueden clasificarse en grampositivas o gramnegativas si retienen o no el colorante cristal violeta (5). *Escherichiacoli* aparece en el frotis como bastoncillos gramnegativos cortos que pueden formar cadenas (10).

6.3.2.2. Pruebas bioquímicas

Las pruebas bioquímicas son de gran utilidad pues determinan la existencia de una enzima o pasos metabólicos determinados (11). *E. coli* produce de manera típica reacción positiva al indol, que determinan la presencia de la enzima triptofanasa degradando el aminoácido triptófano a indol. Asimismo tiene una reacción positiva a la lisina descarboxilasa, que genera la descarboxilación de la lisina produciendo cadaverina con liberación de anhídrido carbónico. Además produce ácidos y gas a partir de la fermentación de carbohidratos (12).

Otras pruebas son la fermentación del ácido fórmico (rojo de metilo y Voges-Proskauer) y la utilización del citrato como única fuente de carbono (Citrato de Simmons). Estas pruebas constituyen colectivamente el método IMVIC “Indol, Rojo de Metilo, Voges-Proskauer y Citrato” (13,14).

6.4. Antibióticos utilizados para el tratamiento de *E. coli*

6.4.1. Antibióticos Betalactámicos

Los antibióticos betalactámicos presentan actividad bactericida lenta, relativamente independiente de la concentración plasmática alcanzada, siempre que ésta exceda la concentración inhibitoria mínima (CIM) del agente causal (15).

Los antibióticos betalactámicos inhiben la síntesis de la pared celular bacteriana e inducen además un efecto autolítico (25). La pared celular está formada por cadenas poliméricas de peptidoglucano, compuestas por N-acetil glucosamina y ácido acetilmurámico se encuentran unidas por puentes de pentaglicina que le dan la rigidez final a la pared (unidades

llamadas nucleótidos Park). Los enlaces entre nucleótidos de Park se ven interrumpidos por las denominadas proteínas fijadoras de penicilinas (PFP). Después de que la penicilina se ha unido a sus receptores se inhibe la reacción de transpeptidación y se evita la unión polimérica de los nucleótidos de Park, bloqueándose la síntesis de peptidoglicano. El resultado es la inhibición del ácidolipotecoico, con la consecuente activación de enzimas autolíticas en la pared celular, es un desequilibrio de presiones que destruye a la bacteria (16).

Las penicilinas son un grupo de antibióticos que contienen un anillo betalactámico y un anillo de tiazolidina, formando el ácido 6-aminopenicilánico. Las aminopenicilinas se diferencian porque son de segunda generación y semisintéticos como la ampicilina y la amoxicilina que se utilizan para el tratamiento de infecciones por *E.coli*(15) (17).

La ampicilina tiene una escasa absorción oral en aves y, por ende su uso brinda resultados menos impactantes que la amoxicilina. Sin embargo un factor limitante de la amoxicilina es la pobre estabilidad en solución acuosa (16).

Cuando se administra Amoxicilina u Ampicilina en aves de corral, presenta vida media corta, siendo una característica deseable en cuanto al manejo de los tiempos de retiro en pollos de engorde. La vida media de la amoxicilina por vía intravenosa en dosis de 10 mg/k es de 8 horas(17).

6.4.2. Cefalosporinas

Las cefalosporinas poseen el anillo β -lactámico fusionado con un anillo dihidrotiazínico, formando el núcleo cefem. Ejercen su actividad antibacteriana inhibiendo la síntesis del peptidoglicano, produciendo finalmente lisis bacteriana (18).

Las cefalosporinas más utilizadas en avicultura son el ceftiofur, la ceftriaxona y la cefotaxima. Cuando se utiliza ceftiofur en dosis de 0.12, 0.24 y 0.48 mg/animal se logra una vida media de 5 a 8 h, no obstante, los datos existentes obtenidos a nivel experimental, indican que las concentraciones séricas a las 24 h no alcanzan niveles mínimos inhibitorios para la mayoría de las cepas de *Escherichiacoli* (16).

6.4.3. Fluoroquinolonas

Las Fluoroquinolonas son algunos de los compuestos antimicrobianos más eficaces desarrollados para su uso en aves de corral. Estos compuestos son altamente eficaces contra las infecciones de Gram-positivas, Gram-negativas y *Micoplasma* (16, 17).

Las fluoroquinolonas están compuestas por dos anillos con un nitrógeno en la primera posición, un grupo carbonilo en la posición cuatro y un grupo carboxilo en la posición tres. El átomo de flúor en la posición seis aumenta su capacidad de penetración en la célula bacteriana. Frente a bacterias Gram negativas también aumenta la potencia si en la posición siete hay un grupo piperacínico (norfloxacin, ciprofloxacina); etilpiperacínico (danofloxacina, enrofloxacina) o un grupo metilpiperacínico (ofloxacina, levofloxacina, gatifloxacina) (16,19).

Las Fluoroquinolonas actúan en el interior de la bacteria, penetrando a través del canal acuoso de las porinas. Bloquean la duplicación bacteriana del DNA, al inhibir la topoisomerasa bacteriana II (DNA-girasa) y la topoisomerasa IV (16, 19).

Las topoisomerasas son enzimas que controlan el superenrollamiento y desenrollamiento del ADN bacteriano. La inhibición de la actividad de estas enzimas impide a la célula bacteriana producir las proteínas necesarias para su reparación, crecimiento y reproducción. Esta inhibición conduce así a la muerte celular (16).

Las fluoroquinolonas tienen un amplio margen de seguridad en aves de corral. Se absorben rápidamente en el tracto gastrointestinal, alcanzando niveles sanguíneos máximos dentro de 1-2 horas después de la ingestión. La larga vida media de las fluoroquinolonas resulta en un efecto postantibiótico significativo (17).

6.4.4. Tetraciclinas

Las tetraciclinas inhiben la síntesis de proteínas y son bacteriostáticas para muchas bacterias grampositivas y gramnegativas (20).

Su mecanismo de acción es a nivel del ribosoma bacteriano, mediante difusión pasiva por la membrana celular exterior a través de los poros hidrófilos, en el caso de la doxiciclina que es lipofílica, pasa directamente por la doble capa de lípidos, pero en todos los casos es necesario un transporte activo dependiente de energía para que las tetraciclinas atraviesen la membrana citoplasmática interna (20).

Cuando ingresa a la célula bacteriana, inhibe la síntesis de proteínas y se liga a la subunidad 30S de los ribosomas, se impide el acceso del aminoacilRNA al sitio aceptor del complejo RNAm-ribosoma y los aminoácidos no se adicionan a la cadena peptídica en crecimiento (20).

Se ha demostrado que la presencia de oxitetraciclina o clortetraciclina en el alimento de aves (200 a 400 ppm) desafiados con una cepa patógena de *E.coli* resistente a tetraciclinas, evita la adherencia o adhesión de la bacteria al epitelio gastrointestinal y con esto se previenen brotes por dicha bacteria (16).

En aves, su farmacocinética ha sido calculada como muy baja (clortetraciclina y oxitetraciclina) debido a que los iones bivalentes del alimento reaccionan por quelación con estos medicamentos y no logran absorberse. Esto es menos marcado con la minociclina y la doxiciclina que sufren menor quelación (16).

Las tetraciclinas difunden y logran concentraciones antibacterianas en todo el organismo pero tienen mayor afinidad por órganos como bazo, hígado y pulmón. Difunden bien hacia líquido pleural, ascítico, sinovial; se depositan en sitios de osificación activa de la diáfisis y epífisis y en el cascarón del huevo (16).

6.4.5. Aminoglucósidos

Los aminoglucósidos se componen de aminoazúcares unidos por enlaces glucosídicos a un alcohol cíclico hexagonal con el componente aminociclitol (21).

Actúan sobre gérmenes gramnegativos, con muy poca acción sobre anaerobios y limitada sobre los grampositivos. A través de la difusión, atraviesan la membrana externa bacteriana y alcanzan el espacio periplasmático, a través de un mecanismo activo oxígeno-dependiente, penetran y alteran la membrana interna citoplasmática, finalmente se unen a polisomas e inhiben la síntesis bacteriana (22).

Su sitio intracelular de acción es la subunidad ribosómica 30s, que provoca error de lectura del RNAmensajero con producción de una proteína anómala, que induce fuga de sodio, potasio y otros componentes esenciales, lo que conduce a la muerte del microorganismo (21, 22).

Debido a que los aminoglucósidos son de absorción mínima desde el tracto gastrointestinal cuando se administran por vía oral, su uso principal en aves de corral ha sido por inyección subcutánea (16,17).

La gentamicina es el aminoglucósido más utilizado. Se ha informado que una dosis terapéutica de 5 mg / kg de peso en pollos de engorde ha sido adecuada cuando se administra por vía intravenosa, intramuscular o subcutánea. La administración subcutánea fue asociada con la mejor biodisponibilidad absoluta (100%), mientras que la administración oral tenía una biodisponibilidad absoluta de cero (16, 17).

La estreptomina se obtuvo a partir de *Streptomyces griseus*. Se absorbe parcialmente desde los intestinos y por lo tanto puede ser considerado para el uso del tratamiento de infecciones sistémicas de *E. coli*. La neomicina es utilizada comúnmente para tratar las infecciones entéricas, administrándose en el alimento o el agua. A pesar de la mala absorción desde el tracto gastrointestinal hay informes que la administración de la neomicina ha resultado eficaz en el tratamiento de la colibacilosis en aves de corral, probablemente debido a un efecto local (17, 23).

La espectinomicina y higromicina son aminociclitolos aprobados para aves de corral. La espectinomicina es usado en combinación con la lincomicina para el tratamiento de aerosaculitis causado por *E. coli*(17, 24).

6.4.6. Sulfonamidas

Las sulfonamidas son bacteriostáticas e interfieren con la síntesis de ácido fólico. Son análogos estructurales y antagonistas de la PABA (ácido para-aminobenzoico) (16, 25).

Esta acción se ejerce compitiendo por la acción de una enzima bacteriana no responsable de la incorporación de PABA al ácido dihidrofólico. Debido a la reducción en la síntesis de dihidrofolato, las concentraciones de la forma reducida activa, el tetrahidrofolato (ácido folínico), también disminuyen (16, 26).

La sinergia entre trimetoprim y sulfametoxazol inhibe la síntesis bacteriana de ácido tetrahidrofólico, la forma fisiológicamente activa de ácido fólico y un cofactor necesario en la síntesis de timidina, purinas, y ADN bacteriano (16, 25, 27).

Esta combinación de antibióticos se utilizan para tratar infecciones bacterianas causadas por *E. coli* y *Pasteurellamultocida*, permitiendo una menor dosis terapéutica en cada producto, disminuyendo el riesgo de toxicidad por sobredosis (17).

Debido a que las aves de corral son altamente coprófago y las sulfonamidas son excretados en la orina y las heces; posibilita el reciclaje por coprofagia que puede dar lugar a residuos de antibióticos en la carne o los huevos. Es por ello que el médico veterinario que prescriba sulfonamida debe incluir un tiempo de espera adicional para garantizar el tiempo necesario para el despacho de medicamentos (mayor de 7-10 días) antes del recojo de carne o huevos (17).

6.4.7. Derivados del ácido fosfónico

La fosfomicina es un antimicrobiano que fue aislada de una cepa de *Streptomyces fradiae*, fármaco análogo al fosfoenolpiruvato y a otros derivados del ácido fosfónico (16).

Es bactericida porque bloquea la biosíntesis de la pared celular bacteriana en su primera etapa al interferir en el citoplasma de la bacteria. Inhibe en forma irreversible la acción de la enzima piruvil transferasa, que cataliza la primera reacción en la síntesis de la pared celular al incorporar el fosfoenolpiruvato, impidiendo la formación de uridin-difosfato N-acetil murámico. La inhibición de la síntesis de peptidoglicanos origina una acumulación de los nucleótidos precursores con la correspondiente inactivación de la bacteria (28).

Tiene actividad importante contra *Staphilococcus aureus*, *Staphilococcus sp*, *E. coli*, *Pseudomona aeruginosa*, *Salmonella sp*, *Pasteurella sp*, *Haemophilus sp* y *Campilobacter sp* (16).

La presencia de alimentos disminuye la absorción de todas las sales de fosfomicina, por lo que debe administrarse en forma de bolo en el agua de bebida y en animales a los que se le restrinja el alimento por lo menos una hora antes de la dosificación. Se ha establecido que es un antibacteriano de excelente distribución a tejidos. En aves se ha ensayado con dosis de hasta 10 mg/kg con buenos resultados, aunque se reconoce que existen muchas calidades de fosfomicinas, algunas de ellas menos potentes y requieren dosis de hasta 40 mg/kg (16).

6.4.8. Fenicoles

El precursor de los fenicoles es el cloranfenicol, descubierto a partir de *Streptomyces venezuelae*. El Cloranfenicol no puede administrarse en animales usados como productores de alimentos, debido a que la toxicidad de sus residuos incrementa el riesgo a desarrollar anemia aplástica (16).

El tianfenicol es un derivado sulfonado del cloranfenicol, utilizado en medicina humana sin que se haya detectado la producción de anemia aplásica. Presenta excelente biodisponibilidad cuando se administra por VO en aves, tiene buena actividad contra gramnegativos como *Escherichia coli*, *Pasteurella sp*, *Haemophilus sp*, *Campylobacter sp* y *Mycoplasma sp*. La dosis recomendada es de 20 - 30 mg/kg /día, y dado que es un fármaco tiempo-dependiente, se recomienda aplicarlo un mínimo de tres días para máximos resultados (16).

El florfenicol es un antibiótico de amplio espectro, que surge a partir de tianfenicol al sustituir un radical hidroxilo de la cadena alifática por un átomo de flúor, como una alternativa para generar menos daño en el hombre y disminuir la resistencia bacteriana. Debido a que tiende a fijarse a proteínas tisulares y acumularse en los tejidos, es necesario limitar el máximo número de residuos en la carne, basándose en la ingesta diaria admisible microbiológica que es 3 µg/kg, es decir 180 µg en el hombre (16, 29)

Su mecanismo de acción se basa en la inhibición de la síntesis de proteínas bacterianas a nivel ribosomal, es decir, bloquea la incorporación de aminoácidos a las cadenas peptídicas de las proteínas en proceso de información (26).

En avicultura se puede usar para tratamiento de infecciones por *Salmonella sp*, *Staphylococcus sp*, *Haemophilus sp*, *Manhemia Haemolytica*, *Pasteurella Multocida*, *Escherichia coli*. No presenta actividad importante contra micoplasmas. Su dosis es 20 mg/kg x 2-4 días en agua, funciona mejor si está disponible todo el día en el tinaco. Se promueve la interacción medicamentosa con los macrólidos, las tetraciclinas o las lincosamidas (26, 30).

En un estudio llevado a cabo en Brasil, donde aislaron *E.coli* de lesiones de celulitis en pollos, las muestras presentaron una alta sensibilidad al Florfenicol (31)

6.4.9. Polimixinas

Las polimixinas B y E son antibióticos polipeptídicos derivados de *Bacillus colistinus* (colistina o polimixina E) y *Bacillus polymyxa* (polimixina B). Su estructura química está compuesta por un decapeptido cíclico catiónico unido a un ácido graso. Asimismo son de naturaleza hidrosoluble, estables en medios con pH ácido pero se descomponen con facilidad en medios alcalinos (21, 26).

Actúan como detergentes catiónicos a nivel de la membrana celular bacteriana, interfiriendo en el equilibrio de iones y líquidos entre el medio interno y el externo. Se liberan purinas y pirimidinas y se detiene el metabolismo celular, en muchos casos induce lisis (16, 32).

Tiene actividad bactericida frente a *Pseudomona sp*, *Salmonella sp*, *Escherichia coli* y *Proteus sp*. La colistina tiene una actividad anti-endotoxina debido a que se une y neutraliza a los fosfolípidos y polifosfatos de las endotoxinas de las enterobacterias (16,32).

Se considera que las bacterias que son sensibles, lo deben ser a concentraciones que fluctúen entre 1 - 5 µg /ml. La colistina se absorbe lentamente y muy poco por el tubo Gastrointestinal obteniéndose bajas concentraciones plasmáticas, por ello no se recomienda su uso en infecciones sistémicas (16).

Para aplicación parenteral se utiliza la colistina sódica o sal sulfato. La dosis es 3 mg/kg/12h, no más de tres días. Las polimixinas no se deben combinar con cuaternarios de amonio porque existe un antagonismo competitivo (16).

6.4.10. Macrólidos

El término macrólido se aplica por la estructura constituida por un anillo lactona macrocíclico multimembrado al cual se unen desoxiazucares aminados. Los macrólidos son bases débiles altamente liposolubles. (16, 33).

Un ejemplo es la Espiramicina, macrólido de 16 carbonos que bloquea la síntesis proteica a nivel ribosomal interfiriendo con la enzima peptidil transferasa. Actúa primero como bacteriostático y después como bactericida. Al igual que otros macrólidos, llega al interior de macrófagos polimorfonucleares y contribuye al proceso de acumulación de espiramicina en el sitio de infección. Además de esto posee una miosacarosa que le confiere mayor actividad contra enterobacterias(16).

La tilosina es un producto de la fermentación de *Streptomyces fradiae*, se combina con minerales orgánicos para producir sales más solubles como el tartrato y fosfato. La sal tartrato es soluble en agua en medios ácidos, en sus formas inyectables contiene 50 % de propilengicol y tienden a la precipitación cuando se mezclan con otros fármacos. Es activa contra microorganismos grampositivos, destacando *Micoplasma gallisepticum*. También actúa sobre algunos gramnegativos (16).

La sal tartrato presenta una mejor absorción intestinal cuando se administra en agua de bebida y la sal fosfato en premezclas por presentar mayor estabilidad. Para aplicar por vía IM o SC es mejor el tartrato, a pesar de que puede provocar irritación y dolor temporal en la zona de aplicación. En problemas por micoplasmas se recomienda a una dosis de 0.5 g/l del agua de bebida. En aves de postura se ha dado concentraciones de 500 mg por litro de agua durante tres días, en tratamientos de enfermedades respiratorias y enteritis necrótica, estas dosis corresponde a 75 mg/kg/ día (16).

Entre las interacciones, se da una adición del efecto en las administraciones con dihidroestreptomicina ya que la tilosina actuara en contra de micoplasma y otras bacterias sensibles y la dihidroestreptomicina contra bacterias como *Escherichia coli*. Su tiempo de retiro es de cinco días (16).

6.4.11. Pleuromutilinas

Su origen se encuentra en *Pleurotus mutilus*, el cual es un hongo comestible. La tiamulina es un antibacteriano diterpeno. Se une a un sitio específico del centro de la peptidil-transferasa de la subunidad ribosomal 50S. La base tricíclica de la tiamulina se coloca en el sitio de unión del A-ARNt, esta unión también bloquea en forma indirecta el sitio de unión P-ARNt, por lo que se inhibe la formación de péptidos. Asimismo, la tiamulina se une al sitio V del 23S ARN induciendo interacciones hidrofóbicas y cambios que bloquean la síntesis de proteínas (16).

El fumarato hidrogenado de tiamulina es un derivado semisintético de las pleuromutilinas, efectivo en el tratamiento de aerosaculitis por *Mycoplasma sp*, *Escherichia coli* y infecciones virales como bronquitis y la enfermedad de New Castle (34).

La tiamulina se administra a una dosis de 25 a 50 mg/kg, dependiendo de la edad y tipo de ave, administrada durante tres y cinco días consecutivos en el agua de bebida. Este antibiótico muestra compatibilidad con tetraciclinas en pollos broiler (16, 34)

6.4.12. Lincosamidas

La lincomicina es un antibiótico producido por *Streptomyces lincolnensis*. Es una base débil y liposoluble en un medio con pH 7.4-7.6. Su espectro de acción es contra bacterias

grampositivas y muestra actividad contra micoplasma. Es común su combinación con espectinomicina y sulfadimidina (16).

Posee una baja o nula actividad contra la mayoría de las bacterias gramnegativas, en las cuales no logra acumularse ni llegar a concentraciones inhibitorias. La combinación de lincomicina con espectinomicina (1:2) se ha usado en aves con problemas de micoplasmosis y complicaciones por *Escherichia coli*, a razón de 200 ppm durante las primeras semanas de vida o bien con dosis de 300 - 400 ppm en aves pesadas (16).

Se maneja un periodo de siete días de retiro en aves de carne, no se permite su uso en aves de postura. Puede llegar a generarse resistencia cruzada con macrólidos y clindamicina (16).

6.5. Resistencia bacteriana

La resistencia bacteriana puede definirse como la capacidad de un microorganismo para crecer en presencia de un antimicrobiano a dosis terapéuticas (35).

En el Perú, la vigilancia de resistencia se realiza de manera *in vitro* mediante métodos fenotípicos, donde se determina la sensibilidad o resistencia antibiótica, siendo muy pocos los estudios de investigación realizados para la búsqueda de genes de resistencia antibiótica y aún menos los dirigidos hacia enteropatógenos específicamente. Dentro de los pocos estudios realizados en el país, se muestra por ejemplo la diseminación de las beta-lactamasas de espectro extendido (BLEE) tipo CTX-M en *Escherichiacoli* aisladas de niños sanos menores de cuatro años (36).

En veterinaria, el empleo de antibióticos como promotores de crecimiento generó preocupaciones a los consumidores debido a la cantidad de residuos que quedan en la carne de los animales y en sus productos, sin contar con la resistencia generada en algunas cepas bacterianas por la administración continuada, por lo que se usan otras alternativas como los probióticos (37).

6.5.1. Principales mecanismos de resistencia

La mutación y la movilidad de la información genética en bacterias son mecanismos fundamentales en la aparición y diseminación de la resistencia a antibióticos. Un gen de resistencia puede aparecer por «mutación» de un gen bacteriano que posee una actividad diferente. Otro origen posible de los genes de resistencia a antibióticos son las propias bacterias productoras de antibióticos. No se debe olvidar que los antibióticos, como la estreptomicina, son producidos por bacterias del género *Streptomyces*, y que estas bacterias del suelo son naturalmente resistentes a los antibióticos que ellas mismas producen. Los estreptomicetos coexisten en el suelo con otras especies a las que han podido transferir sus genes de resistencia (38).

El número de genes de resistencia a antibióticos identificados es muy grande y preservan a los gérmenes de la destrucción mediada por los antibióticos a través de los mecanismos(17,38):

- Bloqueo del transporte del antibiótico: se consigue resistencia a la fosfomicina por pérdida del sistema de transporte del glicerol-fosfato que es el que usa la fosfomicina para alcanzar el interior de la bacteria.
- Inducción de la síntesis de enzimas que modifican o degradan el antibiótico: El cloranfenicol se inactiva por acetilación catalizada por una cloranfenicol-acetiltransferasa.

- Inactivación o eliminación del antibiótico: Los betalactámicos son inactivados mediante hidrólisis de las betalactamasas
- Expulsión del antibiótico por un mecanismo activo de bombeo: Se sintetizan bombas de «flujo hacia fuera» que expulsan al antibiótico del interior de la célula, antes de que tenga tiempo de encontrar su lugar-diana molecular. La tetraciclina se expulsa de forma activa del interior de las bacterias resistentes.
- Modificación del blanco o sitio de acción del antibiótico: La metilación del ARN23S en una posición específica confiere resistencia a los macrólidos que no pueden fijarse al ribosoma y producir su efecto inhibitorio.
- Producción de una enzima alternativa que evita el efecto inhibitorio (bypass): la resistencia al trimetoprim se consigue produciendo una dihidrofolato-reductasa nueva que deja sin efecto la inhibición de la dihidrofolato-reductasa normal de la bacteria.

Los genes de resistencia se suelen encontrar localizados en el cromosoma bacteriano (ADN que almacena la información necesaria para la reproducción y el mantenimiento de rutina de la bacteria) si bien muchos genes de resistencia se localizan en elementos extracromosómicos autónomos que se denominan plásmidos (minúsculos anillos de ADN) y especialmente plásmidos R. Habitualmente, los plásmidos tienen la capacidad de transferirse o donarse de una bacteria a otra por el proceso de conjugación bacteriana. La conjugación es posible entre bacterias de diferentes géneros e incluso de diferente carácter Gram (conjugación interGram) (39).

6.5.2. Resistencia de antibióticos utilizados en la avicultura

En la industria avícola, los antibióticos son utilizados en grandes cantidades, no solo para terapia y prevención de enfermedades bacterianas, sino también como promotores de crecimiento. Por lo tanto la resistencia en la bacteria por presión de selección de antibiótico es alta y como consecuencia su flora fecal contiene una relativa alta proporción de bacteria resistente (40-41).

Los aspectos que favorecen la proliferación de microorganismos resistentes son el uso inadecuado de antibióticos en agentes virales, la comercialización indiscriminada de antibióticos, aplicaciones terapéuticas sin cumplir el tiempo de supresión y la debilidad de los servicios públicos y privados en la vigilancia y control de productos veterinarios (42).

Bravo et al evaluó los niveles de resistencia y sensibilidad de antibióticos, pertenecientes a los beta-lactámicos, quinolonas, sulfas, fosfomicinas, aminoglucósidos, entre otras combinaciones, los que fueron enfrentados a cepas de *E.coli* aisladas de pollos de carne, obteniendo un 54% de resistencia, 29% sensibilidad y 17% perfil de sensibilidad intermedio (43).

Se identificó resistencia antimicrobiana en 468 cepas de *E. coli* aisladas de aves en España, mostrando altos niveles de resistencia a sulfametoxazol+trimetropin (67%) y Fluoroquinolonas. Como estos agentes antimicrobianos pueden causar resistencia cruzada con patógenos entéricos humano, se recomienda uso prudente en veterinaria (44).

Un estudio llevado a cabo en Bangladesh, reveló que el 87,50 % de aislamientos de *E.coli* aislados de muestras fecales de pollos de engorde presentaron resistencia a ampicilina y sulfametoxazol (45).

Salehi y Bonab en Iran, estudian cepas de *E. coli* obtenidas de pollos con colisepticemia y encuentran resistencia múltiple a los antimicrobianos en todos los aislamientos, así como una alta prevalencia de resistencia a quinolonas, esto se debería al incremento en el uso de antibióticos como aditivo para la promoción del crecimiento y la prevención de enfermedades (46).

Saidi, Mafirakureva y Mbangwa en Zumbabwe obtuvieron 103 aislamientos con *E.coli* de 503 pollos diagnosticados con colibacilosis, muchos de los aislamientos exhibieron resistencia a más de un antibiótico, indicando una resistencia máxima a tetraciclina, bacitracina, cloxacina y ampicilina (47)

En México, se realizó la prueba de sensibilidad antimicrobiana en pollitas de reemplazo, mostrando un porcentaje mayor a 90% de cepas resistentes a tilosina y amoxicilina, seguido por oxitetraciclina y doxiciclina (80%). Asimismo sulfacloropirimidacina y clortetraciclina obtuvieron el 70% de resistencia (48).

Resistencia a enrofloxacin, ceftiofur y ampicilina fue baja desde 1998 hasta 2001, pero se incrementó al año siguiente en el estado de Minesota (49).

En el centro de sanidad avícola de Catalunya y Arago de España, las principales resistencias se observaron frente a enrofloxacin, doxiciclina y amoxicilina. Mientras que los dos primeros antimicrobianos sufren un incremento del porcentaje de cepas resistentes en los últimos cinco años, las resistencias a amoxicilina se mantienen elevadas durante todos los años (70,4 % de las cepas analizadas). También se detectó un aumento de aparición de cepas resistentes a los aminoglucósidos, concretamente frente a la neomicina que sufre un incremento considerable del año 2011 al 2013 (16,7 % a 57,1%respectivamente) (50).

6.6. *Escherichia coli* en la producción avícola

Entre el 2005 y 2006, la actividad avícola ha experimentado un incremento de 7,7 % del valor de la producción en el subsector pecuario. Asimismo, en diciembre del 2014, la mayor producción de aves (4,8%) se vio reflejada en más de 1'600 000 aves beneficiadas (51,52).

Sin embargo, la mayor velocidad de crecimiento y el mejoramiento de los parámetros de producción del pollo de engorde han tenido un precio, ya que al mismo tiempo que se ha logrado reducir la susceptibilidad a enfermedades como el síndrome ascítico, se ha vuelto más sensible a fallas de manejo, factores ambientales como el frío o calor, deficiencias nutricionales y a la acción de microorganismos patógenos (53).

Escherichiacoli patogénica aviar (APEC) es considerada como la mayor causa de morbilidad y mortalidad, desencadenando pérdidas económicas en la industria avícola porque se asocia a otras enfermedades como patógeno principal o secundario, extendiéndose hacia órganos y causando la colibacilosis, una enfermedad sistemática fatal (54,55).

APEC se adhiere al epitelio del tracto respiratorio por medio de las fimbrias e ingresa al torrente sanguíneo vía pulmones y sacos aéreos hasta alcanzar los órganos internos. Las fimbrias tipo 1 son mayormente expresadas por la bacteria colonizando la tráquea, pulmones y sacos aéreos, mas no colonizando tejidos profundos o sangre (8).

Por otro lado, la fimbria P del serotipo F11, producida por algunas cepas de APEC, son expresadas por bacterias colonizadoras de sacos aéreos, pulmones y órganos internos pero no por aquellos que colonizan tráquea, sugiriendo una participación en la fijación bacteriana en tejidos profundos. Una fimbria recién conocida llamada Stg, parece estar implicada en la colonización de los sacos aéreos (8).

Los factores de virulencia suelen estar localizados en islas de patogenicidad en plásmidos o agrupados en cromosomales. Los genes relacionados a toxina y bacteriocinas, como el gen estructural del opero CoIV están localizados en los plásmidos. Mientras las adhesinas, como Crl, gen que codifica las fibras curli de adhesión e internalización, están ubicadas en

el genoma. Otros factores de virulencia de APEC son el antígeno K1 y los sistemas de captación de hierro (aerobactin, sit, salmochelin y hemaglutinina sensitiva a la temperatura) (8, 56).

Los aislamientos de APEC en aves de corral comúnmente pertenecen a ciertos serogrupos, particularmente los serogrupos O78, O1, and O2 y en cierto grado también O15 and O55 (57,58). La colibacilosis aviar se encontró ampliamente prevalente en pollos de todas las edades (9,52 to 36,73%) con alto rango de prevalencia en gallinas ponedoras (36,73%) (59). La ocurrencia de la colibacilosis está predispuesta por la enfermedad de bursitis infecciosa (IBD), micoplasmosis, coccidiosis, enfermedad de Newcastle o bronquitis, así como también deficiencias nutricionales. Sin embargo, la contaminación fecal del huevo puede dar como resultado la penetración de *Escherichiacolia* través de la cáscara y difundirse hacia el pollo durante la incubación y a menudo es asociado con altos rangos de mortalidad, o podría dar lugar a infección del saco vitelino (60).

El riesgo de colibacilosis se incrementa con la presión de las infecciones en el medio ambiente. Otros factores de riesgo son la duración de las exposiciones, virulencia de la cepa, cultivo y el estado inmunitario del ave. Todo daño al sistema respiratorio favorece la infección con APEC (61, 62).

Carranza et al muestreo 36 pollos entre los 14 y 31 días, obtenidas de explotaciones avícolas del norte, centro y sur de Perú, hallándose 65.9% de cepas patogénicas de *E.coli* mediante análisis de PCR múltiple, identificando colonias portadoras de dos o más genes codificadores de virulencia. (63).

Un estudio sobre caracterización de aislamientos de *E.coli* con PCR múltiple en embriones de pollo, comprobó la asociación entre la virulencia y el número de genes patógenos, debido a que un aislamiento contenía cuatro genes y tuvo la capacidad de matar a más de un embrión en comparación con otros aislados (64).

En Bélgica, de un gran número de aves enfermas y muertas examinadas, identificaron APEC como patógeno responsable. La incidencia parece ser alta en gallinas ponedoras con un promedio de 38.6 %. (65)

6.7. *Escherichia coli* en la salud pública

Las Enfermedades Transmitidas por Alimentos (ETAs) son producidas por la ingestión de alimentos o agua contaminados con microorganismos patógenos, toxinas o sustancias químicas. La prevención de las enfermedades de transmisión alimentaria depende de la manipulación cuidadosa de los productos crudos y de los productos terminados en la cadena de producción (66, 67).

Según la dirección general de epidemiología, las ETAS en el Perú tienen significación en la salud pública, considerando que solo 38 % de hogares tienen acceso al agua. Entre los años 2010 al 2012 se han reportado 35 brotes de ETA por año, 47% relacionados con salmonelosis (67).

Escherichiacoli productor de toxina Shiga (STEC) es considerado un patógeno emergente transmitido por alimentos asociado a casos esporádicos y brotes de diarrea, colitis hemorrágica (CH) y síndrome urémico hemolítico (SUH). *Escherichiacoli* O157:H7 es el

prototipo de más de 150 serotipos que comparten el mismo potencial patogénico. Las cepas STEC asociadas a enfermedades severas en el hombre pertenecen a la categoría de *E. coli* enterohemorrágica (EHEC) (68,69).

La carne de pollo es uno de los productos de mayor demanda a nivel mundial por sus ventajas como fácil digestibilidad y su aceptación por la mayoría de gente (70). Según la norma técnica peruana, los derivados de aves (carcasas, cortes, menudencias, apéndices y despojos) para consumo humano deberán proceder de centro de beneficios autorizados y cumplir con la inspección veterinaria. En carne fresca y congelada, el recuento permitido de *E. coli* deberá ser menor a 10^2 ufc/g (71).

Reportes epidemiológicos sugieren que la carne de ave continua siendo la primera causa de intoxicación alimentaria (72). Durante el retiro del animal de la granja, se presenta dificultades como su captura, tiempo de transporte y manejo en la planta de procesamiento, lo cual genera estrés en el ave y desencadena problemas en la calidad de la canal y de la carne (73).

Mediante la técnica de PCR, Alonso M et al , detecto *E. coli* enteropatógeno (EPEC) colectado de hisopados cloacales (19%), carcasas evisceradas no lavadas (49%) y carcasas lavadas (33%) de pollos en el proceso de faena (74). En otro estudio de Alonso también detectó EPEC en cloacas, demostrando que el proceso de faena no se realiza bajo las condiciones adecuadas (75).

Asimismo Ramirez P aislo *E. coli* productora de Shiga toxinas (STEC) como grupo más común de 150 cepas de *E. coli* de las canales de pollo, seguido por ETEC y EPEC. Sin embargo 14 aislamientos solo dieron positivos a genes de virulencia (76).

Investigaciones han sugerido que cuando se beneficia a los pollos, las cepas resistentes del intestino inmediatamente ensucian las carcasas de aves comerciales y como resultado los productos cárnicos del pollo a menudo se contaminan con *E. coli* multirresistente; igualmente los huevos se llegan a contaminar durante la puesta. Por lo tanto, *E. coli* resistente fecal de las aves puede infectar a los humanos directamente mediante el alimento. Esta bacteria resistente puede colonizar el tracto intestinal del humano y propiciar genes resistentes a la flora endógena del ser humano (41).

Los serotipos O2:K1 de *E. coli* aislados de infecciones del tracto urinario humano y de pollos septicémicos están fenotípicamente muy relacionados. Se diferencian ambos grupos solo examinando su contenido del plásmido (77). En un estudio realizado se obtuvo resultados similares para un grupo de aislamientos y concluyeron que los pollos podrían ser la fuente de infecciones septicémicas humanas (78).

A pesar de que *E. coli* 0157 verotoxigenica (VTEC) haya sido detectada en broilers, el pollo no es considerado como un importante reservorio para este serotipo zoonótico a menudo reportado (79).

No obstante, otros estudios han reportado que la carne de pollo fue positivo a VTEC (80,81). Adicionalmente, en un estudio caso control se demostró que el consumo frecuente de pollo está asociado con la infección del tracto urinario producidas por *E. coli* multiresistente. Por lo tanto, *E. coli* aviar representa un grave problema en el bienestar animal y un riesgo para la salud pública (82).

6.7.1. Epidemiología molecular de *E.coli*

En América Latina las infecciones transmitidas por alimentos representan alrededor del 70 % de los casos de enfermedad diarreica aguda, según estimaciones de la Organización Mundial de la Salud (83).

La Epidemiología molecular busca cuantificar la exposición a determinado agente y su efecto biológico temprano e identificar la presencia de genes codificadores de susceptibilidad (84).

Las técnicas moleculares ayudan a estratificar y refinar los datos al proporcionar mediciones más sensibles y específicas, que facilitan las actividades epidemiológicas, incluyendo la vigilancia de enfermedades, las investigaciones de brotes, la identificación de los patrones de transmisión y los factores de riesgo entre los casos aparentemente distintos, caracterizando las interacciones hospedero-patógeno y la detección de organismos que no poseen la capacidad de ser cultivado (85).

Los métodos moleculares de tipificación pueden utilizar como diana tanto ADN cromosómico como ADN de elementos genéticos móviles de transmisión horizontal (plásmidos, transposones, integrones y secuencias de inserción). Las técnicas moleculares abarcan estudios de los perfiles de restricción del ADN (plasmídico o cromosómico); técnicas de amplificación de secuencias de ADN mediante reacción en cadena de la polimerasa (PCR) y técnica de secuenciación parcial de genes (86).

La frecuencia con la que las infecciones de *E. coli* O157: H7 se han reportado sigue aumentando, probablemente reflejando gran interés por este patógeno y un aumento en su incidencia y distribución geográfica (87).

El genoma de las cepas patogénicas de *E. coli* es diverso y puede ser hasta 1 Mb mayor que el de las cepas comensales, debido principalmente a la adquisición y pérdida de islas de patogenicidad y material accesorio genético. Se cree que las cepas de *E. coli* secuenciadas tienen un núcleo del genoma de aproximadamente 2,200 genes y un pan-genoma de aproximadamente 13,000 genes. Es intrigante que aunque la mayoría de los genomas de las cepas de *E. coli* patógenas pueden codificar más de 5,000 genes menos de la mitad de estos genes constituyan el núcleo del genoma. Esto permite una considerable diversidad y plasticidad genética, debido a la pérdida y la ganancia de genes que conlleva a la aparición de un conjunto diverso de patotipos de *E. coli* (88).

Para el estudio de *E. coli* patogénica aviar (APEC), se han utilizado métodos de caracterización molecular. Serotipos predominantes asociados a la colibacilosis, por medio del método electroforesis de enzima multilocus, aparecen filogenéticamente distantes, aunque los clones patogénicos están estrechamente relacionados con respecto a las cepas comensales. El método de tipificación de secuencia multilocus de las cepas O 78 ha revelado una estrecha relación de los clones a residir en diferentes huéspedes y una fuerte correlación entre virulencia y su origen clonal (89- 92).

Otros estudios como tipificación filogenética basada en PCR y tipificación de secuencia multi- locus han revelado una conexión entre APEC y *Escherichiacoli* patógena extraintestinal (ExPEC) de humano, sugiriendo una potencial fuente ExPEC humano de origen alimentario (93).

Por lo tanto, son necesarios los estudios de epidemiología molecular que involucran aislamientos de origen animal, alimentario, humano y del medio ambiente para reunir más evidencia sobre el potencial zoonótico de ExPEC y para evaluar todos los riesgos de reservorios animales para la salud humana. Uno de los riesgos asociados con la transmisión de ExPEC a partir de reservorios animales, además de propagar una enfermedad potencial, es la diseminación de resistencia a los antimicrobianos (94).

6.8. Síndromes infecciosos causados por *Escherichiacoli* en aves comerciales

6.8.1. Enfermedad respiratoria aviar

Se caracterizan por estornudo, tos, fluidos nasales, conjuntivitis e incremento de la mortalidad considerándose hasta el 20 % en algunos casos (95).

La susceptibilidad de las aves a esta infección se incrementa por la deciliación a las células epiteliales del tracto respiratorio superior después de la exposición al amoniaco y al polvo del entorno del ave (96).

Dependiendo de la severidad de la enfermedad, se puede observar traqueítis y congestión del hígado, bazo y riñón. Los sacos aéreos aparecen de consistencia viscosa y cubiertos con coagulo de fibrina, asociándose a pericarditis, perihepatitis y peritonitis (95).

6.8.2. Onfalitis

En las aves el saco vitelino suele estar afectado debido a su estrecha relación anatómica. La infección continúa con contaminación del ombligo no cicatrizado con APEC. La contaminación fecal de huevos es considerada como la fuente más importante de infección (97).

El incremento de mortalidad en el octavo día causado por onfalitis da como resultado pobre ganancia de peso del pollito. Es decir, si la prevalencia de *E.coli* aumenta en pollitos de un día, también se incrementará la mortalidad en la primera semana. Sin embargo si existiera 70% de pollitos colonizados por *E. coli*, esto no significaría que la mortalidad será 70%, aumentando el riesgo si no se controla el manejo de los pollitos durante el proceso de incubación. (98, 99).

Inflamación, edema, enrojecimiento, y posiblemente pequeños abscesos caracterizan la inflamación aguda del ombligo. El abdomen está distendido y los vasos sanguíneos están hiperémicos. En los casos graves la pared del cuerpo y la piel que lo recubre se someten a lisis y están húmedos y sucios (97).

Puede haber otros cambios no específicos como deshidratación, gota visceral, emaciación, conductos de ventilación pegados y vesícula biliar agrandada. El saco vitelino esta normalmente distendido porque la yema no ha sido absorbido y productos inflamatorios se han añadido. La yema posee color, consistencia y olor anormal, y puede contener un exudado visible. Los vasos sanguíneos del saco vitelino a menudo son prominentes. Los pollos con el saco vitelino infectado que viven más de 4 días también pueden tener pericarditis o perihepatitis, indicando diseminación sistémica del organismo desde el saco vitelino (97).

6.8.2. Celulitis

La celulitis se ha convertido en un síndrome económicamente significativo en pollos de engorde, resultado del incremento de sacrificios, degradación de procesamientos, y el aumento de los costos asociados con el recorte y el reprocesamiento de las carcasas afectadas (100).

La celulitis se caracteriza por una difusa reacción inflamatoria en el tejido subcutáneo. *Escherichiacoli* ha sido el organismo predominante recuperado de lesiones de celulitis en un número de estudios y se considera el agente causante de la celulitis. Trauma o daños a la piel por rascado se ha demostrado que aumenta las lesiones de celulitis formadas por *E. coli*. En un estudio se observó que en una parvada con alta mortalidad por celulitis también poseía alta tasa por otras lesiones con infección de *E. coli* (100,101).

6.8.3. Síndrome de la cabeza hinchada

Es una celulitis aguda a subaguda que involucra los tejidos subcutáneos periorbitarios y adyacentes de la cabeza. El síndrome de la cabeza hinchada (SHS) fue descrita por primera vez en los pollos de engorde en Sudáfrica asociados con *E. coli* y una infección por coronavirus no identificado. La hinchazón de la cabeza es causado por un exudado inflamatorio debajo de la piel que se acumula en respuesta a las bacterias, por lo general *E. coli*, seguidas de infecciones virales del tracto respiratorio superior (pneumovirus aviar, virus de la bronquitis infecciosa). El amoníaco agrava la enfermedad. El portal de entrada se considera que es la conjuntiva, las membranas mucosas inflamadas de los senos paranasales o en la cavidad nasal (97).

6.8.4. Enteritis

La diarrea resulta de las infecciones con *E. coli* enterotoxigénica (ETEC), enterohemorrágica (EHEC), enteropatógena (EPEC), o enteroinvasiva (EIEC); cada tipo posee ciertos factores de virulencia que determinan las características de cada tipo de enfermedad entérica. Las cepas de EHEC y EPEC producen lesiones adherentes y obliterantes en la superficie de la mucosa intestinal. La enterotoxigenicidad causada por cepas de ETEC es poco común en la APEC (97).

6.8.5. Peritonitis y Salpingitis

La salpingitis se caracteriza por ser un proceso supurativa subaguda que compromete el oviducto, el desarrollo del embrión y el tiempo de vida del polluelo. *E. coli* en aves adultaspuede infectar el tracto reproductivo causando salpingitis, ooforitis y peritonitis que induce a la muerte. La infección temprana en las reproductoras puede ser clínicamente asintomática; en ciertos casos responsable del aumento de la mortalidad embrionaria en incubadora (97,102).

La peritonitis por yema es una leve a moderada peritonitis difusa que resulta de la yema libre en la cavidad corporal. Exudación marcada, inflamación extensa, y cultivos positivos caracterizan a la peritonitis por coliformes y sirven para distinguirla de la peritonitis por yema (97).

6.8.6. Colisepticemia

La colisepticemia se define como la presencia de *E. coli* virulento en el torrente sanguíneo. Lavirulencia de la bacteria y la inmunidad del ave determinan la duración, el grado, y el resultado de la enfermedad, así como el patrón y la gravedad de las lesiones. La colisepticemia progresa a través de las siguientes etapas: septicemia aguda, poliserositis subaguda, e inflamación granulomatosa crónica (97).

La pericarditis está asociado con la colisepticemia. Los vasos del pericardio se vuelven prominentes debido a la hiperemia y el pericardio se vuelve nublado y edematosa. Inicialmente masas blandasde exudado pálido se acumulan dentro del saco pericárdico seguidos de exudado fibrinoso. El exudado se puede ver débilmente adherido al epicardio cuando se abre el saco pericárdico (97).

III. MATERIALES Y MÉTODOS

1. Espacio y tiempo

El estudio se realizó en las instalaciones del Laboratorio de la Empresa BIOSERVICE en el distrito de Villa María del Triunfo y en el Laboratorio de Computo de la Universidad Alas Peruanas - Sede Pachacamac, entre los meses de marzo y octubre del 2015.

2. Población y muestra

Se revisaron 2 974 fichas clínicas que contienen los registros de cultivos bacterianos y antibiogramas provenientes de tejidos con aislamientos de *Escherichiacolide* muestras de aves comerciales del laboratorio Bioservice desde el 2001 al 2014.

3. Diseño de la investigación

Se llevó a cabo un estudio retrospectivo observacional, registro de fichas clínicas de resultados de aislamientos de *E. coli* en aves comerciales y su perfil de susceptibilidad antimicrobiano del laboratorio Bioservice. Se tabularon los datos en una hoja de cálculo, procesando los resultados y determinando la tendencia de susceptibilidad antimicrobiana mediante el análisis de regresión lineal. (Ver anexo 1).

4. EQUIPOS Y PROCEDIMIENTOS

4.1 Materiales

- Informes de análisis de laboratorio (Cultivo bacteriano, identificación bioquímica y antibiogramas) de los años 2001-2014.
- Programa estadístico MINITAB 16.
- Editor de textos y hojas de cálculo (Microsoft Word y Excel)
- Computador personal
- Material de oficina (lapiceros, resaltadores, pizarra acrílica, plumones, mota, archivadores)
- USB Flash Drive Memory (Medio de almacenamiento externo)
- Hojas bond 80g

4.2 Procedimientos

4.2.1 Autorización de la empresa de servicios

Se envió una solicitud al laboratorio BIOSERVICE para obtener la autorización para el uso de su laboratorio y de sus registros clínicos para realizar la investigación.

4.2.2. Recopilación de Datos

Se trabajó con las fichas de resultados del laboratorio obtenidas a partir del análisis de muestras de aves comerciales remitidas al laboratorio. Se recolectaron y tabularon los resultados de los aislamientos de *E.coli* y niveles de susceptibilidad bacteriana a los antibióticos evaluados en la prueba de susceptibilidad antimicrobiana obtenidos a partir de protocolos del laboratorio (Ver anexo 2-5).

En las pruebas de susceptibilidad se colocaron valores de susceptible, intermedio y resistente de acuerdo a los halos de inhibición bacteriana frente a los antibióticos usados.

Para la determinación del perfil de susceptibilidad se utilizó el Manual del Comité Nacional de Estándares de Laboratorio Clínico (NCCLS) donde se detallan los datos de potencia de los antibióticos y los estándares de los halos de inhibición bacteriana a cada uno de los antibióticos (103)Ver anexo 6.

4.2.3. Análisis de Datos

La información recopilada en el presente estudio fue introducida a una base de datos de Microsoft Excel 2013 y expresada en porcentaje para determinar:

- Frecuencia de presentación de *Escherichiacolien* las muestras de aves comerciales en el laboratorio BIOSERVICE durante el periodo 2001-2014.
- Frecuencia de susceptibilidad antimicrobiana de *Escherichiacoli*; durante el periodo de estudio, determinando que antibióticos resultaron ser los más eficientes para las infecciones con *E.coli*.

Asimismo, para analizar la variable de susceptibilidad antimicrobiana de *E.coli* durante el periodo de estudio, el porcentaje de susceptibilidad fue introducida a una hoja de trabajo del programa estadístico MINITAB 16, para determinar la regresión lineal y análisis de varianza

IV. RESULTADOS

En el periodo 2001-2014 se analizaron en el laboratorio 19497 muestras de microbiología, de los cuales 2 974 pertenecieron a la especie aviar, representando el 16,54 % del total. El número de muestras con aislamientos de *Escherichiacoli* fue 1 257, representando el 42,27 %. La mayor frecuencia de aislamientos de *E.coli* se obtuvo de los pollos de carne (Cuadro N° 1) Ver anexo 7.

Cuadro N° 1.- Frecuencia de Aislamiento de *E. coli* por finalidad

Finalidad del ave	Casos totales de aves	Nºcasos <i>E. coli</i>	Frecuencia (%)
Pollos de carne	1566	859	54,85
Gallinas de postura	893	246	27,55
Reproductores	494	145	29,35
Gallos	21	7	33,33
TOTAL	2974	1257	42,27

De las muestras de aves comerciales enviadas durante el periodo 2001 – 2014 al laboratorio Bioservice, la mayor frecuencia de aislamientos de *E. coli* en el aparato respiratorio se obtuvo de los cornetes nasales (37,59%), tráquea (37,24%) y senos infraorbitarios(31,54%). En otros órganos se observó una alta frecuencia en el corazón (83,33%), la cavidad oral (80,00%) y ojos (33,33 %), y moderada frecuencia en la barbilla (27,5%), el intestino (25,41%) y el saco vitelino (23,87%) Ver Anexo 8.

En las pruebas de susceptibilidad antimicrobiana para los aislamientos de *E.coli*, se utilizaron una amplia gama de antibióticos, entre los cuales destacan las fluoroquinolonas como la ciprofoxacina, norfloxacina, enrofloxacina y levofloxacina; los betalactámicos como la amoxicilina y la ampicilina; las tetraciclinas como la oxitetraciclina, doxiciclina, tetraciclina y clortetraciclina; las sulfonamidas como el Sulfametaxol- trimetropim y los derivados de ácido fosfónico como la fosfomicina.

De los diversos aislamientos de *E.coli* obtenidos de muestras de aves comerciales en el periodo 2001- 2014, se encontró que las cepas de *E. coli* fueron susceptibles a espectinomicina con 66.93 % (168/251), cloranfenicol con 49.49% (194/392) y colistina con 35.06% (61/174) (Cuadro N° 2)

Antibióticos como la neomicina (68/178), ceftiofur (34/110) obtuvieron un porcentaje de sensibilidad intermedia a cepas de *E.coli* de 38.20 y 30,91 respectivamente (Cuadro N° 2).

Los antibióticos individuales que presentaron mayores niveles de resistencia bacteriana en las pruebas de susceptibilidad fueron la clortetraciclina con 96.79 (151/156), lincomicina con 85.71% (114/133), amoxicilina con 83.89% (859/1024), oxitetraciclina con 83.53% (852/1020), levofloxacina con 78.50% (168/214), doxiciclina 77.72 (565/727), tetraciclina con 77.44 (127/164), enrofloxacina con 73.38 % (838/1111), norfloxacina con 60,71% (669/1102), entre otros.

Cuadro N 2. Resultados de la prueba de susceptibilidad de antibióticos individuales en los aislamientos de *Escherichia coli* de muestras de aves en el periodo 2001-2014.

ANTIBIOTICOS		SUSCEPTIBLE		INTERMEDIO		RESISTENTE		TOTAL
		Nº	%	Nº	%	Nº	%	
Betalactamicos	Amoxicilina	126	12,30	39	3,81	859	83,89	1 024
	Ampicilina	0	0	0	0	7	100	7
Cefalosporinas	Ceftiofur	16	14,55	34	30,91	62	56,36	110
	Ceftriazona	14	18,67	14	18,67	47	62,67	75
	Cefazolina	4	8,33	3	6,25	41	85,42	48
Polimixinas	Colistina	61	35,06	56	32,18	57	32,76	174
Fluorquinolonas	Ciprofloxacina	259	22,72	151	13,25	730	64,04	1140
	Norfloxacina	341	30,94	92	8,35	669	60,71	1102
	Enrofloxacin	120	10,25	213	18,19	838	71,56	1171
	Levofloxacina	29	13,55	17	7,94	168	78,50	214
Tetraciclinas	Oxitetraciclina	93	9,12	75	7,35	852	83,53	1020
	Tetraciclina	20	12,20	17	10,37	127	77,44	164
	Doxiciclina	76	10,45	86	11,83	565	77,72	727
	Clortetraciclina	4	2,56	1	0,64	151	96,79	156
Aminoglicosidos	Gentamicina	142	34,89	39	9,58	226	55,53	407
	Neomicina	42	23,60	68	38,20	68	38,20	178
	Kanamicina	1	100	0	0	0	0	1
	Espectinomycin	168	66,93	39	15,54	44	17,53	251
Nitrofuranos	Furaltadona	131	31,72	81	19,61	201	48,67	413
	Furazolidona	0	0	0	0	2	100	2
	Nitrofurantoina	0	0	0	0	2	100	2
Macrolidos	Eritromicina	0	0	0	0	6	100	6
	Tilosina	3	6,12	0	0	46	93,88	49
Pleuromutilina	Tiamulina	0	0	0	0	34	100	34
Derivados Del Ácido Fosfónico	Fosfomicina	326	32,28	106	10,50	578	57,23	1010
Lincosamidas	Lincomicina	8	6,02	11	8,27	114	85,71	133
Fenicoles	Cloranfenicol	194	49,49	29	7,40	169	43,11	392
	Florfenicol	153	25,46	74	12,31	374	62,23	601

Los antibióticos asociados que fueron resistentes a cepas de *E.coli* aisladas de aves comerciales fueron la ciprofloxacina+doxiciclina con 91.84% (180/196), enrofloxacina+amoxicilina con 74.39 % (334/449), sulfametaxazol+trimetropin con 72.69 % (812/1117), entre otros. (Cuadro N 3).

Cuadro N 3. Resultados de la prueba de susceptibilidad a antibióticos asociados en los aislamientos de *Escherichia coli* de muestras de aves en el periodo 2001-2014.

ANTIBIOTICOS	SUSCEPTIBLE		INTERMEDIO		RESISTENTE		TOTAL
	Nº	%	Nº	%	Nº	%	
Sulfametoxazol- trimetropin	251	22,47	54	4,83	812	72,69	1117
Ciprofloxacina + Amoxicilina	75	14,10	92	17,29	365	68,61	532
Norfloxacina + Amoxicilina	111	19,82	45	8,04	404	72,14	560
Enrofloxacina + Amoxicilina	57	12,69	58	12,92	334	74,39	449
Fosfomicina + Trimetropin	86	27,48	3	0,96	224	71,57	313
Ciprofloxacina + Doxiciclina	6	3,06	10	5,10	180	91,84	196
Levofloxacina + Colistina	13	10,16	16	12,50	99	77,34	128
Lincomicina + espectinomicina	88	29,14	59	19,54	155	51,32	302

De los antibióticos individuales procesados en el análisis de regresión lineal, la amoxicilina y norfloxacina presentaron un coeficiente de variación menor a 0,05. Asimismo en las combinación antibiótica ciprofloxacina+amoxicilina, se obtuvo resultados similares que demostrarían asociación entre las variables Antibiótico-año (Ver anexo 9).

V. DISCUSION

En el Perú, la colibacilosis, al igual que otras enfermedades genera pérdidas económicas, por ello es fundamental el estudio de *Escherichia coli* como agente primario en el desarrollo de infecciones en aves comerciales, basándose principalmente en la caracterización genética de las cepas patógenas y el perfil de susceptibilidad antimicrobiana (43,63).

Según los resultados obtenidos en el presente trabajo, de las 2974 muestras de especie aviar, se aisló un 42,27 % cepas pertenecientes a *Escherichia coli* en aves comerciales en el laboratorio Bioservice. Este porcentaje es mayor contrastando con Malik y col (2005), que de un total de 218 cepas extraídas de muestras órganos respiratorios de pollos de un laboratorio en Minesota desde el 1998 a 2002, tuvo como frecuencia de *E.coli* un 36.7 % (49).

El número de aislamientos de *E. coli* en aves ha sido mayor en los últimos 4 años. De estos resultados podemos señalar el aumento de los procesos infecciosos por *E. coli* en muestras de aves durante el periodo 2001-2014, lo que indica una alta ocurrencia de las infecciones a través del tiempo, concordando así con lo sostenido por Koga (2010), quien muestra en la casuística de *Avibacterium paragallinarum*, *Pasteurella multocida*, *Gallibacterium anatis* y *Ornithobacterium rhinotracheale* realizada entre el 2005 y el 2009, afirmando que existe un alta prevalencia de infecciones bacterianas (103)

La mayor frecuencia de *E.coli* ha sido en pollos de carne. Como sostiene Mosqueda (2013), los resultados demuestran la sensibilidad que tiene el pollo de engorde a fallas de manejo como factores ambientales, deficiencias nutricionales y a la acción de microorganismos patógenos. Asimismo, el Instituto Nacional de Estadísticas de Perú (2014), afirma el predominio de la población de pollos de carne en comparación a las gallinas y reproductores. Por otro lado, Vandemaele(2002) en Bélgica,reporto una alta incidencia de *E.coli* en gallinas ponedoras desde 1997 a 2000, mientras que en reproductoras y broilers la incidencia fue menor (51, 52 ,62).

La frecuencia de aislamientos de *E.coli* de los órganos del aparato respiratorio fue elevada, sugiriendo que la bacteria ha sido inhalado por los pollos y ha causado la infección en el tracto respiratorio, como lo ha comprobado Dho-Moulin y col (1999), en algunos de sus modelos experimentales que la infección por APEC ocurrió a través de la inhalación de polvo contaminado con heces. Asimismo, Vandemaele (2002), sostiene que los síndromes asociados a la Infección con *E.coli* empiezan con aerosaculitis, evolucionando a una bacteriemia y una infección generalizada que se manifiesta como una poliserositis (90, 96).

En cuanto a la frecuencia de aislamientos de *E.coli* en órganos del aparato digestivo de las aves, el intestino y el saco vitelino tuvieron una frecuencia menor a 30 por ciento.Los resultados de Skyberg y col (2003),sugieren que cepas intestinales aisladas de aves aparentemente sanas podrían causar enfermedad en huéspedes susceptibles, dependiendo de la combinación de los factores de virulencia que se presenten (64).

En las pruebas de susceptibilidad, las bacterias presentaron niveles altos de susceptibilidad a antibióticos como espectinomicina, cloranfenicol y colistina.Con respecto a Cloranfenicol, Sumano (2010), ha documentado que debido a la toxicidad de sus residuos, tan solo una

parte por millón (ppm) es suficiente para inducir anemia aplástica o síndrome del niño gris, por lo que se descarta su uso en veterinaria (16).

Por otro lado se corroboró los resultados de Antilles y col (2013), los que presentaron un porcentaje mayor a 50% en cepas de *E. coli* aisladas de aves que fueron sensibles a Colistina (50). En otro estudio, Rahman y col (2013), sostiene que 50 % de aislamientos de *E. coli* de pollos de engorde fueron sensibles a cloranfenicol y 37.50% a la gentamicina (59).

Las cepas de *E. coli* presentaron sensibilidad intermedia a neomicina. Antilles y col (2013), reportó que más del 60 % de las cepas de *E. coli* de pollos de engorde resultaron sensibles a la neomicina (50). La tolerancia o susceptibilidad intermedia debe ser considerada como un tipo de resistencia (42).

Dentro del estudio se encontró un alto nivel de resistencia bacteriana, por encima del 50%, para las tetraciclinas, lincosamidas, betalactámicos, fluoroquinolonas, sulfonamidas, cefalosporinas, fenicoles y aminoglucósidos. En medicina veterinaria, crianza intensiva (aves, porcinos, ovinos), los antimicrobianos son usados en dosis subterapéuticas como promotores de crecimiento, profilácticos para prevención de enfermedades y para terapia en animales. Por ello, se ha registrado resistencia bacteriana desde 1950, evolucionando a través del tiempo. La venta indiscriminada de antibióticos en veterinaria y la mínima vigilancia de resistencia por las autoridades son factores que han contribuido con el problema de resistencia (42). Asimismo, la investigación realizada por Moulin (2007), en la cual reportó la transferencia de genes de *Escherichia coli* patogénica extraintestinal de aves a humano, nos hace reconocer que pueden existir residuos de antibióticos que transmitan genes de resistencia a través de la ingestión de pollo, considerándose a la resistencia bacteriana como un riesgo para la salud pública (93).

Más del 70 % de las cepas de *E.coli* fueron resistentes a las tetraciclinas, comprobado también por Saidi y col (2013), quienes reportaron que un 100 % de los aislamientos de *E. coli* de aves fueron resistentes a este antibiótico (47).

En el caso de los flouoroquinolonas, entre 60-70% de las cepas de *E.coli* fueron resistentes, siendo similar a los resultados de Salehi y col (2006), quienes muestran alta prevalencia de resistencia de enrofloxacina (68%) y ciprofloxacina (67%) (46). Asimismo, Bravo y col (2014), también encontraron que cepas de *E.coli* procedentes de pollos de carne presentaron elevados niveles de resistencia a enrofloxacina (80%) y norfloxacina (77%) (43).

En el estudio, la resistencia a la amoxicilina fue 83,89 %, coincidiendo con Antilles y col (2013), quienes encontraron que la amoxicilina es el antibiótico con mayor número de aislados de *E. coli* resistentes 70,4% (64.6- 81.0%) (50).

Más del 50 % de aislamientos de *E.coli* fueron resistentes a los antibióticos asociados. Bravo y col (2014), encontró un nivel de resistencia de 90% a la sulfa asociada al trimetoprim (43).

El análisis de regresión lineal (p) para la amoxicilina, norfloxacina y ciprofloxacina+amoxicilina, señala que ellos presentan un coeficiente de regresión negativo para susceptibilidad, es decir un aumento de resistencia bacteriana a través del tiempo.

VI. CONCLUSIONES

La frecuencia relativa de los aislamientos de *E. coli* de muestras de aves comerciales remitidas a la empresa Bioservice fue de 42,27%. Asimismo las cepas de *E.coli* presentaron altos niveles de resistencia bacteriana a las tetraciclinas, lincomicinas y Fluoroquinolonas. Mientras que *E.coli* presentó sensibilidad ante la espectinomicina, cloranfenicol y colistina.

VII. RECOMENDACIONES

1. Concientizar a los criadores de pollos comerciales con el propósito de detener la aplicación indiscriminada de antibióticos, instaurar una lista de antibióticos para el tratamiento de *E.coli* y modificarla de acuerdo al comportamiento del agente en el tiempo.
2. Promover la utilización de mezclas de exclusión competitiva como los prebióticos y probióticos.
3. Creación de programas para monitorear la transmisión de resistencia antimicrobiana mediada por plásmidos.

VIII. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Gyles C. Shiga toxin-producing *Escherichia coli*: an overview. *J Anim Sci.* 2007; 85: 45-62.
2. Garrity G, Bell J, Lilburn T. Taxonomic outline of the Prokaryotes *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*. 2.^a ed. New York: *Bergey's Manual Trust*; 2004.
3. Quinn P, Markey B, Carter M, Donnelly W, Leonard F. *Microbiología y Enfermedades Infecciosas Veterinarias*. España: *EditorialAcribia*;2002.
4. Gonzales A. Virotipos de *Escherichiacoli* en infecciones intestinales: Epidemiología y Factores de Virulencia de los *E.coli* enterohemorrágico. *Rev. Inv. Vet. Perú.* 2001; 1:10-24.
5. Koneman E, Allen S, Janda W, Schereckenberger P, Winn W. *Diagnostico Microbiológico*. 5.^a ed. Buenos Aires: *Editorial Médica Panamericana*;2004.
6. Nataro J, KaperJ. Diarrheagenic *Escherichia coli*. *ClinMicrob Rev.* 1998;11 (1):142-201.
7. Kaper J, Nataro J, Mobley H. Pathogenic *Escherichia coli*. *Nat Rev Microb.* 2004; 2: 123-140.
8. Gyles C, Prescott J, Glenn J, Thoen C. *Pathogenesis of bacterial infections in Animals*. 4.^a ed. USA. *Blackwell publishing*;2010.
9. Gilbert M. *Detección y Caracterización de aislados de E. coli de origen clínico y fecal en gallinas ponedoras [Tesis doctoral]*. Madrid: *Universidad Complutense de Madrid*;2010.

10. Jawetz E, Melnick J, Adelberg E. Microbiología Medica. 16.^a ed. México: El Manual Moderno;1999.
11. Aquiahualt M, Pérez M. Manual de prácticas de laboratorio de microbiología general. Unidad Itztapalapa:Universidad Autónoma Metropolitana; 2004.
12. Agurto T. Microbiología Bioquímica Bacteriana. Enterobacteriaceae. Perú:Universidad Ricardo Palma. Facultad de Ciencias Biológicas; 2009.
13. Blanco J, Blanco M, Blanco J, Mora A, Alonso M, González E, Bernárdez M. Enterobacterias: características generales. Género Escherichia. Manual de Microbiología Veterinaria. 2002;21: 301-325.
14. Vandekerchove D, De Herdt P, Laevens H, Pasmans F. Colibacillosis in caged layer hens: characteristics of the disease and the aetiological agent. Avian Pathology. 2004;33(2): 117-125.
15. Marin M, Gudiol F. Antibioticos betalactamicos. Enferm Infecc Microb Clin. 2003; 21 (1).
16. Sumano H, Gutierrez L. Farmacologia clinica en aves comerciales. 4^a ed. México:Mc Graw Hill;2010.
17. Tanner AC. Antimicrobial drug use in poultry. In Antimicrobial therapy in veterinary medicine, 3.^a ed; Prescott JF, Baggot JD, Walker RD, editors; Iowa State University Press: Ames, IA,2000; p. 637-55.
18. Mella S, Zemelman C, Bello H, Dominguez M, Gonzales G, Zemelman R. Propiedades microbiológicas, clasificación y relación estructura- actividad de cefalosporinas e

- importancia de las cefalosporinas de cuarta generación. Rev chil infectol. 2001;18(1)
19. Campos A, Martínez M, Patiño N. Actualidades farmacológicas: Quinolonas. Rev Fac Med UNAM.2008;51(4)
20. Rodríguez M, González J, Barreto J, Lim N, et al. Acta médica: Tetraciclinas. 1998; 8(1):75-9
21. Molina J, Cordero E, Palomino J, Pachon J. Aminoglucósidos y polimixinas. Enferm Infecc Microb Clin. 2009; 27(3):178–188.
22. Barranco E. Acta médica:Aminoglucósidos.1998;8(1):48-53.
23. Mella S, Sepulveda M, González G, Bello H, Domínguez M, Zelmelman R, et al. Aminoglucósidos-aminociclitolos: Características estructurales y nuevos aspectos sobre su resistencia. Rev Chil Infect. 2004; 21(4): 330-338.
24. Abu-Basha E, Gehring R, Albwa'neh S. Pharmacokinetics and bioavailability of spectinomycin after i.v., i.m., s.c. and oral administration in broiler chickens. J Vet Pharmacol Therap. 2007; 30: 139–144.
25. Cue M, Morejon M. Antibacterianos de acción sistémica: Parte III. Sulfonamidas y tetraciclinas. Rev Cubana Med Gen Integr 1999; 15(2):156-67
26. Masters P, O'Bryan T, Zurlo J, Miller D, Joshi N. Trimethoprim-Sulfamethoxazole Revisited. Arch Intern Med. 2003; 163:402-410.

27. Sköld O. Sulfonamides and Trimethoprim. En Mayers D. Antimicrobial Drug Resistance. Vol.1: Mechanisms of Drug Resistance. USA: Publisher Humana Press; 2009. Pp. 259-269,
28. Coloma Z. Fosfomicina. Sistema de Revisiones en Investigación Veterinaria de San Marcos. Hallado en: http://veterinaria.unmsm.edu.pe/files/Articulo_coloma_Final.pdf. Acceso el 7 de marzo del 2016
29. Mestorino N, Daniele M, Errecalde J. Residuos tisulares de florfenicol tras su administración oral en pollos parrilleros. Hallado en : https://www.researchgate.net/profile/Nora_Mestorino/publication/259461321_Residuos_tisulares_de_florfenicol_tras_su_administracion_oral_en_pollos_parrilleros/links/54aa6d410cf2eccc56e6edab.pdf
30. Rios A. Biodisponibilidad y metabolismo de un derivado fluorado del tianfenicol en pollos broiler. Madrid. Universidad Complutense de Madrid. 2004
31. Brito K, Jaenisch F, Oliveira G, Soares B, Brito B. resistencia antimicrobiana y patogenicidad de muestras de Escherichia coli aisladas de lesiones de celulitis en pollos. Hallado en: <http://ainfo.cnptia.embrapa.br/digital/bitstream/item/54734/1/resistencia-antimicrobiana.pdf>. Acceso el 15 de marzo del 2016
32. Falagas M, Kasiakou S. Colistin: The Revival of Polymyxins for the Management of Multidrug-Resistant Gram-Negative Bacterial Infections. Clin Infect Dis. 2005;40 (9): 1333-1341.
33. Lucas M, Mestorino N, Errecalde J. Macrólidos: novedades de un clásico grupo de antimicrobianos. Analecta Veterinaria. 2007; 27 (1): 36-45.

34. Islam K, Klein U , Burch D. The activity and compatibility of the antibiotic tiamulin with other drugs in poultry medicine—A review. *Poultry Science*. 2009; 88 (11):2353-2359
35. Rubio C, Gil J, Gomez-Lus R. Significado clínico de las resistencias bacterianas. En Gómez J, Gobernado M. Eds. *Enfoque clínico de los Grandes Síndromes Infecciosos*. 2.^a ed. Madrid: Ergón Editorial;2006.
36. Pallecchi L, Malossi M, Mantella A, Gotuzzo E, Trigoso C, Bartoloni A, et al. Detection of CTX-M-type betalactamase genes in fecal *Escherichia coli* isolates from healthy children in Bolivia and Peru. *Antimicrob Agents Chemother*. 2004; 48: 4556-61.
37. Gutiérrez L, Montoya O, Velez J. Probióticos: una alternativa de producción limpia y de remplazo a los antibióticos promotores de crecimiento en la alimentación animal. 2013.
38. Antibióticos de uso veterinario y su relación con la seguridad alimentaria y salud pública. Hallado en: <http://www.racve.es/files/2013/03/2007-02-10-Discursoringreso-D.-Arturo-Ram%C3%B3n-Anad%C3%B3n-Navarro.pdf>. Acceso el 12 de Enero de 2015.
39. Burrows W. *Tratado de Microbiología*. México: Editorial Freeman Interamericana;1985.
40. Van den Bogaard, Willems R, London N, Top J, Stobberingh E. Antibiotic resistance of faecal enterococci in poultry, poultry farmers and poultry slaughterers. *J. Antimicrob. Chemother*. 2002; 49 (3): 497-505
41. Van den Bogaard A, London N, Driessen C, Stobberingh E. Antibiotic resistance of faecal *Escherichia coli* in poultry, poultry farmers and poultry slaughterers. *JAntimicrob Chemother*. 2001; 47 (6): 763-771.

42. Falcón N, Ortega C, Gorniak S, Villamil L, Ríos C, Simón M. El problema de la resistencia a antibióticos en la salud pública. *Rev Sapuvet Salud Pública*; 1: 75-88. Hallado en: <http://revistas.lasalle.edu.co/index.php/us/article/viewFile/235/176>. Acceso el 15 de marzo del 2016.
43. Bravo E, Castro N, Salas M. Evaluación de resistencia y sensibilidad de los principales antibióticos usados en avicultura frente a cepas de *Escherichia coli* aisladas de pollo de carne. 2014. Hallado en: <http://www.actualidadavipecuaria.com/articulos/evaluacion-resistencia-sensibilidad-antibioticos-usados-avicultura.html>. Acceso el 15 de marzo del 2016.
44. Blanco J, Blanco M, Mora A. Prevalence of Bacterial Resistance to Quinolones and Other Antimicrobials among Avian *Escherichia coli* Strains Isolated from Septicemic and Healthy Chickens in Spain. *J of Clin microb*. 1997; 35(8): 2184-2185.
45. Rahman M, Rahman B, Rahman B. Antibiogram and plasmid profile of isolated *Escherichia coli* from Broiler and layer. *Research Journal of Microbiology*. 2008; 3 (2) :82-90.
46. Salehi T, Bonab S. Antibiotics Susceptibility Pattern of *Escherichia coli* strains isolated from chickens with colisepticemia in Tabriz Province, Iran. *Int J Poult Science*. 2006;5(7):677-84.
47. Saidi B, Mafirakureva P, Mbanga J. Antimicrobial. Resistance of *Escherichia coli* Isolated from Chickens with Colibacillosis in and Around Harare, Zimbabwe. *Avian Dis*. 2013; 57:152–154.

48. Rosario C. Resistencia antimicrobiana de cepas apec (avian pathogenic escherichia Coli) provenientes de aves de postura hyline w36 de 1 a 10 días de edad. México. Hallado en: <http://www.engormix.com/MA-avicultura/articulos/aneca-resistencia-antimicrobiana-cepas-t4353/p0.htm>. Acceso el 1 de marzo del 2016.
49. Malik YS, Chandler Y, Gupta SC, Goyal SM. A retrospective study on antimicrobial resistance in Mannheimia (Pasteurella) haemolytica, Escherichia coli, Salmonella Species, and Bordetella avium from Chickens in Minnesota. J. Appl. Poult. Res. 2005; 14(3):506–511.
50. Antilles N, Blanco A, Camprubi Q, Jove R, Biarnes M. Análisis de resistencias a antimicrobianos de cepas de Escherichia coli aisladas en aves en España de 1998 a 2013. Centro de Sanidad Avícola de Catalunya y Aragón. Hallado en: http://www.wpsa-aeca.com/aeca_imgs_docs/_ analisis_de_resistencias_a_antimicrobianos_de_cepas_de_escherichia_coli_aisladas_en_aves_en_espana_d e_1998_a_2013_-_antilles,_n.pdf. Acceso el 7 de agosto del 2015.
51. Ministerio de Agricultura de Perú. Realidad y problemática del sector pecuario: Aves. Hallado en: <http://www.minag.gob.pe/portal/sector-agrario/pecuaria/situacion-de-las-actividades-de-crianza-y-produccion>. Acceso el 26 de diciembre del 2014.
52. Instituto Nacional de Estadística e Informática. Producción Nacional. Hallado en: <http://www.inei.gob.pe/media/MenuRecursivo/boletines/produccion-ocutbre-2014.pdf>. Acceso el 12 de Enero del 2015.
53. Mosqueda A. El Denominado Síndrome Respiratorio del pollo de engorde. 2013. Hallado en : <http://avimex.dyndns.org/...lo%2520de%2520Engorda.pdf> . Acceso el 1 de julio del 2013.

54. Barnes H, Gross W. Colibacillosis. In Diseases of Poultry, 10.^a ed.; Calnek, B.W., Barnes, H.J., Beard, C.W., McDougald, L.R., Saif, Y.M., Eds.; Iowa State University Press: Ames, IA, USA, 1997; pp. 131-141.
55. La Ragione R, Woodward M. Virulence factors of *Escherichia coli* serotypes associated with avian colisepticemia. Res. Vet. Sci. 2002; 73: 27-35.
56. Condemarin A. Caracterizacion Molecular de Patotipos de *Escherichia coli* patogeno aviar. Hallado en: http://veterinaria.unmsm.edu.pe/files/Articulo_condemarin_2012.pdf. Acceso el 30 de marzo del 2016.
57. Gross W. Diseases due to *Escherichia coli* in poultry. In Gyles C. *Escherichia coli* in Domestic Animals and Humans. Wallingford, UK. Ed CAB International Library; 1994.
58. Chart H, Smith H, La Ragione R, Woodward M. An investigation into the pathogenic properties of *Escherichia coli* strains BLR, BL21, DH5 α , and EQ1. J. Appl. Microbiol. 2000; 89:1048-1058.
59. Rahman M, Samad M, Rahman M, Kabir S. Bacteriopathological studies on salmonellosis, colibacillosis and pasteurellosis in natural and experimental infections in chickens. Bangl. J. Vet. Med. 2004; 2:1-8.
60. Wray C, Davies R. Enterobacteriaceae. In Jordan F, Pattison M, Alexander D, Faragher T. Poultry Diseases. 5.^a ed. USA: Saunders Editors; 2001
61. Gross W, Siegel P, Hall R, Domermuth C, DuBoise, R. Production and persistence of antibodies in chickens to sheep erythrocytes. 2. Resistance to infectious diseases. Poult. Sci. 1980; 59: 205-210.

62. McGruder E, Moore G. Use of lipopolysaccharide (LPS) as a positive control for the evaluation of immunopotentiating drug candidates in experimental avian colibacillosis models. *Res. Vet. Sci.* 1998; 66: 33-37.
63. Carranza C, León R, Falcón 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 Inv Vet Perú.* 2012; 23 (2): 209-219.
64. Skyberg J, Horne S, Giddings C, Wooley R, Gibbs P, Nolan L. Characterizing avian *Escherichia coli* isolates with Multiplex Polymerase Chain Reaction. *Avian Dis.* 2003; 47: 1441-1447
65. Vandemaele F, Goddeeris B, Vereecken M, Derijcke J. Incidence and antibiotic resistance of pathogenic *Escherichia coli* among poultry in Belgium. *Vet Rec.* 2002; 151:355–356.
66. Bayona M. Evaluación Microbiológica de alimentos adquiridos en la vía pública en un sector del norte de Bogotá. *Rev UDCA Act & Div Cient.* 2009;12(2): 9-17. Hallado en: <http://www.scielo.org.co/pdf/rudca/v12n2/v12n2a02.pdf>. Acceso el 12 de Enero del 2015.
67. Dirección General de Epidemiología. Enfermedades Transmitidas por Alimentos, una importante causa de morbilidad en nuestro País. *Bol Epidemiol.* 2012; 21(50). Hallado en: <http://www.dge.gob.pe/portal/docs/vigilancia/boletines/2012/50.pdf>
68. World Health Organization (WHO). Prevention and control of enterohaemorrhagic *Escherichia coli* (EHEC) infections. Report of a WHO Consultation. Geneva. 1997.

69. Levine M. Escherichia coli that cause diarrhea: enterotoxigenic, enteropathogenic, enteroinvasive, enterohemorrhagic, and enteroadherent. J. Infect. Dis. 1987; 155: 377-89.
70. Martínez T , Mora D. Conocimientos y opiniones sobre la carne de pollo de dos comunidades rural-urbana de Costa Rica. Rev costarric salud pública. 2010; 19(1): 03-11.
71. Norma Técnica Peruana. NTP 201.054. Carne y productos cárnicos. 2001. Hallado en: <https://es.scribd.com/doc/36905714/Aves-Para-Consumo>. Acceso el 15 de marzo del 2016.
72. Mulder R. Hygiene during transport, slaughter and processing. In Richardson R, Mead G. Poultry Meat Science: Poultry Science Symposium Series. Oxford shire UK; 1999. pp. 277-285.
73. Alvarado C. Calidad de la carne de pollo. Universidad de Texas A&M, EUA, durante el XXII Congreso Centroamericano y del Caribe de Avicultura, en Panamá en mayo de 2012. Hallado en: <http://www.elsitioavicola.com/articles/2268/calidad-de-la-carne-de-pollo/>
74. Alonso M, Padola N, Parma A, Lucchesi P. Enteropathogenic Escherichia coli contamination at different stages of the chicken slaughtering process. Poultry Science. 2011; 90 (11):2638-2641.

75. Alonso M, Sanz M, Padola N, Lucchesi P. Caracterización de cepas de *Escherichia coli* enteropatógeno (EPEC) aisladas durante el proceso de faena de pollos. *Rev. argent. microbiol.* 2014;46 (2).
76. Ramirez P, Castañeda M, Eslava C, Navarro A, Licona D, Morales M, Rosario C. Caracterización de cepas *E. coli* aisladas de canales de pollo obtenidas de rastro, mercados públicos y supermercados. Simposio de procesamiento e inocuidad de productos avícolas. Hallado en: http://usapeec.org.mx/publicaciones/presentaciones/pdf/caracterizacion_de_cepas_de_escherichia_coli_aisladas_de_canales_de_pollo_2014.pdf. Acceso el 15 de marzo de 2016.
77. Achtman M, Heuzenroeder M, Kusecek B, Ochman H, Caugant D, Selander R, et al. Clonal analysis of *Escherichia coli* O2: K1 isolated from diseased humans and animals. *Infect. Immun.* 1986; 51: 268-276.
78. Cherifi A, Contrepolis M, Picard B, Gouillet P, Orskov I, Orskov F. Clonal relationships among *Escherichia coli* serogroup O78 isolates from human and animal infections. *J. Clin. Microbiol.* 1994; 32: 1197-1202.
79. Hafez H, Löhren U. Swollen head syndrome: clinical observations and serology in West Germany. *Deutsche Tierärztliche Wochenschrift.* 1990; 97:322-324.
80. Doyle M, Schoeni J. Isolation of *Escherichia coli* O157:H7 from retail fresh meats and poultry. *Appl. Environ. Microbiol.* 1987; 53: 2394-2396.
81. Radu S, Ling O, Rusul G, Karim M, Nishibuchi M. Detection of *Escherichia coli* O157:H7 by multiplex PCR and their characterization by plasmid profiling, antimicrobial resistance, RAPD and PWWFGE analyses. *J Microbiol Methods.* 2001; 46:131-139.

82. Manges A, Smith S, Lau B, Nuval C, Eisenberg J, Dietrich P, et al. Retail meat consumption and the acquisition of antimicrobial resistant *Escherichia coli* causing urinary tract infections: A case-control study. *Foodborne Pathog. Dis.* 2007; 4:419-431.
83. Boric V. Aplicaciones de la Epidemiología Molecular en la detección de brotes de enfermedades transmitidas por alimentos. *Rev Boliv.* 2008; 16(1):92-97.
84. Organización Panamericana de la Salud. Potencial epidemiológico del diagnóstico molecular. *Rev Panam Salud Publica.* 1997; 2(4).
85. Foxman B, Riley L. Molecular Epidemiology: Focus on Infection. *American Journal of Epidemiology.* 2001; 153(12).
86. Fernandez F, Lopez L, Pascual A. Técnicas de tipificación molecular para la vigilancia y control de la infección. *Enferm Infecc Microbiol Clin.* 2013; 31(1):20-25.
87. Griffin P, Tauxe R. The epidemiology of infections caused by *Escherichia coli* O157:H7, other enterohemorrhagic *E. coli*, and the associated hemolytic uremic syndrome. 1991. *Epidemiol Rev.* 1991; 13(1): 60-98.
88. Croxen M, Finlay B. Molecular mechanisms of *Escherichia coli* pathogenicity. *Nature Rev Microb.* 2010; 8: 26-38.
89. Carvalho de Moura A, Irino K, Vidotto M. Genetic variability of avian *Escherichia coli* strains evaluated by enterobacterial repetitive intergenic consensus and repetitive extragenic palindromic polymerase chain reaction. *Avian Dis.* 2001; 45: 173-181.
90. White D, Dho-Moulin M, Wilson R, Whittam T. Clonal relationships and variation in virulence among *Escherichia coli* strains of avian origin. *Microb Pathog.* 1993; 14: 399-409.

91. Da Silveira W, Lancellotti M, Ferreira A, Solferini V, De Castro A, Stehling E, et al. Determination of the clonal structure of avian *Escherichia coli* strains by isoenzyme and ribotyping analysis. *Journal Vet Med, Series b*. 2003; 50(2):63-69.
92. Adiri R, Gophna U, Ron E. Multilocus sequence typing (MLST) of *Escherichia coli* O78 strains. *FEMS Microb Letters*. 2003; 222: 199-203.
93. Moulin-Schouleur M, Reperant M, Laurent S, Bree A, Mignon-Grasteau S, Germon P, et al. Extraintestinal pathogenic *Escherichia coli* strains of avian and human origin: link between phylogenetic relationships and common virulence patterns. *Journal of Clinical Microbiology*. 2007; 45: 3366-3376.
94. Belanger L, Garenaux A, Harel J, Boulianne M, Nadeau E, Dozois C. *Escherichia coli* from animal reservoirs as a potential source of human extraintestinal pathogenic *E. coli*. *FEMS Immunol Med Microbiol*. 2011;62: 1–10
95. Georgopoulou J, Lordanidis P, Bougiouklis P. The frequency of respiratory diseases in broiler chickens during 1992–2001. *J Hellenic Vet Med Soc*. 2005; 56:219–227
96. Dho-Moulin M, Morris J. Avian pathogenic *Escherichia coli* (APEC). *Veterinary Research*. *BioMed Central*. 1999;30(2-3):299-316.
97. Barnes H, Nolan L, Vaillancourt L, Colibacillosis. EnFadly A, Glisson J, Mc Dougald L, Nolan L, Swayne D. *Diseases of Poultry*. 12 ed. Blackwell Publishing. Australia. 2008.
98. Abad J, Garcia F. Valoración de la calidad del pollito. 2013. Hallado en : http://www.wpsa-aeca.es/aeca_imgs_docs/juan_carlos_abat.pdf

99. Rosario C, Téllez G, López , Villaseca J, Anderson R, Eslava C. Bacterial isolation rate from fertile eggs, hatching eggs, and neonatal broilers with yolk sac infection. *Rev Latinoam Microbiol.* 2004; 46 (1-2): 12-16.
100. Schrader J, Singer R, Atwill E. A Prospective Study of Management and Litter Variables Associated with Cellulitis in California Broiler Flocks. *Avian Dis.* 2004; 48 (3): 522-530.
101. Gomis M, Riddell C, Potter A, Allan B. Phenotypic and genotypic characterization of virulence factors of *Escherichia coli* isolated from broiler chickens with simultaneous occurrence of cellulitis and other colibacillosis lesions. *Can J Vet Res.* 2001; 65(1): 1–6.
102. Monroy M, Knöbl T, Bottino J, Ferreira C, Ferreira A. Virulence characteristics of *Escherichia coli* isolates obtained from broiler breeders with salpingitis. *Comp. Immun. Microbiol. Infect. Dis.* 2005; 28:1-15.
103. Comité Nacional de Estándares Clínicos de Laboratorio (NCCLS). 2002. Performance Standards for Antimicrobial Disk and Dilution Susceptibility Test for Bacteria Isolated from Animals. M31-A2, Ed.2, vol.22, N° 6.
104. Koga Y. Enfermedades respiratorias inducidas en bacterias emergentes (Síndrome Respiratorio Bacteriano Aviar): diagnóstico y control. Hallado en :<http://www.actualidadavipecuaria.com/articulos/enfermedades-respiratorias-inducidas-por-bacterias-emergentes>

ANEXO 2

Criterios para la recopilación de datos

- a. Finalidad del ave: Gallina de postura, gallos, pollo de engorde, reproductores
- b. Diagnóstico de *E. coli* en base a los órganos lesionados
 - Órganos del aparato respiratorio: Sacos aéreos, pulmones, tráquea, senos infraorbitarios y cornetes nasales.
 - Órganos del aparato digestivo: Cavidad oral, saco vitelino, hígado, bazo, intestino
 - Órganos del aparato reproductor: Ovario, oviducto
 - Órganos del aparato urinario: Riñones
 - Otros: Articulaciones barbilla , ojos, tejido subcutáneo, saco pericárdico

Fuente: Elaboración propia, 2015

ANEXO 3

Formato 2: Protocolo de procesamiento de la muestras (Aves comerciales)

1. **OBJETIVO**
2. **REFERENCIAS**
 - 2.1. A Laboratory Manual for the Isolation and Identification of Avian Pathogens, Fifth Edition, 2008. Edited by L. Dufour-Zavala, Swayne D. J. Glisson, M. Jackwood, J. Pearson, W. Reed, M. Jackwood, and P. Woolcock. Published by The American Association of Avian Pathologist, University of Pennsylvania, USA.
 - 2.2. Manual de Procedimientos Técnicos de Laboratorio, 5° Edición 2007. Editado por MVZ J.C. Valladares, 2007, Laboratorio de Control de Calidad y Patología Aviar, PAPSA, México.
3. **PROCEDIMIENTO**
 - 3.1. **MUESTRAS:** Aves bebes, jóvenes y/o adultas (Broilers, Ponedoras, Reproductoras).
 - 3.2. **MATERIALES, REACTIVOS Y EQUIPOS:** Solución desinfectante, alcohol, formol al 10%, frascos para muestras, algodón, jeringas, agujas, papel desechable, hisopos, mandiles plásticos.
 - 3.3. **METODO:**
 - 3.3.1. El personal deberá colocarse el mandil plástico antes de comenzar el procedimiento. La inspección clínica debe realizarse antes de la toma de muestras y al sacrificio de las aves, registrando de severidad de los signos.
 - 3.3.2. Para el sacrificio de las aves utilizamos los métodos físicos como la dislocación cervical (Aves jóvenes y Adultas) y la decapitación (Aves bebes).
 - 3.3.3. Las aves sacrificadas se colocan en bandejas en posición decúbito dorsal, con los miembros inferiores hacia el extremo y se llevan al área microbiológica donde se encuentra el instrumental y material necesario para la necropsia y toma de muestras.
 - 3.3.4. Se hace una incisión cortando la piel desde la parte ventral del pico hasta la punta del esternón, por la línea media y continuarla por ambos lados hasta las piernas por la parte ventral. A partir de la incisión, separar la piel del tejido subcutáneo hacia ambos lados, hasta exponer los órganos cervicales y las masas musculares de tórax, abdomen y piernas.
 - 3.3.5. Se desarticula la articulación coxofemoral de ambas piernas haciendo tracción hacia arriba hasta liberar la cabeza del fémur de su acetábulo.
 - 3.3.6. Se realiza una segunda incisión para exponer las vísceras, cortando con las tijeras de necropsias los huesos pectorales desde la punta del esternón, hacia ambos lados de la pechuga, en dirección caudo craneal hasta la articulación clavicular, desprender las articulaciones de un lado y desplazar la pechuga hacia arriba para exponer la cavidad toracoabdominal.
 - 3.3.7. Se seleccionan y recolectan las muestras para estudios microbiológicos: Con el fin de evitar contaminación, antes de manipular los órganos y tejidos dentro de las cavidades, se deben seleccionar y recolectar las muestras para bacteriología en caso necesario, de acuerdo a los datos de la Historia Clínica y a los estudios requeridos; estas muestras deben tomarse en condiciones de esterilidad. Las muestras para aislamiento de microorganismos pueden ser tomadas por la disección de una porción del tejido, bien ser tomadas con un hisopo estéril.
 - 3.3.8. Para coleccionar muestras de órganos con un hisopo estéril, se debe flamear con la espátula al rojo la superficie del órgano en el caso de órganos parenquimatosos, o la pared en el caso de órganos tubulares. Cortar con tijeras la superficie o la pared del órgano, introducir el hisopo en la abertura, girándolo sobre su eje mayor. Se puede usar el mismo hisopo para muestrear hasta 10 aves, siempre y cuando la muestra proceda del mismo órgano. El hisopo con la muestra puede ser colocado en tubos con medio de transporte o puede ser sembrado mediante una estría primaria sobre la superficie del medio de cultivo contenido en cajas de Petri.

Fuente: Laboratorio Bioservice

ANEXO 4

Formato 3. Protocolo de aislamiento e identificación bioquímica de enterobacterias (A excepción de *Salmonella spp.* y *Yersinea spp.*)

1. **OBJETIVO:**
2. **REFERENCIAS**
 - 2.1. Markey B., Leonard F., Archambault M., Culliname A., Maguire D. 2013. Clinical Veterinary Microbiology. 2da Ed. Section 2: Bacteriology, Chapter 17.
 - 2.2. Bergey's manual of Systematic Bacteriology.
3. **PROCEDIMIENTO**
 - 3.1. **MUESTRA:** Heces, tejidos, leche (mastitis), orina, descargas uterinas y exudados.
 - 3.2. **MATERIALES, REACTIVOS Y EQUIPOS:** Agar sangre, agar MacConkey, estufa 37°C.
 - 3.3. **METODO:**
 - 3.3.1. Sembrar la muestra en agar sangre y MacConkey. Para esto colocar la muestra en contacto con la superficie del agar:
 - 3.3.1.1. Heces colocar de 1 a 3 gotas de heces diarreicas o de una suspensión de heces, sembrar por agotamiento.
 - 3.3.1.2. Órganos poner en contacto la mucosa o parénquima con la superficie del agar, sembrar por agotamiento.
 - 3.3.1.3. Leche (mastitis), exudados, orina: Colocar de 1 a 3 gotas en la superficie del agar, sembrar por agotamiento.
 - 3.3.2. Incubar a 37^a C por 24 a 48 horas.
 - 3.3.3. Examinar la presencia o ausencia de crecimiento en los agares. Evaluar las características coloniales y la morfología mediante tinción gram.
 - 3.3.4. Seleccionar las colonias que crecieron en el agar MacConkey (rojas: lactosa positiva, claras: lactosa negativa) y realizar las pruebas bioquímicas.
 - 3.3.5. Realizar la prueba de oxidasa, catalasa y fermentación de glucosa.
 - 3.3.6. Para que sea una enterobacteria, debe ser oxidasa negativo, catalasa positivo, fermentador de glucosa.
 - 3.3.7. Realizar la identificación bioquímica por tubos múltiples o mediante sistema API o RAPID.
 - 3.3.8. Tubos múltiples: Realizar el test IMViC (Producción de indol, rojo de metilo, Vogler Proskauer, utilización del citrato), descarboxilación de la lisina, producción de la enzima ureasa, producción de la enzima betagalactosidasa.
 - 3.3.9. Para la identificación del género bacteriano y especie bacteriana ver Anexo 1 y 2.
4. **REGISTRO**
5. **CONTROL DE CAMBIOS**
6. **ANEXOS**

Fuente: Laboratorio Bioservice

ANEXO 5

Formato 4. Protocolo de prueba de sensibilidad antimicrobiana

1. OBJETIVO:

2. REFERENCIAS

2.1. Comité Nacional de Estándares Clínicos de Laboratorio (NCCLS). 2002. Performance Standards for Antimicrobial Disk and Dilution Susceptibility Test for Bacteria Isolated from Animals. M31-A2, Ed.2, vol.22, N° 6.

2.2. Comité Nacional de Estándares Clínicos de Laboratorio (NCCLS).2000. Performance standards for antimicrobial disk susceptibility test. M2-A7. Ed. 7, vol. 20,N° 1.

2.3. Comité Nacional de Estándares Clínicos de Laboratorio (NCCLS). 2008. Performance standards for antimicrobial susceptibility testing. M100- S19. Ed. 19.

3. PROCEDIMIENTO

Cada muestra fue inoculada en el medio Mueller-Hinton, aplicando los discos de sensibilidad e incubando a 37°C para su posterior medición del halo de inhibición, según las normas del Comité Nacional de Estándares Clínicos de Laboratorio (NCCLS) para los antibióticos de diferentes familias

Los antibióticos (discos de sensibilidad que fueron utilizados en las pruebas de susceptibilidad, se encuentran agrupados dentro de las siguientes familias:

- Betalactámicos: Amoxicilina y ampicilina.
- Cefalosporinas: Ceftiofur, ceftriazona y cefazolina.
- Fluroquinolonas: Ciprofloxacina, enrofloxacina, norfloxacina, levofloxacina.
- Polimixinas: Colistina
- Lincosamidas: Lincomicina
- Aminoglucósidos: Gentamicina, neomicina, kanamicina y espectinomina.
- Macrolidos: Eritromicina y tilosina.
- Pleuromutilina: Tiamulina
- Tetraciclinas: Clortetraciclina, doxiciclina, oxitetraciclina y tetraciclina.
- Nitrofuranos: Furaltadona, furazolidona y nitrofurantoina.
- Fenicoles: Cloranfenicol y florfenicol.
- Sulfonamidas: Sulfametaxol + Trimetoprim.
- Derivados del ácido fosfónico: Fosfomicina
- Antibióticos asociados: Ciprofloxacina + amoxicilina, norfloxacina + amoxicilina, enrofloxacina + amoxicilina, fosfomicina + trimetoprim, ciprofloxacina + doxiciclina, levofloxacina + colistina y lincomicina + espectinomina.

Fuente: Laboratorio Bioservice

ANEXO 6

Formato 5: Halos de inhibición estándares (NCCLS)

ANTIBIOTICOS	CONTENIDO DISCO	ZONA DE DIÁMETRO (mm)		
		SENSIBLE	INTERMEDIO	RESISTENTE
BETALACTAMICOS				
Amoxicilina	20µg	≥ 17	14-16	≤ 13
AMPICILINA	10µg	≥ 17	14-16	≤ 13
CEFALOSPORINAS				
CEFTIOFUR	30 µg	≥ 21	18-20	≤ 17
CEFTRIAZONA	30 µg	≥ 21	14-20	≤ 13
Cefazolina	30 µg	≥ 18	15-17	≤ 14
POLIMIXINAS				
COLISTINA	10 µg	≥ 11	9-10	≤ 8
FLUORQUINOLONAS				
Ciprofloxacina	5 µg	≥ 21	16-20	≤ 15
Norfloxacina	10 µg	≥ 17	13-16	≤ 12
Enrofloxacina	5 µg	≥ 23	17-22	≤ 16
LEVOFLOXACINA	5 µg	≥ 17	14-16	≤ 13
TETRACICLINAS				
Oxitetraciclina	30 µg	≥ 19	15-18	≤ 14
TETRACICLINA	30 µg	≥ 19	15-18	≤ 14
DOXICICLINA	30 µg	≥ 19	15-18	≤ 14
Clortetraciclina	30 µg	≥ 19	15-18	≤ 14
AMINOGLUCOSIDOS				
GENTAMICINA	10 µg	≥ 15	13-14	≤ 12
NEOMICINA	30 µg	≥ 17	13-16	≤ 12
KANAMICINA	30 µg	≥ 18	14-17	≤ 13
ESPECTINOMICINA	100 µg	≥ 14	11-13	≤ 10
NITROFURANOS				
FURALTADONA	15 µg	≥ 18	15-17	≤ 14
FURAZOLIDONA	100 µg	≥ 17	15-16	≤ 14
NITROFURANTOINA	300 µg	≥ 17	15-16	≤ 14
MACROLIDOS				
ERITROMICINA	2 µg	≥ 21	16-20	≤ 15
TILOSINA	15 µg	≥ 18	15-17	≤ 14
PLEUROMUTILINA				
TIAMULINA	10 µg	≥ 21	19-20	≤ 18
DERIVADOS DEL ACIDO FOSFONICO				
Fosfomicina	50 µg	≥ 18	13-17	≤ 12
LINCOSAMIDAS				
LINCOMICINA	15 µg	≥ 18	14-17	≤ 13
FENICOLES				
CLORANFENICOL	30 µg	≥ 18	13-17	≤ 12
FLORFENICOL	30 µg	≥ 19	15-18	≤ 14
SULFONAMIDAS				
Sulfametoxazol- trimetropin	1.25 / 23.75 µg	≥ 16	11-15	≤ 10
ANTIBIOTICOS ASOCIADOS				
Ciprofloxacina + Amoxicilina	5 / 20 µg	≥ 21	16-20	≤ 15
Norfloxacina + Amoxicilina	10 / 20 µg	≥ 18	14-17	≤ 13
Enrofloxacina + Amoxicilina	5 / 20 µg	≥ 21	16-20	≤ 15
Fosfomicina + Trimetropin	50 / 5 µg	≥ 15	13-14	≤ 12
Ciprofloxacina + Doxiciclina	5 / 30 µg	≥ 21	16-20	≤ 15
Levofloxacina + Colistina	5 / 10µg	≥ 17	14-16	≤ 13
Lincomicina + espectinomicina	15 / 100 µg	≥ 20	17-19	≤ 16

ANEXO 7

Frecuencia de Aislamiento de *E. coli* por año

Años	Casos totales del laboratorio	Nº de aislamientos de <i>E. coli</i> en aves	Frecuencia relativa de <i>E. coli</i> (%)
2001	81	45	55,56
2002	131	59	45,04
2003	142	49	34,51
2004	127	53	41,73
2005	109	34	31,19
2006	193	86	44,56
2007	202	74	36,63
2008	173	46	26,59
2009	206	77	37,38
2010	189	63	33,33
2011	297	117	39,39
2012	346	168	48,55
2013	405	180	44,44
2014	373	206	55,23
TOTAL	2 974	1 257	42,27

Fuente: Elaboración propia, 2015

ANEXO 8

Frecuencia de aislamientos de *E.coli* según diagnóstico de órganos durante los años 2001 - 2014

Diagnóstico de órganos		Casos totales	Nº de casos <i>E.coli</i>	Frecuencia (%)
Aparato respiratorio	Sacos aéreos	2 876	415	14,43
	Pulmones	2 884	371	12,86
	Tráquea	1 724	658	38,16
	Senos infraorbitarios	1 595	516	32,35
	Cornetes nasales	290	111	38,28
Aparato digestivo	Cavidad oral	5	4	80,00
	Hígado	2 843	374	13,16
	Bazo	2 310	179	7,75
	Intestino	185	48	25,95
	Saco vitelino	1 123	273	24,31
Aparato reproductor	Ovario	96	12	14,89
	Oviducto	47	7	14,89
Aparato Urinario	Riñón	20	1	5
Otros	Articulación	16	3	18,75
	Barbilla	80	18	22,50
	Ojos	9	3	33,33
	Tejido subcutáneo	8	7	87,5
	Saco Pericárdico	6	5	83,33

Fuente: Elaboración propia, 2015

ANEXO 9

Resultados del análisis de regresión lineal del porcentaje de susceptibilidad antimicrobiana en los aislamientos de *Escherichia coli* de muestras de aves en el periodo 2001-2014

Antibióticos utilizados 2001 - 2014	ANÁLISIS DE VARIANZA (p)
Betalactámicos	
Amoxicilina	0,036*
Ampicilina	ID
Cefalosporinas	
Ceftiofur	ID
Ceftriaxona	ID
Cefazolina	ID
Fluoroquinolonas	
Ciprofloxacina	0,078
Norfloxacina	0,029*
Enrofloxacina	0,409
Levofloxacina	0,687
Tetraciclinas	
Oxitetraciclina	0,932
Tetraciclina	0,472
Doxiciclina	NR
Clortetraciclina	0,109
Aminoglucosidos	
Gentamicina	NR
Neomicina	NR
Kanamicina	ID
Espectinomicina	NR
Nitrofuranos	
Furaltadona	NR
Furazolidona	ID
Nitrofurantoina	ID

Macrolidos	
Eritromicina	ID
Tilosina	NR
Tiamulinas	
Tiamulina	NR
Polimixinas	
Colistina	NR
Fosfomicina	NR
Lincosamidas	
Lincomicina	NR
Fenicoles	
Cloranfenicol	NR
Florfenicol	ID
Sulfametoxazol- trimetropin	0,155
Combinaciones antibioticas	
Ciprofloxacina + Amoxicilina	0,002*
Norfloxacina + Amoxicilina	0,000
Enrofloxacina + Amoxicilina	0,027
Fosfomicina + Trimetropin	0,829
Ciprofloxacina + Doxiciclina	0,049
Levofloxacina + Colistina	0,028
Lincomicina + espectinomicina	0,009

*Presento regresión

NR: No presento regresión

ID: Insuficiente datos para un análisis de regresión.

Fuente: Elaboración propia, 2016