Artículo Original

Bordetella avium y Escherichia coli en pollos de engorde de la provincia Manabí, Ecuador

Bordetella avium and *Escherichia coli* in broilers in Manabí province, Ecuador

http://opn.to/a/Es75t

Laura Monserrate De la Cruz-Veliz [1], Ivette Espinosa-Castaño [2], Michel Báez-Arias [2], Evelyn Lobo-Rivero [3 *]

[1]Facultad de Ciencias Veterinarias, Universidad Técnica de Manabí, Manabí, Ecuador
[2]Laboratorio de Bacteriología Animal, Dirección de Salud Animal, Centro Nacional de Sanidad Agropecuaria (CENSA), Apartado 10, CP 32700, San José de las Lajas, Mayabeque, Cuba
[3]Laboratorio de diagnóstico de Micoplasma (MYCOLAB), Dirección de Salud Animal, Centro Nacional de Sanidad Agropecuaria (CENSA), Apartado 10, CP 32700, San José de las Lajas, Mayabeque, Cuba.

RESUMEN: El Complejo Respiratorio Aviar (CRA) es uno de los problemas que más pérdidas ocasiona en la avicultura; su etiología es multifactorial e incluye combinaciones de microorganismos y factores nutricionales y ambientales. Entre los agentes microbianos se reportan virus, micoplasmas y otras bacterias de los siguientes géneros y especies: *Ornithobacterium rhinotracheale*, *Bordetella avium, Pasteurella multocida y Escherichia coli*. El presente estudio tuvo como objetivo identificar la presencia de estas bacterias en muestras procedentes de pollos de engorde con sintomatología compatible al CRA. Para ello se analizaron 60 exudados traqueales de pollos pertenecientes a cuatro granjas de la provincia Manabí, Ecuador. Las muestras se identificaron por pruebas fenotípicas (culturales, tintoriales y bioquímicas) y genotípicas por la reacción en cadena de la polimerasa (PCR). Cinco muestras (8 %) resultaron positivas a estas bacterias; de ellas cuatro correspondieron a *B. avium* y un aislado a *E. coli*. El perfil de susceptibilidad reveló que ambas especies fueron sensibles a ciprofloxacina y kanamicina, mientras que fueron resistentes a amoxicilina y cloranfenicol. Este estudio constituye la primera evidencia molecular que confirma la presencia de estas bacterias en pollos de engorde de la provincia Manabí, Ecuador.

Palabras clave: Complejo Respiratorio Aviar, *Bordetella avium, Escherichia coli*, pollos de engorde.

ABSTRACT: The Avian Respiratory Complex (ARC), is one of the most frequent problems in poultry. Its etiology is multifactorial and includes combinations of microorganisms, nutritional and environmental factors. Among the microbial agents, viruses, mycoplasmas and bacteria of the following genera and species: *Ornithobacterium rhinotracheale*, *Bordetella avium*, *Pasteurella multocida* and *Escherichia coli*, are reported. The objective of this study was to identify the presence of these bacteria in samples from broilers with symptoms compatible with the disease. To this end, 60 tracheal exudates of chickens belonging to four farms in Manabí province, Ecuador, were analyzed. The samples were identified by phenotypic (cultural, dye and biochemical) and genotypic tests by polymerase chain reaction (PCR). Five samples (8 %) tested positive for these bacteria, of which four corresponded to *B. avium* and one isolate to *E. coli*. The susceptibility profile revealed that both species were sensitive to ciprofloxacin and kanamycin, while they were resistant to amoxicillin and chloramphenicol. This study is the first evidence confirming the presence of these bacteria in broilers in Manabí province, Ecuador.

Key words: Avian Respiratory Complex, *Bordetella avium, Escherichia coli*, broilers.

*Autor para correspondencia: *Evelyn Lobo-Rivero*. Correo electrónico: elobo@censa.edu.cu

Recibido: 09/03/2018
Aceptado: 06/06/2018

INTRODUCCIÓN

Cuando se enfrenta un problema respiratorio en especies de crianza intensiva, como la del pollo, los signos y síntomas que se observan no son patognomónicos o "exclusivos" de un agente. Generalmente, estos procesos son resultado de la combinación, de la presencia de agentes virales y bacterianos con factores nutricionales y ambientales deficientes, lo que complica la solución del brote (1). Los microorganismos que participan en estos procesos pueden clasificarse en dos categorías, de acuerdo con su contribución a la infección: una que se relaciona con los agentes predisponentes, entre los que se encuentran los virus Newcastle, Bronquitis infecciosa, Rinotraqueitis aviar y Laringotraqueitis, entre otros, y las bacterias *M. gallisepticum y M. synoviae* (2); la otra categoría es un grupo diverso de géneros y especies de bacterias consideradas patógenos secundarios (*Escherichia coli, Ornithobacterium rhinotracheale*, *Bordetella avium, Pasteurella multocida, Aerobacter* spp., *Klebsiella* spp., *Proteus* spp., *Salmonella* spp., *Bacillus* spp., *Staphylococcus* spp., *Enterococcus* spp. y *Clostridium* spp., entre otros (3).

La discriminación entre los géneros y especies de bacterias que actúan como patógenos secundarios es posible por cultivo microbiológico y técnicas serológicas que incluyen la SAR, ELISA y serotipado mediante antisueros específicos (4,5). De igual manera, por diferenciación fenotípica (bioquímica), que es una de las formas más frecuentes y rápidas de diferenciar géneros y hasta especies bacterianas (6). Los ensayos basados en la detección de regiones específicas en el ácido nucleico, específicamente en la región del ARNr 16S, son confirmatorios de las especies y de la caracterización de estos agentes (7,8). La confirmación de estas bacterias es de gran interés para la aplicación de antibióticos específicos para su control, ante el incremento de la resistencia antimicrobiana (9,10).

Ecuador es un país altamente productivo; la avicultura es una de las actividades que contribuye al producto interno bruto (PIB) agropecuario nacional con alrededor de 13 % por aves de carne y 3,5 % por aves de postura. Manabí es la tercera provincia de la región costa más importante en la producción de pollos de engorde (AGROCALIDAD, 2015) (11); sin embargo, esta actividad se ve afectada por los problemas respiratorios, los cuales se consideran los de mayor prevalencia e incidencia; se reportan pérdidas de 20 % en pollos de engorde. En el año 2013, los estudios realizados en pollos de engorde procedentes de la provincia Manabí mostraron, por ensayos serológicos, la presencia de anticuerpos a *Mycoplasma* spp. (12), pero no se ha realizado la identificación de otras bacterias que puedan estar asociados a procesos respiratorios en esta especie. El presente trabajo tuvo como objetivo detectar la presencia de bacterias asociadas a trastornos respiratorios en pollos de engorde, procedentes de Manabí, Ecuador.

MATERIALES Y MÉTODOS

Muestreo

Se realizó un muestreo al azar que incluyó cuatro granjas de pollos de engorde, en sistemas de explotación con edades múltiples y pertenecientes a la provincia Manabí, Ecuador. Las mismas son representativas del norte (N), centro (C), este (E) y oeste (O) de la provincia. En la identificación de las granjas se tuvo en cuenta la confidencialidad de los productores y, en el criterio de representatividad (inclusión), la zona geográfica, la historia de aves de padecer trastornos respiratorios compatibles con CRA y la disminución de los indicadores productivos. El periodo de estudio fue entre los meses de enero-marzo de 2017.

Animales

Se seleccionaron 60 pollos de la raza Cobb 500, entre cinco y seis semanas de edad. El criterio de selección, para el número de animales (15 por granjas), se realizó cumpliendo las regulaciones de la asociación de productores avícolas de la provincia. Se seleccionaron los animales con signos compatibles del CRA.

Muestras

La colecta de exudados traqueales se realizó con hisopos de algodón estériles. El pico del ave se desinfectó con alcohol al 70 %, se sujetó la lengua con la ayuda de un algodón estéril y se realizó el hisopaje de la primera porción de la

tráquea, según lo describe Poveda (34). El hisopo se introdujo en un tubo Eppendorf que contenía 1 mL de PBS estéril (del inglés, *Phosphate Buffer Saline*). Una vez rotulados los tubos, se remitieron al Laboratorio de Microbiología y Biología Molecular de la Universidad Técnica de Manabí, Ecuador, para realizar el cultivo microbiológico y la extracción del ácido desoxirribonucleico (ADN). El traslado de las muestras se realizó bajo condiciones de bioseguridad y según lo describe el Código Sanitario de Animales Terrestres de la Organización para la Sanidad Animal (OIE) (5).

Análisis bacteriológico

Las muestras de exudados traqueales se sembraron en medios de cultivo agar Columbia (Oxoid) suplementado con sangre ovina al 5 % y agar MacCokey (Oxoid); en ambos casos se prepararon según instrucciones del fabricante. Las placas se incubaron durante 72 horas a 37°C en aerobiosis. Para la identificación de los aislados se tuvieron en cuenta las características morfológicas de las colonias, la tinción de Gram, la actividad oxidasa (Difco) y el comportamiento frente a diferentes pruebas bioquímicas con la utilización de los sistemas comerciales API 20E y API 20NE API - E (BioMérieux, France). Para las pruebas de oxidasa y el API se siguieron las instrucciones del productor.

Extracción del ADN

Se partió de una colonia de cultivos de 24 horas en medio sólido, se colocó en 50 µL de agua libre de nucleasas (Promega), se hirvió a 100 ºC por cinco minutos y se colocó inmediatamente a -20 ºC durante 10 minutos. A continuación, se centrifugó a 5000 g por 5 min; el sobrenadante se transfirió a un tubo Eppendorf y se conservó a -20 ºC.

Cebadores

Para la identificación de *E. coli* se utilizaron los cebadores EcoF2083: 5´-GCTTGACACTGAACATTGAG-3´ y EcoR2745: 5´GCACTTATCTCTTCCGCATT-3´ descritos por Chotar (9), que amplifican una región de 662 pb del gen ARNr 16S. En el caso de *B. avium*, se utilizó la siguiente pareja de cebadores: MB- F: 5'-AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3´ y MB-R :5'-GCGGCTGCTGGCACG-3´, reportados por Register y Yersin (13).

Condiciones de amplificación

La reacción de PCR para *B. avium* se realizó según el programa descrito por Register y Yersin (13), que incluyó un paso inicial de 5 minutos a 95°C, seguido de 35 ciclos de 1 minuto a 95°C, 30 segundos a 50°C y 30 segundos a 72°C, con una extensión final de 7 minutos a 72°C. La reacción de PCR para *E. coli* se realizó según el programa descrito por Chotar *et al*.(14), que consistió en 1 minuto a 95°C seguido por 35 ciclos de 1 minuto a 95°C, 30 segundos a 53ºC y 30 segundos a 72°C, con un paso de extensión final de 5 min a 72°C. Las reacciones de amplificación, para ambos ensayos, se realizaron en un volumen final de 25 µL, con los siguientes componentes:1X GoTaq® Green Master Mix (Promega, Madison, EE.UU.), 20 pmol de cada cebador y 5 µL de ADN de la muestra. Todos los reactivos se manipularon en flujo laminar (Ikem), utilizando puntas con filtros (Eppendorf) resistentes a aerosoles; las amplificaciones se realizaron en un equipo de PCR ThermoHybaid. Como controles positivos se utilizó ADN de la cepa *E. coli* ATCC25922 y ADN de *B. avium*, pertenecientes a la colección del Laboratorio de Bacteriología Animal, de la Dirección de Salud Animal del Centro Nacional de Sanidad Agropecuaria (CENSA), Mayabeque, Cuba.

Electroforesis en gel de agarosa

Los productos amplificados se aplicaron en un gel de agarosa al 2 % (w/v) (GIBCO) en cámara de electroforesis 2012 Maxiphor (LKB Bromma) con solución tampón TBE 0.5X, que contenía bromuro de etidio (0,5 µg/mL). La corrida se realizó a 100 Volts y 50 mA por 35 minutos. Se utilizó marcador de peso molecular de 100 pb (Promega). La visualización del resultado se realizó en un transiluminador de luz ultravioleta MacroVue (Pharmacia).

Se seleccionó un aislado representativo de las especies identificadas para la realización de la prueba de susceptibilidad antimicrobiana. La evaluación e interpretación de los resultados se realizó por el método Agar Difusión con discos de Bauer-Kirby, según la normativa del Instituto de Estándares de Laboratorio Clínico (CLSI, 2017). Se utilizaron los siguientes discos de

antibiogramas: tetraciclina (30 µg), kanamicina (30 µg), ciprofloxacina (5 µg), amoxicilina (30 µg), cloranfenicol 30 µg), trimetropin/ sulfametoxazol (25 µg); todos procedentes de la casa comercial Liofilchem. Las cepas de referencia empleadas para el control de calidad interno de los ensayos fueron *Escherichia coli* ATCC 25922, *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 y *Pseudomona aeruginosa* ATCC27853 (CLSI, 2006), pertenecientes a la Colección Americana de Cultivo Tipo (ATCC), Rockville, Md y mantenidas en el Laboratorio de Microbiología de la Universidad Técnica de Manabí.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Los principales hallazgos clínicos observados en los animales examinados fueron la presencia de secreciones nasales y oculares, plumas erizadas, senos infraorbitarios hinchados, decaimiento y anorexia.

En el medio Agar sangre se visualizó el crecimiento de colonias translúcidas, de aspecto liso y bordes regulares; como resultado de la tinción de Gram se evidenció la presencia de bacilos Gram negativos a partir de cuatro muestras, de las 60 colectadas y procedentes de granjas ubicadas en las zonas Norte y Central de la provincia. A partir de estas muestras, en el medio agar MacConkey se observaron colonias pequeñas de aspecto liso, traslúcidas, perladas, de bordes regulares a las 24 horas de incubación, las cuales a las 48 horas desarrollaron un centro marrón. La prueba oxidasa resultó positiva. Estas características culturales se correspondieron con lo descrito para bacilos Gram negativos no fermentadores.

Las características de las colonias, de estos aislados, en los medios de cultivo empleados pueden tener un aspecto similar a las producidas por varias especies de la familia Alcaligenaceae, como *Bordetella avium, Bordetella hinzii* y *Alcaligenes faecalis* tipo 1 (15). *B. avium* resulta la especie de mayor interés en avicultura, pues se asocia a procesos respiratorios en aves (26). *A. faecalis* es una bacteria que se encuentra en suelos, en el ambiente y como patógeno oportunista en humanos y especies animales (16). *B. hinzzi* puede estar presente en las vías respiratorias de aves de corral enfermas; sin embargo, durante años ha sido considerada no patógena para las aves, pues varios intentos de reproducción experimental en pavos y pollitos no revelaron signos clínicos (17). Un estudio realizado más recientemente por Register *et al.* (18) encontró que las cepas de *B. hinzii* mostraron diferencias en su capacidad de colonizar, fueron ligeramente virulentas para pavos y colonizaron asintomáticamente a los pollitos, lo cual podría ser de preocupación para los productores avícolas y señala la necesidad de contar con ensayos de laboratorio que garanticen la discriminación entre ambas especies.

Los aislados mostraron similar comportamiento frente a diferentes sustratos y azúcares, mediante el empleo del API 20 NE (Biomerieux, France); específicamente se obtuvo el código de identificación 0-0-0-0-47 (Fig. 1), que correspondió a *B. avium* y *A. faecalis,* coincidiendo con las propiedades descritas por Harrington (20) para colonias de estas especies. Una de las pruebas bioquímicas que permite distinguir entre los géneros *Bordetella* y *Alacaligenes* es la fermentación del malonato, para el cual *B. avium* es negativa, mientras que *A. faecalis* es positiva (18). Como se pudo comprobar en los resultados de esta prueba contenida en el sistema api 20NE, los aislados fueron negativos a la fermentación del malonato, lo que confirma la identificación de *B. avium*, aunque es de señalar que los resultados de las pruebas bioquímicas pueden mostrar variaciones según la concentración del inóculo y las condiciones del cultivo (3).

La amplificación de un fragmento de 520 pb, que corresponde a una región del ARNr 16S específica para *B. avium* (Figura 2), permitió confirmar la presencia de este agente en las muestras analizadas. La diferenciación entre especies del género *Bordetella*, que colonizan el tracto respiratorio en aves, es de gran importancia en los laboratorios de diagnóstico veterinario (19,20). Regsiter *et al.* (13) verificaron la capacidad analítica de un ensayo de PCR con los cebadores que se emplearon en este trabajo y encontraron alta especificidad, pues solamente amplificaron el fragmento a partir de cepas previamente identificadas, como *B. avium*; no así en 49 cepas identificadas como *B. hinzii*; lo anterior reafirma la utilidad del ensayo de PCR

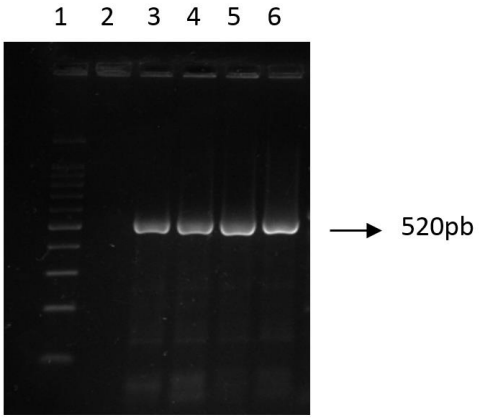

FIGURA 1. Electroforesis en gel de agarosa al 2% de los productos amplificados con el sistema de PCR para *B. avium*. Línea 1: Patrón de peso molecular de 100 pb (Promega); Línea 2: Control negativo; Líneas 3-5: ADN de muestras clínicas de *B. avium* (previamente caracterizados por estudios morfológicos y bioquímicos); Línea 6: ADN de *B. avium* utilizado como control positivo. / *2% agarose gel electrophoresis of the products amplified with the PCR system for B. avium. Line 1: 100 bp molecular weight standard (Promega); Line 2: Negative control; Lines 3-5: DNA from clinical samples of B. avium (previously characterized by morphological and biochemical studies); Line 6: B. avium DNA used as a positive control*

basado en este fragmento del ARNr 16S, para la discriminación entre estas especies (18,20).

La bordeteliosis es una enfermedad altamente contagiosa del tracto respiratorio superior de pavos y pollos (21,22). La colonización del epitelio ciliado por *B. avium* ocasiona inflamación prolongada y distorsión de la mucosa respiratoria y, aunque el hospedero natural es el pavo, también en pollos se reporta su presencia (18). Los resultados de este estudio coinciden con los obtenidos por Cigoy *et al.* (23), quienes reportan aislamientos de *B. avium* en pollos de engorde hasta con 62 % de índice de infección.

Aunque *B. avium* se reconoce como un patógeno secundario de los trastornos respiratorios, produce diferentes factores que contribuyen a su virulencia, como son las toxinas con efectos citotóxicos (24). Hayashimoto *et al.* (17) describieron una toxina termolábil capaz de matar ratones y pavos jóvenes. Trabajos recientes demostraron que *B. avium* produce una toxina dermonecrótica, muy similar a la producida por *B. pertussis y B. bronchiseptica*, pero en este caso parece no estar relacionada con el efecto de ciliostasis y daño epitelial local (24).

A partir de estos resultados se debe analizar la frecuencia de presentación de este microorganismo en las explotaciones avícolas de los pollos de engorde en la región estudiada, para conocer si se requiere implementar medidas preventivas para que disminuya su transmisión. Estas medidas podrían ser aplicadas en las plantas de incubación antes de que los pollitos sean transportados a las granjas.

Un aislado procedente de pollos de la región central de la provincia mostró un cultivo puro y abundante de colonias medianas, grises, mucoides en el medio Agar sangre y rosadas en agar Mac Conkey, presuntivas de *E. coli* por la apariencia cultural. Las pruebas bioquímicas contenidas en el Api 20 E también coincidieron en identificar esta especie acorde a lo descrito por Gi Yun (25). Atendiendo a la amplia diversidad de las especies que conforman la familia Enterobacteriaceae, el aislado se confirmó como *E. coli*, por la amplificación de una región de 662 pb, específica del ARNr 16S.

En la avicultura comercial, las infecciones por *E. coli* son las que con mayor frecuencia se reportan a nivel de campo. La patogenicidad se debe a su localización en el organismo, ya que de forma saprofita suele encontrarse en el tracto digestivo y no es habitual en otros sistemas. Los distintos serotipos de *E. coli* poseen una serie de factores de virulencia que influyen en la variación de su patogenicidad.

Piatti *et al.* (26) describen la existencia de diferentes serogrupos O de *E. coli* patogénica de las aves (APEC, por sus siglas en inglés): en procesos de septicemia aparecen los serotipos 1, 2, 8, 15, 18, 35, 78, 88, 109 y 115 y en la celulitis el 1, 2, 25, 71 y 78. Los signos clínicos

respiratorios que producen estos serotipos son la disnea acompañada de estertores (27). Cuando las aves inhalan polvo contaminado con heces fecales y son expuestas a altas concentraciones de amoníaco, la presencia de *E. coli* puede inducir un exudado fibrinoso de intensidad variable en los senos paranasales, tráquea, pulmones y sacos aéreos (25).

La prueba de susceptibilidad a los antibióticos reveló que el aislado de *B. avium* fue sensible a ciprofloxacina y kanamicina; resistente a cloranfenicol, tetraciclina y trimethoprim-sulfamethoxazol. La resistencia antimicrobiana en cepas de *B. avium* ha sido poco investigada; existen dos estudios en Estados Unidos basados en agar difusión y mínima concentración inhibitoria (MCI), y uno en Europa que combina ambos métodos (9,10) y no existen datos sobre mecanismos de resistencia en esta especie (9). Todos coincidieron en encontrar aislados sensibles a ampicilina, amoxicilina, penicilina, ceftiofur, enrofloxacina, norfloxacina, ciprofloxacina, eritromicina, cloranfenicol y cotrimoxazol. Similar a los resultados en este trabajo, las cepas fueron resistentes a sulfamethoxazol (9). El perfil de susceptibilidad que mostró el aislado de *B. avium* señala la posibilidad de utilizar quinolonas y aminoglucósidos para el control de esta infección.

En cuanto al aislado de *E. coli*, la prueba de susceptibilidad mostró que fue sensible a tetraciclina, ciprofloxacina, kanamicina y trimethoprim-sulfamethoxazol, mientras resultó resistente a amoxicilina y cloranfenicol. La mayoría de los trabajos publicados sobre evaluación de la susceptibilidad en cepas de *E. coli* de origen aviar, asociada a proceso respiratorios, coincide en señalar la amoxicilina como el antibiótico para el cual se encuentra mayor porcentaje de resistencia (27).

A pesar de estos reportes sobre la susceptibilidad, se debe señalar que aún no existen normas internacionales aprobadas para la mayoría de los patógenos que afectan la avicultura, específicamente para la relación entre el fenotipo (zona de inhibición, MCI) y las posibilidades de éxito del tratamiento (28,29,30).

En algunos escenarios, la tendencia del criterio médico veterinario es otorgar mayor importancia a los procesos virales como causantes de problemas respiratorios y considerar a los agentes infecciosos bacterianos como secundarios u oportunistas y de prevención opcional; esto es erróneo, pues las bacterias también pueden ocasionar alteraciones, inclusive, en algunos casos de mayor envergadura que los virus (21,28). Durante los últimos años, los patógenos bacterianos que se consideran agentes secundarios, tal es el caso de *E. coli* y *B. avium*, se describen involucrados en problemas respiratorios, en los cuales no fue posible determinar el agente etiológico primario y el tratamiento con antibióticos no resolvió estas infecciones, probablemente debido al incremento de cepas bacterianas multirresistentes a los antibióticos (9,22,26).

Los resultados de este estudio permitieron conocer la presencia de *E. coli* y *B. avium* en granjas de la provincia Manabí, Ecuador, lo cual orienta hacia el estudio futuro de la frecuencia de presentación de estos microorganismos en las explotaciones avícolas de los pollos de engorde, para conocer si se requieren implementar medidas preventivas a fin de disminuir su transmisión, así como al estudio de otras entidades que pueden estar relacionadas con el CRA.

REFERENCIAS

1. Mosqueda M. El denominado Síndrome respiratorio del pollo de engorde. Sitio Argentino de Producción Animal. 2011. http://www.produccionanimal.com.ar
2. Kleven SH. *Mycoplasmas*; diagnóstico y monitoreo. XII Seminario Internacional de Patología y producción aviar en el Poultry Diagnostic and Research Center, College of Veterinary Medicine, University of Georgia, Athens, Georgia. 2010.
3. Koga Y. Enfermedades respiratorias inducidas por bacterias emergentes (Síndrome Respiratorio Bacteriano Aviar): diagnóstico y control. 2010. http://www.reinmark.com.
4. Barrientos R. Bacteriología en el complejo respiratorio de las aves. Servicio Nacional de Sanidad, Inocuidad y Calidad Agroalimentaria - Secretaría de Agricultura, Ganadería,

Desarrollo Rural, Pesca y Alimentación (SENASICA-SAGARPA), México. 2011.

5. OIE. Código Sanitario para los animales terrestres. Capítulo 10.9. 2012
6. Poveda JB. Biochemical Characteristic in Mycoplasma identification. En: Methods in Molecular Biology. Vol. 104. Mycoplasma Protocols. Miles RJ, Nicholas RA. (eds). Humana Press Inc, Totowa, New Jersey. 1998. pp: 69-79.
7. Frey J. Mycoplasmas of animals. En: Molecular Biology and Pathogenecity of *Mycoplasmas*. Razin, S. y Herrmann, K. (eds.). Kluwer Academic/Plenum Publishers, New York. 2002. pp:73-90.
8. Zavala G. Practical use of molecular tools for epidemiological studies of current Mycoplasma respiratory problems. Memorias 57th WPDC/ANECA. 2008.
9. Beach M, Thompson S, Mutnick R, Brown L, Kettig G, Puffenbarger R. *Bordetellaavium* antibiotic resistance, novel enrichment culture, and antigenic characterization. Vet Microbiol 2012;160:189-96. doi:10.1016/j.vetmic.
10. Szabo R, Wehmann E, Magyar T. Antimicrobial susceptibility of Bordetella avium and Ornithobacterium rhinotracheale strains from wildland domesticated birds in Hungary. Acta Vet Hung. 2015; 63:413-24. doi:10.1556/004.2015.039
11. La Agencia Ecuatoriana de Aseguramiento de Calidad del Agro (AGROCALIDAD) http://simce.ambiente.gob.ec/2014.
12. De la Cruz L, Lobo E. Anticuerpos a Mycoplasmas ynoviae en pollos de engorde en granjas de la provincia de Manabí, Ecuador. Rev Salud Anim. 2013;35(3):206-209
13. Register K,Yersin AG. Analytical Verification of a PCR Assay for Identification of Bordetella avium. J Clin Microbiol. 2005;43(11):5567-5573.doi: 10.1128/ JCM.43.11.5567-5573.
14. Chotar M, Vidova B, Godany A. Development of specific and rapid detection of bacterial pathogens in dairy products by PCR. Folia Microbiol. 2006;51:639-646.
15. Manual of Systematic Bacteriology Bergey. The Bacteroidetes,Spirochaetes, Tenericutes (Mollicutes), Acidobacteria, Fibrobacteres, Fusobacteria, Dictyoglomi, Gemmatimonadetes, Lentisphaerae, Verrucomicrobia, Chlamydiae, and Planctomycetes. Brown, D.R.; May, M.; Bradbury, J.M.; Johansson, K.E. and Neimark, H. 2nd edn, vol. 4, (edited by Krieg, Staley, Brown, Hedlund, Paster, Ward, Ludwig and Whitman). Springer, New York. 2010. pp. 574-644.
16. Blackall P, Doheny M. Isolation and characterisation of Bordetella avium and related species and an evaluation of their role in respiratory disease in poultry. Aust Vet J. 1987;64:235-239.
17. Hayashimoto N, Morita H, Yasuda M, Ishida T, Kameda S, Takakura A, et al. Prevalence of Bordetella hinzii in mice in experimental facilities in Japan. Res Vet Sci. 2012;93:624-626.
18. Noguera C, Infante D, León A, Fernández J, Rolo M, Avila I, Herrera A. Primer aislamiento e identificación del agente causal de Bordetelosis aviar y reproducción de la enfermedad en Venezuela. VetTrop. 2001;26(1):35-46.
19. Register B. Development of a PCR for Identification of Bordetella hinzii Avian Diseases. 2013;57(2):307-310. doi: 10.1637/10433-02212-ResNote.1
20. Harrington A, Castellanos J, Ziedalsky M, Clarridge JE, Cookson BT. Isolation of Bordetella avium and Novel Bordetella Strain from Patients with Respiratory Disease. Emerg Infect Dis. 2009;15(1):72-74.
21. Jackwood M, Saif Y. Bordetellosis (turkey coryza), 705-718. In Y.M. Saif (ed.), Diseases of poultry, 11th ed. Iowa StatePress, Ames, Iowa. 2003.
22. López Q. Manejo en el campo del complejo respiratorio. Soluciones. Informe técnico. Dpto. de Medicina y Zootecnia Avícola. Fac. de Medicina y Zootecnia. Universidad Nacional Autónoma de Mexico. 2012.
23. Cigoy L, Malena C, Terzolo R, Chacana A. Aislamiento de Bordetella avium en pollos de

engorde en Argentina. Avian Dis. 2011;37:310-314.

24. Karen B, Randy E, Gwen E. Nordholm Comparison of Ribotyping and Restriction Enzyme Analysis for Interand Intraspecies Discrimination of Bordetella avium and Bordetella hinzii J Clin Microbiol. 2003;41(4):1512-1519.
25. Gi YL, Hye I, Gyun H, Min S. Prevalence and classification of pathogenic *Escherichia coli* isolated from fresh beef, poultry, and pork in Korea. 2009.
26. Piatti G, Mannini A, Balistreri M, Schito A. Virulence factors in urinary *Escherichia coli* strains: phylogenetic background and quinolone and fluoroquinolone resistance. J Clin Microbiol. 2008;6:480-487.
27. Rodríguez-Ángeles G. Principales características y diagnóstico de los grupos patógenos de *Escherichia coli*. 2002. pp. 464-475.
28. Martínez-Alesón S. Procesos respiratorios en aves jóvenes. Sitio Argentino de Producción Animal. 2010. http://www.produccion-animal.com.ar.
29. Abu-Basha EA, Gharaibeh SM, Thabet AM. In vitro susceptibility of resistant Escherichia coli field isolates to antimicrobial combinations. J Appl Poult Res. 2012;1:595-602. doi:10.3382/japr.2011-00500
30. Veterinary Investigation Diagnosis Analysis (VIDA). Annual Report on Data Recorded by APHA and Scotland's Rural College on Animal and Bird Diagnostic Submissions in Great Britain. Animal and Plant Health Agency (APH). 2016. Available from: http://ahvla.defra.gov.uk/vet-gateway/surveillance/reports.htm

Los autores de este trabajo declaran no presentar conflicto de intereses.
Este artículo se encuentra bajo licencia Creative Commons Reconocimiento-NoComercial 4.0 Internacional (CC BY-NC 4.0)
La mención de marcas comerciales de equipos, instrumentos o materiales específicos obedece a propósitos de identificación, no existiendo ningún compromiso promocional con relación a los mismos, ni por los autores ni por el editor.