
Universidad de Guadalajara

FACULTAD DE MEDICINA VETERINARIA Y ZOOTECNIA



"EVALUACION DE LA EFICACIA DE BACTERINAS DE ESCHERICHIA COLI EMULSIFICADAS EN POLLO DE ENGORDA"

TESIS PROFESIONAL

PARA OBTENER EL TITULO DE:

MEDICO VETERINARIO ZOOTECNISTA

P R E S E N T A

ADRIANA ELIZABETH CERVANTES VAZQUEZ

ASESOR: M.V.Z. ENEAS RENDON RUIZ

GUADALAJARA, JAL.

FEBRERO 1991

A MIS PADRES ...

Por su comprensión y cariño

A MI ASESOR Y AMIGO ...

M.V.Z. Eneas Rendón Ruiz

A MI JURADO...

*Por su valiosa
colaboración.*

I N D I C E

Página

INTRODUCCION	1
PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA	3
JUSTIFICACION.	4
HIPOTESIS.	5
OBJETIVOS.	6
MATERIAL Y METODO.	7
RESULTADOS	12
DISCUSION.	21
CONCLUSIONES	24
RESUMEN.	25
BIBLIOGRAFIA	26

I "INTRODUCCION"

La Industria Avícola Mundial sufre anualmente pérdidas económicas considerables a causa de la Colibacilosis, - por lo que es un problema crítico para la avicultura, ya -- que la Escherichia coli agente causal de la enfermedad habita normalmente en el organismo de las aves en forma saprófita ayudando al proceso de la digestión, siendo un germen -- oportunista que produce la enfermedad en casos de influencias ambientales desfavorables, condiciones inadecuadas de explotación, otras enfermedades, fallas en el manejo y estados de inmunosupresión. (1,2,3,4,5,7,11,16,18,22,23,24,25,-26,28).

Se sabe que dentro del organismo de las aves existe una gran variedad de cepas de Escherichia coli, pero diferentes investigaciones han demostrado que solo del 10 al -- 15% de las cepas son patógenas al tener condiciones favorables para su desarrollo, teniendo la capacidad de producir alta morbilidad y mortalidad en la parvada, los serotipos - patógenos que más frecuentemente han sido identificados son el 01, 02, y 078. (1, 5, 9, 10, 23, 29, 30)

Se han realizado muchas investigaciones acerca de - la elaboración y evaluación de las bacterinas para colibacilosis aviar, tratando de encontrar alguna que proporcione un alto grado de seguridad. La inmunidad que se proporciona al ave depende de las proyecciones proteicas de la E.coli - ("pilis") por lo que las investigaciones de las condiciones óptimas para su desarrollo de estos tales como temperatura,

tiempo de incubación, agitación ó estática, así como el medio de cultivo ideal no han cesado. (9,12,13,15,17,19,20,-21,30).

Los primeros estudios fueron llevados a cabo en -- 1957 por W.B. Gross (10); dichas investigaciones apoyan el uso de las bacterinas en explotaciones comerciales de pollo de engorda, aún cuando la eficacia de éstas es muy relativa, ya que aparecen brotes aún en parvadas bacterinizadas, sin embargo estas responden mejor al tratamiento -- que las parvadas que no han sido bacterinizadas. (3,6,8, -13,14,16,18,22,24,26,29).

Jayappa, en su investigación utilizó 90 aves, las cuales fueron inmunizadas con una bacterina polivalente -- emulsionada, observando que las aves no bacterinizadas tuvieron más mortalidad (30%) y desarrollaron de un modo significativo más lesiones que las aves inmunizadas. (16).

Similares resultados obtuvo B. Panigrahy con su -- bacterina emulsionada en aceite, demostrando que el adyuvante que utilizó potencializó a la bacterina. (22).

Y así, con similares resultados encontramos muchos estudios, concluyendo todos que la inmunización con bacterinas es un factor importante para evitar pérdidas económicas.

" PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA "

Desde 1950 el control de la Colibacilosis ha dependido principalmente de la profilaxis y uso terapéutico de los antibióticos. Sin embargo, la protección obtenida es transitoria y no segura, debido al extensivo uso de estos y al incremento de la resistencia de las cepas a los antibióticos. (4,5,7,16,22).

En vista de que el tratamiento es costoso y generalmente ineficaz, los investigadores se han visto en la necesidad de buscar nuevas formas de control para esta enfermedad. (16).

Una de las más importantes sería la elaboración de Bacterinas.

" J U S T I F I C A C I O N "

Al desconocer cuales son las condiciones óptimas -- para que la Escherichia coli de origen aviar (patógena) -- proporcione inmunidad, es necesario la investigación de diferentes medios de cultivo para la elaboración de bacterinas, obteniendo con ellos antígenos que permitan una buena formación de anticuerpos que a su vez proporcionen al ave una inmunidad que las proteja de la infección natural.

" HIPOTESIS "

Se espera que los medios de cultivo a utilizar en este trabajo sean determinantes para el desarrollo de -- Escherichia coli (patógena) que proporcionará una buena - inmunidad en el ave.



" O B J E T I V O S "

. GENERAL ...

Evaluar diferentes medios de cultivo y determinar -- cual es el que da mayor protección o títulos de anti cuerpos más altos.

. PARTICULARES ...

- 1.- Producir bacterinas emulsificadas con tres diferentes medios de cultivo.
- 2.- Determinar títulos de anticuerpos aglutinantes - para cada bacterina en pollos inmunizados.
- 3.- Establecer la sobrevivencia de los pollos inmuni zados con las bacterinas cuando son retados con do sis letal media (LD50).
- 4.- Determinar los parámetros de producción de las - aves.
- 5.- Evaluar estadísticamente parámetros de producción y mortalidad, por medio del Análisis de Varianza, Diferencia mínima significativa y χ^2 para dife-- rencia de varias proporciones.

" MATERIAL Y METODO "

Para el desarrollo de este trabajo se utilizaron 135 pollitos de la línea Hubbard, de un día de edad, los cuales se pesaron y dividieron al azar en 5 grupos de 27 pollos cada uno.

Las cepas de *Escherichia coli* que se utilizaron fueron aisladas de casos de colibacilosis de pollos comerciales, las cuales se sembraron en eosina azul de metileno (EMB) e infusión cerebro corazón (BHI), para identificarlas. Una vez hecho esto se realizó una prueba de patogenicidad, la cual se llevó a cabo en pollitos de un día de edad inoculando vía intrasacular, se manejaron 17 cepas utilizando 3 pollos para cada una, realizando chequeos de mortalidad a las 24, 48 y 72 horas postinoculación, determinando de esta manera cuales fueron las más patógenas de las que se seleccionaron para la elaboración de las bacterinas y el desarrollo. (27).

Se prepararon tres bacterinas con diferentes medios de cultivo cada una, los medios utilizados fueron Minca (12), que fué denominada como bacterina "A", Minca con Levadura (9) llamada bacterina "B" y Caldo Casoy (9) a la que se le designó bacterina "C". Métodos estándar fueron usados para preparar la bacterina emulsionada en aceite. (22).

Ya formados los grupos se les aplicó el primer día la bacterina correspondiente quedando los grupos de la siguiente manera ...

GRUPO	BACTERINA
I	"A"
II	"B"
III	"C"
IV	Control positivo (no bacterinizado y desafiado)
V	Control Negativo (no bacterinizado, ni desafiado).

A las 2 semanas de edad las aves se pesaron nuevamente separándose en subgrupos de 5 pollos cada uno colocándolos en jaulas individuales, para manejar 4 réplicas por cada tratamiento, los 4 pollos restantes de cada grupo fueron utilizados para la titulación de anticuerpos (se dejaron tres pollos extras en cada grupo con el objeto que al final de la prueba los grupos no fueran a disminuir de 20 para bacterinizar y 4 para titulación de anticuerpos, al final estas aves se tomaron en cuenta en la evaluación de los parámetros).

Las bacterinas se administraron dos veces, la primera dosis se aplicó al primer día de edad, siendo esta de 0.2 ml. por ave, la segunda se llevó a cabo el quinceavo día de edad aplicando 0.5 ml. por ave, ambas dosis se administran por vía subcutánea, en el punto medio de la parte posterior del cuello. (3) A la cuarta semana las aves

fuieron desafiadas intramuscularmente con 0.5 ml. de un cultivo vivo completo de 6 horas de incubación (4×10^6 -CFU).

Observándose diariamente a las aves para calificar signos de la enfermedad, la morbilidad, la mortalidad y lesiones en forma individual, dando por terminado el experimento a los diez días posteriores al desafío.

Las lesiones se calificaron en una escala de 0 a 3 ...

- . 0 : normal;
- . 1 : leve turbidez del pericardio y/o turbidez en sacos aéreos;
- . 2 : Moderado aumento y turbidez del pericardio y/o moderada turbidez de sacos aéreos;
- . 3 : Severa pericarditis y/o aereosaculitis con depósitos fibrinosos y/o perihepatitis;

determinando el promedio de lesiones por tratamiento. (16)

Los parámetros se evaluaron de la siguiente manera:

'Promedio de lesiones

Lesiones - No. de pollos

'Índice de protección

$$\frac{\% \text{ Mortalidad controles} - \% \text{ Mortalidad vacunados}}{\% \text{ Mortalidad controles}} \times 100$$

'Peso Inicial

$$\frac{\text{peso de las aves}}{\text{No. de aves}}$$

'Peso Final

$$\frac{\text{peso de las aves}}{\text{No. de aves}}$$

'Ganancia Diaria

$$\frac{\text{ganancia total/ave}}{\text{días de prueba}}$$

'Ganancia Final

$$\text{Peso final} - \text{peso inicial}$$

' % Viabilidad

$$100 - \% \text{ mortalidad}$$

'Indice de Producción

$$\frac{\text{Ganancia total de peso} \times \text{viabilidad}}{\text{conversión}}$$

'% Eficiencia

El resultado más alto dado - en el índice de producción - tomarlo como 100% y hacer una regla de tres con los demás grupos.

Los parámetros de producción como ganancia final y conversión alimenticia fueron evaluados mediante el método estadístico de Análisis de Varianza completamente aleatoria y Diferencia mínima significativa. La mortalidad se evaluó por la prueba de χ^2 para diferencia de varias proporciones.

La respuesta serológica en las aves se determinó por la prueba de Microaglutinación en tubos capilares. -

(24)

" R E S U L T A D O S "

En este trabajo se evaluó el uso de tres bacterinas y los grupos control.

Utilizando los métodos estadísticos de X^2 comparación de proporciones, y el de Varianza completamente aleatoria, complementado con la prueba múltiple de diferencia mínima significativa.

En mortalidad los grupos tratados no mostraron diferencia estadística a una ($P < 0.05$). Siendo esta mayor en el grupo control positivo, 69 %. Tabla I.

El promedio de lesiones del grupo I fue significativamente menor en comparación con los otros grupos tratados. Tabla I.

En cuanto al Índice de protección, se observó que el grupo III obtuvo el más alto porcentaje, 81.15 %. Tabla I.

La Tabla 2, muestra la morbilidad postdesafío, -- observando una descenso en todos los grupos tratados, marcándose en el grupo I, el cual presentó solo el 5% al finalizar la prueba.

En la titulación de anticuerpos se puede observar que el grupo II en los días 21 y 28 tuvo una mejor titulación, 1:14 y 1:24 respectivamente, en comparación con los demás grupos tratados. Notándose que los grupos controles

también presentaron aglutinación.

La Tabla 4, muestra la ganancia de peso, donde el grupo I tuvo la mayor ganancia entre los grupos tratados, siendo esta de 0.666. Aunque estadísticamente los grupos I y III son iguales a una ($P=0.05$). Gráfica 1.

En la conversión alimenticia tenemos que el grupo I y V, con 2 y 1.92, son considerados iguales estadísticamente, y el grupo control positivo mostró diferencia con los demás grupos. Tabla 4. Gráfica 2.

En el índice de producción y el porcentaje de eficiencia de los diferentes grupos se observó que los mejores promedios son del grupo V, (control negativo). Tabla 5.

TABLA I

EVALUACION DE TRES BACTERINAS DE ESCHERICHIA COLI EN -
POLLOS DE ENGORDA, BACTERINIZADOS EL 1o. Y 15o. DIA DE
EDAD Y DESAFIADOS A LOS 30 DIAS DE EDAD.

GRUPO	BACTERINA	NO. AVES	MORTA-- LIDAD...	PROMEDIO LESIONES	INDICE DE PROTECCION
I	"A"	23	3(13%)	1	81.15%
II	"B"	21"	6(28%)	2.3	59.4 %
III	"C"	22"	2(9%)	2	86.9 %
IV	Control Positivo	23	16(69%)	2.06	-
V	Control Negativo	23	-	-	-

' Número de pollos desafiados.

" en estos grupos el número de pollos es menor porque al iniciar la prueba murieron (2 pollos del grupo II y I del grupo III).



TABLA 2

% MORBILIDAD DE LOS POLLOS, DESPUES DEL DESAFIO

GRUPO	DIAS POSTERIORES AL DESAFIO									
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
I	100	100	85	50	20	20	15	15	10	5
II	100	100	100	80	60	60	60	46.6	53.3	46.6
III	100	100	95	90	36.8	31.5	63.1	26.3	42.1	36.8
IV	100	100	100	91.6	77.7	70	50	50	60	62.5
V	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0

Los pollos se siguieron observando 10 días después de finalizada la prueba, encontrando que la morbilidad fué en descenso.

TABLA 3

TITULOS DE ANTICUERPOS POR AGLUTINACION
EN TUBO CAPILAR

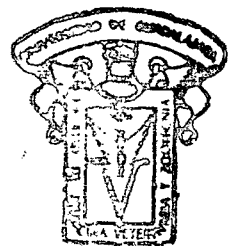
GRUPO	DIAS DE EDAD			
	7	14	21	28'
I	-	1:5	1:10	1:10
II	-	1:3	1:14	1:24
III	-	1:7	1:10	1:12
IV	-	1:5	1:14	1:12
V	-	1:3	1:12	1:20

' La última muestra se tomó 2 días
antes del desafío.

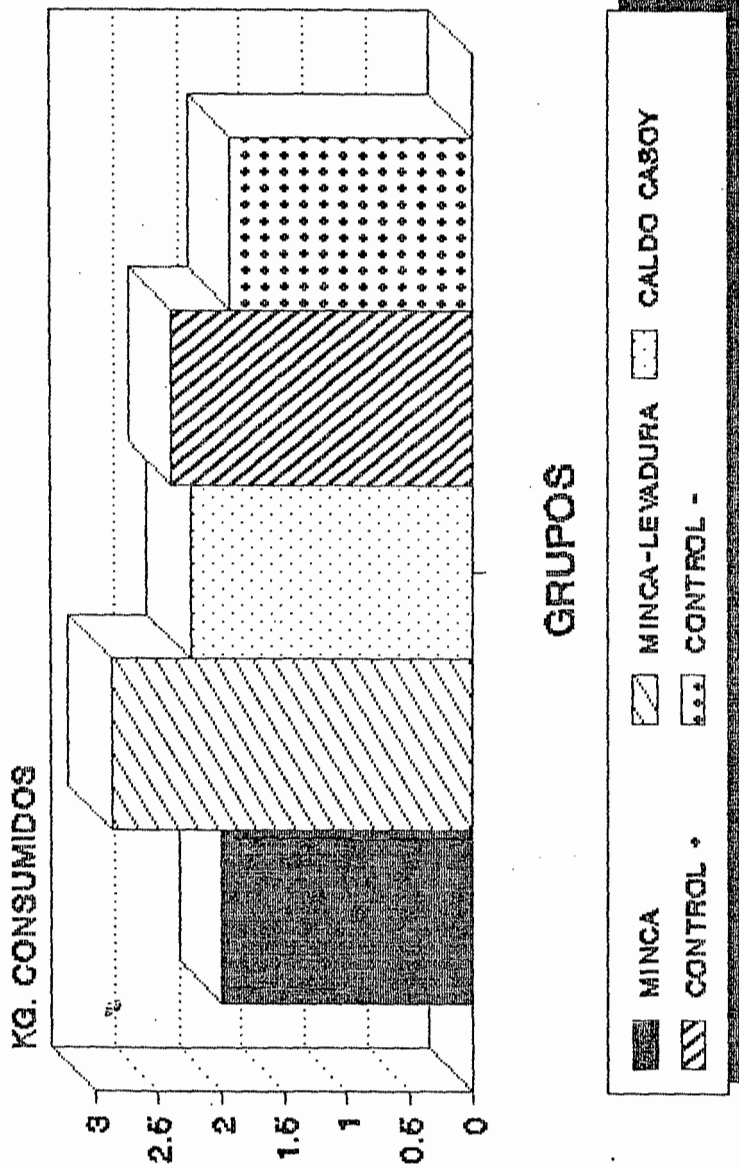
TABLA 4

PARAMETROS DE PRODUCCION

GRUPO	<u>PESO EN G/AVE</u>		<u>GANANCIA</u>		<u>CONSUMO/ALIMENTO/A</u>	
	INICIAL	FINAL	DIARIA	FINAL	TOTAL	CONVERSION
I	0.188	0.854	0.016	0.666	1.383	2.0
II	0.224	0.640	0.010	0.416	1.192	2.86
III	0.197	0.792	0.014	0.595	1.334	2.24
IV	0.187	0.561	0.009	0.374	0.893	2.38
V	0.188	1.237	0.026	1.049	2.023	1.92



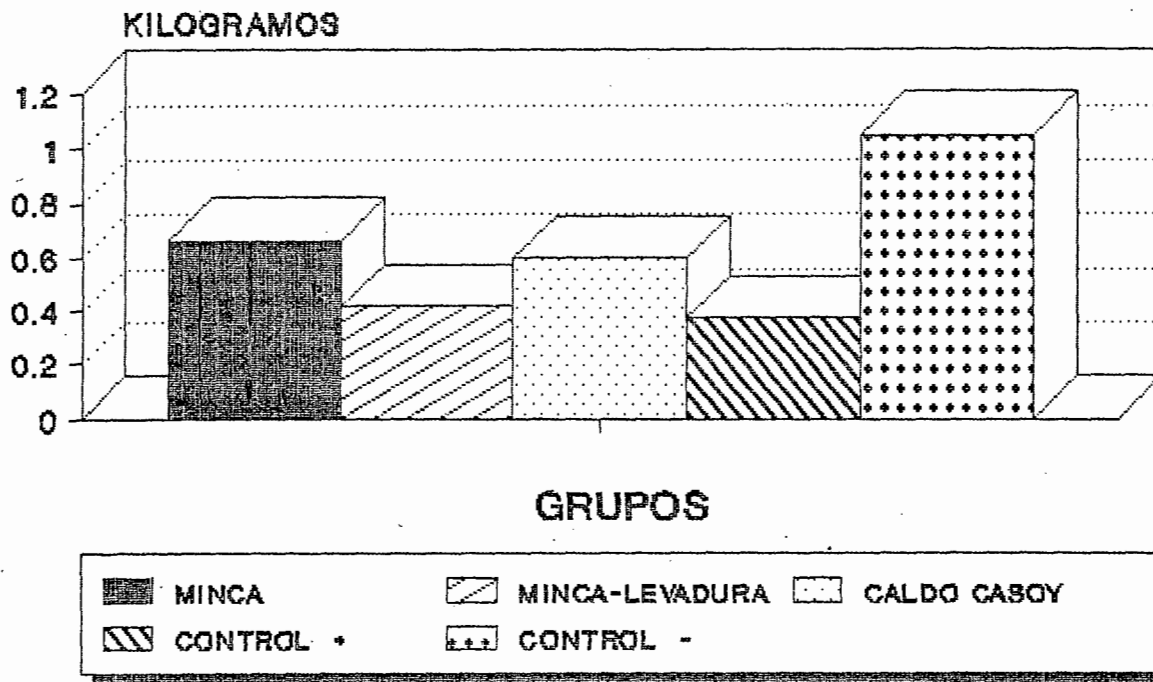
CONVERSION ALIMENTICIA



GRAF. 2

GANANCIA DE PESO PROMEDIO FINAL / AVE

19



GRAF. 1

TABLA 5

PARAMETROS DE PRODUCCION

GRUPO	%MORTALIDAD	%VIALIDAD	INDICE DE PRODUCCION	%EFICIENCIA
I	13	87	28.9	52.93
II	28	72	10.47	19.17
III	9	91	24.17	44.26
IV	69	31	4.87	8.91
V	0	100	54.6	100.

" D I S C U S I O N "

En cuanto al índice de protección se observó que el grupo III proporcionó un mayor porcentaje de protección comparándolo con los grupos I y II, sin embargo entre estos tres grupos no hay diferencia estadística en cuanto a mortalidad. Observándose una diferencia marcada, con el control positivo (TABLA I).

El porcentaje de morbilidad de los grupos desafiados se comportó de la siguiente manera:

En los dos primeros días se observó que el 100% de las aves presentaron signos de la enfermedad, a partir del día 3 en el grupo I y III, se notó una ligera reducción de la enfermedad; al 4o. día en el grupo I hubo una notable disminución de la morbilidad siendo esta en un 50% finalizando al día 10 con un 5% de morbilidad comportándose como el mejor de los grupos que recibieron el desafío. (TABLA 2).

En la titulación de anticuerpos se observa a los 7 días de haber realizado la primer aplicación de las bacterinas no se presentó aglutinación en los grupos tratados ni en los controles. A los 14 días se observa que el grupo III presentó el más alto título de anticuerpos seguido por el grupo I y el control positivo.

En la titulación de los días 21 y 28 hubo un incremento notable en el grupo II, mientras que en los grupos I y III los títulos fueron más bajos. (Tabla 3).

La eficacia de la bacterina es explicada por --- Rowley (1968) en el caso de Salmonela por la estimulación de una respuesta celular ayudada por una opsonina específica como anticuerpo.

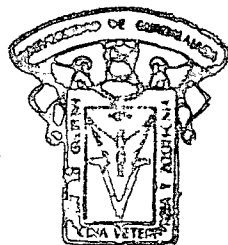
En investigaciones realizadas con Escherichia coli de origen aviar se observó que produce en medio Minca antígenos protectores que podrían tener relación con los mecanismos de producción del antígeno K99, deprimiendo esta producción al enriquecerlo con extracto de levadura. -- (9).

Los mejores parámetros de producción fueron obtenidos por el control negativo, corroborado estadísticamente lo cual es explicable ya que estas aves tuvieron un mínimo de manejo, no fueron expuestas a la bacteria lo que redujo en mayores pesos, mejor ganancia y conversión alimenticia. Aún cuando estadísticamente el grupo I resultó ser igual a este en cuanto al parámetro de conversión alimenticia, siendo diferentes en ganancia de peso, comportándose igual estadísticamente que el grupo III en este último parámetro.

En conversión los grupos III y IV fueron iguales estadísticamente, siendo diferentes en cuanto a ganancia de peso. Los grupos I y III fueron iguales en ganancia de peso, y el grupo II fue el más deficiente en ambos parámetros, comportándose igual que el grupo IV en el parámetro-

de ganancia de peso. (Tabla 4, gráficas I y 2, pág.18, 19 y 20).

En la mortalidad se observó que los grupos bacterinizados no tuvieron diferencia estadística, aunque en el índice de producción y porcentaje de eficiencia el grupo I fué mejor comparándolo con el grupo control negativo. (Tabla V).



" C O N C L U S I O N E S "

En base a los resultados y a las observaciones - realizadas se concluye lo siguiente:

- 1.- Con la Bacterina elaborada con el medio Minca (A) de acuerdo a los parámetros evaluados se obtienen mejores resultados.
- 2.- Los niveles de títulos de anticuerpos no tienen ninguna relación demostrable entre la -- aglutinación en suero y protección.
- 3.- En las aves bacterinizadas se ve una notable-reducción de la morbilidad y mortalidad al -- ser expuestas a la enfermedad a diferencia de las aves no inmunizadas, por lo que es costea ble la utilización de bacterinas.

" RESUMEN "

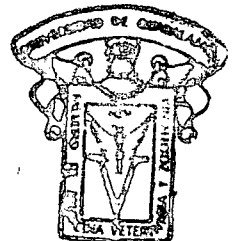
Se evaluaron tres bacterinas emulsificadas en --
pollos de engorda.

Las aves se dividieron en 5 grupos, distribuyén--
dose de la siguiente manera:

Al grupo I se le aplicó la bacterina elaborada -
con el medio Minca; al II se le administró la del medio --
Minca con levadura el III fue inmunizado con la bacterina-
preparada con Caldo Casoy; el grupo IV es el control posi-
tivo y el V es el control negativo.

Las aves fueron inmunizadas por vía subcutánea -
al 10 y 150 día de edad administrando una dosis de 0.2 y -
0.5 ml. respectivamente. A las 4 semanas los pollos inmu-
nizados y el control positivo fueron desafiados.

Observando que las aves inmunizadas con la Bacte-
rina I (Minca) fueron protegidas contra la infección demos-
trándose por: a) ganancia en el peso corporal en compara-
ción con las aves no inmunizadas y desafiadas; b) baja mor-
talidad; c) tuvieron lesiones macroscópicas leves; d) un -
índice de producción y porcentaje de eficiencia mejor com-
parándolo con el control positivo.



" B I B L I O G R A F I A "

- 1.- ARP L.H.: Response of turkeys to *Escherichia coli*. The 46th Annual National Turkeys Federation Convention. -- (1984)
- 2.- BARBOUR E., NABBUT H. and HABEEB A.: Production of H_2S by *Escherichia coli* isolated from Poultry: An unusual-character useful for Epidemiology of colisepticemia. - *Avian Dis.*, 29 No. 2: 341-346 (1985).
- 3.- BELLMANN B.: Contribution al Etude de la Colibacillo - se des Volailles. Docteur Vétérinaire. A.L'Université Claude Bernard de Lyon. Lyon, Francia, 1971.
- 4.- CLOUS S.S., ROSENBERG J.K., FRIES P.A., WILSON R.A. and ODOR E.M.: In Vitro and in vivo characterization - of avian *Escherichia coli*. I.- Serotypes, Metabolic -- Activity, and Antibiotic Sensitivity. *Avian Dis.*, 29 - No. 4; 1084-1093 (1986).
- 5.- CHEVILLE N.F. and ARP L.H.: Comparative pathologic -- findigs of *Escherichia coli* infection in birds. *JAVMA*- 173 No. 5: 584-587 (September I 1978).
- 6.- DEB J.R. and HARRY E.G.: Laboratory trials with inac- tivated vaccines against *Escherichia coli* (02:KI) in- fection in fowls. *Res.Vet.Sci.* 24: 308-313 (1978).
- 7.- DORN P.: *Manual de Patología Aviar*. Ed. 3o. Editorial Acribia, España. 128-133. 1973.

- 8.- GARCIA R.: *E. coli* control. *Feedstuffs*, 57 No.27: 22 - (1985).
- 9.- FRAAF, KRENN and KLAASEN: Organization and Expression of genes involved in the Biosynthesis of K99 Fimbriae. *Infection and Immunity*, 43 No. 1: 508-514 (Feb.1984).
- 10.- GROSS W.B.: Vaccines against *Escherichia coli* infection in chickens. *Avian Dis.*, 1: 347 (1957).
- 11.- GROSS W.B.: *Escherichia coli* as a complicating factor of New Castle disease vaccination. *Avian Dis.*, 5: 132-134 (1961).
- 12.- GUINEE, VELDKAMP and JANSEN W.H.: Improved Minea Medium for the detection of K99 antigen in Calf. Enterotoxigenic strain of *Escherichia coli*. *Infection and Immunity*, 15 No. 2: 676-678 (Feb.1977).
- 13.- GYIMAH J.E. and PANIGRAHY B.: Immunogenicity of an *Escherichia coli* (serotype O1) Pili vaccine in chickens. *Avian Dis.*, 29 No. 4: 1078-1083 (1986).
- 14.- GYIMAH J.E. and PANIGRAHY B.: Immunogenicidad de una bacteria de *Escherichia coli* emulsionada en aceite -- frente al desafío con cepas heterologas. *Avian Dis.*, - 29 No. 5: (1986).
- 15.- GYIMAH J.E., PANIGRAHY and WILLIAMS J.D.: Immunogenicity of an *Escherichia coli* multivalent pilus vaccine in chickens. *Avian Dis.*, 30 No. 4: 687-689 (1986).

- 16.- JAVAPPA H.G. and GARCIA R.: Efficacy of a new *Escherichia coli* bacterin in controlling colibacillosis in -- chickens and turkeys. *Avian Dis.*, 30 No. 2: 874-882 -- (1986).
- 17.- KLEMN.: Fimbrial adhesion of *Escherichia coli*. *Reviews of infectious diseases*, 7 No. 3: 321-339 (1985).
- 18.- KUMAR S., BOCLAIR W., ROSENBERGER J.K.: Field studies on an *Escherichia coli* vaccine for use in poultry. *Avian Dis.*, 29: 158-163 (1986).
- 19.- NAVEH M., ZUSMAN, SKUTELSKY and RON E.Z.: Adherence Pili in avian strain of *Escherichia coli*: Effect on pathogenicity. *Avian Dis.*, 28 No. 3: 651-661 (1985).
- 20.- NAVEH M., and RON E.Z.: Effect of adherence pili on invasiveness of avian strains of *Escherichia coli*. 330 - Western Poultry Disease Conference, Pág.15 (1984).
- 21.- NAVEH M., ZUSSMAN and RON E.Z.# Adherence pili from -- avian strain of *Escherichia coli* and their possible -- use in protective vaccination. 330 Western Poultry Disease Conference. Pág. 16. (1984).
- 22.- PANIGRAHY J.E., GYIMAH, HALL and WILLIAMS J.D.: Immunogenic potency of an Oil-Emulsified *Escherichia coli* bacterin. *Avian Dis.*, 28 No. 2: 475-481 (1984).
- 23.- PARDO C. y VILLAGOMEZ P.: Efecto del uso de una bacteria emulsionada a base de *Escherichia coli* y el virus de la enfermedad de New Castle (VENC) sobre los índices de producción de pollo de engorda. *Avian Dis.*, 30- No. 2: 153-157 (1986).

- 24.- ROSENBERGER J.K., FRIES P.A. and CLOUD S.S.: *In vitro* and *in vivo* characterization of avian *Escherichia coli* II. Factors associated with Pathogenicity. *Avian Dis.*, 29 No. 4: 1094-1107 (1986).
- 25.- ROSENBERGER J.K., FRIES P.A. and CLOUD S.S.: *In vitro* and *in vivo* characterization of avian *Escherichia coli* III. Immunization. *Avian Dis.*, 29 No. 4: 1108-1117 --- (1986).
- 26.- SANDHU T.S. and LAVTON H.W.: Laboratory and field trials with Formalin-Inactivated *Escherichia coli* (078) - *Pasteurella Anatispestifer* bacterin in white pekin ducks. *Avian Dis.*, 29 No.1: 128-135 (1985).
- 27.- SILVA and JORGE.: Factores de Patogenicidade de amostras de *Escherichia coli* isoladas de aerosaculite de galinhas. *Avian Dis.*, 29 No. 2: 144-152 (1985).
- 28.- SPONENBERG D.P., DOMERMUTH C.H. and LARSEN C.T.: Field outbreaks of Colibacillosis of turkeys associated with Hemorrhagic Enteritis Virus. *Avian Dis.*, 29 No. 3: 838 - 842 (1986).
- 29.- STONE H.D., BRUGH M., HOPKINS S.R., YODER H.W. and BEARD C.W.: Preparation of inactivated Oil-Emulsion Vaccines with avian viral or *Mycoplasma* antigens. *Avian Dis.*, 22 No. 4: 666-672 (1979).
- 30.- SUWANICHKUL and PANIGRAHY.: Biological and Immunological characterization of pili *Escherichia coli* Serotypes 01,02 and 078. Pathogenic to Poultry. *Avian Dis.*, 30 No. 4: 781-787 (1986).