



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL ESTADO DE MÉXICO
PROGRAMA MAESTRÍA Y DOCTORADO EN CIENCIAS
AGROPECUARIAS Y RECURSOS NATURALES

**Sensibilidad antimicrobiana de aislamientos de *Avibacterium*
paragallinarum de México, Ecuador, Panamá y Perú**

TESIS

QUE PARA OBTENER EL GRADO DE MAESTRA EN
CIENCIAS AGROPECUARIAS Y RECURSOS NATURALES

PRESENTA

BIÓL. GRISEL ALEJADRA LUNA GALAZ

El Cerrillo Piedras Blancas, Toluca, Estado de México. Diciembre 2014



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL ESTADO DE MÉXICO
PROGRAMA MAESTRÍA Y DOCTORADO EN CIENCIAS
AGROPECUARIAS Y RECURSOS NATURALES

**Sensibilidad antimicrobiana de aislamientos de *Avibacterium
paragallinarum* de México, Ecuador, Panamá y Perú**

TESIS

QUE PARA OBTENER EL GRADO DE MAESTRA EN
CIENCIAS AGROPECUARIAS Y RECURSOS NATURALES

PRESENTA

BIÓL. GRISEL ALEJADRA LUNA GALAZ

COMITÉ DE TUTORES:

Dr. Edgardo Soriano Vargas	Tutor Académico
Dra. Claudia Giovanna Peñuelas Rivas	Tutor Adjunto
Dr. Patrick J. Blackall	Tutor Adjunto

Cerrillo Piedras Blancas, Toluca, Estado de México. Diciembre 2014

DEDICATORIA

A Dios por darme lo más importante: vida y salud.

A mí amada hija y compañera de este camino llamado vida. Por darme tú apoyo, por prestarme tus besos, abrazos y noches de cuentos para realizar mis sueños. Te admiro por toda tu paciencia y tu carácter valiente, fuerte y tranquilo que en la distancia aprendiste a tener. Y aunque a veces no lo comprendías, no dejaste de hacer y dar lo mejor de ti y si cada viaje a Guadalajara me hacían regresar con el corazón en la garganta, también me llenaron de fuerzas, admiración y respeto hacia ti, porque creciste demasiado, aprendiste a tocar piano, a bailar, pero sobre todo a saber que te tienes a ti y que siempre hay y habrá alguien a tu lado, que se ama en la distancia y a pesar de ella, que eres y serás por siempre y para siempre lo mejor de mi vida, mi niña Nahel.

A las tres mosqueteras, mi madre María de los Angeles por toda por su confianza y por estar siempre de la mano de Nahel, a mi abuela Naty por cuidarla por las tardes y darle de comer y a mi hermana y cómplice Hazel por hacerla más fuerte y más segura de sí misma, enseñándole que aprender a reírse de uno mismo es estar segura de quien eres.

“La vida es buena”

AGRADECIMIENTOS

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT), por la beca otorgada para la realización de mis estudios.

A la Universidad Autónoma del Estado de México, a través del Centro de Investigación y Estudios Avanzados en Salud Animal de la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia por permitirme realizar el trabajo de investigación y ser parte de esta institución.

A la empresa FARVET S.A.C., Perú y al Dr. Manolo Fernández, por permitirme realizar dos estancias en sus laboratorios, las cuales han sido de gran ayuda para mi vida profesional.

Al Dr. Edgardo Soriano Vargas por guiarme con paciencia, por su tiempo, por su amistad, por creer en mí y motivarme, pero sobre todo por ser un ejemplo a seguir.

A mis asesores, Dr. Patrick Blackall, The University of Queensland, Australia y Dra. Giovanna Peñuelas Rivas de la FMVZ-UAEM, por la asistencia técnica para el desarrollo del trabajo.

A Josefina Erasto, por ser y estar para Nahel. A Vladimir por haber sido un impulso a realizar la maestría, Héctor Trujillo, Brithy Ortiz, Alejandra García, Wael Hegazy, Ana Gama y Celene Salgado, por el apoyo recibido y los momentos compartidos durante el proceso de maestría.

A mi room mate Alejandra Payan, por su apoyo, por las risas compartidas y por los llantos y abrazos cuando la nostalgia de no tener a mi hija junto a mí, me invadían.

A mis amigos y compañeros de vida que aún en la distancia estuvieron junto a mí: Jacqueline Macias, Nadia Romero, Julio Franco, Rocío León Kempis, Ingrid Borja, Lilia Catellanos y Alberto Uribe.

A ti, gracias y como Frida Kahlo dijo: “Jamás en toda la vida, olvidaré tu presencia”.

FINANCIAMIENTO

Esta tesis se realizó en el marco del proyecto “Antígenos, antisueros e inmunógenos de *Avibacterium paragallinarum* de la serovariedad C-1 emergente en la avicultura de México”, UAEM 3102/2011.

CONTENIDO

DEDICATORIA.....	i
AGRADECIMIENTOS	ii
FINANCIAMIENTO.....	iv
CONTENIDO.....	v
RESUMEN	vii
ABSTRACT	ix
I. INTRODUCCIÓN	1
II. REVISIÓN DE LITERATURA.....	3
a. Etiología.....	3
b. Distribución.....	4
c. Coriza infecciosa.....	5
c. Impacto económico.....	5
d. Tratamiento.....	5
e. Resistencia antimicrobiana	6
f. Pruebas de sensibilidad antimicrobiana.....	7
III. JUSTIFICACIÓN	14
IV. HIPÓTESIS.....	15
V. OBJETIVOS	16
a. Objetivo General.....	16
b. Objetivos Específicos.....	16
VI. MATERIAL Y MÉTODOS.....	17
a. Bacterias.....	17

b. Medios de cultivo	19
c. Estandarización del inóculo	19
d. Selección de agentes antimicrobianos	19
e. Prueba de difusión en disco.....	20
f. Interpretación del antibiograma	22
VII. RESULTADOS.....	24
a. Artículo enviado a <i>Avian Diseases</i>	26
b. Artículo en preparación para <i>Veterinary Microbiology</i>	43
VIII. DISCUSIÓN.....	52
IX. CONCLUSIÓN	59
X. BIBLIOGRAFÍA	60
ANEXO 1.....	64
ANEXO 2.....	68

RESUMEN

Avibacterium paragallinarum es el agente causal de la coriza infecciosa, una enfermedad aguda del tracto respiratorio superior de pollos y gallinas. Los signos clínicos característicos de la enfermedad son descarga nasal, estornudo e inflamación facial. El impacto económico de la enfermedad radica en las pérdidas ocasionadas por retraso en el crecimiento de las aves, incremento en el número de aves eliminadas y una marcada reducción (10% al 40%) en la producción de huevo. El tratamiento para disminuir la severidad y el curso de los signos clínicos ocasionados por *Av. paragallinarum* está basado en antibióticos y quimioterapéuticos. Sin embargo, el uso prolongado e imprudente de los antibióticos ha resultado en la aparición de cepas de *Av. paragallinarum* resistentes y multi-resistentes, limitando el éxito del tratamiento. Las pruebas de sensibilidad antimicrobiana desempeñan un papel crucial en la selección de una terapia más adecuada contra la coriza infecciosa. Sin embargo, esta característica fenotípica de *Av. paragallinarum* no ha sido ampliamente estudiada. Además, no se han reportado los valores de sensibilidad de las 11 cepas de referencia. El propósito del presente estudio fue determinar la sensibilidad *in vitro* de 11 cepas de referencia de *Av. paragallinarum*. Un total de 30 aislamientos de Bolivia y Perú y 66 aislamientos de Ecuador, México, Panamá y Perú fueron incluidos en el estudio y probados contra 15 antimicrobianos. Los resultados de los 30 aislamientos de Bolivia y Perú, no mostraron 100% de sensibilidad a ninguno de los aislamientos. Sin embargo, el 90% presentaron sensibilidad al florfenicol y más del 70% de los aislamientos fueron sensibles a amoxicilina-ácido clavulánico, ampicilina, colistina, fosfomicina y gentamicina. Sólo el 53% de los aislamientos fueron sensibles a la doxiciclina. Todas las cepas fueron resistentes a la lincomicina y se registró 7% de sensibilidad a la oxacilina. Se registró resistencia a la enrofloxacina, neomicina, penicilina, estreptomina, sulfametoxazol-trimetoprima y tetraciclina. En cuanto a las cepas de referencia, todas fueron resistentes a lincomicina; además 2 cepas mostraron resistencia a estreptomina y una más a eritromicina. Los 66 aislamientos estudiados de México, Panamá y

Perú (100%), fueron sensibles a amoxicilina-ácido clavulánico, ampicilina, doxiciclina y fosfomicina. En cuanto a los aislamientos de Ecuador, los valores de sensibilidad para estos mismos antibióticos fueron de 88%, 85%, 65% y 96%, respectivamente. En general, la sensibilidad antimicrobiana fue variable para el resto de los antibióticos. En conclusión, los valores de sensibilidad antimicrobiana obtenidos en nuestro estudio, pueden servir como referencia para estudios de sensibilidad antimicrobiana de aislamientos de *Av. paragallinarum*. Los resultados sugieren que puede existir una diferencia en la sensibilidad antimicrobiana basada en el origen geográfico de los aislamientos.

ABSTRACT

Avibacterium paragallinarum is the causative agent of infectious coryza, an acute disease of the upper respiratory tract of chickens. The characteristic clinical signs of the disease include nasal discharge, sneezing and facial swelling. The economic impact of the disease lies in the losses caused by retarded growth of birds, increasing the number of birds removed and a marked reduction (10% to 40%) in egg production. Treatment to decrease the severity and course of the clinical signs caused by *Av. paragallinarum* is based on antibiotics and chemotherapeutics. However, prolonged and reckless use of antibiotics has resulted in the emergence of strains of *Av. paragallinarum* resistant and multi-resistant, limiting the treatment success. The antimicrobial susceptibility test plays a crucial role in selecting a suitable therapy against infectious coryza. However, this phenotypic characteristic of *Av. paragallinarum* has not been widely studied. Furthermore, there have been reported sensitivity values of the 11 reference strains. The purpose of this study was to determine the *in vitro* susceptibility of 11 reference strains of *Av. paragallinarum*. A total of 30 isolates from Bolivia and Peru and 66 isolates from Ecuador, Mexico, Panama and Peru were included in the study and tested to 15 antimicrobials. The results of the 30 isolates of Bolivia and Peru, showed 100% sensitivity to any of the isolates. However, 90% were sensitive to florfenicol and over 70% of isolates were susceptible to amoxicillin-clavulanate, ampicillin, colistin, fosfomicin and gentamicin. Only 53% of the isolates were sensitive to doxycycline. All strains were resistant to lincomycin and 7% of sensitivity to oxacillin. Resistant to enrofloxacin, neomycin, penicillin, streptomycin, sulfamethoxazole-trimethoprim and tetracycline was recorded. All reference strains were resistant to lincomycin; furthermore, 2 strains showed resistance to streptomycin and erythromycin. The 66 isolates studied from Mexico, Panama and Peru (100%) were susceptible to amoxicillin-clavulanate, ampicillin, doxycycline and fosfomicin. Regarding the Ecuadorian isolates, the sensitivity values for these same antibiotics were 88%, 85%, 65% and 96%, respectively. In general, the antimicrobial sensitivity was variable for other antibiotics. In conclusion, the

antimicrobial susceptibility values obtained in our study can serve as a reference for antimicrobial susceptibility studies of isolates of *Av. paragallinarum*. The results suggest that there may be a difference in the antimicrobial sensitivity based on the geographic origin of the isolates.

I. INTRODUCCIÓN

Avibacterium paragallinarum es una bacteria Gram negativa y es el agente causal de la coriza infecciosa, una enfermedad aguda del tracto respiratorio superior de pollos y gallinas; los signos clínicos característicos de esta enfermedad son descarga nasal, estornudo e inflamación facial (Blackall y Soriano-Vargas, 2013).

La hemoaglutinina de *Av. paragallinarum* es clasificada serológicamente en tres serogrupos (A, B y C) y nueve serovariedades (A-1, A-2, A-3, A-4, B-1, C-1, C-2, C-3, C-4), mediante la técnica de inhibición a la hemaglutinación (Blackall *et al.*, 1990).

La importancia económica de la coriza infecciosa a nivel mundial radica en las pérdidas ocasionadas por retraso en el crecimiento de las aves, incremento en el número de aves eliminadas (Blackall y Soriano-Vargas, 2013) y una marcada reducción (10% al 40%) en la producción de huevo (Calderon *et al.*, 2010).

El control de la coriza infecciosa se basa en la bacterinización de parvadas susceptibles. Una vez que se presenta un brote, el tratamiento para disminuir la severidad de los signos clínicos ocasionados por *Av. paragallinarum* está basado en el uso de antibióticos y quimioterapéuticos. Sin embargo en forma rutinaria y tomando en cuenta el tiempo de presentación de los signos clínicos (24 horas post-infección), la decisión del tratamiento se basa casi por lo regular en la experiencia personal.

El uso prolongado e imprudente de los antibióticos ha resultado en cepas resistentes y multi-resistentes (Hsu *et al.*, 2007, Chukiatsiri *et al.*, 2012), limitando el éxito del tratamiento. Estudios previos han mostrado que *Av. paragallinarum* es sensible (100%) a cloranfenicol, furoxone, ácido nalidíxico, novobiocina, espectinomicina, penicilina, tetraciclina, eritromicina, gentamicina y neomicina

(Rimler, 1979; Reece y Coloe, 1985). Sin embargo, también se han reportado altos porcentajes de resistencia (90%-100%) a estos dos últimos antibióticos y a la cloxacilina, lincomicina, amikacina (Prabhakar *et al.*, 1988), estreptomicina, tetraciclina y neomicina (72.8%) (Blackall *et al.*, 1989). Esta característica fenotípica no ha sido estudiada ampliamente en aislamientos de *Av. paragallinarum*. Los estudios reportados han evaluado un número reducido de aislamientos y son pocas las regiones geográficas de las cuales provienen dichos aislamientos, por ejemplo: Alemania (Reece y Coloe, 1985), Australia (Blackall, 1988; Blackall *et al.*, 1989), Egipto (Aly, 2000), Georgia, India (Prabhakar *et al.*, 1988), Indonesia (Takagi *et al.*, 1991) (Poernomo *et al.*, 2000), Japón, República Dominicana, Sudáfrica (Reece y Coloe, 1985), Tailandia (Chukiatsiri *et al.*, 2012), Taiwán (Hsu *et al.*, 2007) y Uganda (Byarugaba *et al.*, 2011).

En lo que respecta al continente Americano, se han estudiado aislamientos de Estados Unidos de América (California, Norte de California, Florida y Washington), Brasil y un aislamiento de Guatemala (Rimler, 1979). Particularmente en México, solo se ha reportado un trabajo que incluyó 40 aislamientos y 6 antibióticos (Fernández *et al.*, 2000). Aún cuando se han incluido algunas cepas de referencia de *Av. paragallinarum* en estudios de sensibilidad antimicrobiana, no se muestran los valores individuales.

Las pruebas de sensibilidad antimicrobiana desempeñan un papel crucial en la selección de una terapia más adecuada contra la coriza infecciosa.

Por lo tanto el objetivo del presente estudio es evaluar la sensibilidad antimicrobiana de aislamientos de *Av. paragallinarum* de Ecuador, México, Panamá y Perú, frente a diferentes antimicrobianos de importancia en la avicultura.

II. REVISIÓN DE LITERATURA

a. *Etiología*

La bacteria *Avibacterium paragallinarum*, anteriormente conocida como *Haemophilus paragallinarum*, fue reclasificada mediante un análisis fenotípico y genotípico (Blackall *et al.*, 2005), es el agente causal de la coriza infecciosa.

Es una bacteria Gram negativa, no móvil, en cultivos de 18 a 24 horas forma bacilos y cocobacilos que miden de 1-3 μm de largo y 0.4-0.8 μm de ancho y que tienden a formar filamentos (Blackall y Soriano-Vargas, 2013).

Esta bacteria es considerada un microorganismo exigente, debido a que, para su crecimiento *in vitro*, crece con 5% de dióxido de carbono o con reducción de oxígeno y la mayoría de los aislamientos dependen de NAD (dinucleótido de adenina nicotidamida), el cual es proporcionado por una cepa nodriza de *Staphylococcus aureus* creciendo en forma satelital. En placas de agar sangre forman colonias que miden de 0.3 a 1.0 mm de diámetro (Figura 1). En México y Sudáfrica se han identificado aislamientos independientes de NAD para su crecimiento (Bragg *et al.*, 1977; García *et al.*, 2004).

La hemoaglutinina es el antígeno principal de *Avibacterium paragallinarum* y permite clasificar la bacteria mediante la prueba de inhibición de la hemoaglutinación (IH) (Kume *et al.*, 1983; Eaves *et al.*, 1989; Blackall *et al.*, 1990).

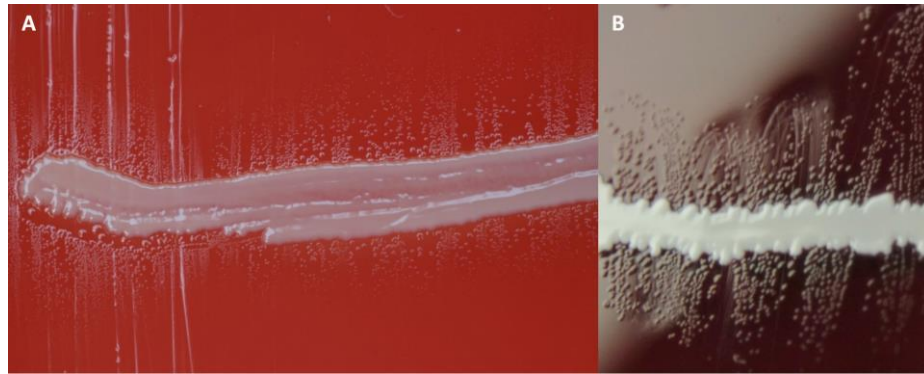


Figura 1. Cultivos de *Avibacterium paragallinarum* en base de agar con 10% de sangre de ovino con colonia nodriza de *Staphylococcus epidermidis*. Colonias dependientes de NAD (a) o independientes de NAD (b) (Tomado de Soriano-Vargas *et al.*, 2013).

Inicialmente, mediante pruebas de aglutinación en placa, los aislamientos de *Av. paragallinarum* se clasificaron en tres serovariedades A, B y C (Page, 1962). Posteriormente, se identificaron 3 serogrupos (I, II y III) y se identificaron 7 hemaglutininas, de HA-1 a HA-7 (Kume *et al.*, 1983). Eaves *et al.* (1989), reportaron 2 hemoaglutininas más y actualmente se reconocen 9 serovariedades (A-1, A-2, A-3, A-4, B-1, C-1, C-2, C-3, C-4) (Blackall *et al.*, 1990).

b. Distribución

La distribución actual de las serovariedades hemoaglutinantes es como sigue: Alemania, A-1, A-2, B-1 y C-2 (Eaves *et al.*, 1989; Kume *et al.* 1983), Australia, A-4, C-2 y C-4 (Blackall *et al.*, 1990; Eaves *et al.*, 1989), Brasil, A-3 (Kume *et al.* 1983), Ecuador, A-3, B-1 y C-1 (Cabrera *et al.*, 2011), Estados Unidos de América, (Eaves *et al.*, 1989; Soriano *et al.*, 2004), Israel, C3 (Bragg *et al.*, 2007), Japón, A-1 y C-1 (Kume *et al.* 1983), México, A-1, A-2, B-1, C-1 y C-2 (Soriano *et al.*, 2001; Morales *et al.*, 2011), Panamá, B-1 (Calderón *et al.*, 2010), Sudáfrica, A-1, B-1, C-2 y C-3 (Eaves *et al.*, 1989) y Zimbabue, C-3 (Bragg, 2002).

c. Coriza infecciosa

La coriza infecciosa es una enfermedad aguda que afecta el tracto respiratorio superior de pollos y gallinas y *Av. paragallinarum* es el agente etiológico. Los signos clínicos incluyen descarga nasal serosa o mucosa, estornudo y en casos más severos inflamación facial y conjuntivitis (Blackall y Soriano-Vargas, 2013). Soriano y Terzolo (2004) mencionan que la inflamación de barbillas puede ser evidente en machos.

c. Impacto económico

El impacto económico en la avicultura es significativo, debido a pérdidas causadas por la disminución del consumo de alimento de las aves, trayendo consigo el retraso en el crecimiento, pérdida de peso e incremento en el número de aves eliminadas. En gallinas de postura ocasiona baja en la producción de huevo que va desde 10% hasta 40%. Sin embargo se han reportado pérdidas que alcanzan el 58.7% (Soriano y Terzolo, 2004) y aún más severas desde 15.7% hasta 75% (Blackall y Soriano-Vargas, 2013). Los pollos y gallinas son susceptibles en todas las edades.

d. Tratamiento

Los brotes de coriza infecciosa son tratados con antimicrobianos y sulfonamidas, debido a que estos son la herramienta de elección para la prevención y control de coriza infecciosa (Blackall y Soriano-Vargas, 2013).

En un inicio se evaluó la efectividad del antibiótico espectinomicina, y espectinomicina en combinación con eritromicina en aves infectadas experimentalmente. Tanto la eritromicina sola como en combinación, mostraron una marcada diferencia del 20% al 24% en las aves infectadas y medicadas

(Hanley, 1968). Posteriormente, se examinó la eficacia antimicrobiana de la norfloxacin en pollos reproductores de engorda con signos clínicos de coriza, disminuyendo rápidamente y desapareciendo al segundo día de tratamiento, mostrando que este antibiótico es una buena elección para el tratamiento de coriza infecciosa (Lublin *et al.*, 2000).

La eritromicina y derivados de las tetraciclinas son los antibióticos comúnmente utilizados en diferentes países, entre ellos Tailandia (Chukiatsiri *et al.*, 2012). En cambio en Taiwan, la combinación sulfametoxazol-trimetoprimaa es de elección más frecuente para tratar esta enfermedad (Hsu *et al.*, 2007). Algunos otros antibióticos utilizados son fluoroquinolonas, eritromicina y estreptomina (Bornstein *et al.*, 1954), entre otros.

e. Resistencia antimicrobiana

No obstante, el éxito del tratamiento de la coriza infecciosa puede verse limitado debido a la resistencia antimicrobiana. En general, el tema de la resistencia antimicrobiana no es nuevo y es motivo de preocupación creciente tanto en salud animal como en salud pública. El número de organismos resistentes y las localizaciones geográficas de la resistencia a los antibióticos ha ido en aumento. En la actualidad, las bacterias no son caracterizadas únicamente por la resistencia antimicrobiana, sino también por la multi-resistencia (Levy y Marshall, 2004).

En lo que respecta a la avicultura, los antibióticos son utilizados para tratar infecciones activas y de una manera profiláctica para prevenir infecciones. Sin embargo, la terapia empírica al realizar mezclas de antibióticos y la modificación de dosis traen consigo grandes consecuencias negativas en el tratamiento de las aves (Sumano y Gutiérrez, 2010).

Incluso, los antibióticos han sido utilizados ampliamente como promotores de crecimiento. Desde la década de 1940 se mostró que los pollos tratados con

antibióticos de amplio espectro, logran aumentar su talla y cantidad de carne producida, pese a la evidencia de la resistencia antimicrobiana ya en 1951 (Cully, 2014).

Por lo tanto, las malas prácticas mencionadas anteriormente traen consigo un alto riesgo, aumentando la presión de selección de bacterias resistentes, promoviendo la propagación de genes de resistencia, ya sea situados en plásmidos o transposones (Kehrenberg *et al.*, 2001).

En cuanto a *Av. paragallinarum* solo se ha reportado el plásmido pYMH5, el cual confiere multi-resistencia a la estreptomicina, sulfonamida, kanamicina y neomicina, con una frecuencia del 72% en los aislamientos estudiados ().

El uso inapropiado de los antibióticos promueve la resistencia antimicrobiana, la cual es un obstáculo para el tratamiento eficaz, puesto que se reducen las opciones terapéuticas disponibles hasta este momento para aliviar el curso de esta enfermedad.

f. Pruebas de sensibilidad antimicrobiana

Actualmente, las pruebas de sensibilidad antimicrobiana son una herramienta para medir la sensibilidad *in vitro* de una variedad de agentes antimicrobianos frente a los aislamientos de diferentes microorganismos (CLSI, 2008). Para efectuar las pruebas de sensibilidad, se han descrito varios métodos como difusión en agar, dilución en agar, macrodilución en caldo, microdilución en caldo, y Epsilon test (E test), principalmente (Koneman *et al.*, 1997).

La sensibilidad *in vitro* de *Av. paragallinarum* no ha sido examinada ampliamente (Blackall, 1988; Hsu *et al.*, 2007). En un periodo de 35 años, tan solo se han reportado aproximadamente 13 investigaciones que han evaluado dicha característica. Asimismo, el número de aislamientos incluidos en cada estudio es

reducido, al igual que los antibióticos que han sido utilizados para evaluar la sensibilidad de este microorganismo. Además no se han evaluado aislamientos de diferentes partes del mundo, es decir, las regiones geográficas de las cuales provienen dichos aislamientos abarcan de uno a dos países del continente Australiano (Blackall, 1988; Blackall *et al.*, 1989; Reece y Coloe, 1985), Asiático (Prabhakar *et al.*, 1888; Takagi *et al.*, 1991; Poernomo *et al.*, 2000; Hsu *et al.*, 2007; Chukiatsiri *et al.*, 2012), Africano (Byarugaba *et al.*, 2011; Aly, 2000) y el continente Europeo (Blackall, 1989). El número de aislamientos incluidos en cada estudio es reducido, al igual que los antibióticos que han sido evaluados (Cuadro 1).

Con relación a América, solamente se han evaluados 13 aislamientos provenientes de Estados Unidos de América (California, Florida y Washington), 13 aislamientos de Brasil y un aislamiento de Guatemala (Rimler, 1979). Particularmente en México, el único trabajo reportado se realizó hace más de una década, que incluyó 6 antibióticos (Fernández, 2000).

Cuadro 1. Estudios históricos de la sensibilidad antimicrobiana de *Av. paragallinarum* en diferentes países.

No. de aislamientos evaluados	No. antimicrobianos	País	Aislamientos Resistentes (%)	Aislamientos sensibles (%)	Método utilizado	Referencia
29 aislamientos 6 cepas de referencia (083, 0222, Modesto, 2403, Spross) 14	14	EUA Georgia Japón, Alemania Sudáfrica República Dominicana Brasil Guatemala	Bacitracina (65.8) Colistina (68.5) Lincomicina (77.2) Estreptomicona (42.9)	Cloromicetin, Eritromicina, Furoxone, Gentamicina, Ácido nalidíxico Neomicina, Novobiocina, Espectinomicina, Tetraciclina Penicilina	Difusión en disco	Rimler (1979)
19 (1978 a 1983)	7	Australia	Estreptomicona (27) Sulfametoxazol-trimetoprimaa (11), Sulfonamidas(25) sulfametazina, sulfatiazol y sulfamerazina), Tetraciclina (22)	(100) Furazolidona, Neomicina Eritromicina	Difusión en disco	Reece Coloe (1985)
40 aislamientos de campo 31 aislamientos de referencia 8 cepas de	6	Australia	Estreptomicona (26.6) y 1 estos aislamientos además mostró resistencia a tetraciclina y otro más neomicina.	Ampicilina, Eritromicina, Neomicina, Penicilina, Estreptomicona y Tetraciclina (73.3)	MIC	Blackall (1988)

referencia (221, 2403, 2671, H-18, Modesto, SA-3, 0083,0222)						
9 aislamientos	15	India	Neomicina, Cloxacilina, Co-trimaxazole, Lincomicina, Capalexina y Amikacina (100) Gentamicina (90)	Enrofloxacin, Ciprofloxacina y Ampicilina (100) Norfloxacin (55) Pefloxacin (44) Cloranfenicol (30)	Difusión en disco	Prabhakar <i>et al.</i> (1988)
92	6	Australia, Alemania, Japón, Sudáfrica Estados Unidos.	Estreptomycin, tetracycline and neomycin (72.8) Neomycin and Tetracycline (21.7), Tetracycline (1%) Neomycin (4%)	Ampicilina Eritromicina Penicilina	MIC	Blackall <i>et al.</i> (1989)
3 aislamientos, 2 cepas de referencia (221 y Modesto)	12	Indonesia	Dihydrostreptomycin, kanamycin, spiramycin, erythromycin Ampicilina, novobiocin, oxitetracycline.	Altamente sensibles a Cloranfenicol	Difusión en agar	Takagi <i>et al.</i> (1991)

20	58	India	Cloxacilina, Eritromicina, Ampicilina y Lincomicina (100)	Enrofloxacina (86.2) Gentamicina (82.7) Ciprofloxacina, Pefloxacina, Norfloxacina y Cloranfenicol (65.5) Doxiciclina (24.1) Cefalexina (22.4) Clortetraciclina y Kanamicina (17.2) Estreptomina (13.7) Oxitetraciclina, neomicina y cotrimaxazol (12.06)	Difusión en disco	Prasad <i>et al.</i> (1999)
26 (1995-1999)	12	Egipto	ND	Altamente susceptibles a fluoroquinolonas, gentamicina, estreptomina y espectinomina		Aly (2000)
40	6	México	Neomicina (20) Estreptomina (27.5) Tetraciclina (5)	Ampicilina, Penicilina y Eritromicina (100) Neomicina (80) Estreptomina (62.5) Tetraciclina (95)	MIC	Fernández <i>et al.</i> (2000)

14 (1991-1999)	7	Indonesia	Eritromicina y Estreptomina (78.5) Neomicina (71.4) Oxitetraciclina (57.1) Doxiciclina (35.7) Sulfametoxazol-Trimetroprim (21.4)	Ampicilina (100) Eritromicina y Estreptomina (21.5) Doxiciclina (57.1) Sulfametoxazol-Trimetroprim (78.6)	Difusión en Disco	Poernomo <i>et al.</i> (2000)
18 (1990-2003)	8	Taiwán	Neomicina (83.3) Estreptomina (88.8) Eritromicina (77.7) Ampicilina (38.8) Tetraciclina (22.2) Kanamicina y Sulfametoxazol/ trimetroprim (ND)	Neomicina (16.7) Estreptomina (11.2) Eritromicina (22.3) Ampicilina (61.2) Tetraciclina (77.8)	MIC	Hsu <i>et al.</i> (2007)
5	6	Uganda, África	Ampicilina (60) Estreptomina (60) Sulfametoxazol (60) Tetraciclina (80)	Cloranfenicol y Neomicina (100)		Byarugaba <i>et al.</i> (2011)
18 (2006-2009)	16	Tailandia	Eritromicina (≥ 90) Neomicina, Eritromicina y Estreptomina (≥ 75) Oxitetraciclina y Sulfametoxazol/ trimetroprim ($\geq 60\%$)	Amoxicilina/ ác. Clavulanico (100) Amoxicilina, Ceftiofur, Gentamicina, Espectinomicina y Tilosina ($\geq 70\%$)	Difusión en disco	Chukiatsiri <i>et al.</i> (2012)

Se observa que en el transcurso del tiempo en diferentes partes del mundo se ha reportado una variación en la resistencia antimicrobiana contra *Av. paragallinarum*. En general, se han reportado aislamientos de *Av. paragallinarum* con resistencia a la amikacina, ampicilina, bacitracina, capalexina, cloxacilina, colistina, co-trimaxazole, dihidroestreptomicina, doxiciclina, eritromicina, espiramicina, estreptomicina, gentamicina, kanamicina, lincomicina, neomicina, novobiocin, oxitetraciclina, sulfametoxazol-trimetoprima, sulfonamidas (sulfametazina, sulfatiazol y sulfamerazina) y tetraciclina. Los antibióticos que se han evaluado con mayor frecuencia desde 1979 hasta el año 2000 son: eritromicina, neomicina, estreptomicina y tetraciclina, con un aumento en el porcentaje de resistencia.

III. JUSTIFICACIÓN

Dado que coriza infecciosa es una enfermedad de importancia económica en muchas partes del mundo, que impacta la avicultura, principalmente en la producción de huevo, es de vital interés conocer la sensibilidad antimicrobiana de un número significativo de cepas de referencia y aislamientos de *Av. paragallinarum*.

Los resultados serán de gran valor, ya que de manera indirecta podrían guiar el uso terapéutico de algunos antimicrobianos en el tratamiento de la coriza infecciosa.

IV. HIPÓTESIS

Todos los aislamientos de *Av. paragallinarum* presentan resistencia a dos o más antimicrobianos. Es posible que los patrones de susceptibilidad no sean similares a los ya reportados, ya que esta característica fenotípica pudiera estar relacionada con el origen geográfico.

V. OBJETIVOS

a. Objetivo General

Determinar la sensibilidad y resistencia *in vitro* de once cepas de referencia de *Av. paragallinarum* y de 96 aislamientos provenientes de Bolivia, Ecuador, México, Panamá y Perú frente a diferentes antimicrobianos.

b. Objetivos Específicos

1. Determinar la sensibilidad antimicrobiana *in vitro* de cepas de referencia y aislamientos de *Av. paragallinarum*.
2. Identificar patrones de resistencia antimicrobiana *in vitro* de cepas de referencia y aislamientos de *Avibacterium paragallinarum*.

VI. MATERIAL Y MÉTODOS

a. Bacterias

En el estudio se incluyeron 11 cepas de referencia de *Av. paragallinarum* (Cuadro 2). Asimismo, se incluyeron 27 aislamientos provenientes de Perú y 3 aislamientos de Bolivia, los cuales fueron proporcionados por la empresa FARVET, SAC, Perú, El análisis de estos aislamientos se realizó en el Laboratorio de Microbiología de la misma empresa. Además se analizaron 35 aislamientos de México de las serovariedades A-1, B-1, C-1 y C-2, 26 aislamientos de Ecuador de las serovariedades A-3, B-1 y C-1, 2 aislamientos de Panamá serovariedad B-1, 3 aislamientos serovariedad C-2 de Perú. Todos los aislamientos forman parte de una colección bajo resguardo en el Centro de Investigación y Estudios Avanzados en Salud Animal, Universidad Autónoma del Estado de México.

Cuadro 2. Origen y serovariedad de las cepas de referencia de *Av. paragallinarum* incluidas en este estudio.

Cepas de referencia			
	Serovariedad	Origen	Referencia
221	A-1	Japón	Kume <i>et al.</i> (1983)
2403	A-2	Alemania	Kume <i>et al.</i> (1983)
E-3C	A-3	Brasil	Kume <i>et al.</i> (1983)
HP14	A-4	Australia	Kume <i>et al.</i> (1983)
2671	B-1	Alemania	Kume <i>et al.</i> (1983)
H-18	C-1	Japón	Kume <i>et al.</i> (1983)
Modesto	C-2	EUA	Kume <i>et al.</i> (1983)
SA-3	C-3	Sudáfrica	Kume <i>et al.</i> (1983)
HP60	C-4	Australia	Kume <i>et al.</i> (1983)
0083	A-1	EUA	Page <i>et al.</i> (1962)
0222	B-1	EUA	Page <i>et al.</i> (1962)

b. Medios de cultivo

Las bacterias fueron incubadas por 24 horas en placas de agar con 10% de sangre de ovino y *Staphylococcus aureus* como colonia nodriza. Posteriormente fueron propagadas y cultivadas en tubos con 5 ml de caldo infusión cerebro corazón suplementado con suero inactivado de caballo al 1 % y 25 µg/mL de dinucleótido de adenina nicotidamida (NAD) e incubados a 37° C, 18 a 24 horas. Para la prueba de difusión en disco, fue utilizado TM/SN, el cual es suplementado con 1% (v/v) de suero de pollo, con 5% v/v de complejo de albumina oleico y 0.0025% (w/v) de dinucleótido de adenina nicotidamida (NAD) (Blackall, 1989).

c. Estandarización del inóculo

Más de una colonia (4-10 colonias) de cada aislamiento de *Av. paragallinarum* se tomó para asegurar una muestra representativa. La normalización de cada inóculo se realizó ajustando a una turbidez de 0,5 en escala Mc Farland, con la finalidad de obtener una suspensión uniforme y asegurar resultados exactos y reproducibles. Se realizaron 3 inóculos por aislamiento y cepas de referencia.

d. Selección de agentes antimicrobianos

Los agentes antimicrobianos utilizados en este estudio se seleccionaron con base en las siguientes consideraciones: antimicrobianos referidos por otros autores para las pruebas de sensibilidad antimicrobiana de este agente, antibióticos recomendados específicamente para uso en aves (CLSI, 2008), antibióticos incluidos en la lista de antimicrobianos de importancia veterinaria (OIE, 2004) y antibióticos disponibles comercialmente (Cuadros 3 y 4).

e. Prueba de difusión en disco

Para determinar la sensibilidad bacteriana *in vitro* a los antibióticos, se realizaron antibiogramas por el método de difusión en disco, basado en el trabajo de Kirby–Bauer (Bauer *et al.*, 1966). Este método es recomendado por el *Clinical Laboratory Standards Institute* (CLSI) (CLSI, 2012), por ser un método sencillo y fácil de estandarizar. Los cultivos se dispersaron con ayuda de un hisopo estéril en la superficie de placas de agar TM/SN. Posteriormente se colocaron los discos comerciales de los diferentes antimicrobianos con ayuda de un dispensador de discos (Oxoid). Las placas de agar fueron incubadas reduciendo el oxígeno, mediante el método tradicional de frasco con vela a 37° C. Después del tiempo de incubación, las zonas de inhibición se midieron en milímetros con ayuda de un calibrador vernier. En este estudio, se incluyeron las cepas estándar de referencia de *Escherichia coli* ATCC 25922 y *Staphylococcus aureus* ATCC (Cuadro 5).

Las pruebas de sensibilidad antimicrobiana se realizaron en 2 laboratorios: FARVET, SAC, Perú y en el CIESA-FMVZ-UAEM, México. El estudio realizado en Perú incluyó aislamientos de Bolivia y Perú de la colección del mismo laboratorio. El estudio realizado en México incluyó aislamientos de Ecuador, México, Panamá y Perú.

Cuadro 5. Límites de control de calidad para las cepas de referencia de *Escherichia coli* y *Staphylococcus aureus*.

Antimicrobiano(μg)	<i>E. coli</i> (ATCC 25922)	<i>S. aureus</i> (ATCC 25923)
Amoxicillin - Acid clavulanic (30)	18-24	28-36
Ampicilina (10)	16-22	27-35
Colistina (10)	ND	ND
Doxiciclina (30)	ND	ND
Eritromicina (15)	---	22-30
Fosfomicina (50)	ND	ND
Gentamicina (10)	19-26	19-27
Kanamicina (30)	17-25	19-26
Lincomicina (2)	ND	ND
Neomicina (30)	ND	ND
Oxitetraciclina (30)	ND	ND
Penicilina (10)	-	26-37
Estreptomina (300)	ND	ND
Sulfametoxazole-trimetoprima (23.75 / 1.25)	23-29	24-32
Tetraciclina (30)	18-25	24-30
Enrofloxacin (5)	32-40	27-31
Florfenicol (30)	22-28	22-29

f. Interpretación del antibiograma

La clasificación de la respuesta *in vitro* de *Av. paragallinarum* se realizó en las siguientes categorías: **sensible**, que incluyó los aislamientos inhibidos por las concentraciones del agente antimicrobiano alcanzadas cuando se administra la dosis recomendada para el lugar de la infección; **intermedio**, incluye aislamientos en los que la concentración inhibitoria media (CIM) del agente antimicrobiano que se acerca a las concentraciones alcanzadas en la sangre y los tejidos y para que las tasas de respuesta puedan ser inferiores a las de los aislados sensibles; **resistente**, implica los aislamientos no inhibidos por las concentraciones del antimicrobiano alcanzadas generalmente con una pauta nosológica o que los diámetros del halo de inhibición caen dentro del intervalo en el que es probable que haya mecanismos específicos de resistencia microbiana y la eficacia clínica del agente frente al aislado no se ha demostrado fehacientemente en estudios de tratamiento (CLSI, 2008).

Cuadro 3. Antimicrobianos probados con aislamientos de *Av. paragallinarum* de Bolivia y Perú.

Antibiótico	µg	Código	Marca	Referencia
Amoxicilina/ Ácido clavulánico	20+10	AmC	BD- BBL	Chukiatsiri <i>et al.</i> (2012)
Ampicilina	10	Amp	BD- BBL	Chukiatsiri <i>et al.</i> (2012)
Colistina	10	CO	BD- BBL	Chukiatsiri <i>et al.</i> (2012)
Doxiciclina	10	D	OXOID	Chukiatsiri <i>et al.</i> (2012)
Enrofloxacina	5	Enr	OXOID	
Estreptomina	300	S	BD- BBL	CLSI (2008)
Florfenicol	30	FF	OXOID	
Fosfomicina	50	Fos	OXOID	Sumano y Gutiérrez (2010)
Gentamicina	10	Cn	OXOID	CLSI (2008)
Lincomicina	2	My	BD- BBL	Chukiatsiri <i>et al.</i> (2012)
Neomicina	30	Ne	OXOID	Chukiatsiri <i>et al.</i> (2012)
Oxacilina	1	OX	BD- BBL	Chukiatsiri <i>et al.</i> (2012)
Penicilina	10	Pe	BD- BBL	Chukiatsiri <i>et al.</i> (2012)
Sulfametoxazole- trimetoprima	23.75 + 1.25	SxT	BD- BBL	Chukiatsiri <i>et al.</i> (2012)
Tetraciclina	30	Te	BD- BBL	CLSI (2008)

Cuadro 4. Antimicrobianos probados con aislamientos de *Av. paragallinarum* de Ecuador, México, Panamá y Perú.

Antibiótico	µg	Código	Marca	Referencia
Amoxiciclina/		AmC		
Ácidoclavulanico	20+10			Chukiatsiri <i>et al.</i> (2012)
Ampicilina	10	Amp		Chukiatsiri <i>et al.</i> (2012)
Colistina	10	CO		
Doxiciclina	10	D		Chukiatsiri <i>et al.</i> (2012)
Eritromicina	15	Enr		Chukiatsiri <i>et al.</i> (2012)
Fosfomicina	50	S		
Gentamicina	10	FF	OXOID	Chukiatsiri <i>et al.</i> (2012)
Kanamicina	30	Fos		
Lincomicina	2	Cn		Chukiatsiri <i>et al.</i> (2012)
Neomicina	30	My		Chukiatsiri <i>et al.</i> (2012)
Oxitetraciclina	30	Ne		Chukiatsiri <i>et al.</i> (2012)
Penicilina	10	OX		Chukiatsiri <i>et al.</i> (2012)
Estreptomicina	300	Pe		CLSI (2008)
Sulfametoxazole	23.75 +	SxT		
-trimetoprima	1.25			Chukiatsiri <i>et al.</i> (2012)
Tetraciclina	30	Te		CLSI (2008)

VII. RESULTADOS

En el presente estudio, un total de 27 aislamientos provenientes de Perú y 3 aislamientos de Bolivia fueron incluidos en la prueba de difusión en disco y realizados en un primer estudio.

En un segundo estudio, se evaluó la sensibilidad antimicrobiana de las 11 cepas de referencia de *Av. paragallinarum* y un total de 66 aislamientos de Ecuador, México, Panamá y Perú.

Los resultados de sensibilidad antimicrobiana de los aislamientos de *Av. paragallinarum* provenientes de Perú y Bolivia, de las serovariedades (A-1, A-2-B-1, C-2) y (A-2, C-1 y C-2) respectivamente, no mostraron 100% de sensibilidad a ninguno de los aislamientos. Sin embargo, el 90% presentaron sensibilidad al florfenicol y más del 70% de las cepas fueron sensibles a amoxicilina-ácido clavulánico, ampicilina, colistina, fosfomicina y gentamicina. Sólo el 53% de las cepas fueron sensibles a la doxiciclina.

Los resultados se encuentran artículo titulado “Hemagglutinin serotyping and antimicrobial sensitivity of *Avibacterium paragallinarum* isolates from Peru and Bolivia”, el cual fue enviado y en revisión por pares de la revista *Avian Diseases* (Artículo A).

Respecto al segundo estudio, los resultados de las cepas de referencia fueron sensibles a amoxicilina-ácido clavulánico, ampicilina, colistina, doxiciclina, fosfomicina, gentamicina, kanamicina, neomicina, oxitetraciclina, penicilina, y sulfametoxazol- trimetoprima. Sin embargo, todas fueron resistentes a lincomicina; además las cepas 2403 y 2671, provenientes de Alemania y 0083 proveniente de EUA y pertenecientes a la serovariedad A-2, B-1 y A-1,

respectivamente también mostraron resistencia a estreptomicina y la cepa H-18, proveniente de Japón y serovariedad C-1 mostró resistencia a eritromicina.

Los 66 aislamientos provenientes de México, Panamá y Perú, todos (100%), fueron sensibles a amoxicilina-ácido clavulánico, ampicilina, doxiciclina y fosfomicina. En cuanto a los aislamientos originarios de Ecuador, los valores de sensibilidad para estos mismos antibióticos fueron de 88%, 85%, 65% y 96%, respectivamente. La sensibilidad antimicrobiana fue variable para el resto de los antibióticos.

En general, los aislamientos de Ecuador mostraron una tendencia menor de sensibilidad a los antimicrobianos probados que los aislamientos de México, Panamá y Perú. En particular, se observa una alta resistencia de los aislamientos a la eritromicina. El promedio del triplicado de cada aislamiento, así como el número de aislamientos sensibles, resistentes e intermedio y el porcentaje de sensibilidad de cada país estudiado, se encuentra en los **Anexos 1 y 2**.

Estos resultados se presentan en el artículo titulado “Antimicrobial sensitivity of *Avibacterium paragallinarum* isolates from the Americas” que será enviado a la revista *Veterinary Microbiology* (Artículo B).

Artículo A. Enviado a Avian Diseases

Dear Miss Luna,

Your manuscript titled: "Hemagglutinin serotyping and antimicrobial sensitivity of Avibacterium paragallinarum isolates from Peru and Bolivia", with the tracking number MS# 10985-111314-ResNote has successfully passed the quality control stage for Avian Diseases. It is now in the peer review process.

You can review the status of your manuscript at any time by following the instructions below.

You can use the link below to go directly to your homepage within The Avian Diseases website. From your homepage click the "Live Manuscripts" link and then click on "Check Status # 10985-111314-ResNote" to view the status of this manuscript.

<<http://aviandiseases.allentrack.net/cgi-bin/main.plex?el=A7BB1BLm5A7ERE6J2A9MCclNE9vG0ovAbR4cPj2wZ>>

If you need any further assistance, please contact us with the manuscript tracking number at: avian.diseases@aaap.info.

Janece Bevans-Kerr
Office Manager
Avian Diseases
avian.diseases@aaap.info

RESEARCH NOTE

Hemagglutinin serotyping and antimicrobial sensitivity of *Avibacterium paragallinarum* isolates from Peru and Bolivia

Grisel A. Luna-Galaz,^{AD} Vladimir Morales-Erasto,^A Francesca Falconi-Agapito,^B Luis Saravia,^B Eliana Icochea,^C Edgardo Soriano-Vargas,^A and Manolo Fernández-Díaz^{BD}

^ACentro de Investigación y Estudios Avanzados en Salud Animal, Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia, Universidad Autónoma del Estado de México, Toluca, 50200, México.

^BFARVET S.A.C., Carretera Panamericana Sur No. 766, Km 198.5, Chincha Alta - Ica, Perú.

^CLaboratorio de Patología Aviar, Facultad de Medicina Veterinaria, Universidad Nacional Mayor de San Marcos, Lima, Perú.

Running title: Serotyping and antimicrobial sensitivity of *Av. Paragallinarum*.

^DCorresponding autor

Postal address: FARVET S.A.C., Carretera Panamericana Sur N° 766 Km 198.5, Chincha ALTA – Ica, Perú. Phone: (511) 3441419; Email: farvet@farvet.com

SUMMARY. *Avibacterium paragallinarum* is the etiology of infectious coryza, an upper respiratory tract disease of chickens. In the current study, a total of 27 isolates from Peru and 3 from Bolivia were serotyped and the antimicrobial sensitivity determined. Serovars A-1, A-2, B-1, C-1, and C-2 were identified among the Peruvian isolates, while serovars A-2, C-1 and C-2 were identified among the Bolivian isolates.

The disk diffusion method was used to examine the sensitivity of isolates to 15 antimicrobial agents. None of the tested isolates showed 100% of sensitivity to any antibiotic. Only 90% of the isolates showed sensitivity to florfenicol. All isolates were resistant to lincomycin and there was a high prevalence of resistance to oxacillin, streptomycin, and enrofloxacin.

Abbreviations: CLSI= Clinical Laboratory Standards Institute; HI = hemagglutination-inhibition; NAD = nicotinamide adenine dinucleotide; PBS = phosphate-buffered saline.

Key words: *Avibacterium paragallinarum*, serotyping, antimicrobial sensitivity, infectious coryza, Bolivia, Peru.

Avibacterium paragallinarum is the causative agent of infectious coryza, an acute respiratory disease of chickens, characterized by nasal discharge, facial swelling and conjunctivitis. Major economic effects are an increased culling rate in meat chickens and a marked reduction in egg production (10-40%) in laying and breeding hens (1).

Two related schemes have been used to serotype *Av. paragallinarum*. The first serotyping scheme was performed by Page (17), who recognized three serovars A, B, and C with the use of a plate agglutination test. The second serotyping scheme (Kume scheme) recognized nine serovars (A-1, A-2, A-3, A-4, B-1, C-1, C-2, C-3, and C-4) based on hemagglutination-inhibition (HI) tests (3). Up to date in the Americas, serovars A-1, B-1 and C-2 have been identified in the United States (11,14); A-1, A-2, B-1, C-1, and C-2 in Mexico (16,22); A-3 in Brazil (14), B-1 in Panama (7) and the serovars A-3, B-1 and C-1 in Ecuador (6). In Peru, Page serovars A, B and C have been identified in isolates of *Av. paragallinarum* (15).

The antimicrobials are the tools of choice for control of infections due to *Av. paragallinarum*. Sulfonamides and different antibiotics are useful as treatment of infectious coryza (1). Although, few studies have evaluated this phenotypic characteristic and an increase in antimicrobial resistance by *Av. paragallinarum* have been reported (9,13). An appropriate selection of antibiotics for the treatment of the disease based on the antimicrobial sensitivity of this bacterium is relevant.

Hence, the aim of the present study was the serotyping of *Av. paragallinarum* field isolates from Peru and Bolivia and their antimicrobial sensitivity.

MATERIALS AND METHODS

Bacteria. A total of 27 field isolates of *Av. paragallinarum* from Peru and 3 isolates from Bolivia, were included in the study (Table 1).

Hemagglutinins. Hemagglutinating antigens were prepared by growing bacteria overnight in brain-heart infusion broth, supplemented with 1% (w/v) sodium chloride, 0.0025% (w/v) reduced nicotinamide adenine dinucleotide (NADH), and 1% (v/v) filter-sterilized, heat-inactivated horse serum. Bacterial cells were collected by centrifugation and washed three times with PBS, pH 7.2, containing 0.01% (w/v) thimerosal, and stored at 4°C until used (21).

PCR. The identity of isolates was confirmed by polymerase chain reaction (PCR) as described (8).

Serotyping. Rabbit antisera, against the nine reference strains were produced as previously reported (3). Glutaraldehyde-fixed chicken erythrocytes were prepared as previously described (22). The hemagglutinins of each isolate were adjusted to four units by HA technique and were assigned to a Kume serovar by performing HI tests with specific and absorbed antisera to all nine recognized serovars. The assignment of each isolate to a serovar was assessed as the highest titer of hemagglutination-inhibition (HI) (22).

Antimicrobial sensitivity test. The sensitivity of the isolates were evaluated by disk diffusion test to 15 antimicrobial drugs (sulfamethoxazole-trimethoprim 23.75–1.25 µg, penicillin 10 µg, doxycycline 30 µg, ampicillin 10 µg, amoxicillin–clavulanic acid 30 µg, colistin 10 µg, streptomycin 300 µg, lincomycin

2 µg, oxacillin 1 µg, tetracycline 30 µg, neomycin 30 µg, enrofloxacin 5 µg, fosfomicin 50 µg, florfenicol 30 µg, gentamicin 10 µg). The technique was used under specifications of the Clinical Laboratory Standards Institute (CLSI) (1), with some modifications (5). Briefly, the inoculums were prepared with a bacterial suspension and growth overnight at 37° C in brain-heart infusion broth, supplemented as mentioned in section hemagglutinins and were adjusted at 0.5 McFarland turbidity standard and spread in TM/SN agar plates and the plates were incubated at 37° C for 24 hours as described (2,9). The reference strains of *Staphylococcus aureus* (ATCC 25923) and *Escherichia coli* (ATCC 25922) were used for quality control. The results were measured with the category of susceptible, intermediate and resistant. The breakpoints were used as recommended by the CLSI (10) and Chukiatsuri *et al.* (9). The zone diameter interpretive is shown in Table 2.

RESULTS

A total of 27 isolates from Peru and 3 isolates from Bolivia were confirmed as *Av. paragallinarum* by PCR. In the serotyping study, serovars A-1 (2 isolates), A-2 (5 isolates), B-1 (13 isolates), C-1 (5 isolates), C-2 (1 isolate) were identified in *Av. paragallinarum* isolates from Peru. One isolate was identified as serovar A-2, one isolate identified as serovar C-1 and one isolate identified as serovar C-2 of *Av. paragallinarum* isolates from Bolivia (Table 1). One isolate showed no hemagglutinating activity and was untypeable.

Regarding the antimicrobial sensitivity, the percentages of sensitivity of isolates included in the study are shown in Table 2. None of the isolates showed 100% of sensitivity. However, 90% of isolates showed sensitivity to florfenicol and more than 70% of the isolates were sensible to amoxicillin–clavulanic acid, ampicillin, colistin, fosfomicin and gentamicin. Only 53% of the isolates were sensible to doxycycline. All isolates were resistant to lincomycin and there was a high prevalence of resistance to oxacillin with only 7% of sensibility. Also there was a high prevalence of resistance to enrofloxacin, neomycin, penicillin, streptomycin, sulfamethoxazole-trimethoprim and tetracycline.

DISCUSSION

All isolates examined were obtained from outbreaks of infectious coryza from Peru and Bolivia and were confirmed by a PCR-specific test. In a previous study, Peruvian isolates obtained during 1998-2008 were serotyped and Page serovars A, B and C were identified (15). In the present study, isolates representing the three Page serovars of *Av. paragallinarum* were confirmed. The Kume serovars A-1, A-2, B-1, C-1, and C-2 were identified in *Av. paragallinarum* isolates from Peru. In the Americas, these Kume serovars have been identified also in Mexico (16). The serovars A-2, C-1, and C-2 in *Av. paragallinarum* isolates from Bolivia were identified. This study is the first report of serotyping of isolates from that country.

Different antibiotics are used as treatment to relieving the course and severity of infectious coryza (1). However, over time in different parts of the world,

a increased resistance to some antibiotics against *Av. paragallinarum* have been reported. Since 1985, Reece and Cole (19) found resistant to sulphonamides, sulphamethoxazole–trimethoprim and streptomycin in isolates from Victoria, Australia. Similarly, Blackall (4), reported resistant to streptomycin in isolates from Australia, Germany, Japan, South Africa, and the United States. In that study, one isolate was resistance to both streptomycin and tetracycline. Blackall *et al.* (5) according to a previously report (5,19,20), found resistance also to streptomycin, but also to tetracycline and neomycin in isolates from Australia. Takagi *et al.* (23) reported isolates from Indonesia resistant to dihydrostreptomycin, kanamycin, spiramycin, erythromycin and low resistant to oxytetracycline and tetracycline. Recently, Poernomo *et al.* (18) found a frequent occurrence of resistance to streptomycin, erythromycin and neomycin in isolates from Indonesia. In a study that included a total of 40 Mexican isolates all were susceptible to ampicillin, erythromycin and penicillin. Five antimicrobial drug resistance patterns were recognized, encountering variation in the resistance to streptomycin, tetracycline and neomycin (12). In Taiwan a high frequency of resistance to streptomycin, erythromycin and sulfamethoxazole–trimethoprim was reported (13). Recently, the evaluation of the phenotypic characteristic of *Av. paragallinarum* were tested in isolates from Thailand which were highly resistance to erythromycin and 100% of isolates resistant to cloxacillin, lincomycin, and neomycin (9).

In present study, a total of 27 isolates from Peru and 3 isolates from Bolivia, obtained during 2010-2013 from typical clinical cases of infectious coryza, were tested. Only one isolate from Peru and one isolate from Bolivia were resistant at

least to three antibiotics, the remaining isolates (92.5%) showed resistant from four to eleven antibiotics. These results exceed the percentage and number of isolates resistant to antibiotics than those reported by Hsu *et al.* (13), suggesting that the Peruvian and Bolivian isolates of *Av. paragallinarum* tested are multidrug resistant.

In the present study, 30% of the isolates proved to be susceptible to trimethoprim-sulfamethoxazole, an antibiotic commonly used for the treatment of infectious coryza in Peru, as similar as reported by Hsu *et al.* (13) in Taiwanese isolates.

The Peruvian and Bolivian isolates showed a high percentage of resistance to antibiotics as lincomycin, oxacillin, sulfamethoxazole-trimethoprim, penicillin and enrofloxacin, also showed a high percentage of resistance to neomycin, streptomycin and tetracycline, the resistance to these last three antibiotics has been reported previously in isolates from Australia, Mexico, Indonesia and Thailand (5,9,12,18). This is the first report that evaluates this phenotypic characteristic in isolates of Peru.

In conclusion, the antimicrobial sensitivity results could help to improve the choice of the most appropriate antibiotic for treatment of infectious coryza outbreaks in Peru and Bolivia.

REFERENCES

1. Blackall, P. J., and E. Soriano-Vargas. Infectious coryza and related bacterial infections. In: Diseases of Poultry, 13th ed. D. E. Swayne, J. R. Glisson, L. R. McDougald, L. K. Nolan, D. L. Suarez, and V. L. Nair, eds. Wiley-Blackwell Publishing, Ames, IA. pp. 859–868. 2013.
2. Blackall, P. J., and G. G. Reid. Further characterization of *Haemophilus paragallinarum* and *Haemophilus avium*. *Vet. Microbiol.* 7:359–367. 1982.
3. Blackall, P. J., L. E. Eaves, and D. G. Rogers. Proposal of a new serovar and altered nomenclature for *Haemophilus paragallinarum* in the Kume hemagglutinin scheme. *J. Clin. Microbiol.* 28:1185–1187. 1990.
4. Blackall, P.J. Antimicrobial drug resistance and the occurrence of plasmids in *Haemophilus paragallinarum*. *Avian Dis.* 32:742–747. 1988.
5. Blackall, P.J., L. E. Eaves, and D. G. Rogers. Biotyping of *Haemophilus paragallinarum* isolates using hemagglutinin serotyping, carbohydrate fermentation patterns, and antimicrobial drug resistance patterns. *Avian Dis.* 33:491–496. 1989.
6. Cabrera, A., V. Morales-Erasto, C. Salgado-Miranda, P. J. Blackall, and E. SorianoVargas. Hemagglutinin serotyping of *Avibacterium paragallinarum* isolates from Ecuador. *Trop. Anim. Health Prod.* 43:549–551. 2010.
7. Calderón, E. N., K. Thomas, V. Morales-Erasto, C. Salgado-Miranda, and E. Soriano-Vargas. Identification of *Avibacterium paragallinarum* serovar B-1 from severe infectious coryza outbreaks in Panama. *Avian Dis.* 54:1095–1097. 2010.

8. Chen, X., J. K. Mifflin, P. Zhang, and P. J. Blackall. Development and application of DNA probes and PCR tests for *Haemophilus paragallinarum*. *Avian Dis.* 40:398–407. 1996.
9. Chukiatsiri, K., J. Sasipreeyajan, P. J. Blackall, S. Yuwatanichsampan, N. Chansiripornchai. Serovar identification, antimicrobial sensitivity, and virulence of *Avibacterium paragallinarum* isolated from chickens in Thailand. *Avian Dis.* 56:359–364. 2012.
10. Clinical and Laboratory Standards Institute [CLSI]. Performance standards for antimicrobial disk and dilution susceptibility tests for bacteria isolated from animals; approved standard, 3rd ed. M31-A3. CLSI, Wayne, PA. 2008.
11. Eaves, L. E., D. G. Rogers, and P. J. Blackall. Comparison of hemagglutinin and agglutinin schemes for the serological classification of *Haemophilus paragallinarum* and proposal of a hemagglutinin new serovar. *J. Clin. Microbiol.* 27:1510–1513. 1989.
12. Fernandez, R. P., G. A. García-Delgado, P. Ochoa, E. V. Soriano. Characterization of *Haemophilus paragallinarum* isolates from Mexico. *Avian Pathol.* 29:473–476. 2000.
13. Hsu, Y. M., H. K. Shieh, W. H. Chen, T. Y. Sun, and J. H. Shiang. Antimicrobial susceptibility, plasmid profiles and haemocin activities of *Avibacterium paragallinarum* strains. *Vet. Microbiol.* 124:209–218. 2007.
14. Kume, K., A. Sawata, T. Nakai, and M. Matsumoto. Serological classification of *Haemophilus paragallinarum* with a hemagglutinin system. *J. Clin. Microbiol.* 17:958–964. 1983.

15. Mendoza-Espinoza A., H. R. Terzolo, R.I. Delgado, A.I. Zavaleta, Y. Koga, and Y. D. Huberman. Serotyping of *Avibacterium paragallinarum* Isolates from Peru. *Avian Dis.* 53:462–465. 2009.
16. Morales-Erasto, V., A. García-Sánchez, C. Salgado-Miranda, M. Talavera-Rojas, F. Robles-González, P. J. Blackall, and E. Soriano-Vargas. ERIC-PCR genotyping of emergent serovar C-1 isolates of *Avibacterium paragallinarum* from Mexico. *Avian Dis.* 55:686–688. 2011.
17. Page, L. A. *Haemophilus* infections in chickens. I. Characteristics of 12 *Haemophilus* isolates recovered from diseased chickens. *Am. J. Vet. Res.* 23:85–95. 1962.
18. Poernomo, S., S. Sutarma, M. Rafiee, and P. J. Blackall. Characterisation of isolates of *Haemophilus paragallinarum* from Indonesia. *Aust. Vet. J.* 78:759–762. 2000.
19. Reece, R.L., Coloe, P.J. The resistance to anti-microbial agents of bacteria isolated from pathological conditions of birds in Victoria, 1978 to 1983. *Aust. Vet. J.* 62:379–381. 1985.
20. Rimler, R.B. Studies of the pathogenic avian haemophili. *Avian Dis.* 23:1006–1018. 1979.
21. Soriano, E. V., M. L. Garduño, G. Téllez, P. F. Rosas, F. Suárez-Güemes, and P. J. Blackall. Cross-protection study of the nine serovars of *Haemophilus paragallinarum* in the Kume haemagglutinin scheme. *Avian Pathol.* 33:506–511. 2004.

22. Soriano, V. E., P. J. Blackall, S. M. Dabo, G. Téllez, G. A. García-Delgado, and R. P. Fernández. Serotyping of *Haemophilus paragallinarum* isolates from Mexico by the Kume hemagglutinin scheme. *Avian Dis.* 45:680–683. 2001.
23. Takagi, M., T. Takahashi, N. Hirayama, Istiananingsi, S. Mariana, K. Zarkasie, Sumadi, M. Ogata, S. Ohta. Survey of infectious coryza of chickens in Indonesia. *J. Vet. Med. Sci.* 53:637–642. 1991.

ACKNOWLEDGEMENTS

We gratefully aknowledgements to Melchorita Montalvan Avalos, FARVET S.A.C., Peru, for their technical assistance

Table 1. Results of hemagglutinin serotyping of 30 isolates of *Avibacterium paragallinarum* from Peru and Bolivia included in the study.

Strain	Month/Year isolation	of Origin	Serovar
Farper-030	Mar/2010	Peru	B-1
Farper-031	Mar/2010	Ica, Peru	B-1
Farper-033	Mar/2010	Lima, Peru	B-1
Farper-049	Sep/2011	Ica, Peru	B-1
Farper-050	Ago/2011	Ucayali, Peru	C-1
Farper-051	Feb/2011	Ica, Peru	C-1
Farper-052	May/2011	Ica, Peru	A-2
Farper-059	Jul/2010	Arequipa, Peru	B-1
Farper-060	Sep/2012	Ica, Peru	A-1
Farper-064	Feb/2011	Ica, Peru	B-1
Farper-065	Jun/2011	Ica, Peru	A-2
Farper-066	May/2011	Ica, Peru	Nontypeable
Farper-086	Oct/2010	Lima, Peru	B-1
Farper-087	Oct/2010	Lima, Peru	C-1
Farper-088	Feb/2011	Lima, Peru	C-1
Farper-089	May/2011	Lima, Peru	C-1
Farper-090	Sep/2012	Arequipa, Peru	A-2
Farper-100	Apr/2013	Lima, Peru	A-1
Farper-103	May/2013	Ucayali, Peru	B-1

Farper-104	May/2013	Lima,Peru	B-1
Farper-105	May/2013	Lima,Peru	B-1
Farper-107	Jun/2013	Ica, Peru	B-1
Farper-110	Feb/2012	Ica. Peru	B-1
Farper-111	Jul/2013	Ucayali, Peru	C-2
Farper-113	Jul/2013	Arequipa, Peru	B-1
Farper-114	Jul/2013	Arequipa, Peru	A-2
Farper-117	Ago/2013	Arequipa, Peru	A-2
Farper-034	Mar/2010	Bolivia	A-2
Farper-047	May/2010	Bolivia	C-2
Farper-048	May/2010	Bolivia	C-1

Table 2. Disk diffusion test of antimicrobials against *Av. paragallinarum* isolates from Peru (n=27) and Bolivia (n=3).

Antibiotic (μg)	Zone diameter (mm)		No. of isolates classified as			
	S	R	Resistant	Intermediate	Sensitive	Sensitive (%)
Amoxicillin / clavulanic acid (20 + 10)	≥ 18	≤ 13	5	2	23	77
Ampicillin (10)	≥ 17	≤ 13	4	4	22	73
Colistin (10)	≥ 11	≤ 8	4	1	25	83
Doxycycline (10)	≥ 19	≤ 14	7	7	16	53
Enrofloxacin (5)	≥ 23	< 16	23	1	6	20
Florfenicol (30)	≥ 19	≤ 14	3	0	27	90
Fosfomicin (50)	≥ 15	≤ 12	8	1	21	70
Gentamicin (10)	≥ 16	< 12	7	0	23	77
Lincomycin (2)	≥ 21	≤ 14	29	1	0	0
Neomycin (30)	≥ 17	≤ 12	10	6	14	47
Oxacillin (1)	≥ 13	≤ 10	27	1	2	7
Penicillin (10)	≥ 22	≤ 11	6	13	11	37
Streptomycin (300)	≥ 16	≤ 11	24	1	5	17
Sulfamethoxazole-trimethoprim (23.75 + 1.25)	≥ 15	≤ 10	20	1	9	30
Tetracycline (30)	≥ 19	≤ 14	13	4	13	43

Artículo B. En preparación para Veterinary Microbiology

Short communication

Antimicrobial sensitivity of *Avibacterium paragallinarum* isolates from the Americas

Grisel Alejandra Luna-Galaz ^a, Vladimir Morales-Erasto ^a, Claudia Giovanna Peñuelas-Rivas ^a, Patrick J. Blackall ^b, Edgardo Soriano-Vargas ^{a*}

^a Centro de Investigación y Estudios Avanzados en Salud Animal, Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia, Universidad Autónoma del Estado de México, Toluca, México.

^b Queensland Alliance for Agriculture and Food Innovation, The University of Queensland, St Lucia 4072, Australia.

* Corresponding author.

Tel.: +52 722 296 5555; fax: +52 722 296 5555. E-mail address:

soriano@uaemex.mx (Edgardo Soriano-Vargas).

Abstract

The antimicrobial sensitivity of eleven reference strains and sixty-six *Avibacterium paragallinarum* isolates from the Americas was investigated. All the eleven reference strains were sensitive to amoxicillin-clavulanic acid, ampicillin, colistin, doxycycline, fosfomicin, gentamicin, kanamycin, neomycin, oxytetracycline, penicillin, and trimethoprim-sulfamethoxazole. All the eleven reference strains were resistant to lincomycin. All isolates (100%) from Mexico, Panama, and Peru were sensitive to amoxicillin-clavulanic acid, ampicillin, doxycycline, and fosfomicin. Particularly, the Ecuadorian isolates showed a lower antimicrobial sensitivity. It is the first time that the sensitivity values for the reference strains are reported and may serve as a guide in the antimicrobial sensitivity testing of *Av. paragallinarum*. Antimicrobial sensitivity differences exist based on the geographical origin of isolates.

Keywords: *Avibacterium paragallinarum*, antimicrobial sensitivity, poultry, Americas.

Introduction

The bacterium *Avibacterium paragallinarum*, a member of the family *Pasteurellaceae*, is the etiologic agent of infectious coryza of chickens. Sneezing, nasal discharge, and infraorbital and wattle swelling characterize the disease. The main economic impact is due to reduction in egg production (10% - 40%) both in laying and breeding hens (Blackall and Soriano-Vargas, 2013).

The treatment of infectious coryza outbreaks has not been widely examined. However, the use of some antibiotics and chemotherapeutics has been reported (Hanley et al., 1968; Sumano and Ocampo, 1987; Lublin et al., 1993). Similarly, the in vitro sensitivity of *Av. paragallinarum* isolates has not been widely examined (Rimler, 1979; Reece and Coloe, 1985; Blackall, 1988; Hsu et al., 2007; Chukiatsiri et al., 2012). Hence, the aim of the current study was to determine the antimicrobial sensitivity of a number of isolates of *Av. paragallinarum* from the Americas.

2. Materials and Methods

2.1. Bacterial strains

Eleven reference strains and a total of 66 isolates of *Av. paragallinarum* were included in the study. The source and origin of isolates are shown in Table 1.

2.2. Media

For propagation and maintenance of bacterial cultures, both brain-heart infusion broth and agar plates, supplemented with 1% sodium chloride, 0.0025%

(w/v) nicotinamide adenine dinucleotide (NADH; Sigma Chemical Co., St. Louis, MO), and 1% (v/v) filter-sterilized, heat-inactivated horse serum, were used. Also, 10% sheep blood agar plates with *Staphylococcus epidermidis* as feeder colony were used (Soriano et al., 2004).

The medium used for *Av. paragallinarum* disk diffusion testing was TM/SN agar supplemented with NADH, thiamine HCL, chicken serum, and O-A complex as elsewhere reported (Chukiatsiri et al., 2012).

2.2. Antimicrobial sensitivity testing

The antimicrobial sensitivity of all references strains and isolates of *Av. paragallinarum* was determined by the disk diffusion method as reported by Chukiatsiri et al. (2012) and using the Clinical Laboratory Standards Institute (CLSI) criteria (CLSI, 2013). The antimicrobials (Oxoid, Hants, UK) included in the study were amoxicillin-clavulanic acid (20 µg-10 µg), ampicillin (10 µg), colistin (10 µg), doxycycline (30 µg), erythromycin (15 µg), fosfomicin (50 µg), gentamicin (10 µg), kanamycin (30 µg), lincomycin (2 µg), neomycin (30 µg), oxytetracycline (30 µg), penicillin (10 µg), streptomycin (10 µg), and trimethoprim-sulfamethoxazole (1.25 µg-23.75 µg). The interpretation criteria used in this study are show in Table 2 and are based, in general on the CLSI criteria (2013). The exceptions are as follows:- Reference strains of *Escherichia coli* (ATCC 25922) and *Staphylococcus aureus* (25923) were included in the study.

3. Results and discussion

3.1. Antimicrobial sensitivity testing

All the eleven reference strains were sensitive to amoxicillin-clavulanic acid, ampicillin, colistin, doxycycline, fosfomicin, gentamicin, kanamycin, neomycin, oxytetracycline, penicillin, and trimethoprim-sulfamethoxazole. All the eleven reference strains were resistant to lincomycin. Reference strains 2403, 2671, and 0083 were resistant to streptomycin, and H-18 to erythromycin (Table 2). Previous studies have included reference strains 0083, 0222, Modesto, 221, 2403, 2671, H-18, and SA-3 (Rimler, 1979; Blackall, 1988). However, it is the first time that individual sensitivity values are reported.

In the present study, a total of 66 isolates of *Av. paragallinarum* from Ecuador, Mexico, Panama, and Peru were included in antimicrobial disk diffusion tests. All isolates (100%) from Mexico, Panama, and Peru were sensitive to amoxicillin-clavulanic acid, ampicillin, doxycycline, and fosfomicin (Table 3). For Ecuadorian isolates, sensitivity values of 88%, 85%, 65%, and 96% for those antimicrobials respectively, were obtained. The five isolates from Panama and Peru were sensitive to colistin, gentamicin, kanamycin, penicillin, streptomycin, and tetracycline. For Ecuadorian isolates, sensitivity values of 65%, 23%, 50%, 42%, 50% and 35% respectively, were obtained. For Mexican isolates, sensitivity values of 83%, 69%, 91%, 94%, 20%, and 77% respectively, were obtained. Sensitivity values of 38%, 14%, 50%, and 67% for erythromycin; 35%, 6%, 0%, and 33% for lincomycin; and 27%, 51%, 100%, and 67% for neomycin were obtained for isolates from Ecuador, Mexico, Panama, and Peru, respectively. Sensitivity values

of 19%, 46%, and 50% for oxytetracycline, and 69%, 89%, and 50% for trimethoprim-sulfamethoxazole were obtained respectively for isolates from Ecuador, Mexico, and Panama. The three isolates from Peru were 100% sensitive to oxytetracycline and trimethoprim-sulfamethoxazole (Table 3). In general, isolates from Ecuador showed a lower sensitivity trend to tested antimicrobials than the isolates of Mexico, Panama, and Peru.

In a previous study that included 40 *Av. paragallinarum* isolates from Mexico, all isolates (100%) were sensitive to ampicillin, erythromycin, and penicillin (Fernández et al., 2000). In the present study, the Mexican isolates showed 100%, 14%, and 94% sensitivity to those antimicrobials. Particularly, a high resistance of isolates to erythromycin is observed. Similarly, In general, when the antimicrobial sensitivity of isolates from Thailand (Chukiatsiri et al., 2012) were compared with our results, based on the similarity of the disk diffusion method used, a lower sensitivity trend is observed (Table 3). However, a high sensitivity to amoxicillin-clavulanic acid is observed in isolates from the Americas and Thailand.

In conclusion, the antimicrobial sensitivity values of the reference strains obtained in our study, may serve as references for the antimicrobial sensitivity testing of isolates of *Av. paragallinarum*. Our results suggest that antimicrobial sensitivity difference exist based on the geographical origin of isolates.

Conflict of interest

The author(s) declare that they have no competing interests.

Acknowledgements

This study was financially supported by UAEM grant 3102/2011, Toluca, Mexico. Grisel Luna-Galaz held a scholarship from CONACYT. We gratefully acknowledge Dr. Arturo Cabrera, LAVETEC CIA LTDA., Ecuador, and Dra. Eliana Icochea, Universidad Nacional Mayor de San Marcos, Peru, for providing isolates of *Av. paragallinarum*.

Reference

Blackall, P. J. 1988. Antimicrobial drug resistance and the occurrence of plasmids in *Haemophilus paragallinarum*. *Avian Dis.* 32, 742-747.

Blackall, P.J., Soriano-Vargas, E. 2013. Infectious coryza and related bacterial infections. In: Swayne, D.E., Glisson, J.R., McDougald, L.R., Nolan, L.K., Suarez, D.L., Nair, V. (Eds.), *Diseases of Poultry*, 13th ed., Wiley-Blackwell, Ames, pp. 859-873.

Chukiatsiri, K., Sasipreeyajan, J., Blackall, P.J., Yuwatanichsampan, S., Chansiripornchai, N. 2012. Serovar identification, antimicrobial sensitivity, and virulence of *Avibacterium paragallinarum* isolated from chickens in Thailand. *Avian Dis.* 56, 359-364.

- Fernández, R. P., García-Delgado, G. A., Ochoa, P., Soriano, V. E. 2000. Characterization of *Haemophilus paragallinarum* isolates from Mexico. Avian Pathol. 29, 473-476.
- Hanley, J. E., Davis, R. B., Sunka, E. M. 1968. An evaluation and comparison of spectinomycin and spectinomycin-erythromycin combinations for infectious coryza. Avian Dis. 12, 1-3.
- Hsu, Y. M., Shieh, H. K., Chen, W.-H., Sun, T.-Y., Shiang, J.-H. 2007. Antimicrobial susceptibility, plasmid profile and haemocin activities of *Avibacterium paragallinarum* strains. Vet. Microbiol. 124, 209-218.
- Lublin, A., Mechani, S., Malkinson, M., Weisman, Y. Efficacy of norfloxacin nicotinate treatment of broiler breeders against *Haemophilus paragallinarum*. Avian Dis. 37, 673-679.
- Reece, R. L., Coloe, P. J. 1985. The resistance to anti-microbial agents of bacteria isolated from pathological conditions of birds in Victoria, 1978 to 1983. Aust. Vet. J. 62, 379-381.
- Rimler, R. B. Studies of the pathogenic avian haemophili. Avian Dis. 24, 1006-1018.

Soriano, E. V., Garduño, M. L., Téllez, G., Rosas, F. P., Suárez-Güemes, F, Blackall, P. J. 2004. Cross-protection study of the nine serovars of *Haemophilus paragallinarum* in the Kume hemagglutinin scheme. *Avian Pathol.* 33, 506-511.

Sumano, L. H., Ocampo, L. C. 1987. Estudio cinético comparativo de tres combinaciones de sulfonamida-trimetoprima en gallinas white leghorn sanas y enfermas de coriza infecciosa (*Haemophilus gallinarum*). *Vet Méx.* 18

Table 1. Identification, origin, and Kume serovar of *Avibacterium paragallinarum* reference strains and isolates included in the study.

Identification (isolate/year of isolation)	Origin	Kume serovar
221	Japan	A-1
2403	Germany	A-2
E-3C	Brazil	A-3
HP14	Australia	A-4
2671	Germany	B-1
H-18	Japan	C-1
Modesto	USA	C-2
SA-3	South Africa	C-3
HP60	Australia	C-4
0083	USA	A-1
0222	USA	B-1
L-53/07, L-54/07, L-29/04, L-11/07, L-45/07, L-42/07, L-45/07, L-16/06, L-20/02, L-22/05, L-24/04, L-02/00, L-10/05, L-04/02	Ecuador	A-3
L-21/04, L-33/01, L-13/04, L-30/04, L-01/01	“	B-1
L-34/01, L-26/02, L-43/07, L-19/02, L-31/04, L-12/07, L-03/00	“	C-1
ESV-29/05, ESV-238/11, ESV-240/11, ESV-244/11, ESV-226/11	Mexico	A-1
ESV-131/08, ESV-184/09	“	B-1
ESV-87/08, ESV-129/08, ESV-130/08, ESV-135/08, ESV-182/09, ESV-218/10, ESV-227/11, ESV-231/11, ESV-241/11, ESV-242/11, ESV-243/11, ESV-245/11, ESV-246/11, ESV-247/11, ESV-249/11, ESV-323/11, ESV-326/12, ESV-328/12, ESV-330/12, ESV-331/12, ESV-333/12, ESV-334/12, ESV-338/12, ESV-343/12, ESV-346/12	“	C-1
ESV-117/08, ESV-142/09, ESV-143/09	“	C-2
Panama 1/07, Panama 2/07	Panama	B-1
Lima 1/12, Arequipa 1/12, Arequipa 2/12	Peru	C-2

Table 2. Disk difusión test of antimicrobials against 11 reference strains of *Avibacterium paragallinarum* included in the study.

Antimicrobial (μg)	Zone		Mean of diameter zone of strain										
	diameter		221	2403	E-3C	HP14	2671	H-18	Modesto	SA-3	HP60	0083	0222
	S	R	(mm)										
Amoxicillin-clavulanic (20-10)	≥ 18	≤ 13	28.0	26.3	35.0	30.7	28.0	32.0	36.0	34.3	26.7	39.0	36.7
Ampicillin (10)	≥ 17	≤ 13	28.0	23.0	33.0	30.7	24.0	32.3	30.0	30.7	28.0	38.7	34.0
Colistin (10)	≥ 11	≤ 10	13.0	11.7	14.7	18.0	10.0	18.0	15.0	17.3	13.0	22.0	19.0
Doxycycline (30)	≥ 19	≤ 14	34.7	29.7	34.3	35.7	31.0	32.7	36.0	36.7	33.7	38.7	30.7
Erythromycin (15)	≥ 23	≤ 13	14.0	18.7	19.7	21.0	17.0	10.0	20.7	19.7	19.0	28.7	25.7
Fosfomicin (50)	≥ 16	≤ 12	62.0	43.7	39.7	50.7	40.0	51.0	54.0	51.0	40.0	53.3	64.7

Gentamicin (10)	≥ 16	≤ 12	20.7	16.7	19.0	21.3	22.0	20.7	22.7	24.7	19.3	26.0	23.3
Kanamycin (30)	≥ 18	≤ 13	19.0	27.0	25.3	24.7	18.0	18.0	27.7	26.3	24.3	24.7	27.0
Lincomycin (2)	≥ 21	≤ 14	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
Neomycin (30)	≥ 17	≤ 12	15.3	19.7	22.3	18.0	17.0	15.0	23.3	26.0	20.0	24.0	20.3
Oxytetracycline (30)	≥ 19	≤ 14	27.7	32.0	34.7	34.0	34.0	34.7	18.7	36.0	36.0	42.7	15.7
Penicillin (10)	≥ 22	≤ 11	30.0	24.7	29.3	33.0	28.0	35.0	34.0	34.7	25.0	42.0	36.0
Streptomycin (10)	≥ 10	≤ 6	14.7	3.3	19.3	19.0	0.0	14.0	20.0	22.0	18.7	0.0	22.0
Tetracycline (30)	≥ 19	≤ 14	30.0	26.7	34.7	34.7	31.0	32.3	47.7	41.3	35.7	42.7	24.7
Trimethoprim- sulfamethoxazole (1.25-23.75)	≥ 16	≤ 10	31.3	31.0	33.3	27.3	27.0	34.7	36.7	35.7	23.0	40.7	30.7

Table 3. Disk difusión test of antimicrobials against *Avibacterium paragallinarum* isolates included in the study.

Antimicrobial (μg)	% sensitive of isolates from				
	Ecuador (n=26)	Mexico (n=35)	Panama (n=2)	Peru (n=3)	Thailand* (n=18)
Amoxicillin – clavulanic acid (20-10)	88	100	100	100	100
Ampicillin (10)	85	100	100	100	61
Colistin (10)	65	83	100	100	NT
Doxycycline (30)	65	100	100	100	39
Erythromycin (15)	38	14	50	67	6
Fosfomicin (50)	96	100	100	100	NT
Gentamicin (10)	23	69	100	100	83
Kanamycin (30)	50	91	100	100	NT
Lincomycin (2)	35	6	0	33	0
Neomycin (30)	27	51	100	67	0
Oxytetracycline (30)	19	46	50	100	39
Penicillin (10)	42	94	100	100	44
Streptomycin (10)	50	20	100	100	NT
Tetracycline (30)	35	77	100	100	NT
Trimethoprim-sulfamethoxazole (1.25-23.75)	69	89	50	100	33

VIII. DISCUSIÓN

Este estudio es el primero en reportar la sensibilidad antimicrobiana de las once cepas de referencia de *Av. paragallinarum*. Estudios previos han incluido algunas cepas de referencia: 0083, 0222, Modesto, 221, 2403 y Spross (Rimler, 1979), 221, 2403, 2671, H-18, Modesto, SA-3, 0083, 0222 (Blackall, 1988) y 221 y Modesto (Takagi *et al.*, 1991). Sin embargo, ninguno de estos trabajos reporta los valores de sensibilidad de las cepas de referencia empleadas. Sólo las cepas de referencia 221 y Modesto han sido reportadas como sensibles a cloranfenicol, mediante la técnica de difusión en agar (Takagi *et al.*, 1991).

Los 66 aislamientos de México, Panamá y Perú, fueron sensibles (100%) a amoxicilina-ácido clavulánico, ampicilina, doxiciclina y fosfomicina. En cuanto a los aislamientos de Ecuador, los valores de sensibilidad para estos mismos antibióticos fueron de 88%, 85%, 65% y 96%, respectivamente. El 100% de sensibilidad a la amoxicilina-ácido clavulánico y penicilina fue reportado por Chukiatsiri *et al.* (2012) y Fernández *et al.* (2000), respectivamente. De forma similar, los 2 aislamientos de Panamá también fueron sensibles a la mayoría de los antibióticos (colistina, gentamicina, kanamicina, penicilina, estreptomina y tetraciclina) y los 3 aislamientos de Perú, además de mostrar ser sensibles los mismos antibióticos, también mostraron el mismo porcentaje de sensibilidad a la oxitetraciclina y sulfametoxazol-trimetoprim.

Los antibióticos eritromicina, neomicina, estreptomina y tetraciclina han sido evaluados en estudios previos desde 1970 al 2000 (Rimler, 1979; Reece y Coloe, 1985; Blackall, 1988; Hsu *et al.*, 2007; Fernández *et al.*, 2000). La eritromicina mostró una tendencia de sensibilidad del 100% hasta el año 2000, no obstante los últimos trabajos han reportado una disminución (22.3%) (Hsu *et al.*, 2007) y recientemente hasta del 6% en aislamientos tailandeses (Chukiatsiri *et al.*, 2012).

En este estudio los porcentajes de sensibilidad fueron de 38%, 14%, 50% y 67% para los aislamientos de Ecuador, México, Panamá y Perú, respectivamente.

En cuanto a la neomicina, se han registrado altos porcentajes de sensibilidad (94-100%) en diversos estudios (Rimler, 1979; Reece y Coloe, 1985; Blackall, 1988). En el presente estudio, los 2 aislamientos Panameños mostraron elevada sensibilidad. Sin embargo, en comparación con estos resultados de sensibilidad de los aislamientos de Ecuador, México y Perú, es bajo (27%, 51% y 67%, respectivamente). Estos resultados coinciden con Hsu *et al.* (2007) y Chukiatisri *et al.* (2012), quienes reportaron porcentajes de resistencia de 83.3% y 100%, respectivamente.

El porcentaje de sensibilidad para la estreptomina presenta variaciones. Reece y Coloe (1985) reportaron el porcentaje más alto (73%) y el porcentaje de sensibilidad más bajo (11.2%) fue reportado por Hsu *et al.*, (2007). En este estudio se registraron porcentajes de sensibilidad bajos para Ecuador y México (50% y 20%, respectivamente). De forma similar, para la tetraciclina se obtuvieron porcentajes de sensibilidad diferentes. Los porcentajes más bajos fueron encontrados para aislamientos de Ecuador (69%) y México (89%). Los porcentajes más altos de sensibilidad para este antibiótico fueron reportados por Rimler (1979) y Blackall (1988) hace más de 35 años. Recientemente, Chukiatsiri *et al.* (2012) reportaron 39% de sensibilidad para la oxitetraciclina, que pertenece al grupo de tetraciclinas.

En lo que respecta al sulfametoxazol-trimetoprima y oxitetraciclina, el porcentaje de sensibilidad más alto para el primero fue obtenido en los aislamientos de México y Perú, similar a lo reportado por Reece y Coloe (1985). Sin embargo, para aislamientos de Ecuador y Panamá los porcentajes de susceptibilidad fueron bajos (69%-50%), respectivamente. Para la oxitetraciclina, con excepción de los aislamientos de Perú, se registró una sensibilidad por debajo del 50%.

En general se observa una alta sensibilidad a la amoxicilina-ácido clavulánico en los aislamientos de América y Tailandia (Chukiatsiri *et al.*, 2012).

IX. CONCLUSIÓN

En conclusión, los valores de la sensibilidad antimicrobiana obtenidos en el presente estudio, pueden ser referencia de las pruebas de sensibilidad antimicrobiana de aislamientos de *Av. paragallinarum*.

Los resultados sugieren que existe una diferencia en la sensibilidad antimicrobiana basada en el origen geográfico de los aislamientos.

Los resultados de sensibilidad antimicrobiana podrían orientar al clínico de campo en la elección del antimicrobiano más adecuado para el tratamiento de los brotes causados por *Av. paragallinarum*.

X. BIBLIOGRAFÍA

- Aly, M., (2000). Characteristic and pathogenicity of *Haemophilus paragallinarum* isolates from upper Egypt. *Assiut Vet. Med. J.* 43:319-338.
- Bauer, A.W., Kirby, W.M.M., Sherris, J.C., Turck, M. (1966). Antibiotic susceptibility testing by standardized single disk method. *Amer. J. Clin. Pathol.* 45:493-496.
- Blackall, P.J, Christensen H., Beckenham T., Blackall L.L, Bisgaard M. (2005). Reclassification of *Pasteurella gallinarum*, [*Haemophilus*] *paragallinarum*, *Pasteurella avium* and *Pasteurella volantium* as *Avibacterium gallinarum* gen. nov., comb. nov., *Avibacterium paragallinarum* comb. nov., *Avibacterium avium* comb. nov. and *Avibacterium volantium* comb. nov. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.*; 55: 353-362.
- Blackall, P.J., Eaves, L.E., Rogers D.G. (1990). Proposal of a new serovar and altered nomenclature for *Haemophilus paragallinarum* in the Kume hemagglutinin scheme. *J. Clin. Microbiol.* 28:1185-1187.
- Blackall, P.J., Morrow, C.J., McInnes, A., Eaves, L.E, Rogers, D.G. (1990). Epidemiologic studies on infectious coryza outbreaks in northern New South Wales, Australia, using serotyping, biotyping, and chromosomal DNA restriction endonuclease analysis. *Avian Dis.* 34:267-276.

- Blackall, P. J., Soriano-Vargas, E. (2013). Infectious coryza and related bacterial infections. In: Diseases of Poultry, 13th ed. D. E. Swayne, J. R. Glisson, L. R. McDougald, L. K. Nolan, D. L. Suarez, and V. L. Nair, eds. Wiley-Blackwell Publishing, Ames, IA. pp. 859–868.
- Blackall P.J. (1988). Antimicrobial drug resistance and the occurrence of plasmids in *Haemophilus paragallinarum*. *Avian Dis.* 32:742-747.
- Blackall, P.J., Eaves, L. E., Rogers, D. G. (1989). Biotyping of *Haemophilus paragallinarum* isolates using hemagglutinin serotyping, carbohydrate fermentation patterns, and antimicrobial drug resistance patterns. *Avian Dis.* 33:491-496.
- Bragg, R.R., Greyling, J.M., Verschoor, J.A. (1997). Isolation and identification of NAD-independent bacteria from chickens with symptoms of infectious coryza. *Avian Pathol.* 26:595-606.
- Byarugaba, D.K., Minga, U.M., Gwakisa, P.S., Katunguka-Rwakishaya, E., Bisgaard, M., Christensen, H., Olsen, J. E. (2011). Demonstration of antibiotic resistance genes *strA*, *blaTEM*, *tetA*, *tetC* and *sul2* in *Avibacterium paragallinarum*. *Afr. J. Microbiol. Res.* 5:3624-3627.
- Calderón, E. N., Thomas, K., Morales-Erasto, V., Salgado-Miranda, C., Soriano-Vargas, E. (2010). Identification of *Avibacterium paragallinarum* serovar B-1 from severe infectious coryza outbreaks in Panama. *Avian Dis.* 54:1095-1097.
- Chukiatsiri, K., Sasipreeyajan, J., Blackall, P.J., Yuwatanichsampan, S., Chansiripornchai, N., (2012). Serovar identification, antimicrobial sensitivity, and virulence of *Avibacterium paragallinarum* isolated from chickens in Thailand. *Avian Dis.* 56:359-364.

- Cully, M. (2014): Public health: The politics of antibiotics. *Nature*, 509: 16-17.
- Eaves, L.E., Rogers D.G., Blackall, P.J. (1989). Comparison of hemagglutinin and agglutinin schemes for the serological classification of *Haemophilus paragallinarum* and proposal of a new hemagglutinin serovar. *J. Clin. Microbiol.* 27:1510-1513.
- García, A.J., Angulo, E., Blackall, P.J, Ortiz, A.M. (2004). The presence of nicotinamide adenine dinucleotide-independent *Haemophilus paragallinarum* in México. *Avian Dis.* 48:425-429.
- Hanley, J.E., Davis, RB., Sunka, E.M. (1968). An evaluation and comparison of spectinomycin and spectinomycin-erythromycin combinations for infectious coryza. *Avian Dis.* 12:1-3.
- Kehrenberg, C., Schulze-Tanzil, G., Martel, J.L., Chaslus-Dancla, E., Schwarz, S. (2001). Antimicrobial resistance in *Pasteurella* and *Mannheimia*: epidemiology and genetic basis. *Vet. Res.* 32:323–331.
- Koneman, W.K., Allen, S.D., Janda, W.M., Schreckenberger, P.C., Winn, WC. (1997). Diagnóstico microbiológico. Texto y Atlas a color. 5 ed. Médica Panamericana, Buenos aires.
- Kume, K., Sawata, A., Nakai, T., Matsumoto, M. (1983). Serological classification of *Haemophilus paragallinarum* with a hemagglutinin system. *J. Clin. Microbiol.* 17:958-964.
- Levy, S.B., Marshall, B. (2004). Antibacterial resistance worldwide: causes, challenges and responses. *Nat. Med.* 10:122-129.

- Lublin, A., Mechani, S., Malkinson, M., Weisma, Y. (1993). Efficacy of norfloxacin nicotinate treatment of broiler breeders against *Haemophilus paragallinarum*. *Avian Dis.* 37:673-679.
- OIE. (2004). List of antimicrobial agents of veterinary importance. Paris, France: World Organization for Animal Health.
- Page, L.A (1962). *Haemophilus* infections in chickens. I. Characteristics of 12 *Haemophilus* isolates recovered from diseased chickens. *Am. J. Vet. Res.* 23:85-95.
- Prabhakar, T. G., Dorairajan, N., Swaminathan, R., Sivakumar, S. (1988). Antibiotic sensitivity pattern of *Haemophilus* species from infectious coryza in Namakal. *Indian J. Anim. Sci.* 68:888-889.
- Reece, R.L., Coloe, P.J. (1985). The resistance to anti-microbial agents of bacteria isolated from pathological conditions of birds in Victoria, 1978 to 1983. *Aust. Vet. J.* 62:379–381.
- Sumano, L.H., Gutiérrez O.L. (2010). Farmacología clínica en aves comerciales. 4 ed. Mc Graw Hill, México.
- Takagi, M., Takahashi, T., Hirayama, N., Istiananingsi, Mariana, S., Zarkasie, K., Sumadi, Ogata, M., Ohta, S. (1991). Survey of infectious coryza of chickens in Indonesia. *J. Vet. Med. Sci.* 53:637-642.

ANEXO 1

Resultados de la prueba de difusión en disco

Cuadro 6. Aislamientos de *Av. paragallinarum* de Ecuador ⁿ⁼²⁶

Antibióticos (µg)	Zona de diámetro (mm)		Número de aislamientos clasificados			% sensibilidad
	S	R	Resistente	Intermedio	Sensible	
Amoxicilina - Acido clavulánico (30)	≥18	≤ 13	1	2	23	88
Ampicilina (10)	≥17	≤ 13	0	4	22	85
Colistina (10)	≥11	≤ 8	9	0	17	65
Doxiciclina (30)	≥19	≤14	5	4	17	65
Eritromicina (15)	≥23	≤ 13	15	0	10	38
Estreptomina (300)	≥22	≤ 11	11	2	13	50
Fosfomicina (50)	≥15	≤ 11	1	0	25	96
Gentamicina (10)	≥15	<12	11	9	6	23
Kanamicina (30)	≥16	≤ 12	10	3	13	50
Lincomicina (2)	≥18	≤ 13	16	1	9	35
Neomicina (30)	≥21	≤ 14	10	9	7	27
Oxitetraciclina (30)	≥17	≤ 12	14	7	5	19
Penicilina (10)	≥19	≤ 14	9	6	11	42
Sulfametoxazol-trimetoprimaa (23,75 / 1,25)	≥16	≤ 10	4	4	18	69
Tetraciclina (30)	≥19	≤ 14	6	11	9	35

Cuadro 7. Aislamientos de *Av. paragallinarum* de México ⁿ⁼³⁵

Antibióticos (µg)	Zona de diámetro (mm)		Número de aislamientos clasificados			% sensibilidad
	S	R	Resistente	Intermedio	Sensible	
Amoxicilina - Acido clavulánico (30)	≥18	≤ 13	0	0	35	100
Ampicilina (10)	≥17	≤ 13	0	0	35	100
Colistina (10)	≥11	≤ 8	5	2	29	83
Doxiciclina (30)	≥19	≤14	0	0	35	100
Eritromicina (15)	≥23	≤ 13	12	18	5	14
Estreptomicina (300)	≥22	≤ 11	29	0	7	20
Fosfomicina (50)	≥15	≤ 11	0	0	35	100
Gentamicina (10)	≥15	<12	2	9	24	69
Kanamicina (30)	≥16	≤ 12	1	2	32	91
Lincomicina (2)	≥18	≤ 13	33	0	2	6
Neomycin (30)	≥21	≤ 14	5	12	18	51
Oxitetraciclina (30)	≥17	≤ 12	17	2	16	46
Penicilina (10)	≥19	≤ 14	2	0	33	94
Sulfametoxazol-trimetoprimaa (23,75 / 1,25)	≥16	≤ 10	2	1	31	89
Tetraciclina (30)	≥19	≤ 14	0	8	27	77

Cuadro 8. Aislamientos de *Av. paragallinarum* de Panamá ⁿ⁼²

Antibióticos (µg)	Zona de diámetro (mm)		Número de aislamientos clasificados			% sensibilidad
	S	R	Resistente	Intermedio	Sensible	
Amoxicilina - Acido clavulánico (30)	≥18	≤ 13	0	0	2	100
Ampicilina (10)	≥17	≤ 13	0	0	2	100
Colistina (10)	≥11	≤ 8	0	0	2	100
Doxiciclina (30)	≥19	≤14	0	0	2	100
Eritromicina (15)	≥23	≤ 13	0	1	1	50
Estreptomicina (300)	≥22	≤ 11	0	0	2	100
Fosfomicina (50)	≥15	≤ 11	0	0	2	100
Gentamicina (10)	≥15	<12	0	0	2	100
Kanamicina (30)	≥16	≤ 12	0	0	2	100
Lincomicina (2)	≥18	≤ 13	2	0	0	0
Neomicina (30)	≥21	≤ 14	0	0	2	100
Oxitetraciclina (30)	≥17	≤ 12	0	1	1	50
Penicilina (10)	≥19	≤ 14	0	0	2	100
Sulfametoxazol-trimetoprima (23.75 / 1.25)	≥16	≤ 10	0	1	1	50
Tetraciclina (30)	≥19	≤ 14	0	0	2	100

Cuadro 9. Aislamientos de *Av. paragallinarum* de Perú ⁿ⁼³

Antibióticos (µg)	Zona de diámetro (mm)		Número de aislamientos clasificados			% sensibilidad
	S	R	Resistente	Intermedio	Sensible	
Amoxicilina - Acido clavulánico (30)	≥18	≤ 13	0	0	3	100
Ampicilina (10)	≥17	≤ 13	0	0	3	100
Colistina (10)	≥11	≤ 8	0	0	3	100
Doxiciclina (30)	≥19	≤14	0	0	3	100
Eritromicina (15)	≥23	≤ 13	0	1	2	67
Estreptomicina (300)	≥22	≤ 11	0	0	3	100
Fosfomicina (50)	≥15	≤ 11	0	0	3	100
Gentamicina (10)	≥15	<12	0	0	3	100
Kanamicina (30)	≥16	≤ 12	0	0	3	100
Lincomicina (2)	≥18	≤ 13	2	0	1	33
Neomicina (30)	≥21	≤ 14	0	1	2	67
Oxitetraciclina (30)	≥17	≤ 12	0	0	3	100
Penicilina (10)	≥19	≤ 14	0	0	3	100
Sulfametoxazol-trimetoprima (23.75 / 1.25)	≥16	≤ 10	0	0	3	100
Tetraciclina (30)	≥19	≤ 14	0	0	3	100

ANEXO 2

Cuadro 10. Aislamientos serovariedad A-3 Ecuador¹

Antibiotico / Aislamiento	A-3 Ecuador													
	ESV-38		ESV-40		ESV-148		ESV-138		ESV-141		ESV-151		ESV-153	
	P	S/I/R	P	S/I/R	P	S/I/R	P	S/I/R	P	S/I/R	P	S/I/R	P	S/I/R
Amoxicilina-Ácido Clavulanico (30)	28	S	34	S	21	S	22	S	28	S	30	S	29	S
Ampicilina (10)	22	S	29	S	29	S	22	S	24	S	37	S	23	S
Colistina (10)	20	S	22	S	19	S	16	S	10	R	12	R	23	S
Doxiciclina (30)		R	14	R	16	I	12	R	30	S	34	S	24	S
Eritromicina (15)	0	R	12	R	12	R	10	R	30	S	36	S	29	S
Estreptomina (300)	0	R	0	R	0	R	0	R	38	S	48	S	45	S
Fosfomicina (50)	34	S	46	S	45	S	9	R	17	S	21	S	14	S
Gentamicina (10)	13	R	16	S	13	I	13	I	0	R	0	R	0	R
Kanamicina (30)	19	S	22	S	19	S	18	S	0	R	0	R	0	R
Lincomicina (2)	0	R	0	R	0	R	0	R	19	S	28	S	22	S
Neomicina (30)	12	R	16	I	11	R	12	R	14	R	23	S	38	S
Oxitetraciclina (30)	0	R	6	R	3	R	0	R	13	I	21	S	17	S
Penicilina (10)	20	I	23	S	19	I	18	I	11	R	19	I	12	R
Sulfametoxazole-trimetoprima (23.75 / 1.25)	0	R	20	S	17	S	26	S	29	S	24	S	24	S
Tetraciclina (30)	10	R	11	R	15	I	14	R	15	I	24	S	24	S
Total de resistentes		9		6		5		7		5		3		3
Total intermedios		1		1		4		2		2		1		0
total de sensibles		5		8		6		5		8		11		12
TOTAL		15		15		15		15		15		15		15

Cuadro 11. Aislamientos serovariedad A-3 Ecuador²

Antibiótico / Aislamiento	A-3 Ecuador													
	ESV-162		ESV-164		ESV-165		ESV-167		ESV-175		ESV-178		ESV-186	
	P	S/I/R	P	S/I/R	P	S/I/R	P	S/I/R	P	S/R	P	S/I/R	P	S/I/R
Amoxicilina-Ácido Clavulánico (30)	12	I	14	I	27	S	24	S	19	S	4	R	30	S
Ampicilina (10)	19	I	16	I	26	S	27	S	25	S	21	I	28	S
Colistina (10)	20	S	11	R	10	R	9	R	21	S	11	R	20	S
Doxiciclina (30)	23	S	20	S	29	S	31	S	29	S	26	S	26	S
Eritromicina (15)	30	S	16	I	31	S	32	S	33	S	26	S	12	R
Estreptomina (300)	40	S	33	S	39	S	54	S	48	S	41	S	0	R
Fosfomicina (50)	16	S	16	S	21	S	13	S	17	S	19	S	42	S
Gentamicina (10)	0	R	14	I	0	R	0	R	0	R	11	R	14	I
Kanamicina (30)	0	R	0	R	0	R	0	R	0	R	0	R	21	S
Lincomicina (2)	22	S	18	S	18	S	20	S	19	S	16	I	0	R
Neomicina (30)	29	S	15	I	12	R	13	R	21	S	10	R	14	I
Oxitetraciclina (30)	15	I	15	I	13	I	17	S	14	I	15	I	19	R
Penicilina (10)	12	R	12	R	11	R	5	R	4	R	12	R	25	S
Sulfametoxazole-trimetoprima (23.75 / 1.25)	25	S	16	I	14	R	13	I	26	S	12	R	22	S
Tetraciclina (30)	15	I	15	I	14	I	16	S	15	I	14	I	24	S
Total de resistentes	3		3		6		5		3		7		4	
Total intermedios	4		8		2		1		2		4		2	
total de sensibles	8		4		7		9		10		4		9	
TOTAL	15		15		15		15		15		15		15	

Cuadro 12. Aislamientos serovariedad B-1 Ecuador

Antibiótico / Aislamiento	B-1 Ecuador									
	ESV-54		ESV-173		ESV-144		ESV-185		ESV-170	
	P	S/I/R	P	S/I/R	P	S/R	P	S/I/R	P	S/R
Amoxicilina-Ácido Clavulánico (30)	26	S	29	S	22	S	32	S	29	S
Ampicilina (10)	25	S	28	S	31	S	29	S	27	S
Colistina (10)	19	S	19	S	17	S	21	S	21	S
Doxiciclina (30)	21	S	21	S	21	S	25	S	27	S
Eritromicina (15)	11	R	13	R	12	R	11	R	11	R
Estreptomina (300)	0	R	14	I	15	S	0	R	0	R
Fosfomicina (50)	36	S	45	S	33	S	44	S	47	S
Gentamicina (10)	14	I	17	S	16	S	15	I	16	S
Kanamicina (30)	21	S	19	S	20	S	19	S	20	S
Lincomicina (2)	0	R	0	R	0	R	0	R	0	R
Neomicina (30)	17	S	13	I	14	I	12	R	14	I
Oxitetraciclina (30)	14	R	12	R	6	R	20	S	21	R
Penicilina (10)	22	S	24	S	22	S	23	S	25	S
Sulfametoxazole-trimetoprima (23.75 / 1.25)	31	S	13	I	16	S	24	S	21	S
Tetraciclina (30)	20	S	18	I	16	I	23	S	24	S
Total de resistententes		4		3		3		4		4
Total intermedios		1		4		2		1		1
total de sensibles		10		8		10		10		10
TOTAL		15		15		15		15		15

Cuadro 13. Aislamientos serovariedad C-1 provenientes de Ecuador

Antibiótico/ Aislamiento	C-1 Ecuador													
	ESV- 139		ESV- 146		ESV- 152		ESV- 163		ESV- 171		ESV- 179		ESV- 176	
	P	S/I/R	P	S/I/R	P	S/I/R	P	S/I/R	P	S/I/R	P	S/I/R	P	S/I/R
Amoxicilina-Ácido Clavulánico (30)	27	S	37	S	24	S	29	S	29	S	21	S	25	S
Ampicilina (10)	28	S	37	S	23	S	26	S	26	S	21	S	20	I
Colistina (10)	20	S	15	S	16	S	8	R	6	R	11	S	3	R
Doxiciclina (30)	14	R	43	S	17	I	15	I	16	I	13	R	27	S
Eritromicina (15)	8	R	24	S	9	R	8	R	11	R	7	R	28	S
Estreptomina (300)	0	R	22	S	12	R	15	S	13	I	0	R	45	S
Fosfomicina (50)	37	S	58	S	44	S	48	S	46	S	36	S	11	S
Gentamicina (10)	13	I	24	S	12	R	14	I	13	I	12	R	17	S
Kanamicina (30)	16	I	28	S	16	I	19	S	16	I	18	S	0	R
Lincomicina (2)	0	R	0	R	0	R	0	R	0	R	0	R	20	S
Neomicina (30)	19	S	23	S	3	I	13	R	14	I	12	R	16	I
Oxitetraciclina (30)	0	R	41	S	3	R	9	R	11	R	0	R	14	I
Penicilina (10)	25	S	39	S	20	I	21	I	22	S	22	S	14	R
Sulfametoxazole-trimetoprima (23.75 / 1.25)	20	S	35	S	0	R	21	S	23	S	26	S	18	I
Tetraciclina (30)	13	R	41	S	14	I	14	R	16	I	11	R	18	S
Total de resistententes		6		1	T	6		6		4		8		3
Total intermedios		2		0		5		3		6		0		4
total de sensibles		7		14		4		6		5		7		8
TOTAL		15		15		15		15		15		15		15

Cuadro 14. Aislamientos serovariedad A- 1 provenientes de México.

Antibiótico/ Aislamiento	A-1 México									
	ESV-29		ESV- 238		ESV- 240		ESV-244		ESV-226	
	P	S/I/R	P	S/I/R	P	S/R	P	S/R	P	S/I/R
Amoxicilina-Ácido Clavulanico (30)	22	S	25	S	31	S	28	S	32	S
Ampicilina (10)	22	S	25	S	28	S	28	S	30	S
Colistina (10)	16	S	14	S	20	S	12	S	21	S
Doxiciclina (30)	20	S	19	S	21	S	28	S	24	S
Eritromicina (15)	0	R	11	R	12	S	21	I	11	R
Estreptomicina (300)	0	R	0	R	0	R	0	R	0	R
Fosfomicina (50)	46	S	15	S	36	S	34	S	42	S
Gentamicina (10)	14	I	19	S	18	S	23	S	17	S
Kanamicina (30)	15	I	23	S	21	S	21	S	22	S
Lincomicina (2)	0	R	0	R	0	R	0	R	0	R
Neomicina (30)	13	I	16	I	20	S	19	S	16	I
Oxitetraciclina (30)	10	R	9	R	9	R	0	R	9	R
Penicilina (10)	11	R	24	S	26	S	25	S	28	S
Sulfametoxazole-trimetoprima (23.75 / 1.25)	0	R	25	S	28	S	26	S	22	S
Tetraciclina (30)	17	I	16	I	17	S	27	S	20	S
Total de resistententes		6		4		3		3		4
Total intermedios		4		2		0		1		1
total de sensibles		5		9		12		11		10
TOTAL		15		15		15		15		15

Cuadro 15. Aislamientos serovariedad B-1 provenientes de México.

Antibiótico/ Aislamiento	B-1 México			
	ESV-131		ESV-184	
	Promedio	S/I/R	Promedio	S/R
Amoxicilina-Ácido Clavulanico (30)	28	S	35	S
Ampicilina (10)	29	S	38	S
Colistina (10)	9	I	15	S
Doxiciclina (30)	36	S	42	S
Eritromicina (15)	18	S	18	S
Estreptomicina (300)	19	S	0	R
Fosfomicina (50)	56	S	48	S
Gentamicina (10)	23	S	24	S
Kanamicina (30)	22	S	24	S
Lincomicina (2)	10	R	0	R
Neomicina (30)	11	R	20	S
Oxitetraciclina (30)	33	S	46	S
Penicilina (10)	29	S	34	S
Sulfametoxazole-trimetoprima (23.75 / 1.25)	33	S	38	S
Tetraciclina (30)	37	S	43	S
Total de resistententes		2		2
Total intermedios		1		0
total de sensibles		12		13
TOTAL		15		15

Cuadro 16. Aislamientos serovariedad C-1 provnientes de México¹

Antimicrobiano / Aislamiento	C-1 México																											
	ESV-87		ESV-129		ESV-130		ESV-135		ESV-218		ESV-227		ESV-231		ESV-241		ESV-242		ESV-243		ESV-245		ESV-246					
	P	S/I/R	P	S/I/R	P	S/I/R	P	S/I/R	P	S/I/R	P	S/I/R	P	S/I/R	P	S/I/R	P	S/I/R	P	S/I/R	P	S/I/R	P	S/I/R	P	S/I/R		
Amoxicilina-Ácido Clavulanico (30)	38	S	30	S	32	S	31	S	30	S	32	S	32	S	18	S	32	S	31	S	33	S	34	S	34	S		
Ampicilina (10)	38	S	34	S	37	S	30	S	31	S	32	S	32	S	30	S	29	S	26	S	30	S	28	S	28	S	28	S
Colistina (10)	17	S	22	S	22	S	25	S	20	S	19	S	20	S	0	R	36	S	34	S	16	S	16	S	16	S	16	S
Doxiciclina (30)	30	S	23	S	26	S	21	S	24	S	29	S	22	S	25	S	32	S	31	S	28	S	29	S	29	S	29	S
Eritromicina (15)	24	S	16	I	21	I	15	I	15	I	12	R	14	I	21	I	36	S	36	S	13	R	12	R	12	R	12	R
Estreptomcina (300)	21	S	0	R	0	R	0	R	0	R	0	R	0	R	0	R	0	R	52	S	45	S	0	R	0	R	0	R
Fosfomicina (50)	71	S	37	S	41	S	39	S	48	S	34	S	43	S	21	S	17	S	19	S	22	S	38	S	38	S	38	S
Gentamicina (10)	46	S	19	S	20	S	20	S	18	S	22	S	18	S	16	S	0	R	0	R	15	I	19	S	19	S	19	S
Kanamicina (30)	28	S	22	S	27	S	25	S	22	S	25	S	21	S	34	S	0	R	0	R	20	S	22	S	22	S	22	S
Lincomicina (2)	4	R	0	R	0	R	0	R	0	R	0	R	0	R	20	S	21	S	21	S	0	R	0	R	0	R	0	R
Neomicina (30)	26	S	17	S	21	S	18	S	16	I	19	S	17	S	13	R	35	S	32	S	13	I	15	I	15	I	15	I
Oxitetraciclina (30)	38	S	12	R	13	R	10	R	8	R	6	R	9	R	33	S	15	I	14	R	35	S	30	S	30	S	30	S
Penicilina (10)	38	S	30	S	31	S	31	S	30	S	29	S	30	S	25	S	14	I	9	R	28	S	28	S	28	S	28	S
Sulfametoxazole-trimetoprima (23.75 / 1.25)	36	S	16	S	37	S	19	S	15	I	32	S	7	R	33	S	28	S	27	S	31	S	27	S	27	S	27	S
Tetraciclina (30)	46	S	19	S	22	S	20	S	19	S	20	S	19	S	15	I	16	S	15	I	34	S	35	S	35	S	35	S
Total de resistententes	1		3		3		3		3		4		4		3		2		4		3		3					
Total intermedios	0		1		1		1		3		0		1		2		2		1		2		1					
total de sensibles	14		11		11		11		9		11		10		10		11		10		10		11					
TOTAL	15		15		15		15		15		15		15		15		15		15		15		15					

P= Promedio

S/I/R= Sensible/ Intermedio /Resistente

Cuadro 17. Aislamientos serovariedad C-1 provenientes de México²

Antimicrobiano / Aislamiento	C-1 México																					
	ESV-247		ESV-182		ESV-249		ESV-323		ESV-326		ESV-328		ESV-330		ESV-331		ESV-333		ESV-334		ESV-338	
	P	S/I/R	P	S/I/R	P	S/I/R	P	S/I/R	P	S/I/R	P	S/I/R	P	S/I/R	P	S/I/R	P	S/I/R	P	S/I/R	P	S/I/R
Amoxicilina-Ácido Clavulanico (30)	31	S	17	I	38	S	29	S	27	S	26	S	26	S	26	S	27	S	36	S	45	S
Ampicilina (10)	30	S	23	S	36	S	28	S	28	S	27	S	24	S	27	S	27	S	30	S	47	S
Colistina (10)	12	S	21	S	21	S	18	S	20	S	17	S	17	S	18	S	19	S	27	S	23	S
Doxiciclina (30)	26	S	34	S	31	S	26	S	21	S	20	S	20	S	21	S	19	S	24	S	30	S
Eritromicina (15)	13	R	28	S	15	I	12	R	13	I	15	I	12	R	13	R	14	I	12	R	22	I
Estreptomicina (300)	0	R	16	S	0	R	0	R	0	R	0	R	0	R	0	R	0	R	0	R	0	R
Fosfomicina (50)	22	S	0	R	52	S	18	S	38	S	23	S	38	S	41	S	38	S	19	S	29	S
Gentamicina (10)	15	I	19	S	17	S	15	I	16	S	14	I	15	I	15	I	14	R	19	S	30	S
Kanamicina (30)	19	S	0	R	25	S	18	S	21	S	18	S	15	I	18	S	18	S	23	S	31	S
Lincomicina (2)	0	R	22	S	0	R	0	R	0	R	0	R	0	R	0	R	0	R	0	R	0	R
Neomicina (30)	11	R	13	R	17	S	14	I	16	I	12	R	14	I	15	I	16	I	20	S	27	S
Oxitetraciclina (30)	31	S	19	S	35	S	31	S	9	R	8	R	10	R	10	R	10	R	10	R	18	I
Penicilina (10)	25	S	32	S	29	S	23	S	26	S	25	S	24	S	25	S	26	S	29	S	44	S
Sulfametoxazole-trimetoprima (23.75 / 1.25)	27	S	34	S	29	S	19	S	29	S	23	S	21	S	25	S	22	S	34	S	49	S
Tetraciclina (30)	31	S	18	S	37	S	32	S	18	I	15	I	16	I	17	I	17	I	19	S	29	S
Total de resistententes	4		3		2		3		3		4		4		4		4		4		2	
Total intermedios	1		1		1		2		3		3		4		3		3		0		2	
total de sensibles	10		11		12		10		9		8		7		8		8		11		11	
TOTAL	15		15		15		15		15		15		15		15		15		15		15	

Cuadro 18. Aislamientos serovariedad C-2 provenientes de México.

Antimicrobial / Aislamiento	C-2 México					
	ESV- 117		ESV- 142		ESV- 143	
	P	S/I/R	P	S/I/R	P	S/R
Amoxicilina-Ácido Clavulanico (30)	33	S	28	S	35	S
Ampicilina (10)	26	S	25	S	32	S
Colistina (10)	10	I	0	R	3	R
Doxiciclina (30)	28	S	25	S	37	S
Eritromicina (15)	16	I	17	I	20	I
Fosfomicina (50)	48	S	42	S	57	S
Gentamicina (10)	22	S	16	S	19	S
Kanamicina (30)	26	S	19	S	26	S
Lincomicina (2)	0	R	0	R	0	R
Neomicina (30)	22	S	19	S	23	S
Oxitetraciclina (30)	34	S	28	S	37	S
Penicilina (10)	26	S	24	S	30	S
Estreptomicina (300)	20	S	17	S	21	S
Sulfametoxazole-trimetoprima (23.75 / 1.25)	35	S	28	S	28	S
Tetraciclina (30)	31	S	27	S	39	S
Total de resistententes		1		2		2
Total intermedios		2		1		1
total de sensibles		12		12		12
TOTAL		15		15		15

P= Promedio

S/I/R= Sensible/ Intermedio /Resistente

Cuadro 19. Aislamientos serovariedad B-1 provnientes de Panamá

Antimicrobial / Aislamientos	B-1 Panamá			
	ESV-75		ESV-76	
	P	S/I/R	P	S/I/R
Amoxicilina-Ácido Clavulánico (30)	34	S	28	S
Ampicilina (10)	39	S	30	S
Colistina (10)	17	S	19	S
Doxiciclina (30)	42	S	27	S
Eritromicina (15)	31	S	22	I
Estreptomicina (300)	26	S	22	S
Fosfomicina (50)	49	S	51	S
Gentamicina (10)	25	S	23	S
Kanamicina (30)	27	S	25	S
Lincomicina (2)	12	R	0	R
Neomicina (30)	27	S	25	S
Oxitetraciclina (30)	19	S	17	I
Penicilina (10)	41	S	25	S
Sulfametoxazole-trimetoprima (23.75 / 1.25)	35	S	11	I
Tetraciclina (30)	35	S	23	S
TOTAL		15		15
Total de resistententes		1		1
total de sensibles		14		11
Total intermedios		0		3

P= Promedio

S/I/R= Sensible/ Intermedio /Resistente

Cuadro 20. Aislamientos serovariedad C-2 provenientes de Perú.

Antibiotico/ Aislamiento	C-2 Perú					
	ESV-347		ESV- 348		ESV-350	
	P	S/I/R	P	S/I/R	P	S/R
Amoxicilina-Ácido Clavulanico (30)	54	S	33	S	37	S
Ampicilina (10)	52	S	44	S	33	S
Colistina (10)	20	S	14	S	15	S
Doxiciclina (30)	42	S	34	S	42	S
Eritromicina (15)	29	S	17	I	22	S
Estreptomicina (300)	28	S	15	S	20	S
Fosfomicina (50)	59	S	50	S	55	S
Gentamicina (10)	27	S	17	S	23	S
Kanamicina (30)	31	S	24	S	24	S
Lincomicina (2)	0	R	0	R	0	R
Neomicina (30)	27	S	16	I	20	S
Oxitetraciclina (30)	48	S	41	S	32	S
Penicilina (10)	47	S	40	S	34	S
Sulfametoxazole-trimetoprima (23.75 / 1.25)	36	S	24	S	39	S
Tetraciclina (30)	50	S	40	S	42	S
Total de resistententes		1		1		1
Total intermedios		0		2		0
total de sensibles		14		12		14
TOTAL		15		15		15

P= Promedio

S/I/R= Sensible/ Intermedio /Resistente