

CONCENTRACIÓN INHIBITORIA MÍNIMA DE TILMICOSINA Y ERITROMICINA FRENTE A CEPAS DE *Actinobacillus pleuropneumoniae* AISLADAS EN LA REPÚBLICA ARGENTINA

F. A. Moredo¹, M. F. Landoni², C. J. Perfumo³

¹Cátedra de Microbiología. ²Cátedra de Farmacología. ³Instituto de Patología "Dr. B. Epstein".
Facultad de Ciencias Veterinarias. Universidad Nacional de La Plata.

RESUMEN: El objetivo del presente trabajo fue determinar la concentración inhibitoria mínima de tilmicosina y eritromicina frente a 27 cepas de campo de *Actinobacillus pleuropneumoniae* aisladas en la República Argentina. Para la realización de este estudio se utilizó la técnica de microdilución siguiendo el protocolo publicado por el National Committee for Clinical Laboratory Standards (NCCLS), Subcommittee on Veterinary Antimicrobial Susceptibility Testing, 1994 (M31-P). La CIM_{50} de tilmicosina fue de 2 $\mu\text{g/ml}$ y la CIM_{90} de 4 $\mu\text{g/ml}$. El rango fue 0,25 - 4 $\mu\text{g/ml}$. La CIM_{50} y la CIM_{90} de eritromicina fue de 4 $\mu\text{g/ml}$. El rango de 4 - 1 $\mu\text{g/ml}$. La concentración bactericida mínima de tilmicosina no fue uniforme, para 15 cepas fue de 4 $\mu\text{g/ml}$, para 10 cepas de 8 $\mu\text{g/ml}$ y para 2 cepas de 16 $\mu\text{g/ml}$. Las 27 cepas de *A. pleuropneumoniae* aisladas en la República Argentina son sensibles a tilmicosina pudiendo utilizarse como droga de elección para el tratamiento de la pleuroneumonía porcina, no ocurriendo lo mismo con eritromicina ya que la sensibilidad observada fue intermedia.

PALABRAS CLAVE: tilmicosina, eritromicina, *A. pleuropneumoniae*, CIM

MINIMUM INHIBITORY CONCENTRATION OF TILMICOSIN AND ERYTHROMYCIN AGAINST *Actinobacillus pleuropneumoniae* FIELD STRAINS ISOLATED IN ARGENTINA

ABSTRACT: The objective of the present study was the determination of tilmicosin and erythromycin's minimum inhibitory concentrations on 27 *Actinobacillus pleuropneumoniae* field strains isolated in Argentina. Microdilution technique, according to guidelines of the National Committee for Clinical Laboratory Standards (NCCLS), Subcommittee on Veterinary Antimicrobial Susceptibility Testing, 1994 (M31-P), was applied. MIC_{50} for tilmicosin was 2 $\mu\text{g/ml}$, while CIM_{90} was 4 $\mu\text{g/ml}$, being the range 0,25 to 4 $\mu\text{g/ml}$. For erythromycin, MIC_{50} and CIM_{90} were 4 $\mu\text{g/ml}$, being the range 4 to 1 $\mu\text{g/ml}$. Minimum bactericidal concentration for tilmicosin was not uniform, being 4 $\mu\text{g/ml}$ for 15 of the tested strains, 8 $\mu\text{g/ml}$ for 10 strains and 16 $\mu\text{g/ml}$ for the remaining two. All *A. pleuropneumoniae* strains tested in the present study were sensitive to tilmicosin, therefore its use on the treatment of pleuropneumonia can be advised. This is not true for erythromycin since bacterial susceptibility was low.

KEY WORDS: tilmicosin, erythromycin, *A. pleuropneumoniae*, MIC

Fecha de recepción: 16/02/01

Fecha de aprobación: 22/11/01

Dirección para correspondencia: Fabiana Moredo CC 296 (B1900AVW) La Plata, ARGENTINA.

Tel/Fax: 0221-4257980.

E-mail: fmoredofcv.unlp.edu.ar

INTRODUCCIÓN

El término macrólido define a varios antibióticos de estructura química caracterizada por la presencia de un anillo lactónico grande (macrocíclico) unido a dos azúcares; siendo la eritromicina el antibiótico prototipo de esta clase (12). Los macrólidos se diferencian entre sí por su tamaño, poseen entre 14 - 16 átomos de carbono y el patrón de sustitución del anillo lactónico. La eritromicina es un integrante natural del grupo 14, conjuntamente con oleandomicina y espiramicina. Tilosina y tilmicosina son macrólidos del grupo 16, de origen natural y semisintético, respectivamente. Estos últimos ofrecen ventajas importantes sobre la eritromicina ya que poseen un espectro bacteriano más amplio, mejores características farmacocinéticas y menores efectos colaterales (13).

Tilmicosina (20-deoxo-20-(3,5-dimethylpiperidin-1-y 1) desmycosin), es un macrólido semisintético desarrollado exclusivamente para uso veterinario. Su actividad principalmente es contra bacterias Gram positivas y para Gram negativas se limita a los miembros del grupo HAP (*Haemophilus*, *Actinobacillus* y *Pasteurella*) y *Mycoplasma* spp (11).

Tilmicosina ha sido desarrollado para el tratamiento de enfermedades respiratorias bovinas debido a su actividad contra *Pasteurella haemolytica* así como también *Actinomyces pyogenes* (15, 16, 17). Una simple dosis subcutánea de 10 mg/kg es suficiente para exceder la mínima concentración inhibitoria (CIM) para *P. haemolytica* durante 72 horas en pulmón. Pulmotil® (fosfato de tilmicosina, Elanco) es el nombre comercial de una formulación para adicionar al alimento, que fue recientemente desarrollado para la prevención de neumonía bacteriana en cerdos (11, 18, 19, 20, 21, 22, 23).

Tilmicosina posee una muy buena absorción oral así como también una distribución tisular muy amplia, alcanzando en pulmones normales y neumónicos niveles 10 veces superiores a los niveles plasmáticos. Los macrófagos alveolares acumulan niveles extraordinarios de tilmicosina, pudiendo aumentar la habilidad del fagocito para destruir la bacteria ingerida dentro del fagolisosoma (24). Este antibiótico posee muy baja unión a proteínas plasmáticas lo que se refleja en un alto volumen de distribución. Tilmicosina, al igual que el resto de los macrólidos, sufre metabolización hepática siendo ésta la vía más importante de eliminación. Sólo un 20 % se elimina por orina en forma activa. En cuanto a su toxicidad, es un ino-

trópico negativo, siendo especialmente sensibles los cerdos y los equinos.

Actinobacillus pleuropneumoniae es agente etiológico de la pleuroneumonía porcina, enfermedad respiratoria grave y con frecuencia mortal, si no se tratan los animales afectados (1, 2). Su significación epidemiológica está asociada con la intensificación de la producción porcina. La enfermedad fue descrita por primera vez en la Argentina en 1964 (3) y es una de las entidades respiratorias de etiología bacteriana que mayores pérdidas produce en las explotaciones porcinas, particularmente en la etapa de engorde (4). La importancia económica de la enfermedad se debe principalmente a las pérdidas debido a la alta mortalidad, así como al aumento de los costos de producción en razón de la utilización de antibióticos para su control. En piaras crónicamente infectadas la relación de ganancia de peso diario no se ve afectada (5). La vía más importante de diseminación es aerógena y la enfermedad se transmite, principalmente, por contacto directo de cerdo a cerdo. El período de incubación es variable. Si bien todas las categorías (edad/etapas) son susceptibles, en condiciones de campo lo es a partir de los 90 - 100 días hasta la faena. En la fase aguda de la enfermedad la mortalidad es, generalmente, alta aunque puede variar en función de los serotipos presentes y las condiciones ambientales y de manejo, así como la interacción con otros agentes.

La terapia antibiótica es eficiente sólo si se administra en la fase inicial de la enfermedad y por vía parenteral en dosis altas y repetidas. La medicación en la comida y la bebida puede ser utilizada exitosamente; aunque debería ser reservada para tratamientos profilácticos de animales de riesgo en la fase aguda de los brotes. En brotes tempranos, los mejores resultados se obtienen con la combinación de tratamientos parenteral y peroral. No obstante, a pesar del aparente éxito clínico se debe recordar que la terapia antibiótica no elimina la infección de la piara. Lesiones crónicas como abscesos pulmonares o en tonsilas de cerdos portadores constituyen una importante fuente de infección para otros animales (2). Diversos agentes antimicrobianos han sido utilizados para la prevención y tratamiento de las neumonías bacterianas: amoxicilina, ampicilina, ceftiofur, danofloxacina, enrofloxacina, eritromicina, lincomicina, lincomicina-espectinomina, tiamulina, oxitetraciclina, tilosina, obteniéndose diferentes resultados (6, 7, 8, 9, 10). Sin embargo, ninguno de ellos tiene acción específica contra *A. pleuropneumoniae*.

El objetivo de este trabajo fue determinar la concentración inhibitoria mínima de tilmicosina y eritromicina, frente a cepas de campo de *Actinobacillus pleuropneumoniae* aisladas en la República Argentina.

MATERIALES Y MÉTODOS

La realización de las técnicas aquí descritas se llevaron a cabo siguiendo el manual de protocolos «*Performance Standards for Antimicrobial Disk and Dilution Susceptibility Test for Bacteria Isolated from Animals; Proposed Standards*». Publicado por el «*National Committee for Clinical Laboratory Standards (NCCLS), Subcommittee on Veterinary Antimicrobial Susceptibility Testing*, 1994 (M31-P)»(25). El método de elección para determinar la Concentración Inhibitoria Mínima (CIM) fue el de microdilución.

Preparación de los antimicrobianos

Se evaluaron dos macrólidos, tilmicosina y eritromicina. Las diluciones se realizaron a doble concentración para que una vez incorporado el inóculo, la concentración final fuera la deseada. Por pocillo, se inocularon 0,05 ml del antimicrobiano y 0,05 ml de la suspensión bacteriana.

Tilmicosina (Micotil® 300 Inyectable): se prepararon las siguientes concentraciones 64, 32, 16, 8, 4, 2, 1, 0,5 y 0,25 µg/ml.

Eritromicina (Sigma): se prepararon las siguientes concentraciones: 64, 32, 16, 8, 4, 2, 1 y 0,5 µg/ml.

Ambas series de diluciones se realizaron con caldo cerebro-corazón adicionado con β-NAD (20 mg/l) e inoculadas en las microplacas en el momento de su utilización.

Preparación de los inóculos

Actinobacillus pleuropneumoniae: se utilizaron 27 cepas de campo. Las mismas se aislaron de pulmones de cerdos muertos por pleuroneumonía, provenientes de establecimientos de cría intensiva en confinamiento localizados en las provincias de Buenos Aires, Córdoba y Santa Fe. Una vez tipificadas se almacenaron a -80 °C.

Para la realización de esta prueba se descongelaron y se sembraron en agar sangre adicionado con extracto de levadura (1 % P/V), e incubaron a 37 °C durante 24 horas en atmósfera en-

riquecida con 10 % de CO₂. Posteriormente, se repicaron en caldo cerebro corazón adicionado con β-NAD (20 mg/l) e incubaron nuevamente a 37 °C durante 24 horas en atmósfera normal. Para lograr la concentración 0,5 de McFarland (≅ 1,5 x 10⁸ UFC/ml), 0,1 ml del cultivo anterior se sembró en 2,5 ml del mismo caldo e incubó entre 18 y 24 horas. A partir de esta concentración se realizó una dilución 1:100, obteniéndose, aproximadamente, 10⁶ UFC/ml. La concentración bacteriana final por pocillo fue de aproximadamente 5 x 10⁵ UFC/ml.

Staphylococcus aureus ATCC 29213: se utilizó como cepa de referencia, según indican las Normas NCCLS. Se sembró en agar tripticasa soya e incubó a 37 °C durante 24 horas. La concentración 0,5 de McFarland se obtuvo en caldo cerebro corazón y a partir de allí se procedió como se describió anteriormente.

Inoculación

Dentro de los 15 min de preparados los inóculos, cada serie de ambos antimicrobianos se sembraron con 0,05 ml de las suspensiones bacterianas.

Las placas se taparon e incubaron durante 24 horas a 37 °C en estufa con humedad controlada.

Control de los inóculos

Se realizó un control de inóculo de cada cepa de *A. pleuropneumoniae* así como de la cepa de referencia, sembrándose 0,05 ml de caldo y 0,05 ml de suspensión bacteriana. Para realizar el conteo viable, se realizó una dilución 1:1000, tomando 0,01 ml de estos pocillos y 9,990 ml de solución fisiológica. Se sembraron 0,1 ml en agar sangre adicionado con extracto de levadura (*A. pleuropneumoniae*) o en agar tripticasa soya (*Staphylococcus aureus* ATCC 29213) e incubaron a 37 °C durante 24 horas. La presencia de 50 colonias se consideró indicativa de una densidad de inóculo de aproximadamente a 5 x 10⁵ UFC/ml.

Se definió a la CIM como la mínima concentración de antimicrobiano que inhibió el desarrollo bacteriano visible. La CIM₅₀ y CIM₉₀ se definieron como las concentraciones de antimicrobiano que inhibieron el desarrollo del 50 % y del 90 % de las cepas respectivamente. El criterio de sensibilidad y resistencia se determinó en función a los valores expresados en las tablas 1 y 2.

Tabla 1.- Puntos de corte expresados en mg/ml para Tilmicosina y Eritromicina según las Normas NCCLS para *Actinobacillus pleuropneumoniae*

Table 1.- Tilmicosin and erythromycin breakpoints (mg/ml) for *Actinobacillus pleuropneumoniae* by NCCLS Norms

Antimicrobiano	Sensible	Intermedio	Resistente
Tilmicosina	≤ 8	16	≥ 32
Eritromicina	≤ 0,5	1 - 4	≥ 8

Tabla 2.- Valores aceptados expresados en mg/ml para Tilmicosina y Eritromicina según las Normas NCCLS para *Staphylococcus aureus* ATCC 29213

Table 2.- Tilmicosin and erythromycin breakpoints (mg/ml) for *Staphylococcus aureus* ATCC 29213 by NCCLS Guideline

Antimicrobiano	Concentraciones (µg/ml)
Tilmicosina	0,5 - 2
Eritromicina	0,12 - 0,5

Determinación de la Concentración Bactericida Mínima (CBM) de Tilmicosina frente a las 27 cepas de *A. pleuropneumoniae*

La CBM se definió como la mínima concentración de antibiótico que mató el 99,9 % de las bacterias.

Luego de realizar la CIM, se subcultivaron todos los pocillos que no presentaron turbidez así como el último que lo hizo. El volumen tomado por pocillo dependió del inóculo inicial que fue utilizado para la CIM calculándose también, a partir de este último dato, la cantidad de colonias que deberían considerarse para el punto de la CBM. Para antimicrobianos bactericidas la CBM coincide con la CIM o difiere en 1 o 2 diluciones más altas, mientras que cuando es bacteriostático la CBM está muy alejada del valor de la CIM.

RESULTADOS

La CIM₅₀ de tilmicosina frente a *Actinobacillus pleuropneumoniae* fue de 2 µg/ml y la CIM₉₀ de 4 µg/ml. El rango fue 0,25 - 4 µg/ml. Todas las cepas estudiadas fueron sensibles a tilmicosina.

La CIM₅₀ y la CIM₉₀ de eritromicina frente a *Actinobacillus pleuropneumoniae* fue de 4 µg/ml. El rango fue 4 - 1 µg/ml. Todas las cepas aisladas presentaron sensibilidad intermedia a eritromicina.

Los valores de CIM de tilmicosina y eritromicina observados frente a la cepa de referencia *Staphylococcus aureus* ATCC 29213 fueron de 1 µg/ml y 0,25 µg/ml respectivamente.

La CBM de tilmicosina no fue uniforme, encontrándose los siguientes resultados: para 15 cepas fue de 4 µg/ml, para 10 cepas de 8 µg/ml y para 2 cepas de 16 µg/ml.

DISCUSIÓN

Los valores de CIM de tilmicosina, obtenidos con las cepas de *A. pleuropneumoniae* aisladas en nuestro país, son menores a los informados por otros autores, siendo la CIM₅₀ de tilmicosina de 8 µg/ml para Aitken y col., 6,25 µg/ml para Blackall y col., la CIM₅₀ de 4 µg/ml y CIM₉₀ de 8 µg/ml para Barigazzi y col. y prácticamente coincidentes con los hallados por Inamoto y col. donde la CIM₉₀ fue de 3,13 µg/ml e iguales a los de Salmon y col. con valor de CIM₉₀ de 4 µg/ml.

El valor de CIM₅₀ de eritromicina coincidió con el encontrado por Salmon y col., variando el de CIM₉₀ de 16 µg/ml. También hubo diferencias con Raemdonck y col. quienes obtuvieron un valor de CIM₉₀ de 8 µg/ml y con Asawa y col., CIM₉₀ de 6,25 µg/ml.

En un trabajo previo fue determinada la CIM de tilosina frente a estas mismas cepas de *A. pleuropneumoniae* (9), obteniéndose valores de CIM₅₀ y CIM₉₀ de 12,5 µg/ml presentando sensibilidad intermedia.

Los resultados obtenidos coinciden, en parte, con Norcia y col. en cuanto a que, si bien, los macrólidos son en general bacteriostáticos, con *A. pleuropneumoniae* y *Pasteurella multocida*, muestran actividad bactericida. Con respecto a las cepas probadas, en 25 mostró efecto bacteriostático mientras que en las 2 restantes mostró una actividad bactericida.

CONCLUSIONES

Las 27 cepas de *Actinobacillus pleuropneumoniae* aisladas en la República Argentina son sensibles a tilmicosina, según los puntos de corte propuestos por la NCCLS pudiendo utilizarse como droga de elección para el tratamiento de la pleuroneumonía porcina. No ocurre lo mismo con eritromicina y tilosina, ya que la sensibilidad observada fue intermedia.

Si bien los estreptococos presentan resistencia cruzada con los macrólidos y los estafilococos resistencia disociada, el comportamiento de *Actinobacillus pleuropneumoniae* es diferente. El presente estudio demostró que las cepas autóctonas estudiadas poseen sensibilidad intermedia a eritromicina y tilosina. Esto indicaría resistencia cruzada entre macrólidos de diferentes grupos. Sin embargo, la alta sensibilidad a tilmicosina observada, contradice esta hipótesis ya que, como planteamos en la introducción, este antibiótico pertenece al mismo grupo que la tilosina. Por tal motivo, es evidente que siempre deben realizarse estudios de sensibilidad antimicrobiana con cepas autóctonas. No se puede inferir el patrón de susceptibilidad antimicrobiana de una bacteria por los resultados obtenidos en otros países ni por los obtenidos con antimicrobianos pertenecientes al mismo grupo del que se desea utilizar.

Los tratamientos empíricos así como el abuso de los antimicrobianos como promotores del crecimiento favorecen la resistencia bacteriana. Conocer los mecanismos bioquímicos de resistencia ayuda a la detección *in vitro* del fenotipo resistente, lo cual es muy útil para guiar los tratamientos y para dilucidar la resistencia cruzada entre los antibióticos. Este conocimiento es también la base de una elección racional de drogas que eludan la resistencia o estén dirigidas contra otros sitios de acción.

BIBLIOGRAFÍA

1. Fedorka-Cray PJ, Hoffman L, Cray WC. *Actinobacillus (Haemophilus) pleuropneumoniae*. Part I. History, epidemiology, serotyping and treatment. *Compend Contin Educ Pract Vet* 1993; 15 (10):1447-1455.
2. Nicolet J. Diseases of Swine. Iowa State University Press (USA), 1992; p.401-408.
3. Shope RE; White DC, Leidy G. Porcine contagious pleuropneumonia. II. Studies of the pathogenicity of the etiological agent *Haemophilus pleuropneumoniae*. *J Exp Med* 1964; 119:369-375.
4. Perfumo CJ; Menendez NA; Petruccelli MA; Idiart RJ, Pons E. Pleuropneumonía del cerdo por *Haemophilus pleuropneumoniae*. II Reproducción experimental. *Rev Med Vet* 1981; 62:89-101.
5. Hunneman WA. Incidence, economic effects, and control of *Haemophilus pleuropneumoniae* infections in pigs. *Vet Q* 1986; 8:83-87.
6. Gilbride KA, Rosendal S. Antimicrobial susceptibility of 51 strains of *Haemophilus pleuropneumoniae*. *Can J Comp Med* 1984; 48:47-50.
7. Gutiérrez CB, Píriz S, Vadillo S, Rodríguez Ferri E. In vitro susceptibility of *Actinobacillus pleuropneumoniae* strains to 42 antimicrobial agents. *Am J*

Vet Res 1993; 54:546-550.

8. Salmon S, Watts J, Case C, Hoffman L, Wegener H, Yancey R. Comparison of MICs of ceftiofur and other antimicrobial agents against bacterial pathogens of swine from the United States, Canada and Denmark. *J Clin Microbiol* 1995; 33:2435-2444.
9. Copes J, Pantozzi F, Vena MM, Perfumo CJ, Yamazaki T. Antimicrobial sensitivity of 20 *Actinobacillus pleuropneumoniae* serovar 1 strains isolated from pneumonic lungs in Argentine. Proc. XXV Congress of the World Veterinary Association. Yokohama, Japan. 1995.
10. Barigazzi G, Candotti P, Foni E, Martinelli L, Raffo A. In Vitro susceptibility of 108 isolated *Actinobacillus pleuropneumoniae* strains to 17 antimicrobial agents from pig lungs in Italy in 1994-95. Proc. 14th IPVS Congress, Bologna, Italy. 1996.
11. Paradis MA, Vessie G, Merrill JK, Dick CP, Moore C, Charbonneau G, Gottschalk M. Efficacy of Tilmicosin Phosphate in Feed (Pulmotil®, Elanco) for the Prevention of *Actinobacillus pleuropneumoniae* Infection in Swine. *Am Assoc Swine Pract* 1998; p 105-107.
12. Bergoglio RM. Antibióticos. Ed. Panamericana (España), 1993; 201-219
13. Thomson, TD, Buck JM, Moran JW, Tonkinson LV, Jordan WH. Pharmacology and Safety of Pulmotil (Tilmicosin Phosphate) in Swine. *Am Assoc Swine Pract* 1997; p 51-55.
14. Quintiliani R., Courvalin P. Manual of Clinical Microbiology. ASM Press (USA), 1995; p. 1308-1326
15. Ose EE. In Vitro antibacterial properties EL-870, a new semisynthetic macrolide antibiotic. *J Antibiotics* 1987; 40:190-194
16. Kirst HA, Toth JE, Debono M, Willard K, Truedell B, Ott JL, Counter FT, Felty-Duckworth AM, Pekarek R. Synthesis and Evaluation of Tylosin-Related Macrolides Modified at the Aldehyde Function: A New Series of Orally Effective Antibiotics. *J Med Chem* 1988; 31:1631-1641.
17. Ziv G, Shem-Tov M, Glickman A, Winkler M, Saran A. Tilmicosin antibacterial activity and pharmacokinetics in cows. *J Vet Pharmacol Therap* 1995; 18:340-345.
18. Moore GM, Rodney PB, Tonkinson LV. Clinical field trials with tilmicosin phosphate in feed for the control of naturally acquired pneumonia caused by *Actinobacillus pleuropneumoniae* and *Pasteurella multocida* in swine. *Am J Vet Res* 1996; 57:224-228.
19. Stoker J, Parker R, Spencer Y. The concentration of Tilmicosin in pigs serum and respiratory tissue following oral administration with Pulmotil® via the feed at a level of 400g/tonne. Proc. 14th IPVS Congress, Bologna, Italy 1996.
20. Thomson TD, Buck JM, Moran JW, Tonkinson LV, Jordan WH. Pharmacology and Safety of Pulmotil (Tilmicosin Phosphate) in Swine. *Am Assoc Swine Pract* 1997; p 51-55.
21. Miller DJ. Comparative Performance of Various

Broad Spectrum Premix Antimicrobials Versus Complex Respiratory Infections. Am Assoc Swine Pract 1997; p 165-174.

22. Aitken IA, Reeve-Johnson L. Antimicrobial susceptibility testing for Tilmicosin and various other antimicrobial agents against porcine pathogens. Proc. 15th IPVS Congress, Birmingham, Englad. 1998; p 202.

23. Bilié V, Habrun B. Efficacy of Tilmicosin for control of pneumonia in weaned pigs. Proc. 15th IPVS Congress, Birmingham, Englad. 1998; p 268.

24. Shryock TR, White DW, Staples JM, Werner CS. Minimum inhibitory concentration breakpoints and disk diffusion inhibitory zone interpretive criteria for tilmicosin susceptibility testing against *Pasteurella* spp. Associated with bovine respiratory disease. J Vet Diagn Invest 1996; 8:337-344.

25. National Committee for Clinical Laboratory Standards. Performance Standards for Antimicrobial Disk and Dilution Susceptibility Test for Bacteria Isolated from Animals; Proposed Standard. NCCLS Document M31-P. National Committee for Clinical Laboratory Standards, Villanova, Pa. 1994.

26. Blackall PJ, Asakawa T, Graydon RJ, White M, Adamson M, Wade LK, Lowe LB. *In vitro* antibacterial properties of tilmicosin against Australian isolates of *Pasteurella multocida* and *Actinobacillus pleuropneumoniae* from pigs. Australian Vet J 1995; 72:35-36.

27. Inamoto T, Kikuchi K, Iijima H, Kawashima Y, Nakai Y, Ogimoto K. Antibacterial activity of tilmicosin against *Pasteurella multocida* and *Actinobacillus pleuropneumoniae* isolated from pneumonic lesions in swine. J Vet Med Sci 1994; 56:917-921.

28. Raemdonck DL, Tanner AC, Tolling ST, Michener SL. Antimicrobial susceptibility of *Actinobacillus pleuropneumoniae*, *Pasteurella multocida* and *Salmonella choleraesuis* isolated from pigs. Vet Rec 1994; 134:5-7.

29. Asawa T, Kobayashi H, Mitani K, Ito N, Morozumi T. Serotypes and antimicrobial susceptibility of *Actinobacillus pleuropneumoniae* isolated from piglets with pleuropneumonia. J Vet Med Sci 1995; 57:757-759

30. Norcia, LJ, Silvia AM, Hayashi SF. Studies on time-kill kinetics of different classes of antibiotics against veterinary pathogenic bacteria including Pasteurella, Actinobacillus and *Escherichia coli*. J. Antibiot 1999; 52:52-59.