

Resistencia antimicrobiana de *Gallibacterium anatis* aisladas de gallinas de postura comercial en Sonora, México

Antimicrobial resistance of *Gallibacterium anatis* isolates from breeding and laying commercial hens in Sonora, Mexico

Reyna Fabiola Osuna Chávez^a, Ramón Miguel Molina Barrios^{a*}, Javier Arturo Munguía Xóchihua^a, Juan Francisco Hernández Chávez^a, José Benito López León^b, Martín Acuña Yanes^b, Víctor Arturo Fernández Martínez^b, Jorge Robles Mascareño^a, Jesús Gabriel Adrián Icedo Escalante^a

RESUMEN

Se consiguieron identificar 23 aislamientos de *Gallibacterium anatis*, a través de pruebas convencionales de cultivo y bioquímicas, confirmándose su identificación a través del método de PCR. Se les efectuó la prueba de difusión en placa para determinar la resistencia antimicrobiana a los antibióticos más utilizados en el área avícola. Los aislamientos fueron más susceptibles a ceftiofur (73 %) y florfenicol (68 %); todos los aislamientos mostraron resistencia marcada a penicilina, tilosina, lincomicina, ampicilina, enrofloxacin, oxitetraciclina, norfloxacin y cefalexina. La presencia de *Gallibacterium anatis* se asocia a problemas respiratorios y reproductivos en las poblaciones de gallinas de postura comercial. Los aislamientos mostraron una resistencia marcada a distintos antibióticos, probablemente por la medicación desmedida ante la presencia de este microorganismo.

PALABRAS CLAVE: *Gallibacterium anatis*, PCR, Resistencia, Susceptibilidad, Antimicrobianos.

ABSTRACT

It was able to identify 23 isolates of *Gallibacterium anatis* through conventional culture and biochemical tests, and identification confirmed through PCR method. A disk diffusion test determined antimicrobial resistance to commonly used antibiotics in the poultry area. Isolates were more susceptible to ceftiofur (73 %) and florfenicol (68 %). All isolates showed marked resistance to penicillin, tylosin, lincomycin, ampicillin, enrofloxacin, oxytetracycline, norfloxacin and cephalexin. The presence of *Gallibacterium anatis* is associated with respiratory and reproductive problems in populations of commercial laying hens. Isolates showed marked resistance to different antibiotics, probably due to excessive medication in the presence of this organism.

KEY WORDS: *Gallibacterium anatis*, PCR, Resistance, Susceptibility, Antimicrobials.

Recibido el 19 de noviembre de 2013. Aceptado el 16 de febrero de 2015.

^a Departamento de Ciencias Agronómicas y Veterinarias. Instituto Tecnológico de Sonora. Antonio Caso S/N 85093. Cd. Obregón, Sonora. México.

^b Pecuarius Laboratorios S.A. de C.V. Cd. Obregón, Sonora. México.

*Autor de correspondencia: rammol62@yahoo.com.

Una de las causas de grandes pérdidas económicas en la industria avícola son las enfermedades reproductivas y respiratorias de las aves, las cuales causan aumento en los costos por el tratamiento y mortalidad⁽¹⁾. La bacteria Gram negativa de *Gallibacterium anatis* causa salpingitis y peritonitis en gallinas ponedoras, lo cual disminuye la producción de huevo⁽²⁾, ocasionando problemas en la avicultura moderna por presentar lesiones como atrofia folicular, ooforitis, septicemia, folículos deformes, peritonitis, agrandamiento de los riñones, enteritis, congestión, así como edema del tracto respiratorio^(3,4,5). Mirle *et al*⁽¹⁾ establecieron que *Gallibacterium* también ocasiona alteración en el tamaño del huevo, variación en la formación del cascarón y bajas significativas en la producción del 2 al 4 %, ocasionando grandes pérdidas económicas y aumento en los costos de producción por tratamientos, por lo que representa un gran reto sanitario y económico para la industria avícola mexicana. La compleja patogenia de *G. anatis* ha sido objeto de revisiones⁽⁶⁾. Es poco lo que se sabe hoy en día de la patogénesis y son pocos los factores de virulencia que se han identificado, como la toxina RTX⁽⁷⁾, las metaloproteasas con capacidad de degradar la IgG aviar⁽⁸⁾, y la fimbria F17-like⁽⁹⁾. Así mismo, se ha demostrado una incidencia del 48 al 61 % y una alta prevalencia con el 95 de significancia, la cual es afectada por los niveles de bioseguridad^(3,10).

Anteriormente *G. anatis* era considerado un agente secundario⁽¹⁾, debido a que este patógeno se encuentra en la flora normal de pollos sanos, por lo que causa intriga en cuanto a su patogenidad primaria, que probablemente se encuentre influenciada por factores adicionales que causan la inmunosupresión de las aves, permitiendo que el agente oportunista de *G. anatis* actúe negativamente sobre el huésped^(3,11,12), sugiriendo que es una bacteria oportunista que puede convertirse en el agente primario para el desarrollo de la enfermedad^(1,3,5).

Aunado a esto, es importante conocer los factores de patogenia y virulencia para mejorar, entender y prevenir los efectos negativos de *G. anatis*⁽²⁾; como también, la aparición de nuevas enfermedades, la modificación de la virulencia y la medicación desmedida, las cuales han contribuido a la

resistencia y susceptibilidad antimicrobiana a los antibióticos, complicando la enfermedad; observando aumento de resistencia antimicrobiana entre varios miembros de la familia Pasteurellaceae^(13,14).

El diagnóstico oportuno de esta enfermedad, podría prevenir algunos inconvenientes. Para ello, se debe integrar el trabajo de campo considerando la observación de signos clínicos, los resultados obtenidos a partir de las muestras enviadas al laboratorio, la identificación del agente y el diagnóstico diferencial con otras enfermedades. De igual manera un tratamiento eficaz con antibióticos específicos permitiría mantener altos niveles de salud animal. Sin embargo, en México, los productores de aves, suelen fracasar en el tratamiento con antibióticos utilizados contra la infección de *G. anatis*⁽¹⁵⁾, debido a que los organismos pertenecientes a la familia de las Pasteurellaceae muestran resistencia recurrente debido al uso desmedido de antibióticos no específicos⁽¹³⁾. Es por esto, que el objetivo del presente trabajo fue determinar la susceptibilidad y resistencia a diferentes antibióticos, incluyendo los más utilizados para el tratamiento de *G. anatis*.

Al iniciar la investigación, fue necesario aislar la bacteria a partir de muestras de tejidos. Los aislamientos, se obtuvieron de 189 granjas avícolas establecidas en el estado de Sonora, las cuales están integradas por múltiples casetas, durante el periodo 2007-2011⁽¹⁶⁾. Se seleccionaron 30 granjas de postura comercial de forma dirigida por presentar sintomatología de tipo respiratorio y reproductivo como referencia, donde se obtuvieron muestras de 20 aves. El procedimiento de necropsia se realizó de acuerdo a lo establecido en el manual de necropsias y toma de muestras de las aves^(17,18). Se buscaron lesiones de tipo reproductivo y respiratorio, tomándose muestras de diversos tejidos como los cornetes, tráquea, pulmones, hendidura palatina, hígado, bazo, riñones, folículos y peritoneo. La superficie del tejido muestreado se cauterizó con una espátula caliente antes de introducir el hisopo estéril con el objeto de prevenir cualquier tipo de contaminación, inoculándose posteriormente en cajas Petri de plástico estériles desechables, con agar sangre (BD Bioxon), con sangre estéril desfibrinada de bovino al 5% y agar Mac Conkey (BD

Bioxon), incubándose a 37 °C de 18 a 24 h en una incubadora microbiológica (1535 Shel Lab). Posteriormente, se realizó la identificación bacteriana de los aislamientos mediante pruebas convencionales de cultivo de agar sangre de bovino al 5%, identificando características morfológicas y de hemólisis⁽¹⁹⁾. Las bacterias se purificaron y se seleccionaron morfológicamente en base a lo descrito por Christensen *et al*⁽¹⁹⁾, quienes mencionan que las colonias deben tener un diámetro de 1 a 2 mm, ser circulares, convexas y grisáceas traslúcidas. Las bacterias se colorearon con tinción de Gram, identificándose como cocobacilos Gram negativos, de acuerdo a lo establecido por Rimler *et al*⁽²⁰⁾, en un microscopio Olympus CX41.

Así mismo, la identificación bioquímica se realizó de cultivos de menos de 24 h de vida, por medio del sistema comercial para cocobacilos Gram

negativos (NC33) de MicroScan Renok™, según especificaciones del fabricante en el procedimiento en un equipo AS-4 con el software LABPRO MICROSCAN; las placas inoculadas (NC33) se incubaron a 37 °C durante 24 h en una incubadora 1535 Shel Lab. La interpretación fue visual; cada pozo se evaluó por su cambio de color específico, indicando así la presencia de una reacción metabólica basándose en la tabla de MicroScan Renok™ Gram negativos⁽²¹⁾, debido a que la base de datos del MicroScan no poseía referencias para *G. anatis*. Para complementar las pruebas y poder biotipificar las bacterias, se realizaron bioquímicas de cuatro carbohidratos más (glucosa, maltosa, trehalosa y D-xilosa) (BD Bioxon). Todas las bioquímicas se corrieron dos veces para detectar cualquier error efectuado durante el procedimiento. Así mismo, se ejecutó la prueba para buscar la

Cuadro 1. Clasificación bioquímica de *Gallibacterium anatis*

BIOVAR	Arabinosa	D(+) xylosa	Meso-inositol	D(-) sorbitol	Maltosa	Trehalosa	Dextrin
Biovar 1	-	+/(+)	+/(+)	+	+	+/(+)	+/(+)
Biovar 2	-	+	+	+	+	+	-
Biovar 3	-	+	+/(+)	+	+	-	+
Biovar 4	-	+	+/(+)	+	-	+/(+)	-/(+)
Biovar 5	-	+	-	-	+	+	(+)
Biovar 6	-	+	-	+	+	+	+
Biovar 7	-	-	(+)	+	+	+	+
Biovar 8	+	+	-	-	+	+	+
Biovar 9	-	+	+/(+)	-	+	-	+
Biovar 10	-	+	-	+	+	+	-
Biovar 11	-	+	+	+	-	-	-/(+)
Biovar 12	-	+	+/(+)	-	-	+/(+)	-/(+)
Biovar 13	-	+	-	+	-	+	-
Biovar 14	-	-	+	+	+	-	-
Biovar 15	-	-	+	+	-	-	-
Biovar 16	-	-	-	+	-	+	-
Biovar 17	-	+	+/(+)	-	-	-	-
Biovar 18	-	+	-	-	-	+/(+)	-/(+)
Biovar 19	-	+	-	-	-	-	-
Biovar 20	-	-	-	-	-	+	-
Biovar 21	-	-	-	-	-	-	-
Biovar 22	-	+	-	+	-	-	-
Biovar 23	-	-	-	-	+	+	+
Biovar 24	-	+/(+)	+/(+)	-	+	+	+/(+)

Bisgaard s/p

presencia de la enzima oxidasa, con tiras reactivas (Bactident® Oxidase). La tipificación de los aislamientos se basaron en investigaciones anteriores, a partir de la fermentación de carbohidratos de (+) L-arabinosa, (+) D-xilosa, m-inositol, (-) D-sorbitol, maltosa, trehalosa y dextrina, diferenciando entre 24 biovares registrados^(19,22) (Cuadro 1).

Para complementar la identificación, se consideró identificar a *G. anatis* por la reacción en cadena de la polimerasa (PCR), y para esto fue necesario primero la extracción de ADN bacteriano genómico, proceso realizado mediante las instrucciones de QIAamp DNA Mini Kit (51306, QIAGEN), según especificaciones del proveedor. Para la cuantificación del ADN se utilizó un espectrofotómetro (Jenway, GENOVA) con celdas de cuarzo, a una absorbancia de 260 y 280 nm. Para la confirmación molecular de los aislamientos bacterianos mediante la amplificación por PCR de los segmentos específicos de los genes de *G. anatis*. Las secuencias de oligonucleótidos se diseñaron en base a las 99 secuencias de 16S rRNA del Gen Bank⁽²³⁾. Se seleccionó el oligonucleótido 1133fgal (5'-TATTCTTTGTTACCARCGG), el cual se prevé que es específico para *Gallibacterium* y no tiene la capacidad de amplificar el ADN de otros miembros de la familia Pasteurellaceae, dentro de las condiciones del PCR elegido donde se espera un amplicón de 790 pb. Para la amplificación inversa se eligió el oligonucleótidos del gen 23S rRNA con secuencia 114r (5'-GGTTTCCCCATTCGG) reportados por Lane⁽²⁴⁾ y Bojesen *et al.*⁽²³⁾, esperando un amplicón de 1080 pb. Para esto se utilizó un termociclador (Mastercycler® personal Eppendorf) en punto final. La reacción de PCR se llevó a la concentración final de 25 µl con 2.5 µl Mg 10X Buffer, 0.85 µl MgCl₂ (25 mM), 0.5 µl DNTP's mix (2.5 mM), Primer F 0.25 µl y Primer R 0.25 µl (50 µM), 0.25 µl Taq (5U/µl), 18.5 µl H₂O libre de RNAsas (Todos los reactivos del laboratorio Invitrogen™), y 2 µl DNA de cada una de las muestras, obteniendo 25 µl de volumen total. Las condiciones de la PCR fueron las siguientes: la desnaturalización de 95 °C durante 4 min, seguido de 35 ciclos de 95 °C por 30 seg cada uno, alineamientos de 54 °C durante 1 min y 2 min a 72 °C, seguido por la extensión final de 72

°C durante 10 min. El amplicón esperado se amplificó en gel agarosa al 1.6% teñido con bromuro de etidio⁽²³⁾, y posteriormente visualizados en un transiluminador UV (Macro Vue UV-25, Hoefer).

Para finalizar, el análisis de resistencia antimicrobiana se realizó mediante el método de Kirby-Bauer, descrito por el Laboratorio Internacional de Referencia: National Committee for Clinical Laboratory Standards (NCCLS)⁽²⁵⁾. Se realizaron cultivos de los aislamientos de *G. anatis* en agar sangre de bovino al 5%, utilizando sensidiscos de papel que contenían una distribución homogénea de antibiótico, para posteriormente incubar a 37 °C por 18 a 24 h⁽²⁶⁾.

Los antibióticos evaluados fueron los aminoglucósidos (gentamicina, estreptomina, neomicina, kamicina, neo-kanamicina); betalactámicos (ampicilina, penicilina); fluoroquinolona (norfloxacin, enrofloxacin); cefalosporina (ceftiofur, cefalexina); fenicoles (florfenicol, tianfenicol); lincosamidas (lincoespectin, lincomicina); tetraciclinas (oxitetraciclina); macrólidos (tilosina); fosfonatos (fosfomicina) y sulfonamidas (sulfametoxazol). La concentración de los sensidiscos fue de 100 µg en los nitrofuranos, 5 µg en las fluoroquinolonas y 30 µg en todas las demás; todo esto es fundamentado en la Farmacopea Americana del Compendio de Normas o Estándares y Técnicas de Laboratorio. La interpretación de la susceptibilidad antimicrobiana se estableció en la medición del halo de inhibición, comparándolo con la concentración mínima inhibitoria (CIM)⁽²⁷⁾.

Se lograron aislar 23 cepas bacterianas de *G. anatis*, de las cuales la cepa de referencia y cuatro cepas más, fueron donadas de estudios anteriores. A pesar que se hicieron 600 muestreos, no se pudo aislar de todos los casos, posiblemente debido a que las aves se encuentran inmunizadas contra este microorganismo; sin embargo, el muestreo fue considerado exitoso, debido a que hubo un brote en el 2010-2011, lo que permitió que del 100 % de las bacterias aisladas, el 34 % correspondiera a *G. anatis* (Figura 1), ya que en otras circunstancias hubiera resultado complicado. El 70 % de las bacterias se asilaron de pulmón, 30 % en tráquea y 30 % en folículos (Figura 2), lo que indica que este

microorganismo causa patologías respiratorias y reproductivas. Las bacterias se identificaron morfológicamente en agar sangre de bovino al 5%, apoyados en la técnica y morfología descrita por Christensen *et al*⁽¹⁹⁾.

En la identificación bioquímica se identificaron los aislamientos como *G. anatis*^(19,22,28), realizando repetición de las pruebas con la finalidad de disminuir errores.

En la identificación molecular por PCR, se obtuvo una media de 20.5 µg/ml y una relación de

pureza de 1.8 en la extracción de ADN bacteriano; con esto fue posible continuar con el proceso, donde los productos de amplificación de las bacterias aisladas obtuvieron 790 pb y un segundo amplicón de 1080 pb, donde están ubicados los segmentos específicos de *G. anatis* que codifican para los genes 16S rRNA y 23S rRNA, según lo establecido por Bojesen *et al*⁽²³⁾, confirmando como positivas a las 23 cepas aisladas (Figura 3).

En el análisis general de la resistencia antimicrobiana de los 23 aislamientos, los resultados revelaron que las bacterias presentaban mayor resistencia a la penicilina con el 100 % y la ampicilina con el 95.7 %, ambos del grupo correspondientes a los betalactámicos. Lincomicina con el 95.7 % y también tilosina con el 95.7 % (Cuadro 2) (Figura 4). *G. anatis* reflejó más susceptibilidad a ceftiofur, con el 73.9 %, seguido de los fenicoles, donde se encuentra al florfenicol con el 65.2 % y al tianfenicol con el 56.5 %. En los antibiogramas realizados a cada una de las bacterias aisladas, todos los aislamientos, a excepción de dos, mostraron una resistencia mayor al 50 % de los antibióticos, demostrando, que la mayoría de los aislamientos de *G. anatis* en el estado de Sonora han creado resistencia marcada.

Los 23 aislamientos de *G. anatis* se obtuvieron de aves con patologías respiratorias y reproductivas; se identificaron macroscópicamente⁽¹⁹⁾, también se

Figura 1. Porcentaje de bacterias aisladas en aves del sur de Sonora, durante en el período 2010 – 2011

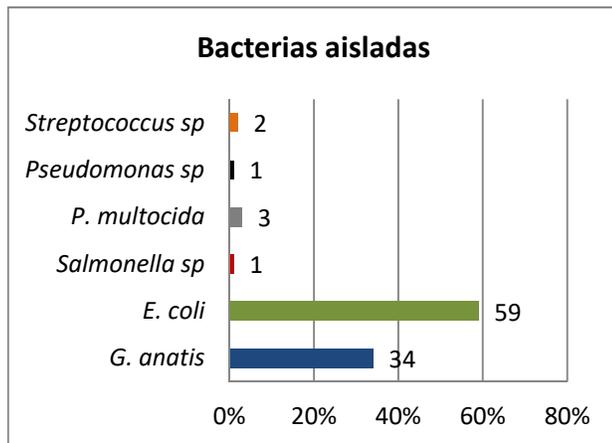


Figura 2. Porcentaje de órganos donde fueron aisladas las bacterias de *Gallibacterium anatis*

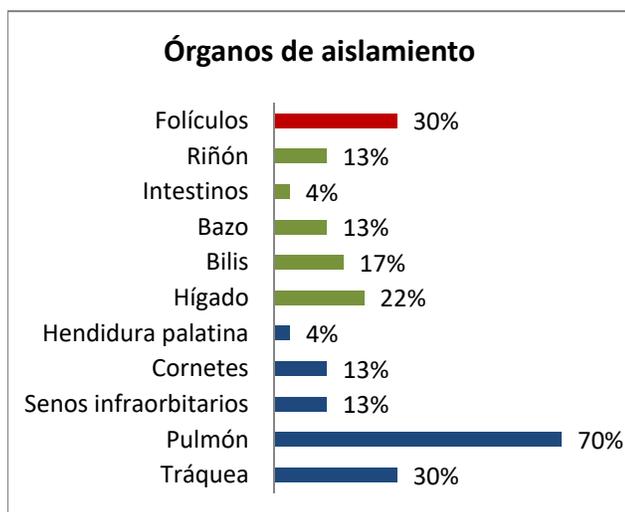
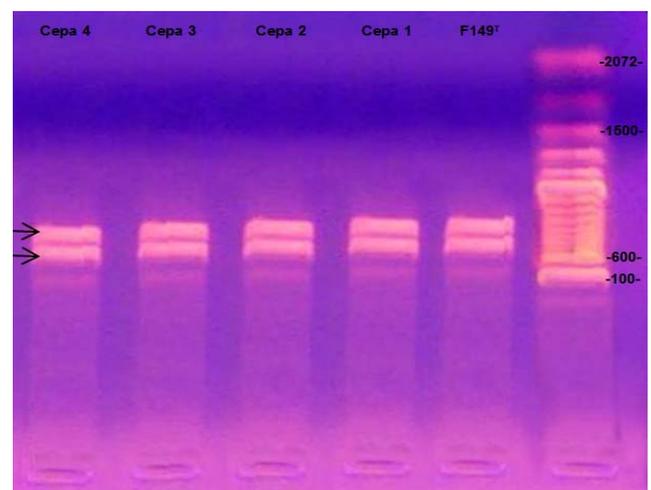


Figura 3. Amplificación genética por PCR, de *Gallibacterium anatis*



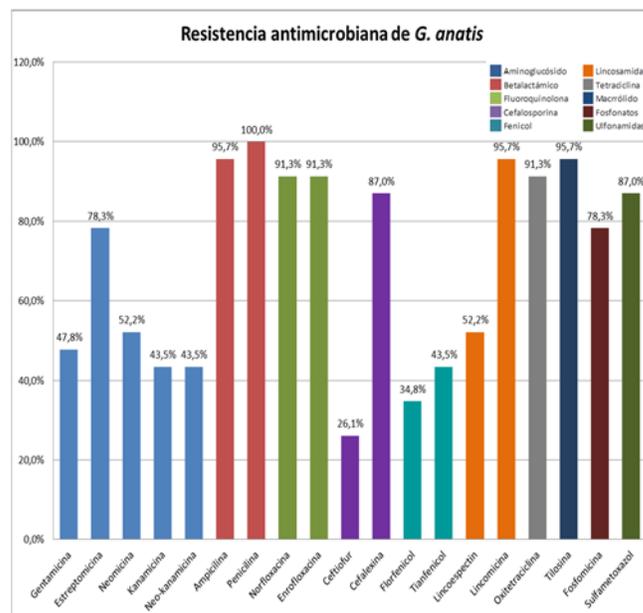
Cuadro 2. Susceptibilidad y resistencia de bacterias de *Gallibacterium anatis* aisladas en el Sur de Sonora, México

		Susceptibilidad No. (%)	Resistencia No. (%)
AISLAMIENTOS		23	23
aminoglucósidos	Gentamicina	12 (52.2)	11 (47.8)
	Estreptomina	5 (21.7)	18 (78.3)
	Neomicina	11 (47.8)	12 (52.2)
	Kanamicina	13 (56.5)	10 (43.5)
	Neo-kanamicina	13 (56.5)	10 (43.5)
betalactámicos	Ampicilina	1 (4.3)	22 (95.7)
	Penicilina	0 (0)	23 (100)
fluoroquinolona	Norfloxacina	2 (8.7)	21 (91.3)
	Enrofloxacina	2 (8.7)	21 (91.3)
cefalosporinas	Ceftiofur	17 (73.9)	6 (26.1)
	Cefalexina	3 (13)	20 (87)
fenicoles	Florfenicol	15 (65.2)	8 (34.8)
	Tianfenicol	13 (56.5)	10 (43.5)
lincosamidas	Lincoespectin	11 (47.8)	12 (52.2)
	Lincomicina	1 (4.3)	22 (95.7)
tetraciclinas	Oxitetraciclina	2 (8.7)	21 (91.3)
macrólidos	Tilosina	1 (4.3)	22 (95.7)
fosfonatos	Fosfomicina	5 (21.7)	18 (78.3)
ufonamidas	Sulfametoxazol	3 (13)	20 (87)

identificaron bioquímicamente. Esto se confirmó genótipicamente por la amplificación, mediante la PCR de los segmentos específicos que codifican para los genes 16S rRNA y 23S rRNA, estipulados en diversos métodos^(19,23,29). Se debió haber tenido un marcador molecular más específico para determinar los pares de bases con mayor exactitud y descartar del 1030 a 1080 propuesto por Bojesen *et al.*⁽²³⁾. La PCR puede ser útil para el diagnóstico de rutina de *Gallibacterium*. Si bien, el uso de los métodos moleculares es limitado debido a los altos costos de la PCR (3 veces más caro que una bacteriología), también ahorra tiempo sin tener que recurrir a las pruebas fenotípicas, las cuales suelen llevar días antes de obtener un resultado.

La patogenia de *G. anatis* está poco definida, por lo que existen pocos estudios que expliquen la farmacocinética de este microorganismo, lo que ha inclinado al productor a medicar desmedidamente esta enfermedad, ocasionando que la bacteria desarrolle una resistencia marcada, como se ha demostrado^(30,31), al comparar los fenotipos de resistencia con los informes de otros taxones de Pasteurellaceae, encontrándose una alta multirresistencia de las tetraciclinas y sulfametoxazol del 92 y 97 % en los aislamientos de campo de

Figura 4. Porcentajes de resistencia de los aislamientos de *Gallibacterium anatis*



Gallibacterium. Confirmando así los resultados obtenidos en el presente estudio, donde la mayoría de los aislamientos presentaron resistencia marcada con las tetraciclinas y los betalactámicos.

En este estudio, los aislamientos resultaron altamente resistentes, indicando la dificultad para el control de esta infección; la medicación no se debería de aplicar sin algún análisis de susceptibilidad antimicrobiano previo, para poder prescribir correctamente los antibióticos, considerando también la naturaleza del proceso infeccioso, la historia clínica, la vía de administración, la dosis, la duración del tratamiento, el mecanismo de acción del antibiótico y su toxicidad⁽²⁷⁾. Sin embargo, aunque la resistencia parezca ser muy común entre los aislamientos de *G. anatis*, los que no son de campo, muestran menor resistencia a algunos antibióticos⁽³⁰⁾.

Se puede concluir que los resultados de este trabajo muestran que la presencia de *Gallibacterium anatis* está frecuentemente asociada a problemas respiratorios y reproductivos en las poblaciones de gallinas de postura comercial en el sur de Sonora, afectando la producción. Los aislamientos de *G. anatis* mostraron una resistencia marcada a distintos antibióticos, probablemente por la medicación desmedida ante la presencia de microorganismos, lo que sugiere implementar un programa eficiente de control para esta bacteria.

AGRADECIMIENTOS

Este trabajo fue parcialmente apoyado por Pecuarius Laboratorios SA de CV. Se agradece al Dr. Miki Bojesen, por su disposición y apoyo al proporcionar información sobre el tema.

LITERATURA CITADA

- Mirle C, Schoengarth M, Meinhardt H, Olm U. Studies into the incidence of *Pasteurella haemolytica* infections and their relevance to hens, with particular reference to diseases of the egg-laying apparatus. *Monat Vet* 1991;(45):545-549.
- Bager RJ, Persson G, Nesta B, Soriani M, Serino L, Jeppsson M. Outer membrane vesicles reflect environmental cues in *Gallibacterium anatis*. *Vet Microbiol* 2013;167(3-4):565-572.
- Bojesen AM, Nielsen SS, Bisgaard M. Prevalence and transmission of haemolytic *Gallibacterium* species in chicken production systems with different biosecurity levels. *Avian Pathol* 2003;32(5):503-510.
- Mirle C, Schöngarth M, Meinhardt H, Olm U. Studies into the incidence of *Pasteurella haemolytica* infections and their relevance to hens, with particular reference to diseases of the egg-laying apparatus. *Monatshefte für Veterinärmedizin* 1991;(45):545-549.
- Mushin R, Weisman Y, Singer N. *Pasteurella haemolytica* found in respiratory tract of fowl. *Avian Dis* 1980;24(1):162-168.
- Rzewuska M, Karpińska E, Szeleszczuk P, Binek M. Isolation of *Gallibacterium* spp. from peacocks with respiratory tract infections. *Med Weter* 2007;63(11):1431-1433.
- Kristensen BM, Frees D, Bojesen AM. GtxA from *Gallibacterium anatis*, a cytolytic RTX-toxin with a novel domain organization. *Vet Res* 2010;(41):25-29.
- García-Gómez E, Vaca S, Pérez-Méndez A, Ibarra-Caballero J, Pérez Márquez V, Tenorio VR. *Gallibacterium anatis* secreted metalloproteases degrade chicken IgG. *Avian Pathol* 2005;(34):426-429.
- Bager RJ, Nesta B, Pors SE, Soriani M, Serino L, Boyce JD, Adler B, Bojesen AM. The fimbrial protein FifA from *Gallibacterium anatis* is a virulence factor and vaccine candidate. *Infect Immun* 2013;81(6):1964-1973.
- Bisgaard M. Incidence of *Pasteurella haemolytica* in the respiratory tract of apparently healthy chickens and chickens with infectious bronchitis. Characterization of 213 strains. *Avian Pathol* 2007;6(4):285-292.
- Alispahic M, Christensen H, Hess C, Razzazi-Fazeli E, Bisgaard M, Hess M. MALDI-TOF mass spectrometry confirms clonal lineages of *Gallibacterium anatis* between chicken flocks. *Vet Microbiol* 2012;(160):269-273.
- Paudel S, Alispahic M, Liebhart D, Hess M, Hess C. Assessing pathogenicity of *Gallibacterium anatis* in a natural infection model: the respiratory and reproductive tracts of chickens are targets for bacterial colonization. *Avian Pathol* 2013;(42):6-12.
- Aarestrup FM, Seyfarth AM, Angen O. Antimicrobial susceptibility of *Haemophilus parasuis* and *Histophilus somni* from pigs and cattle in Denmark. *Vet Microbiol* 2004;101(2):143-146.
- Aarestrup FM. Veterinary drug usage and antimicrobial resistance in bacteria of animal origin. *Basic Clin Pharmacol Toxicol* 2005;(96):279-285.
- Bojesen AM, Vázquez ME, Bager RJ, Ifrah D, González C, Aarestrup FM. Antimicrobial susceptibility and tetracycline resistance determinant genotyping of *Gallibacterium anatis*. *Vet Microbiol* 2011;148(1):105-110.
- Unión de Asociaciones Avícolas del Estado de Sonora (UAAES). 1999.
- Lowenstine LJ. Necropsy procedures. In: Harrison GJ, Harrison LR editors. *Clinical avian medicine and surgery*. USA: WB Saunders Co; 1986;23:298-309.
- Woodford MH, Keet DF, Bengis RG. Postmortem procedures for wildlife veterinarians and field biologists. Published jointly by the Office International des Epizooties, Care for the Wild and the Veterinary Specialist Group/Species Survival Commission of the World Conservation Union (IUCN) 2000;54-55.

19. Christensen H, Bisgaard M, Bojesen AM, Mutters R, Olsen JE. Genetic relationships among avian isolates classified as *Pasteurella haemolytica*, "*Actinobacillus salpingitidis*" or *Pasteurella anatis* with proposal of *Gallibacterium anatis* gen. nov., comb. nov. and description of additional genomospecies within *Gallibacterium* gen. nov. *Int J Syst Evol Microbiol* 2003;(53):275-287.
20. Rimler RB, Sandhu TS, Glisson JR. Pasteurellosis, infectious serositis, and *pseudotuberculosis*. In: A laboratory manual for the Isolation and Identification of avian pathogens. Swayne DE editor. Philadelphia: American Association of Avian Pathogens; 1998.
21. DGRM-01. Guía rápida de operación con sistema LABPRO. DICIPA. 2006.
22. Bisgaard M. Isolation and characterization of some previously unreported taxa from poultry with phenotypical characters related to *Actinobacillus* and *Pasteurella* species. *Acta Pathol Microbiol Immunol* 1982;(90):59-67.
23. Bojesen AM, Vázquez ME, Robles F, González C, Soriano EV, Olsen JE, Christensen H. Specific identification of *Gallibacterium* by a PCR using primers targeting the 16S rRNA and 23S rRNA genes. *Vet Microbiol* 2007;123(1-3):262-268.
24. Lane DJ. 16S/23S rRNA sequencing. In: Stackebrandt E, Goodfellow MN editors. *Nucleic acid techniques in bacterial systematics*. Chichester United Kingdom: John Wiley and Sons; 1991.
25. National Committee for Clinical Laboratory Standards (NCCLS). Performance standards for antimicrobial susceptibility testing: 12th Inform Suppl. Wayne (PA): NCCLS, Document M100-S12; 2002;22(1):15-39.
26. Barry AL, Thornsberry C. Susceptibility test diffusion test procedures. In: Lennette E editor. *Manual of clinical microbiology*, 4th ed. Am Soc Microbiol 1985;978-987.
27. Quinn PJ, Markey BK, Manguirre D. *Elementos de la microbiología veterinaria*. México: Acribia; 2003.
28. Bojesen AM, Torpgahl M, Christensen H, Olsen JE, Bisgaard M. Genetic diversity of *Gallibacterium anatis* Isolates from different chicken flocks. *J Clin Microbiol* 2003;41(6):2737-2740.
29. Tegtmeier C, Angen O, Ahrens P. Comparison of bacterial cultivation, PCR, *in situ* hybridization and immunohistochemistry as tools for diagnosis of *Haemophilus somnus pneumonia* in cattle. *Vet Microbiol* 2000;76(4):385-394.
30. Bojesen AM, Vázquez ME, Bager RJ, Ifrah D, González C, Aarestrup FM. Antimicrobial susceptibility and tetracycline resistance determinant genotyping of *Gallibacterium anatis*. *Vet Microbiol* 2011;148:105-110.
31. Bojesen AM, Bager RJ, Ifrah D, Aarestrup FM. The rarely reported tet (31) tetracycline resistance determinant is common in *Gallibacterium anatis*. *Vet Microbiol* 2011;149:497-499.