



SUSCEPTIBILIDAD A ANTIMICROBIANOS EN *Haemophilus paragallinarum* AISLADOS DE AVES COMERCIALES

Alfredo Mendoza^{1,2}, Ysabel Koga² y Amparo I. Zavaleta¹

¹Laboratorio de Biología Molecular, Facultad de Farmacia y Bioquímica. UNMSM.

²Departamento de Investigación y Desarrollo, Bioservice SRL.

RESUMEN

La Coriza Infecciosa (CI), enfermedad de las vías respiratorias superiores de aves comerciales, es causada por *Haemophilus paragallinarum*, prevenida mediante vacunas y combatida con una gama de antimicrobianos. Con el objetivo de determinar la sensibilidad de los antimicrobianos más utilizados en el tratamiento de la CI se utilizaron 19 cepas de *H. paragallinarum* aisladas de gallinas reproductoras ponedoras y pollos de carne con síntomas típicos de CI provenientes de diferentes regiones avícolas del Perú, se determinaron las concentraciones mínimas inhibitorias al trimetoprim, sulfametoxazol, amoxicilina, gentamicina y enrofloxacin mediante el método de microdilución recomendado por el National Committee for Clinical Laboratory Standards. Todas las cepas de *H. paragallinarum* fueron resistentes al sulfametoxazol; asimismo, presentaron susceptibilidad intermedia y resistencia al trimetoprim, trimetoprim-sulfametoxazol, gentamicina y amoxicilina, no obstante, todas fueron sensibles a la enrofloxacin.

Palabras claves: *Haemophilus paragallinarum*, Coriza Infecciosa, susceptibilidad antimicrobiana, enrofloxacin, sulfametoxazol, trimetoprim.

ABSTRACT

Infectious Coriza (IC) is a disease of the upper respiratory tract of commercial birds, is caused by *Haemophilus paragallinarum*, prevented through vaccines and treated by several antimicrobials. With the objective of determining the sensitivity of most used-anti Infectious Coriza antimicrobials, nineteen strains of *H. paragallinarum* isolated from beeders layer hens and broiler chickens with typical symptoms of IC, from different avian regions of Peru were used. The minimal inhibitory concentrations to trimethoprim, sulfamethoxazole, amoxicillin, gentamicin and enrofloxacin were determined through the microdilution method recommended by the National Committee for Clinical Laboratory Standards. All strains of *H. paragallinarum* were resistant to sulfamethoxazole; intermediate sensitivity and / or resistant to trimethoprim and trimethoprim-sulfamethoxazole, gentamicin and amoxicillin, but sensible to enrofloxacin.

Key words: *Haemophilus paragallinarum*, Infectious Coriza, Antimicrobial sensitivity, Enrofloxacin, Sulfamethoxazole, Trimethoprim.

INTRODUCCIÓN

Haemophilus paragallinarum es el agente etiológico de la Coriza Infecciosa (CI), una enfermedad de las vías respiratorias superiores de gallinas reproductoras, ponedoras y pollos de carne (*Gallus gallus*), que se caracteriza por producir secreción nasal, estornudo e inflamación facial. La enfermedad se encuentra difundida mundialmente y causa

importantes pérdidas económicas en el sector avícola, debido al retraso del crecimiento, pérdida de peso, aumento del número de aves eliminadas, y disminución de la producción de huevos en gallinas de postura del 10% al 40% (1, 2, 3).

Las fallas en los programas de vacunación, la baja protección de las vacunas importadas debido a que no atienden a la variabilidad genética que

pueda manifestarse en todas las cepas de *H. paragallinarum* de diferentes regiones, el hacinamiento de las aves, la escasa ventilación en las granjas o galpones y el uso de aguas sin tratamientos previos son factores que diseminan esta bacteria, constituyendo un peligro para la avicultura. En el Perú hay un consumo de productos avícolas, con poblaciones que superan los 295 000 000 en pollos de carne, 10 000 000 en gallinas de postura y 2 600 000 en reproductoras distribuidos en 7 zonas de producción avícola nacional por año (4).

Los antimicrobianos que son utilizados para tratar la Coriza Infecciosa, tales como las sulfonamidas, trimetoprim en combinación con quinolonas (5), también son usados en la alimentación de las aves como profilácticos, significando un gran desafío para la bacteria, desafío que puede superarlo con la adquisición y diseminación de una variedad de determinantes genéticos de resistencia a diferentes regiones y países (6, 7), tal como describe Soriano y col. en México (4) y Poernomo y col. en Indonesia (8).

En el presente trabajo se estudia el grado de susceptibilidad antimicrobiana en 19 cepas de *H. paragallinarum* aisladas de aves comerciales provenientes de diferentes regiones del país a fin de desarrollar estrategias para su control.

MATERIAL Y MÉTODOS

Material Biológico

Se utilizó *H. paragallinarum* ATCC 29545 como cepa de referencia y 19 cepas de *H. paragallinarum* aisladas de gallinas reproductoras, gallinas de posturas y pollos de carne con síntomas corizoides de granjas de diversas zonas avícolas del Perú durante los años 2001 y 2002 (Tabla N.º 1).

Medios de cultivo

Se utilizaron los medios agar chocolate conteniendo 5 % de sangre de ovino desfibrinada, e Infusión cerebro corazón (BHI) modificado, a ambos medios se les añadió NADH estéril para una concentración final de 0.0025 % (w/v).

Tabla N.º 1. Cepas de *Haemophilus paragallinarum* aisladas de aves comerciales según origen de procedencia y fecha de aislamiento

Nombre	Fecha de aislamiento	Zona geográfica	Tipo de ave
Hpg-01	Ene-2001	Trujillo	Gallinas de postura
Hpg-02	Feb-2001	Huacho	Gallinas reproductoras
Hpg-03	Mar-2001	Cañete	Gallinas de postura
Hpg-04	Mar-2001	Chincha	Pollos de carne
Hpg-05	Abr-2001	Ate-Vitarte	Gallinas de postura
Hpg-06	May-2001	Iquitos	Pollos de carne
Hpg-07	Jul-2001	Huacho	Pollos de carne
Hpg-08	Jul-2001	Ate-Vitarte	Gallinas de postura
Hpg-09	Ago-2001	Ate-Vitarte	Gallinas de postura
Hpg-10	Ago-2001	Ate-Vitarte	Gallinas de postura
Hpg-11	Nov-2001	Iquitos	Pollos de carne
Hpg-12	Feb-2002	Pacasmayo	Gallinas reproductoras
Hpg-13	Mar-2002	Ate-Vitarte	Gallinas de postura
Hpg-14	Mar-2002	Ate-Vitarte	Gallinas de postura
Hpg-15	Mar-2002	Chancay	Pollos de carne
Hpg-16	May-2002	Puente Piedra	Gallinas de postura
Hpg-17	Nov-2002	Trujillo	Gallinas de postura
Hpg-18	Nov-2002	Trujillo	Gallinas de postura
Hpg-19	Dic-2002	Cañete	Gallinas de postura

Preparación de los antimicrobianos.

Se prepararon soluciones concentradas de sulfametoxazol, trimetoprim, trimetoprim-sulfametoxazol, gentamicina, enrofloxacin y amoxicilina en el solvente apropiado para cada antimicrobiano a una concentración de 5.12 mg/ml (solución stock). Luego se esterilizó por filtración y se repartió en tubos de 0.65 ml para su conservación a - 20 °C. A partir de las soluciones stock se prepararon soluciones seriadas desde 256 µg/ml hasta 0.250 µg/ml empleando el criterio de Ericsson y Sherris; y según el NCCLS (National Committee for Clinical Laboratory Standards) (8, 9). Para un mejor cálculo de las diluciones se diseñó una tabla en el programa Microsoft-Excel (Tabla N.º 2).

Tabla N.º 2. Preparación de diluciones de los antimicrobianos modificado de García Rodríguez y col. (10).

Dilución	[Inicial] ug/ml	Stock (µl)	BHI* (µl)	[Final] µg/ml
1	5120	1	9	512.000
2	512	1	1	256.000
3	512	1	3	128.000
4	512	1	7	64.000
5	64	1	1	32.000
6	64	1	3	16.000
7	64	1	7	8.000
8	8	1	1	4.000
9	8	1	3	2.000
10	8	1	7	1.000
11	1	1	1	0.500
12	1	1	3	0.250
13	1	1	7	0.125

BHI, Brain Heart Infusion

Preparación del inóculo.

Se suspendieron cultivos de 24 a 36 horas en solución fisiológica estéril, luego se ajustó a una turbidez equivalente al 0,5 de la escala de Mac Farland (10^8 UFC/ml). La dilución del inóculo final fue de 1:100 utilizando como diluyente el medio infusión cerebro corazón modificado.

Determinación de la Concentración Mínima Inhibitoria (MIC).

Se mezclaron 50 µl de cada dilución de los antimicrobianos con 50 µl del inóculo final en los pocillos de fondo redondo de la microplaca, de este modo se obtuvieron diluciones seriadas de los

antimicrobianos de 128 µg/ml hasta 0.125 µg/ml, con un inóculo de 5×10^4 UFC/pocillo; asimismo se hicieron controles para el inóculo, el medio de cultivo y los antimicrobianos. Las microplacas fueron selladas e incubadas a 37 °C por 20 horas en una cámara de microaerofilia. La MIC fue registrada como la concentración más baja que inhibió completamente de forma visual el crecimiento bacteriano.

Susceptibilidad a los antimicrobianos. Para determinar la susceptibilidad de *H. paragallinarum* a los antimicrobianos se empleó el criterio C de Blackall y col. 1989, que consiste en lo siguiente: sensibilidad (S) < 4 µg/ml, sensibilidad intermedia (SI) = 8 µg/ml y resistencia (R) > 8 µg/ml (11).

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

El uso inadecuado de los antimicrobianos en los animales de consumo humano puede afectar la salud de las personas por la presencia de residuos de fármacos en los alimentos; y especialmente por el incremento de bacterias resistentes en los animales (7). No se ha descrito que *H. paragallinarum* sea patógeno para el hombre, pero una vez ingresado al organismo humano por consumo de alimentos contaminados, puede transferir sus genes de resistencia a microorganismos de la flora nativa (6, 7).

En la Tabla N.º 3 se puede observar que las cepas de *H. paragallinarum* presentan resistencia a los diferentes antimicrobianos analizados, a excepción de la enrofloxacin para la cual fueron todas sensibles. Las MICs obtenidas están entre 32 µg/ml y 128 µg/ml, destacando la resistencia al sulfametoxazol que fue el 100%. La MIC y el porcentaje de resistencia a los diferentes antimicrobianos estudiados se asemeja a los obtenidos en México por Soriano y col. 2001, quienes estudiaron la sensibilidad de 22 cepas de *H. paragallinarum* a 10 antimicrobianos de uso frecuente mediante el método de microdilución; y encontraron que todas las cepas aisladas y las de referencia son resistentes a las sulfas (MIC > 128 µg/ml), mientras la oxitetraciclina, gentamicina, fosfomicina, amoxicilina y trimetoprim mostraron sensibilidad, sensibilidad intermedia y resistencia; todas las cepas estudiadas fueron sensibles a la enrofloxacin (4). Sin embargo, en Indonesia, Poernomo y col. (2000) estudiaron en 18 cepas de *H. paragallinarum* la susceptibilidad a los antimicrobianos por el método de antibiograma disco-placa encontrando cepas resistentes a neomicina,

eritromicina, estreptomina; y sensibles a ampicilina y sulfametoxazol (8). Estas diferencias en los resultados se deberían en parte a la procedencia de las cepas aisladas, así como a los diferentes métodos empleados para determinar la susceptibilidad.

El método de microdilución en caldo resultó ser confiable y reproducible para la determinación de la susceptibilidad, la cual debería estar presente en la toma de decisiones para un adecuado uso de los antimicrobianos en aves comerciales. Mediante este método se obtuvo que las cepas de *H. paragallinarum* aisladas de diferentes regiones avícolas del Perú son resistentes al sulfametoxazol;

asimismo mostraron susceptibilidad intermedia y resistencia al trimetoprim, trimetoprim-sulfametoxazol, amoxicilina y gentamicina, limitando el tratamiento de la CI a los antibióticos más recientes como la enrofloxacin.

El conocimiento del grado de susceptibilidad de *H. paragallinarum* a los antimicrobianos, así como la identificación de los mecanismos moleculares de resistencia a los antimicrobianos de primera elección usados para el tratamiento permitirá tomar medidas correctivas, dar un tratamiento adecuado y hacer un mejor uso de los antimicrobianos en las aves, huevos y subproductos destinados al consumo humano.

Tabla 3. Prueba de susceptibilidad a antimicrobianos en *H. paragallinarum* aislados de aves comerciales

Antimicrobianos	MIC $\mu\text{g/ml}$ (% de cepas)	Susceptibilidad	% Resistencia
SULFAMETOXAZOL	> 128 (94,7)	R	100,0
	128 (5,3)	R	
TRIMETOPRIM	> 128 (42,1)	R	78,9
	128 (21,1)	R	
	64 (5,2)	R	
	32 (10,5)	R	
	4 (21,1)	SI	
TRIMETOPRIM-SULFAMETOXAZOL	128 (57,8)	R	73,6
	32 (15,8)	R	
	4 (26,4)	SI	
AMOXICILINA	64 (15,8)	R	42,1
	32 (26,3)	R	
	4 (57,9)	SI	
GENTAMICINA	64 (21,1)	R	84,2
	32 (36,8)	R	
	16 (26,3)	R	
	4 (15,8)	SI	
ENROFLOXACINA	2 (31,6)	S	0,0
	1 (68,4)	S	

R, resistencia; SI, sensibilidad intermedia; S, sensibilidad.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Blackall P. J. (1999). Infectious Coryza: Overview of the Diseases and New Diagnostic Options. *Clinical Microbiology Reviews* 12: 627-632.
2. Blackall P. J. y Yamamoto R. (1997). Infectious coryza. A laboratory manual for the isolation and identification of avian pathogens (Eds. Purchase H. G., Arp L. H., Domermuth C. H. and Pearson J.E.). American Association of Avian Pathologists, Ames, pp 27-31. Philadelphia.
3. Terzolo H. R. (2000). Revisión sobre Coriza Infecciosa: propuestas para su diagnóstico y control. *Medicina Veterinaria* 8: 262-269.
4. Ministerio de Agricultura del Perú. (2003). Estadísticas. *Mundo Avícola y Porcino* 47: 51-54.
5. Soriano V. E., Velásquez Q. E., Vera N. A., Salado C. R. y Fernández R. P. (2001). Susceptibilidad in vitro de *Haemophilus paragallinarum* a varios antimicrobianos. *Patología y Sanidad* p. 524-528.
6. Rice L. B. and Bonomo R. A. (1996). Genetic and Biochemical Mechanisms of Bacterial Resistance to Antimicrobial Agents. *Antibiotics in Laboratory Medicine*. Lorian V. 4 Edition. Edit. Williams. New York.
7. Organización Mundial de la Salud. (2001). Estrategia mundial de la OMS para contener la resistencia a los antimicrobianos. *Boletín WHO/CDS/CSR/DRS/2001.2*. Suiza.
8. Poemomo S., Sutarma, Rafiee M. and Blackall P. J. (2000). Characterization of isolates of *Haemophilus paragallinarum* from Indonesia. *Australian Veterinary Journal*. 78: 759-762.
9. National Committee for Clinical Laboratory Standards. (2000). Methods for Antimicrobial Susceptibility Testing of Anaerobic Bacteria. Approved Standard, M2-A7. NCCLS, Wayne, PA.
10. García-Rodríguez J. A., Canton R., García-Sánchez J. E., Gomez-Luz M. L., Martínez-Martínez L., Rodríguez-Avial C. y Vila J. (2000). Métodos básicos para el estudio de la sensibilidad a los antimicrobianos. Procedimientos en microbiología clínica recomendaciones de la Sociedad Española de Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica. SEIMC. Madrid.
11. Blackall P. J., Eaves L. E. and Rogers D. G. (1989). Biotyping of *Haemophilus paragallinarum* isolates using hemagglutinin serotyping, carbohydrate fermentation patterns, and antimicrobial drug resistance patterns. *Avian Diseases* 33: 491-496.