

**UNIVERSIDAD NACIONAL MAYOR DE SAN MARCOS**

FACULTAD DE FARMACIA Y BIOQUÍMICA

UNIDAD DE POSGRADO

**“Variabilidad genética de cepas de *gallibacterium anatis* aisladas  
de aves comerciales con infecciones respiratorias”**

TESIS

Para optar el Grado Académico de Magister en Microbiología

AUTOR

Karina Fabiola Mendoza Arias

ASESOR

Dra. Amparo Zavaleta Pesantes

Lima – Perú

2014

## INDICE

AGRADECIMIENTO	2
DEDICATORIA	3
RESUMEN	4
ABSTRACT	5
I. INTRODUCCION	6
II. MARCO TEORICO	8
III. MATERIALES Y METODOS	12
IV. RESULTADOS	18
V. DISCUSION	32
VI. CONCLUSIONES	35
VII. REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS	36
ANEXOS	

## **AGRADECIMIENTO**

Dr. Robert Tinoco

Dra. Ysabel Koga

Dr. Arnaldo Alvarado

Dra. Amparo Zavaleta

Dr. Jorge Rodríguez

Mis más profundos agradecimientos a ustedes por su apoyo, ejemplo y motivación para la realización de este trabajo, además por sus valiosos consejos y por ayudarme incondicionalmente con sus experiencias y conocimientos.

## DEDICATORIA

A Dios creador de todas las cosas  
por ser mi camino, verdad y vida.

A mis padres Alicia y Ángel por su cariño y comprensión.

A mis hermanos Claudia y Kevin por su alegría.

A Jorge mi compañero eterno por su paciencia y amor.

A mi bebe querido Christopher a quien llevo en el corazón.

A mi hijo amado Fabrizio que nos ha traído tanto gozo y felicidad a su padre y a mi.

## RESUMEN

El propósito de este estudio fue determinar la variabilidad genética de cepas de *Gallibacterium anatis* aisladas en aves comerciales del Perú. El trabajo experimental consistió en aislar *Gallibacterium anatis* de muestras clínicas de aves comerciales con sintomatología respiratoria desde el 2007 al 2011, y caracterizarlos mediante pruebas bioquímicas. Se obtuvieron 96 cepas de *G. anatis*. Luego, se identificaron mediante técnicas moleculares y se determinó la variabilidad genética de estas cepas de *G. anatis* mediante ERIC-PCR. Los resultados demostraron que existen 10 biovares circulando en el Perú los cuales son en un 45,83 % del biovar 4, 12,50 % del Biovar 1, 11,45 % del Biovar 3, 7,30 % del Biovar 11, 6,25% del Biovar NI, 4,17% del Biovar 12, 15 y 20 cada uno, y 2,08 % del Biovar 19 y 24 cada uno. El mayor porcentaje de aislados de *G. anatis* y de biovares se encontró en Lima en 64,58 %, La Libertad 28,13 % y en menor porcentaje Ica, Arequipa, Ucayali y Madre de Dios.

Palabras Clave: Variabilidad genética, *Gallibacterium anatis*, Aves comerciales, ERIC-PCR, Biovares, Peru.

## ABSTRACT

The purpose of this study was to determine the genetic variability of strains of *Gallibacterium anatis* isolated in poultry of Peru. The experimental work was to isolate from clinical samples *Gallibacterium anatis* commercial poultry with respiratory symptoms from 2007 to 2011, and characterized by biochemical tests. 96 strains were obtained of *G. anatis*. Then, they were identified by molecular techniques and determined their genetic variability of these strains of *G. anatis* by ERIC-PCR. The results showed that there are 10 biovars circulating in Peru which are in a 45,83% of biovar 4, 12,50% of biovar 1, 11,45% of biovar 3, 7,30% of biovar 11, 6,25% of biovar NI, 4,17% of biovar 12, 15 and 20 each, and 2,08% of biovar everyone 19 and 24. The higher number of isolates of *G. anatis* and biovars was found in 64,58% in Lima, La Libertad 28,13% and a lesser percentage in Ica, Arequipa, Ucayali and Madre de Dios.

Key words: Genetic Variability, *Gallibacterium anatis*, Commercial poultry, ERIC –PCR, Biovars, Peru.

## I. INTRODUCCION

En el sector avícola, las enfermedades infecciosas, principalmente las del sistema respiratorio, representan uno de los mayores problemas de sanidad animal con niveles de morbilidad y mortalidad entre 10 y 50 %.

Los agentes infecciosos comprometidos en las enfermedades respiratorias se pueden clasificar en virales y bacterianas. Dentro de los virus están *Paramixovirus*, *Coronavirus*, *Herpesvirus*, *Metapneumovirus*, *Influenzavirus A* y en las bacterias se describen *Avibacterium paragallinarum*, *Ornithobacterium rhinotracheale*, *Pasteurella multocida*, *Gallibacterium anatis*, *Mycoplasma gallisepticum* y *Escherichia coli* (agente oportunista), entre otras.

Los agentes infecciosos presentan signos clínicos comunes tales como: fluido óculo nasal, ojos con un aspecto almendrado, conjuntivitis y edema facial e intermandibular o hipertrofia de senos infraorbitarios; los cuales dificultan la identificación del agente patógeno responsable.

*G. anatis* es un cocobacilo, Gram negativo frecuentemente aislado de muestras clínicas de aves con infecciones respiratorias superiores. El mayor número de casos de *G. anatis* se han reportado en Dinamarca y Alemania. En Perú, no existe un estudio sistematizado de las cepas y de los biovares circulantes que afectan a las aves comerciales.

Este trabajo permite conocer la epidemiología de *G. anatis* y nuevas técnicas diagnósticas para su caracterización, así como la elaboración de programas efectivos de sanidad aviar en los cuales se consideren cepas endémicas de los principales departamentos de producción avícola de Perú.

Por ello:

El objetivo principal del presente trabajo es determinar la variabilidad genética de cepas de *Gallibacterium anatis* aisladas de aves comerciales con infecciones respiratorias.

Los objetivos específicos fueron:

1. Aislar *Gallibacterium anatis* de muestras clínicas de aves mediante técnicas bacteriológicas tradicionales.
2. Determinar la susceptibilidad antimicrobiana de *Gallibacterium anatis*.
3. Identificar los aislados de *Gallibacterium anatis* mediante técnicas bioquímicas y moleculares.
4. Determinar la variabilidad genética de las cepas de *Gallibacterium anatis* aislados mediante ERIC-PCR.



## II. MARCO TEORICO

*Gallibacterium anatis* es un cocobacilo, Gram negativo, inmóvil, encapsulado, no esporulado, pleomórfico, mesófilo y anaerobio facultativo o microaerófilo, crece satisfactoriamente en agar sangre de ovino al 5 % y en otros medios de cultivo enriquecidos con sangre, *G. anatis* muestra tolerancia a las sales biliares presentes en el agar MacConkey donde crece formando colonias rojas con morfología en “punta de alfiler”. Además, *G. anatis* es catalasa y oxidasa positivos, ureasa, indol y ornitina descarboxilasa negativo, también reduce los nitratos a nitritos (1 - 8).

*G. anatis* pertenece al orden *Pasteurellales*, familia *Pasteurellaceae* y género *Gallibacterium*. La familia *Pasteurellaceae* es muy heterogénea, presenta controversia en cuanto a su clasificación taxonómica. Actualmente, la familia *Pasteurellaceae* comprende 13 géneros según la “*Formerly List of Bacterial names with Standing in Nomenclature*”, estos son: *Actinobacillus*, *Aggregatibacter*, *Avibacterium*, *Bibersteinia*, *Gallibacterium*, *Haemophilus*, *Histophilus*, *Lonepinella*, *Mannheimia*, *Nicoletella*, *Pasteurella*, *Phocoenobacter* y *Volucribacter* (2, 9 – 15).

El género *Gallibacterium*, comprende una sola especie, *G. anatis* y dos *genomospecies*, representa a bacterias previamente reportadas como *Actinobacillus salpingitidis*, *Pasteurella haemolytica aviar* y *P. anatis*. Kjos-Hanssen (1950) publicó el primer trabajo sobre esta bacteria, que probablemente representa el organismo posteriormente nombrado *Gallibacterium*, él aisló *Pasteurella hemolítica* causante de una peritonitis y salpingitis. Desde entonces, varios autores han publicado trabajos sobre lo que presumiblemente es *Gallibacterium* pero con otros nombres (3, 12, 13).

En 1982, Bisgaard descubrió la existencia de un grupo taxonómico, denominado *Gallibacterium*, con características fenotípicas comunes a cepas clasificadas como *A. salpingitidis* y *P. haemolytica aviar*. En esta etapa, la

caracterización se realizó utilizando métodos fenotípicos, que no permitieron establecer una relación filogenética. Sin embargo, después del análisis de hibridación ADN-ADN de cepas de *A. salpingitidis* y *P. haemolytica* aviar evidenciaron un género-común confirmándose con el análisis de secuencias del ARNr 16 S, que *P. anatis* y *A. salpingitidis* forman un género (3, 5-7, 9-15).

Cepas de *Gallibacterium* se han reportado en países de Europa, África, Asia y América. En la mayoría de los casos, esta bacteria fue aislada de aves comerciales, sin embargo, también se ha reportado su presencia en aves domésticas y silvestres tales como: pavos, gansos, patos, faisanes, perdices, garzas, etc. (2-4, 6, 7, 9-19).

*G. anatis* presenta factores de virulencia como exopolisacáridos cápsulares, metaloproteasas que degradan a las inmunoglobulinas A y G, citotoxinas que destruyen los macrófagos alveolares y otros leucocitos. Esta bacteria causa infecciones sistémicas que afectan a múltiples órganos por lo que se ha aislado de infecciones mixtas de un amplio rango de lesiones patológicas de las vías respiratorias superiores y del tracto genital de aves domésticas y silvestres (3, 4, 6, 7, 9-20).

Las condiciones de cultivo de algunas bacterias como *G. anatis* pueden influir en la expresión de ciertos caracteres fenotípicos disminuyendo la reproducibilidad de éstos en la identificación de *G. anatis*. Además, *Manheimia haemolytica* o *Pasteurella pneumotropica* presenta aspecto macroscópico, microscópico y características bioquímicas similares a *Gallibacterium*. La clasificación fenotípica mediante el empleo exclusivo de azúcares ha sido cuestionada, ya que los patrones de utilización no son consistentes en la determinación de la subespecie. Sin embargo, es fundamental para una identificación preliminar y para clasificar los aislados en biovares y subespecies (3, 2, 17, 19, 20).

En un inicio, el sistema de clasificación para estos microorganismos fue mediante el sistema de Jaworski et al (1998) modificado, se detectaron 7 biogrupos de *G. anatis* en México. Sin embargo, el sistema de identificación diseñado por el Prof. Bisggard de "The Royal Veterinary and Agricultural

University” (Dinamarca) y publicado parcialmente por Christensen et al (2003) permitió la clasificación de la especie. Este sistema se fundamenta en la detección de variantes bioquímicos (biovares); con estas pruebas se determinaron 24 biovares, en vez de 13 biogrupos descritos por Jaworski. Así, la subespecie *haemolytica* comprende los biovares 1-4, 6, 7, 10-24 la subespecie *anatis* el biovar Pa, la *genomoespecie 1* el biovar 5 y 8, y la *genomoespecie 2* el biovar 9, en este estudio los investigadores aislaron 37 cepas de *G. anatis* e identificaron los biovares 1, 3 - 5, 8, 9, 11, 12, 15, 17 - 20, 22, 24, Pa y Uc siendo quince biovariedades hemolíticas y dos no hemolítico (Pa y Uc) (2, 19, 20).

A nivel molecular para la caracterización de *Gallibacterium* se han utilizado diferentes técnicas tales como:

**Análisis de restricción de plásmidos.** Técnica basada en la purificación y separación de plásmidos mediante electroforesis en gel de agarosa. Esta técnica es sencilla y económica, pero tiene una aplicación limitada en estudios epidemiológicos, ya que no todos los aislados de *Gallibacterium* poseen plásmidos y, además, algunos los pueden perder en pasajes sucesivos (2, 8, 10-12, 17, 21).

**Ribotipado.** Los fragmentos de ADN obtenidos por REA son transferidos a una membrana e hibridados con una sonda de ADN, correspondiente a las moléculas de los genes del ARNr 16S o 23S. Según algunos autores, de escaso poder discriminatorio y poco valor en estudios epidemiológicos (2, 8, 10-12, 17, 21).

**REP-PCR** (*Repetitive Extragenic Palindromic PCR*). Esta técnica está basada en la amplificación de elementos palindrómicos extragénicos repetitivos dentro del genoma bacteriano. Posee mejor poder discriminatorio que ribotipado, RAPD-PCR y REA (2, 8, 10-12, 17, 21).

**ERIC-PCR** (*Enterobacterial Repetitive Intergenic Consensus PCR*). Mediante este procedimiento se obtiene un patrón de bandas, tras amplificar secuencias repetitivas intergénicas de consenso (2, 8, 10-12, 17, 21).

**PFGE** (*Pulsed Field Gel Electrophoresis*). Técnica que se basa en la comparación de patrones de bandas generadas después de la digestión enzimática de todo el genoma bacteriano tras someterlo a una electroforesis multidireccional. De todas las técnicas moleculares PFGE es considerada como el *gold standard* para el estudio molecular de *la familia Pasteurellaceae* (2, 8, 10-12, 17, 21).

### **III. MATERIALES Y METODOS**

#### **3.1. Recolección de Muestras Biológicas**

Se utilizaron muestras clínicas de pollos de carne, gallinas de postura, gallinas reproductoras y gallos de pelea con enfermedades respiratorias provenientes de granjas de La Libertad, Lima, Ica, Arequipa, Madre de Dios y Ucayali. Además, se utilizaron cepas de *G. anatis* aisladas de muestras clínicas desde el 2007 al 2011, guardadas en glicerol a  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$  y liofilizadas (Anexo 1).

#### **Lugar de ejecución**

La investigación se realizó en Bioservice S.R.L., empresa dedicada al diagnóstico veterinario, ubicada en el distrito de Villa María del Triunfo, Lima.

#### **3.2 Análisis microbiológico**

Se recolectaron las secreciones nasales de las aves en frascos estériles, luego las aves con enfermedades respiratorias fueron sacrificadas y colocadas sobre bandejas, se flameó cabeza y cuello y se tomaron muestras de las barbillas, senos infraorbitarios y tráquea para hisoparlas. Asimismo, se recolectaron muestras de las cavidades torácica y abdominal, se hisoparon pulmones y sacos aéreos; y se hicieron improntas de hígado y ovario. Los hisopados e improntas fueron sembrados en placas de agar sangre de ovino al 5 % (utilizando campanas de microaerobiosis), paralelamente se sembraron en agar MacConkey; y se incubaron a  $37\text{ }^{\circ}\text{C}$  de 24 a 48 horas. A cada aislado se le asignó un código y se elaboró una ficha, donde se registró la historia clínica del caso y el análisis anatomopatológico (Anexo 2, 3 y 4).

De cada placa se seleccionaron 5 colonias de similares características, se les realizó 3 pasajes sucesivos para estabilizar el cultivo. Luego se les asignó un código de acuerdo a la muestra clínica.

### **Análisis macroscópico**

Se observaron las características macroscópicas de las colonias tales como: tamaño, color, consistencia, forma y relieve. Además, se determinó el grado de hemólisis (Anexo 5).

### **Análisis microscópico**

Las colonias que presentaron similitud macroscópica con la cepa de referencia se sometieron a la coloración Gram con la finalidad de determinar dimensiones, morfología y bipolaridad de las bacterias. Luego, se realizaron pruebas de oxidasa, catalasa, indol, ureasa y pruebas bioquímicas con varios carbohidratos. Las cepas con características similares a *G. anatis*, se conservaron liofilizadas y en glicerol a -20 °C (Anexo 6).

### **Análisis bioquímico**

Se preparó el medio basal con peptona 1 g, NaCl 0,5 g, purpura de bromocresol al 1% 0,5 ml, agua destilada 100 mL, se ajustó el pH a 6,8 con NaOH 1 N. En un frasco de vidrio se mezclaron los componentes y se autoclavó la solución final, luego se incubó por 24 a 48 horas a 37 °C para determinar la esterilidad del medio.

Se utilizó los carbohidratos arabinosa, xilosa, inositol, sorbitol, maltosa, trealosa y dextrina. Para la preparación de cada uno de ellos, se pesó 20 g del azúcar y se añadió agua destilada estéril hasta 100 mL. Luego se filtró en membranas de acetato de celulosa de 0,22 µm y se conservó en refrigeración.

Se tomó una colonia del aislado a tipificar y se sembró en 2 mL de caldo nutritivo, a las mismas condiciones de cultivo antes mencionadas. Para cada prueba se utilizaron 7 micro-tubos estériles colocados en una gradilla de tecnopor, a cada uno de ellos se agregaron secuencialmente 200 µL del medio basal, 10 µL de un carbohidrato y 10 µL del inóculo. Adicionalmente, se utilizó un micro-tubo conteniendo medio basal para que sirva como control negativo.

La gradilla con los micro-tubos fue colocada sobre un paño de papel toalla humedecido con agua destilada estéril y colocada dentro de una bolsa plástica transparente, luego se introdujo en la estufa a 37 °C por 24 a 48 horas con la finalidad de crear un microambiente propicio para el proceso de fermentación. Transcurrido el período de incubación, se consideró una reacción positiva si la solución fue de coloración amarilla y negativa si fue púrpura.

La tipificación se realizó utilizando una tabla que relaciona las biovariedades de *G. anatis* con los resultados de la fermentación de los carbohidratos (Anexo 12).

### **Sensibilidad antimicrobiana**

Se determinó mediante el método de difusión en agar sangre al 5 % con discos de sensibilidad JAMPAR (Industria Peruana) con los siguientes antimicrobianos: Florfenicol 30 µg, Fosfomicina 50 µg, Amoxicilina 20 µg, Ciprofloxacina 5 µg, Enrofloxacin 5 µg, Doxicilina 30 µg, Norfloxacina 10 µg, Espectinomicina 100 µg, Sulfatrimetropin 1,25/23,75 µg.

Las placas de agar sangre fueron preparadas con el inóculo, luego se colocaron los discos de antimicrobianos; se incubaron durante 24 a 48 horas a 37 °C. Después, se leyeron los resultados midiendo el diámetro de los halos de inhibición del crecimiento que aparecen alrededor de los discos de papel. Finalmente se interpretó según NLCL asignando la condición de sensible, intermedio o resistente (Anexo 7).

### 3.3 Análisis Molecular

#### Extracción del ADN genómico

Todas las cepas liofilizadas fueron reactivadas en caldo nutritivo por 3 h y sembradas en agar sangre por 24 h. El ADN genómico fue extraído mediante el método de saltingout modificado utilizando el kit “*Wizard Genomic DNA isolation*” (PROMEGA) acorde con lo descrito por el fabricante y que se describe a continuación: una colonia bacteriana se colocó en un tubo conteniendo 600 µL de solución de lisis nuclear. Luego, se mezcló y se incubó a 80 °C por 15 min, se transfirió inmediatamente a 4 °C por 5 min. Se adicionaron 3 µL de RNasa e incubaron a 37 °C por 30 min. Después, se transfirió a 4 °C por 5 min, se adicionaron 300 µL de buffer de precipitación, el ADN se separó por centrifugación, el precipitado se lavó con etanol al 70 % y finalmente, el ADN se disolvió con 100 µL de TE (Tris, EDTA) 1X y se conservó a – 20 °C.

Los ADN extraídos se separaron por electroforesis en gel de agarosa al 1 % en buffer TBE 0,5 X (Tris, Borato, EDTA). Luego, se tiñeron con una solución de bromuro de etidio (0,5 µg /ml), y fotografiaron utilizando un transiluminador de luz ultravioleta (Anexo 8).

#### Identificación molecular de *Gallibacterium sp.* mediante PCR

Se usaron los siguientes primers para la identificación molecular del género *Gallibacterium* diseñados a partir de la secuencia de los genes ribosómicos 16S y 23S de *Gallibacterium* descritos por Bojesen y Col 2007.

114r - 5´ - GGT TTC CCC ATT CGG - 3´

1133fgal - 5´ - TAT TCT TTG TTA CCA CCG G - 3´

La mezcla de reacción consistió de 20 µL que contenía buffer PCR 1X, dNTP 0,2 mM, MgCl<sub>2</sub> 1,5 mM, 5 pmol de cada iniciador, Ampli Taq ADN polimerasa 1 U y ADN genómico, 30 ng.



La reacción se realizó en un termociclador Veriti Thermal Cycler utilizando las siguientes condiciones:

- a. Desnaturalización inicial a 95 °C por 5 min.
- b. 35 ciclos de:
  - Desnaturalización a 94 °C por 30 s
  - Alineación a 55 °C por 1 min
  - Extensión a 72 °C por 2 min
- c. Una extensión final a 72 °C por 10 min

Los productos de PCR se separaron por electroforesis en gel de agarosa al 1 % en buffer TBE 0,5 X (Tris, Borato, EDTA). Se tiñó con una solución de bromuro de etidio (0,5 µg /ml) y se visualizó utilizando un transiluminador de luz ultravioleta (Anexo 8).

### **Tipificación molecular por ERIC – PCR**

Se amplificaron secuencias de ADN repetidos a partir del ADN genómico bacteriano para obtener un perfil genético de cada cepa. Se usaron los primers y condiciones de PCR descritas por Leotta y col., 2006 (22):

ERIC1R - 5´ - ATGTAAGCTCCTGGGGATTAC - 3´

ERIC2 - 5´ - AAGTAAGTGACTGGGGTGAGCG - 3´

La mezcla de reacción consistió de 20 µL y contenía buffer PCR 1X, dNTP 0,2 mM, MgCl<sub>2</sub> 3,5 mM , 10 pmol de cada iniciador, Ampli Taq ADN polimerasa 2 U y ADN genómico, 30 ng.

La amplificación se realizó en un termociclador Veriti Thermal Cycler (Applied Biosystems) utilizando las siguientes condiciones:

- d. Desnaturalización inicial a 95 °C por 3 min.
- e. 35 ciclos de:
  - Desnaturalización a 94 °C por 30 s
  - Alineación a 40 °C por 3 min
  - Extensión a 72 °C por 2 min
- f. Una extensión final a 72 °C por 7 min

Los productos de PCR se separaron por electroforesis en gel de agarosa al 1 % en buffer TBE 0,5 X (Tris, Borato, EDTA). Para determinar los tamaños de los fragmentos de ADN amplificados se utilizó el marcador de peso molecular 100 bp-plus (Fermentas). Los fragmentos de ADN fueron coloreados con bromuro de etidio (0,5 ug/mL) y se visualizaron utilizando un transiluminador de luz ultravioleta (Anexo 8).

La huella genética (ADN fingerprinting) obtenida de los productos de PCR amplificados fueron analizados mediante el programa Biodoc Analyze v2.2 (Biometra). Patrones de bandeo de ERIC-PCR fueron transformados a una matriz bidimensional utilizando el coeficiente de Jaccard y Dice mediante el programa FAMD v1.25 (Schlüter & Harris, 2006). El análisis de la variabilidad genética intra e interespecifica para las 96 cepas de *G. anatis* fue realizado empleando AMOVA y dendrogramas generados por el método UPGMA en base a una matriz de distancia genética y los programas FAMD v1.25 y Mega v5.0 (Tamura y col., 2011) (23 y 24).

#### IV. RESULTADOS

Desde el 2007 al 2011 se aislaron 96 cepas de *Gallibacterium anatis* a partir de pollos de carne, gallinas ponedoras y reproductoras procedentes de diferentes zonas del Perú (Tabla 1).

**Tabla 1.- Procedencia de las cepas de *Gallibacterium anatis* aisladas de aves comerciales con infecciones respiratorias.**

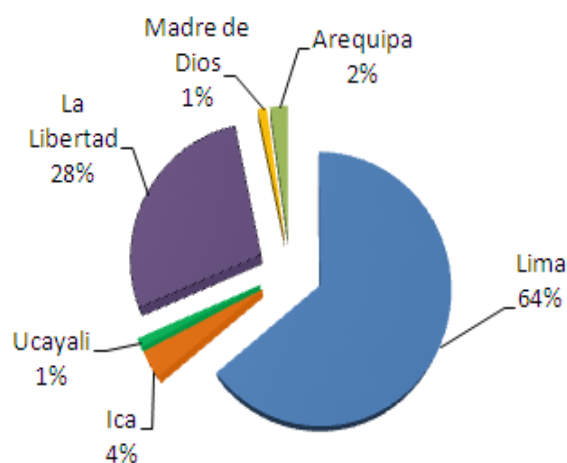
Nº CEPA	CODIGO	LUGAR	TIPO DE AVE	EDAD
1	023 – 07	Lima	pollo de carne	50 días
2	026 – 07	Lima	pollo de carne	35 días
3	038 – 07	La Libertad	gallina ponedora	28 sem
4	040 – 07	La Libertad	pollo de carne	28 días
5	060 - 07	Lima	gallina ponedora	44 sem
6	088 – 07	Lima	pollo de carne	38 días
7	088 – 07	Lima	pollo de carne	38 días
8	108 – 07	La Libertad	gallina ponedora	44 sem
9	110 - 07	Lima	pollo de carne	38 días
10	262 – 07	Lima	pollo de carne	23 días
11	343 – 07	Arequipa	pollo de carne	42 días
12	401 - 07	Lima	gallina ponedora	33 sem
13	054 - 08	Lima	gallina reproductora	28 sem
14	062 - 08	La Libertad	gallina ponedora	14 sem
15	088- 08	Lima	gallina ponedora	19 sem
16	126– 08	Lima	gallina ponedora	24 sem
17	154- 08	Madre de Dios	gallina reproductora	30 sem
18	158- 08	Lima	pollo de carne	28 días
19	249- 08	Ica	pollo de carne	42 días
20	267– 08	Lima	gallina reproductora	30 sem
21	281- 08	Lima	Gallo de Pelea	16 sem
22	296– 08	Lima	gallina ponedora	27 sem
23	320- 08	Lima	gallina ponedora	50 sem
24	336– 08	Lima	gallina ponedora	20 sem
25	531- 08	Lima	gallina ponedora	47 sem
26	551- 08	Arequipa	pollo de carne	50 días
27	565 - 08	Lima	gallina ponedora	12 sem
28	573- 08	Lima	gallina reproductora	33 sem
29	573- 08	Lima	gallina reproductora	33 sem
30	600 - 08	Lima	gallina ponedora	21 sem
31	204 - 09	La Libertad	gallina ponedora	53 sem
32	243 - 09	La Libertad	gallina ponedora	22 sem

33	<b>243 - 09</b>	<b>La Libertad</b>	gallina ponedora	22 sem
34	<b>284- 09</b>	<b>Lima</b>	gallina reproductora	30 sem
35	<b>295 - 09</b>	<b>Lima</b>	gallina ponedora	38 sem
36	<b>295 - 09</b>	<b>Lima</b>	gallina ponedora	58 sem
37	<b>320- 09</b>	<b>Lima</b>	gallina ponedora	50 sem
38	<b>352- 09</b>	<b>Lima</b>	gallina ponedora	19 sem
39	<b>352- 09</b>	<b>Lima</b>	gallina ponedora	8 sem
40	<b>360 – 09</b>	<b>La Libertad</b>	pollo de carne	30 días
41	<b>397 - 09</b>	<b>La Libertad</b>	pollo de carne	28 días
42	<b>432 - 09</b>	<b>Lima</b>	pollo de carne	23 días
43	<b>454- 09</b>	<b>Lima</b>	gallina ponedora	44 sem
44	<b>455 – 09 G-1</b>	<b>Lima</b>	gallina reproductora	35 sem
45	<b>455 – 09 G-3</b>	<b>Lima</b>	gallina reproductora	35 sem
46	<b>455 – 09 G-2</b>	<b>Lima</b>	gallina reproductora	35 sem
47	<b>474 – 09 G-3</b>	<b>Lima</b>	gallina reproductora	30 sem
48	<b>474 – 09 G-9</b>	<b>Lima</b>	gallina reproductora	30 sem
49	<b>474 – 09 G-10</b>	<b>Lima</b>	gallina reproductora	30 sem
50	<b>475- 09</b>	<b>Lima</b>	gallina reproductora	28 sem
51	<b>506 – 09</b>	<b>Lima</b>	pollo de carne	42 días
52	<b>506 – 09</b>	<b>Lima</b>	pollo de carne	42 días
53	<b>648 - 09</b>	<b>Lima</b>	pollo de carne	20 días
54	<b>008-10</b>	<b>Lima</b>	pollo de carne	35 días
55	<b>013-10</b>	<b>La Libertad</b>	pollo de carne	33 días
56	<b>063-10</b>	<b>Lima</b>	gallina ponedora	30 sem
57	<b>150 - 10</b>	<b>Lima</b>	pollo de carne	46 días
58	<b>174-10</b>	<b>Lima</b>	gallina ponedora	35 sem
59	<b>182 -10</b>	<b>Lima</b>	pollo de carne	47 días
60	<b>299-10</b>	<b>La Libertad</b>	gallina ponedora	16 sem
61	<b>302-10</b>	<b>Lima</b>	pollo de carne	46 días
62	<b>312-10</b>	<b>La Libertad</b>	pollo de carne	28 días
63	<b>362-10</b>	<b>La Libertad</b>	pollo de carne	30 días
64	<b>362-10</b>	<b>La Libertad</b>	pollo de carne	30 días
65	<b>363-10</b>	<b>La Libertad</b>	pollo de carne	33 días
66	<b>374-10</b>	<b>La Libertad</b>	gallina ponedora	9 sem
67	<b>467-10</b>	<b>La Libertad</b>	gallina ponedora	29 sem
68	<b>508 – 10</b>	<b>La Libertad</b>	pollo de carne	31 días
69	<b>536 - 10</b>	<b>La Libertad</b>	gallina ponedora	20 sem
70	<b>576-10</b>	<b>Lima</b>	gallina ponedora	19 sem
71	<b>641-10</b>	<b>La Libertad</b>	gallina ponedora	6 sem
72	<b>030-11</b>	<b>Ucayali</b>	pollo de carne	30 días
73	<b>044-11</b>	<b>La Libertad</b>	gallina ponedora	16 Sem
74	<b>124-11</b>	<b>La Libertad</b>	gallina ponedora	8 sem
75	<b>128-11</b>	<b>Lima</b>	pollo de carne	34 días
76	<b>140-11</b>	<b>Lima</b>	pollo de carne	49 días

77	144-11	La Libertad	gallina ponedora	15 sem
78	144-11	La Libertad	gallina ponedora	33 sem
79	160-11	Lima	pollo de carne	32 días
80	182-11	Ica	pollo de carne	31 días
81	182-11	Ica	pollo de carne	40 días
82	191 – 11	La Libertad	gallina ponedora	28 sem
83	207-11	Lima	Gallo de Pelea	25 sem
84	218-11	Lima	gallina reproductora	20 sem
85	257-11	Lima	pollo de carne	34 días
86	278-11	Lima	pollo de carne	34 días
87	382-11	Lima	gallina reproductora	32 sem
88	382-11	Lima	gallina reproductora	32 sem
89	427- 11	La Libertad	pollo de carne	35 días
90	431-11	Lima	gallina ponedora	29 sem
91	443-11	La Libertad	pollo de carne	35 días
92	487-11	Lima	gallina ponedora	13 sem
93	677 – 11	Lima	gallina reproductora	27 sem
94	685-11	Lima	gallina reproductora	33 sem
95	786- 11	Lima	gallina reproductora	13 sem
96	790– 11	Lima	pollo de carne	45 días

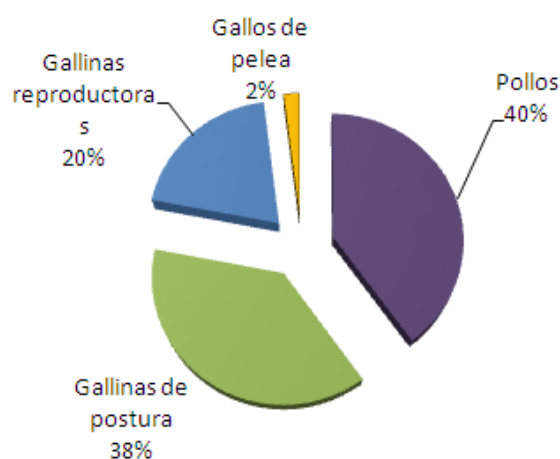
\* sem, semanas

El 64 % (96) de las cepas fueron aisladas de Lima, seguido de La Libertad con 28 %, estos altos porcentajes se explican porque ambos lugares son grandes productores de aves comerciales. Por otro lado, la cercanía de las granjas hace que los transmisores como el viento, vendedores, aves silvestres, roedores, entre otros diseminen la bacteria de un lugar a otro (Tabla1, Figura 1).



**Figura 1. Porcentaje de cepas de *Gallibacterium anatispor* lugar de procedencia.**

Según el tipo de producción, los mayores porcentajes de cepas se aislaron de pollos de carne 40 % y gallinas ponedoras 38 % y en menor proporción en gallos de pelea 2 %. La necesidad de sacrificar a los animales para el aislamiento del microorganismo conlleva una disminución de los gallos de pelea por el alto costo para los criadores (Figura 2).



**Figura 2.- Porcentaje de cepas de *Gallibacterium anatis* por tipo de ave.**

Las edades de los pollos fluctuaron entre 20 a 50 días, las gallinas de postura entre 6 y 50 semanas, las reproductoras entre 13 y 35 semanas (Tabla 1). La mayor parte de aves presentaron cara hinchada, secreción nasal, depresión, postración, anorexia, dificultad respiratoria y algunas tenían crestas y barbillas cianóticas, diarrea verde café y disminución en la postura (gallinas). En algunas necropsias se observó congestión en senos infraorbitarios y tráquea, hepatomegalia con puntos hemorrágicos, esplenomegalia, aerosaculitis, peritonitis; y en otros casos hemorragia en miocardio, inflamación renal, folículos deformes (gallinas), salpingitis, atrofia ovárica, ruptura folicular (Anexo 9).

A todas las cepas aisladas se sometieron a las pruebas Gram, oxidasa, catalasa, indol, ureasa y pruebas bioquímicas con varios carbohidratos para determinar su género, especie y también para clasificar a las cepas de *Gallibacterium anatis* en biovares usándose tablas de referencia (Anexos 10 - 13).

En la tabla 2 se observa la procedencia de *Gallibacterium anatis*, la intensidad de hemólisis, los biovares en que se clasificaron y otras bacteria patógenas implicadas en las infecciones respiratorias.

**Tabla 2. Cepas de *Gallibacterium anatis* según zona, muestra clínica, biovar e intensidad de hemólisis.**

Nº CEPA	ZONA	MUESTRAS CLINICAS	INTENSIDAD DE BETA HEMOLISIS **	BIOVAR	OTRAS BACTERIAS AISLADAS EN MUESTRAS CLINICAS
1	Lima	SI, T, P, SA.	Θ Θ	XII	<i>E. coli</i> (SI, T)
2	Lima La	T	Θ	III	ninguna
3	Libertad La	SI, T	Θ	IV	<i>E. coli</i> (SI, T, P)
4	Libertad	SI, T	Θ	IV	<i>E. coli</i> , <i>Past multocida</i> (S.I,T)
5	Lima	SI, T, P, SA.	Θ Θ	IV	ninguna
6	Lima	O	Θ Θ	I	<i>E. coli</i> (SI, T, P, SA, H)
7	Lima La	SI, T, P, SA.	Θ Θ Θ	I	<i>E. coli</i> (SI, T, P, SA, H)
8	Libertad	T	Θ	XII	<i>Avibacterium</i> (SI)
9	Lima	SI	Θ	XII	<i>Salmonella</i> (H)
10	Lima	SI	Θ	IV	<i>E. coli</i> (SI, T)
11	Arequipa	SI	Θ	IV	ninguna
12	Lima	SI, T, P, SA.	Θ Θ	III	<i>Avibacterium</i> (SI)
13	Lima La	SI	Θ Θ	I	ninguna
14	Libertad	SI	Θ	III	ninguna
15	Lima	SI, T, P, SA.	Θ Θ	III	ninguna
16	Lima	SI	Θ	I	ninguna
17	Madre de Dios	SI	Θ	XI	ninguna
18	Lima	SI, T	Θ	I	<i>E. coli</i> (SI, T, P)
19	Ica	SI, T, P, SA.	Θ Θ	I	ninguna
20	Lima	T	Θ	III	ninguna
21	Lima	T	Θ	IV	<i>E. coli</i> (T)
22	Lima	SI, T	Θ	IV	ninguna
23	Lima	SI	Θ	IV	ninguna

24	Lima	T	∅	NI	ninguna
25	Lima	SI, T	∅	IV	ninguna
26	Arequipa	T	∅	IV	<i>E. coli</i> (SI, T, P)
27	Lima	T	∅	IV	<i>Avibacterium</i> (SI)
28	Lima	SI, T, P, SA.	∅ ∅	IV	<i>E. coli</i> (SI, T, P)
29	Lima	SI, T	∅	I	<i>E. coli</i> (SI, T, P, SA, H)
30	Lima	SI, T, P, SA.	∅ ∅	XI	ninguna
31	La Libertad	T	∅	IV	<i>Avibacterium</i> (SI)
32	La Libertad	H	∅	IV	<i>E. coli</i> (T, P), ORT (T)
33	La Libertad	SI, T, P, SA.	∅ ∅	I	<i>E. coli</i> (T, P), ORT (T)
34	Lima	SI, T, P, SA.	∅ ∅	IV	ORT (SI, T)
35	Lima	T	∅	IV	<i>Avibacterium</i> (SI, T)
36	Lima	T	∅	XX	ninguna
37	Lima	SI	∅	IV	ninguna
38	Lima	SI	∅	IV	ORT (SI, T)
39	Lima	SI, T	∅	I	ninguna
40	La Libertad	S.I	∅	I	<i>E. coli</i> (SI, T)
41	La Libertad	T	∅	XII	<i>E. coli</i> (T)
42	Lima	SI	∅	IV	ORT y <i>E. coli</i> (S.I), ORT (T)
43	Lima	SI, T	∅	IV	<i>E. coli</i> (SI, T)
44	Lima	T	∅	IV	ninguna
45	Lima	T	∅	IV	ninguna
46	Lima	T	∅	III	<i>E. coli</i> (T)
47	Lima	T	∅	IV	ninguna
48	Lima	T	∅	XIX	ninguna
49	Lima	T	∅	XIX	ninguna
50	Lima	SI	∅	IV	ninguna
51	Lima	H	∅ ∅	IV	<i>E. coli</i> (SI, T, P, H)
52	Lima	SI, T	∅ ∅	IV	<i>E. coli</i> (SI, T, P, H)
53	Lima	H	∅	IV	ORT (SI)
54	Lima	SI	∅	IV	<i>E. coli</i> (T)
55	La Libertad	SI, T	∅	IV	ninguna
56	Lima	T	∅	XI	<i>E. coli</i> (SI)
57	Lima	T	∅	XI	ninguna
58	Lima	SI, T	∅	I	<i>E. coli</i> (SI, T)
59	Lima	SI, T	∅	IV	<i>E. coli</i> (SI, T)
60	La Libertad	SI, T	∅	IV	ninguna
61	Lima	SI	∅	IV	ninguna
62	La Libertad	T	∅	IV	<i>E. coli</i> (SI)
63	La Libertad	H	∅ ∅	IV	<i>Past multocida</i> (P)



	<b>Libertad</b>				
64	<b>La Libertad</b>	SA	θ θ	IV	<i>Past multocida</i> (P)
65	<b>La Libertad</b>	SI	θ	III	<i>E. coli</i> (SI)
66	<b>La Libertad</b>	SI	θ	NI	<i>E. coli</i> (SI)
67	<b>La Libertad</b>	.I	θ	XX	ninguna
68	<b>La Libertad</b>	SI	θ	XI	ninguna
69	<b>La Libertad</b>	SI	θ	XI	<i>E. coli</i> (SI, Barbilla)
70	<b>Lima</b>	SI, T	θ	XI	ninguna
71	<b>La Libertad</b>	SI	θ	III	<i>E. coli</i> (SI) <i>Past multocida</i> (SI,T), <i>Salm</i> (H)
72	<b>Ucayali</b>	SI, T	θ	NI	(H)
73	<b>La Libertad</b>	SI, T	θ	XX	ninguna
74	<b>La Libertad</b>	SI, T	θ	III	ninguna
75	<b>Lima</b>	SI, T	θ	I	<i>E. coli</i> (T)
76	<b>Lima</b>	SI, T	θ	NI	ninguna
77	<b>La Libertad</b>	SI, T	θ	IV	ORT (SI,T)
78	<b>La Libertad</b>	SI, T	θ	NI	ORT (SI,T)
79	<b>Lima</b>	SI	θ	IV	<i>E. coli</i> (T)
80	<b>Ica</b>	SI, T	θ	IV	<i>E. coli</i> (SI,T,P,SA,H)
81	<b>Ica</b>	SI, T	θ	IV	<i>E. coli</i> (SI,T,P,SA,H)
82	<b>La Libertad</b>	SI	θ	XXIV	ninguna
83	<b>Lima</b>	SI, T, P, S.A	θ θ	IV	ninguna
84	<b>Lima</b>	SI, T	θ	III	ninguna
85	<b>Lima</b>	SI, T	θ	XXIV	<i>E. coli</i> (T, P, SA)
86	<b>Lima</b>	SI, T	θ	NI	ninguna
87	<b>Lima</b>	O	θ θ	XV	<i>E. coli</i> (T)
88	<b>Lima</b>	SI, T	θ θ	XV	<i>E. coli</i> (T)
89	<b>La Libertad</b>	SI, T	θ	XV	ninguna
90	<b>Lima</b>	SI, T	θ	XV	ninguna
91	<b>La Libertad</b>	SI, T	θ	XX	ninguna
92	<b>Lima</b>	SI, T, P, S.A	θ θ	III	ninguna
93	<b>Lima</b>	SI, T	θ	IV	ninguna
94	<b>Lima</b>	Barbilla, T	θ	IV	ninguna
95	<b>Lima</b>	SI	θ	IV	ninguna
96	<b>Lima</b>	T	θ	IV	<i>E. coli</i> (SI,T,P,SA,H)

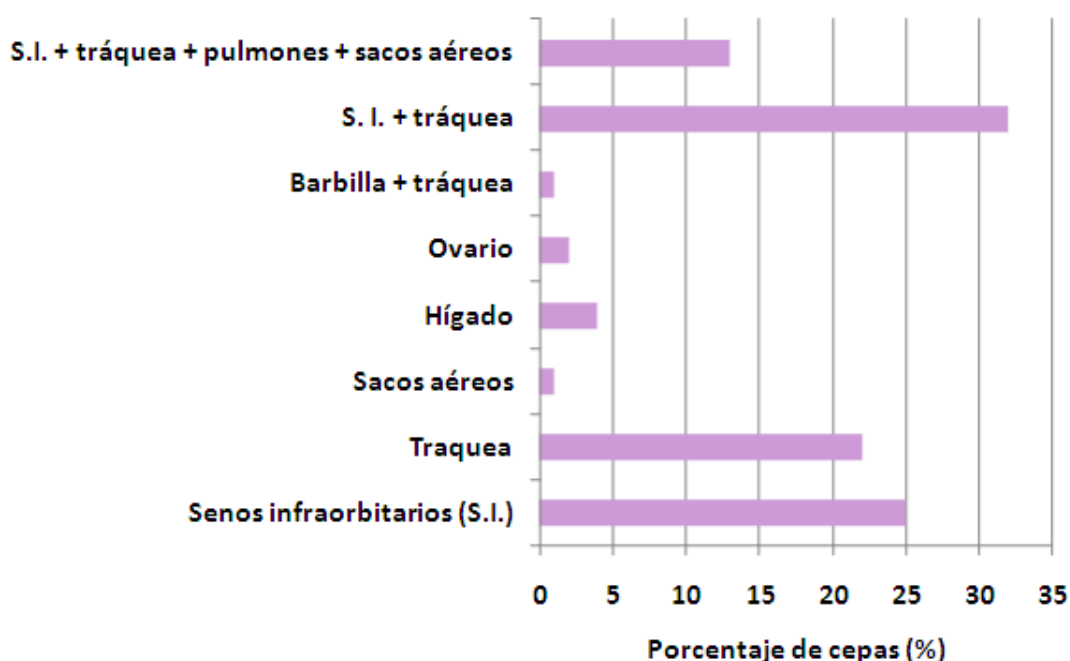
\*SI (Senos Infraorbitarios), T (Tráquea), P (Pulmones), SA (Sacos aéreos), H (Hígado), O (Ovario)

\*\* Intensidad de beta hemólisis: θ, débil; θθ, intensa

El 32 % de cepas se aislaron de senos infraorbitarios y tráquea, 25 % de senos infraorbitarios, 22 % de tráquea, 13 % de cepas se encontraron en todo el sistema respiratorio abarcando senos infraorbitarios, tráquea, pulmones y sacos aéreos, 4 % hígado, 2 % ovario (Figura 3).

El 79 % de cepas se aislaron del sistema respiratorio superior senos infraorbitarios y tráquea, esto debido a que son las vías de ingreso del microorganismo y donde empieza su replicación. En consecuencia, las aves presentaron cara hinchada y tráqueas congestionadas. El 13 % se diseminó por todo el sistema respiratorio tanto superior como inferior, senos infraorbitarios, tráquea, pulmones, sacos aéreos, lo cual demuestra el potencial patogénico de *G. anatis* (Figura 3).

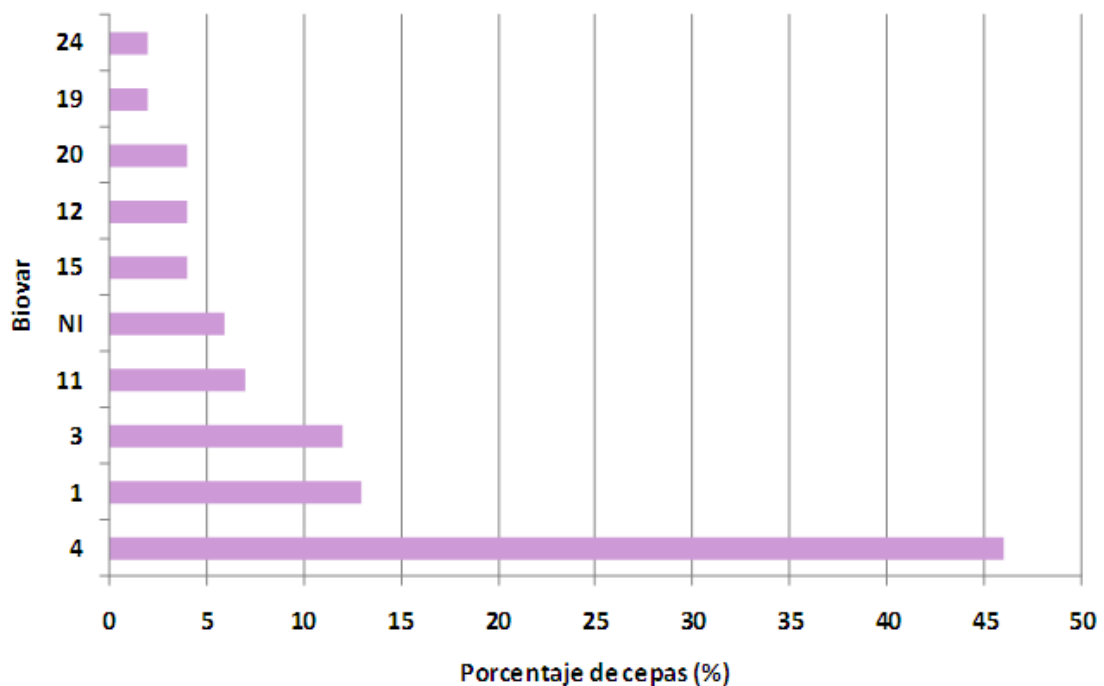
Del hígado y ovario no se aislaron muchas cepas quizá porque la base de la investigación fue en problemas respiratorios, por ello, cabe resaltar la diseminación sistémica de *G. anatis* (Figura 3).



**Figura 3.- Porcentaje de cepas de *G. anatis* según muestra clínica.**

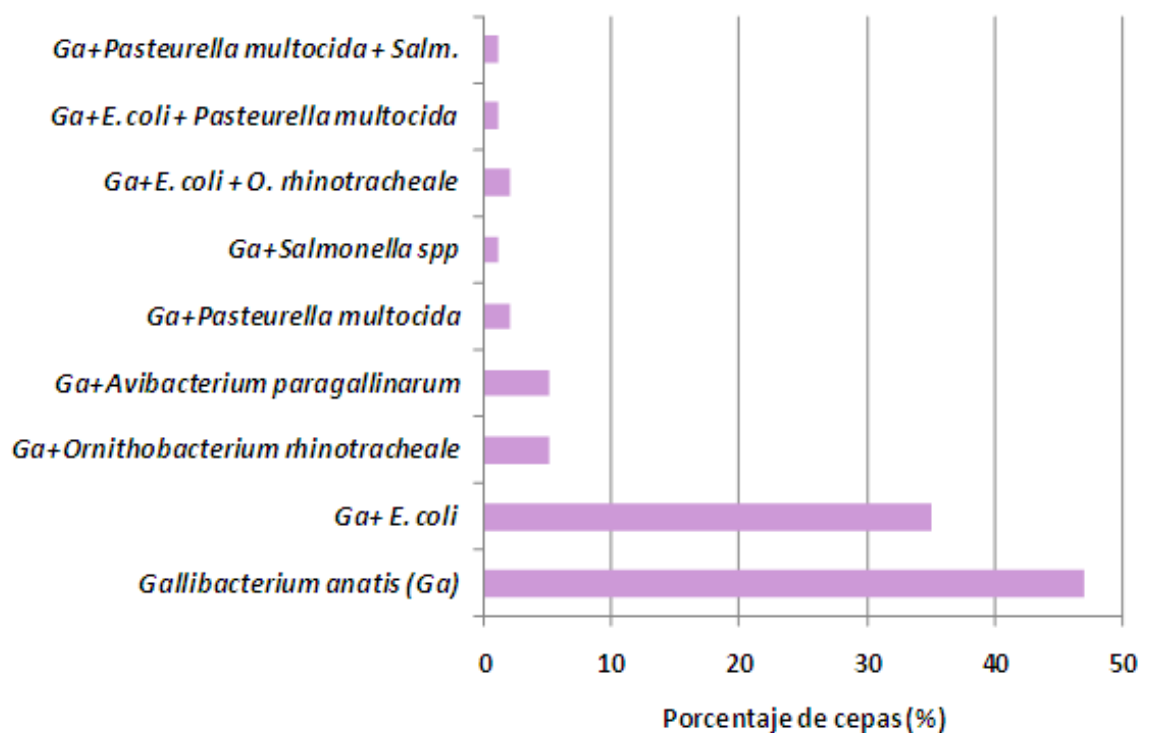
El 80 % de las cepas de *G. anatis* mostraron hemólisis débil y el 20 % hemólisis intensa, asociada con diseminación a varios órganos, demostrando el gran carácter invasivo de las cepas.

Al clasificar las 96 cepas de *Gallibacterium anatis* en biovars mediante pruebas bioquímicas, se determinó que el 46 % de cepas son del biovar 4. Cabe resaltar que algunas cepas fermentaron todos los azúcares constituyendo un biovar nuevo denominado NI (Figura 4).



**Figura 4.- Porcentaje de cepas y número de biovars de *G. anatis* aislados de aves comerciales con infecciones respiratorias.**

En las muestras clínicas de aves comerciales se encontró *Gallibacterium anatis* como único agente infeccioso en el 47 % y asociado a otros agentes bacterianos como *E. coli* 35 %, *Ornithobacterium rhinotracheale* 5 %, *Avibacterium paragallinarum* 5 %, *Pasteurella multocida* 2% y *Salmonella* 1 % (Figura 5).



**Figura 5. Porcentaje de cepas por especies bacterianas aisladas conjuntamente con *Gallibacterium anatis* en aves comerciales con infecciones respiratorias.**

En la Tabla 3 también se presenta la distribución de los biovars de *G. anatis* por departamentos. En Lima y La Libertad se aislaron 10 y 9 biovars respectivamente, en estos departamentos se obtuvo el mayor número de cepas, en comparación a Ica, Ucayali, Madre de Dios y Arequipa.

**Tabla 3. Distribución de las cepas de *G. anatis* aisladas de aves comerciales según biovars y departamentos.**

DISTRIBUCION POR DEPARTAMENTO	Nº AISLADOS	BIOVAR
LIMA	62	IV, I, III, XI, NI, XV, XII, XX, XIX, XXIV
ICA	3	IV Y I
UCAYALI	1	NI
LA LIBERTAD	27	IV, I, III, XI, NI, XV, XII, XX, XXIV
MADRE DE DIOS	1	XI
AREQUIPA	2	IV

NI, Biovar no descrito

Las 96 cepas de *G. anatis* presentaron 34 perfiles de sensibilidad antimicrobiana; siendo el mayoritario, el perfil A con 17 cepas, las cuales fueron resistentes a Amoxicilina, Ciprofloxacina, Enrofloxacina, Doxiciclina, Norfloxacina, Espectinomina y Sulfatrimetroprin, y sensibles a Florfenicol, Fosfomicina. Los perfiles B y C con 11 cepas cada uno, se diferenciaron por ser el primero, resistente a Florfenicol y sensible a Amoxicilina; y el segundo, sensible sólo a Florfenicol (Tabla 4).

**Tabla 4.- Perfiles de sensibilidad antimicrobiana de cepas de *G. anatis* aisladas de aves comerciales con infecciones respiratorias.**

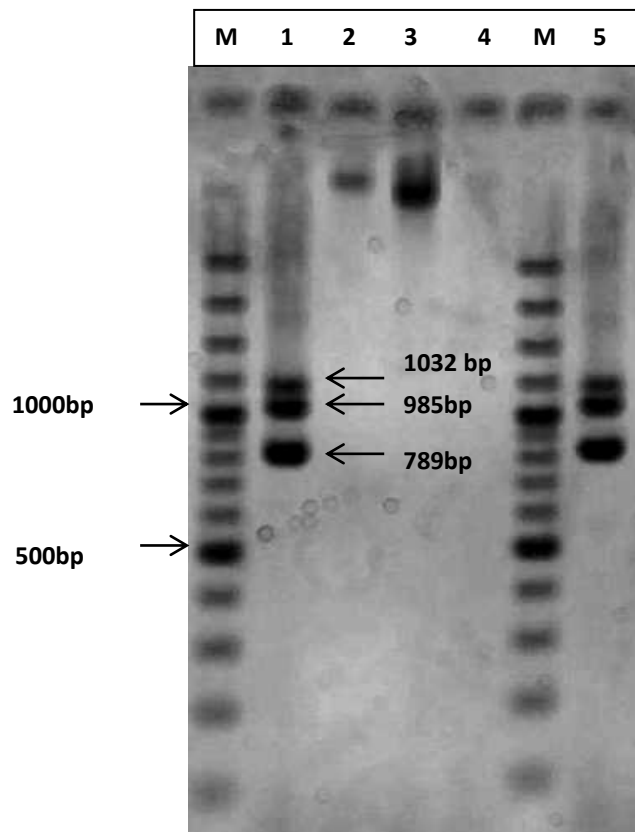
ANTIMICROBIANO	PERFILES DE SENSIBILIDAD																																			
	A	B	C	D	E	F	G	H	I	J	K	L	M	N	Ñ	O	P	Q	R	S	T	U	V	W	X	Y	Z	AB	CD	EF	GH	IJ	KL	MN		
Florfenicol	S	R	S	S	R	R	S	R	S	R	R	R	I	R	S	R	R	R	I	R	I	R	S	I	R	S	S	R	R	R	R	R	R	R	S	I
Fosfomicina	S	S	R	S	S	S	S	R	R	R	R	R	I	R	R	S	I	I	I	R	R	R	R	R	S	I	R	I	I	R	R	R	R	R	R	
Amoxicilina	R	S	R	S	R	S	S	R	S	R	S	I	S	S	S	I	I	R	S	I	R	R	R	R	R	R	R	R	S	S	R	S	R	S		
Ciprofloxacina	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	S	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	S	R	R	R	I	R	
Enrofloxacina	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	S	R	R	R	S	R	R	R	R	R	R	S	R	R	R	R	R	R	R	
Doxiciclina	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	S	R	R	R	S	R	R	S	R	R	S	R	R	R	I	R	R	R	
Norfloxacina	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	S	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	
Espectinomina	R	R	R	R	R	S	S	R	S	S	S	R	R	R	R	R	R	R	R	I	R	S	I	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	
Sulfatrimetroprin	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	S	S	R	R	R	R	R	R	R	
Nº Cepas x Perfil	17	11	11	6	5	4	4	3	3	3	2	2	2	2	2	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1		
Total de Cepas x Perfil	96																																			

Entre 43 y 51 % de cepas fueron sensibles a Florfenicol, Fosfomicina y Amoxicilina. El 80 y 98 % fueron resistentes a Ciprofloxacina, Enrofloxacina, Doxiciclina, Norfloxacina, Espectinomicina y Sulfatrimetroprin (Tabla 5).

**Tabla 5.- Cepas de *G. anatis* aisladas de aves comerciales con infecciones respiratorias según susceptibilidad antimicrobiana.**

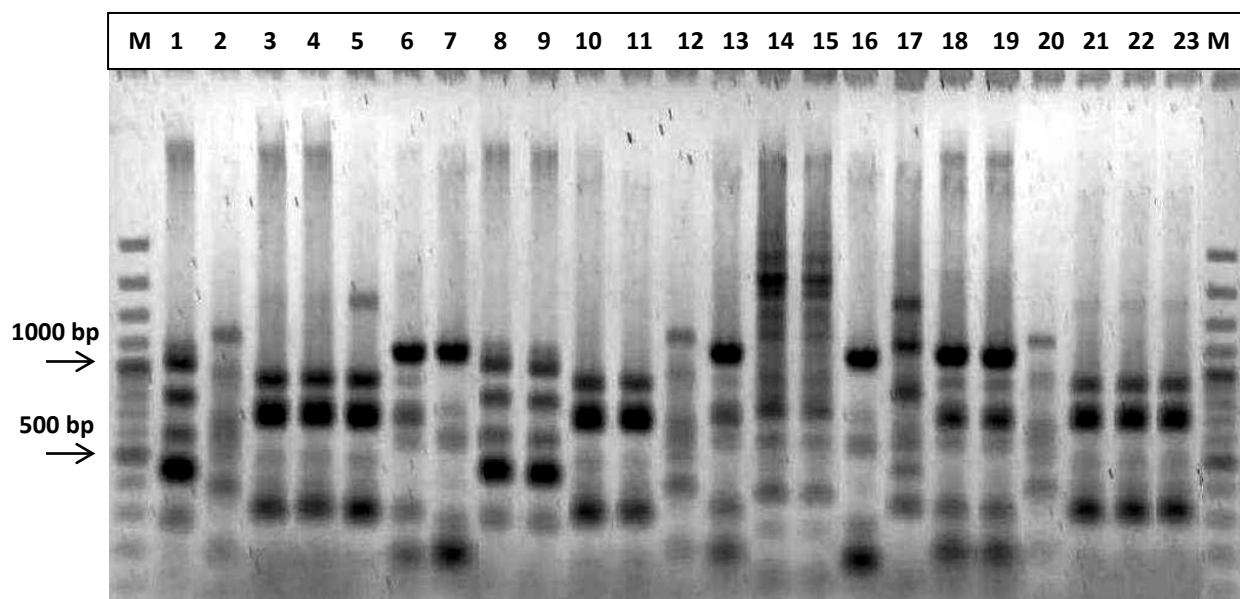
ANTIMICROBIANO	SUSCEPTIBILIDAD			TOTAL DE CEPAS N (%)
	SENSIBLES N (%)	INTERMEDIAS N (%)	RESISTENTES N (%)	
Florfenicol	47 (49)	6 (6)	43 (45)	96 (100)
Fosfomicina	49 (51)	8 (8)	39 (41)	96 (100)
Amoxicilina	41 (43)	5 (5)	50 (52)	96 (100)
Ciprofloxacina	3 (3)	1 (1)	92 (96)	96 (100)
Enrofloxacina	4 (4)	1 (1)	91 (95)	96 (100)
Doxiciclina	4 (4)	1 (1)	91 (95)	96 (100)
Norfloxacina	1 (1)	0 (0)	77 (80)	96 (100)
Espectinomicina	17 (18)	2 (2)	77 (80)	96 (100)
Sulfatrimetroprin	2 (2)	0 (0)	94 (98)	96 (100)

Para realizar las pruebas moleculares, primero se purificó el ADN, y luego se determinó la concentración e integridad del ADN por electroforesis en geles de agarosa (Anexo 14). Las 96 cepas analizadas fueron confirmadas como *Gallibacterium anatis* por PCR usando cebadores entre los genes ribosómicos 16S y 23S, lo cual se evidenció por tres fragmentos de ADN de 1032, 985 y 789 pares de bases (Figuras 6 y Anexo 15).



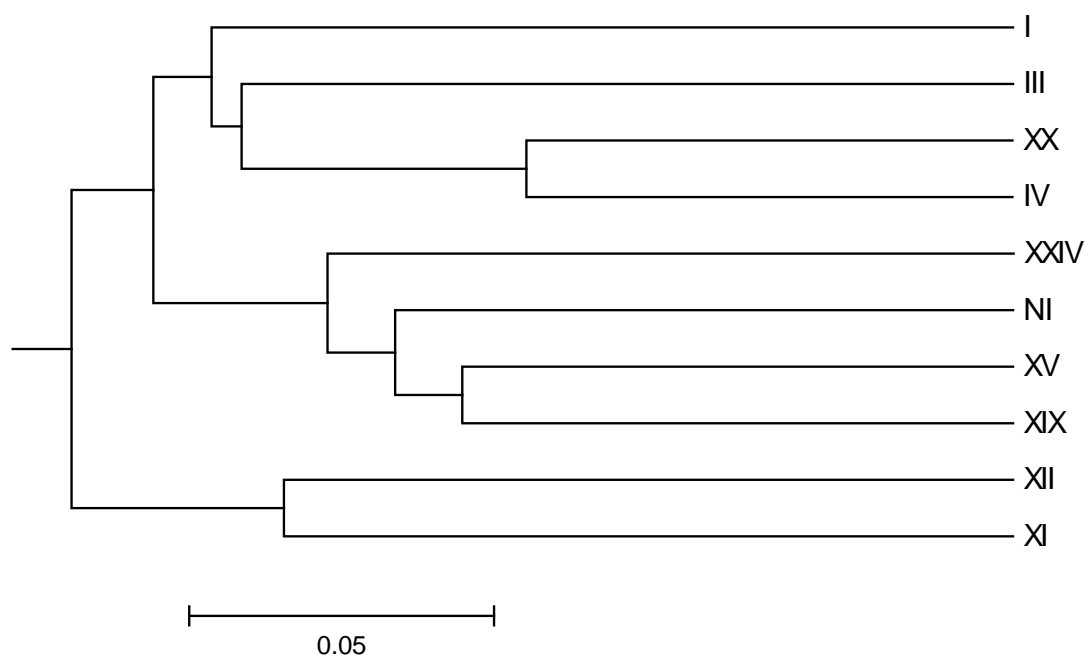
**Figura 6. Perfiles de ADN específicos para *Gallibacterium anatis* en gel de agarosa 1%.** Línea (especie): 1, *Gallibacterium anatis* ATCC 542; 2, *Pasteurella multocida*; 3, *Ornithobacterium rhinotracheale*; 4, Blanco de PCR; 5, *Gallibacterium anatis* (aislado clínico); M, Generuler 100 bp plus DNA ladder (Fermentas).

Después de la identificación molecular de *Gallibacterium anatis* se determinó la variabilidad genética de las 96 cepas usando la técnica ERIC-PCR, el cual es un método utilizado por Leotta (22) para hallar la variabilidad en *Pasteurella multocida* y siendo *Gallibacterium* un genero de la misma familia resulto ser útil, fácil y de bajo costo para determinar la variabilidad intraespecifica de *Gallibacterium anatis*. Se determinaron 20 bandas polimórficas (fragmentos de ADN) cuyos tamaños fueron entre 100 a 1500 pares de bases (Figura 7). En las cepas de *Gallibacterium anatis* biovar III; se observaron 11 bandas polimórficas y ninguna banda en cepas de los biovares XII y XIX. Los perfiles diferenciados de bandas en las 96 cepas analizadas mostraron 24 perfiles o patrones diferentes. La frecuencia en las cepas analizadas (N=96) fue de 0,052 a 0,875 lo cual indica variabilidad genética entre los aislados de *Gallibacterium anatis*. (Figura 7, Anexos 16 y 17).



**Figura 7. Perfiles de ADN de cepas de *Gallibacterium anatis* obtenidas por ERIC-PCR.** Línea (especie): Del 1 al 23, *Gallibacterium sp*; M, Generuler 100 bp plus DNA ladder (Fermentas).

El análisis de varianza molecular AMOVA indica que el 84,28 % de la variación se podría deber a diferencias genéticas entre los biovares y sólo un 15,73 % dentro de los biovares. El dendrograma de similitud indica agrupamiento de las cepas por biovares (Figura 8).



**Figura 8. Dendrograma de similitud de los perfiles de ADN de los biovares de *Gallibacterium sp.* obtenidas por ERIC-PCR.**



## V. DISCUSIÓN

En Perú, la avicultura es afectada por una serie de agentes patógenos que producen infecciones, entre ellas las respiratorias de diversa etiología, pero de parecida sintomatología, lo cual dificulta el diagnóstico clínico. Por otro lado, los microorganismos constantemente están en proceso de cambio, ya sea por mutaciones debido a su adaptación al medio en que se desarrollan o como consecuencia del intercambio de material genético entre los mismos. Estos aspectos crean la necesidad de desarrollar y aplicar metodologías que permitan establecer nuevas alternativas diagnósticas las cuales se proponen en este estudio.

Las aves infectadas con *Gallibacterium anatis* presentaron congestión en senos infraorbitarios, tráquea, hepatomegalia con puntos hemorrágicos, esplenomegalia, aerosaculitis, peritonitis y en algunos casos se observó hemorragia en miocardio, inflamación renal, folículos deformes en gallinas, salpingitis, atrofia ovárica y ruptura folicular, similares características describe Christensen en Alemania (2), Bojesen en Dinamarca (3), Wang en China (4), Koga y Zavaleta en Perú (16), León en EEUU (17), lo cual demuestra que las manifestaciones clínicas son las observadas, pero que al ser tan diversas pueden confundirse con infecciones procedentes por otros agentes patógenos.

En la presente investigación se aislaron cepas de *Gallibacterium anatis* de pollos, gallinas de postura y reproductoras; y gallos de pelea, a diferencia de los estudios de Bojesen en Dinamarca (3), Wang en China (4), Neubauer en Austria (6) que sólo aislaron de gallinas de posturas. Christensen en Alemania aisló de pollos, gallinas de postura, loros, pericos, pavos, patos y palomas (2).

En Perú no se han descrito estudios de variabilidad genética de *Gallibacterium anatis*, tan solo en Dinamarca, Bélgica, Checoslovaquia y Alemania. Christensen y Bojesen, mencionan en sus estudios que existen 24 biovares de *G. anatis*, la subespecie *haemolytica* comprende los biovares 1-4, 6, 7, 10-24, la subespecie *anatis* el biovar Pa, la *genomoespecie 1* el biovar 5 y 8, y la *genomoespecie 2* el biovar 9 (2, 19), estos investigadores aislaron 37 cepas de *G. anatis* de diversas especies y encontraron los biovares 1, 3, 4, 5, 8, 9, 11, 12, 15, 17, 18, 19, 20, 22, 24, Pa y Uc siendo en total 15 biovariedades hemolíticas y *G. anatis* no hemolítico (Pa y Uc); a diferencia de esta investigación que se encontró solo *G. anatis* hemolítico con los biovares 1, 3, 4, 11, 12, 15, 19, 20, 24 y NI. Las diferencias se pueden deber a las diferentes especies de aves en estudio y a la procedencia de las mismas.

Christensen y Bojesen mencionan como biovares de *G. anatis* más frecuentes, la subespecie *anatis* no hemolítica llamada biovar Pa, seguido de los biovares hemolíticos 1, 3, 4, 12 y 18 (2); a diferencia de los resultados de esta investigación en los cuales no se encontró *Gallibacterium anatis* no hemolítico. Los biovares hemolíticos más frecuentes son 1, 3, 4 y NI, este último, indicaría un nuevo grupo de cepas circulantes, no descritas y propias del Perú.

Respecto a la sensibilidad antimicrobiana, Bojesen y col, (3 y 25) estudiaron la sensibilidad antimicrobiana de 58 cepas de *G. anatis* frente a 23 antimicrobianos, ellos observaron multirresistencia (resistencia a  $\geq$  tres antimicrobianos) en el 65% de cepas de campo y sólo dos cepas fueron sensibles a todos los compuestos; similares características se observaron en esta investigación en la cual el 100 % de las cepas (96) mostraron multirresistencia, ninguna fue sensible a los antimicrobianos, por el contrario 3 cepas fueron resistentes a los 9 antimicrobianos analizados. Cabe resaltar que la resistencia a la sulfamida fue de 98 % similar al reportado por Bojesen y col. Esta disminución de la susceptibilidad antimicrobiana puede deberse al uso inadecuado de los antimicrobianos constituyendo un serio problema en el control de *G. anatis* y por ende, de las infecciones respiratorias.

Bojesen y Shivaprasad (7) determinaron la variabilidad de cepas de *Gallibacterium* usando la técnica de amplificación de fragmentos polimórficos (AFLP), encontrando variabilidad genética entre los aislados de *Gallibacterium anatis* dando como resultado más del 94 % de similitud genética; en comparación con la observada en esta investigación que fue desde 52 a 87 %, lo que demuestra una relativa heterogeneidad y la presencia de gran diferencia entre los diferentes biovares en ambas investigaciones. La estrecha relación entre los biovares indicaría genotipos nicho-adaptados procedentes de un ancestro común de las que se puede asumir que han evolucionado por una serie de eventos microevolutivos. Estudios anteriores han demostrado que las poblaciones genéticamente divergentes de los mismos organismos pueden evolucionar rápidamente a partir de un solo clon debido a las diferentes oportunidades ecológicas. La diversificación de la población de *Gallibacterium* es desconocida, sin embargo, pequeñas diferencias cromosómicas (por ejemplo, la codificación de factores de adhesión) pueden proporcionar la base para la adaptación, como se ha demostrado en otras bacterias.

Los resultados de la presente investigación muestran que el método de tipificación ERIC-PCR es útil para distinguir los clones individuales pero estrechamente relacionados, lo que permite el reconocimiento de los linajes clonales patógenos específicos, además este método permite un análisis epidemiológico molecular reproducible y puede servir como una herramienta para una mejor comprensión de la naturaleza del *Gallibacterium anatis*.

## VI. CONCLUSIONES

1. Se aislaron 96 cepas de *Gallibacterium anatis* de muestras clínicas de aves comerciales con infecciones respiratorias. La mayoría procedentes de Lima y La Libertad con 62 y 27 cepas, respectivamente.
2. Se determinó que la susceptibilidad antimicrobiana de las 96 cepas de *Gallibacterium anatis* fue entre 43 y 51 % sensibles a Florfenicol, Fosfomicina y Amoxicilina; y entre 80 y 98 % resistentes a Ciprofloxacina, Enrofloxacin, Doxiciclina, Norfloxacina, Espectinomicina y Sulfatrimetroprina.
3. Se identificaron las 96 cepas de *Gallibacterium anatis* aisladas de muestras clínicas mediante la reacción en cadena de la polimerasa usando cebadores específicos. Además, mediante serotipificación se determinaron 10 biovars circulantes.
4. De las 96 cepas de *Gallibacterium anatis* se obtuvieron 24 perfiles de ADN mediante ERIC-PCR.

## VIII. REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

1. Vadillo S, Píriz S, Mateos E. Manual de Microbiología Veterinaria. Madrid: Mc Graw-Hill Interamericana; 2002.
2. Christensen H, Bisgaard M, Bojesen A, Mutters R, Elmerdahl J. 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. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology 2003; 53: 275-87.
3. Bojesen A, Nielsen O, Christensen J, Bisgaard M. *In vivo* studies of *Gallibacterium anatis*. Avian Pathology 2004; 33(2): 145-52.
4. Wang C, Chen L, Yang X. A preliminary of *Gallibacterium anatis* infection in laying hens. Journal of Henan Agricultural Sciences 2008; 28 (3): 50-53.
5. Bisgaard M, Christensen H, Bojesen AM, Christensen JP. Avian infections by species of *Pasteurellaceae*, an Update. Avian Diseases 2005; 49: 534-9.
6. Neubauer C, Souza M, Bojesen AM, Bisgaard M. Tissue distribution of haemolytic *Gallibacterium anatis* isolates in laying birds with reproductive disorders. Avian Pathology 2009; 38(1): 1-7.
7. Bojesen A, Shivaprasad H. Genetic diversity of *Gallibacterium* isolates from California turkeys. Avian Pathology 2007; 36(3): 227-30.
8. Garcia Benzaquén N. Caracterización fenotípica y genética de *Pasteurella multocida*. [Tesis Doctoral]. Madrid: Universidad Complutense; 2010.
9. Rzewuska M, Karpinska E, Szeleszczuk P, Binek M. Isolation of *Gallibacterium* spp. from peacocks with respiratory tract infections. Medycyna Wet. 2007; 63(11): 1431-33.

10. Bojesen AM, Torpdahl M, Christensen H, Olsen JE, Bisgaard M. Genetic diversity of *Gallibacterium anatis* isolates from different chickens flocks. *Journal of Clinical Microbiology* 2003; 41(6): 2737-40.
11. Bojesen A, Christensen H, Nielsen O, Olsen J, Bisgaard M. Detection of *Gallibacterium* spp. in chickens by fluorescent 16S rRNA *In situ* hybridization. *Journal of Clinical Microbiology* 2003; 41(11): 5167-72.
12. Christensen H, Kuhnert P, Olsen JE, Bisgaard M. Comparative phylogenies of the housekeeping genes *atpD*, *infB* and *rpoB* and the 16S rRNA gene within the Pasteurellaceae. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 2004; 54(5): 1601-9.
13. Blackall PJ, Christensen H, Beckenham T, Blackall L, Bisgaard M. Reclassification of *Pasteurella gallinarum*, *Haemophilus paragallinarum*, *Pasteurella avium* and *Pasteurella volantium* as *Avibacterium gallinarum* *comb. nov.*, *Avibacterium avium* *comb. nov.* and *Avibacterium volantium* *comb. nov.* *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 2005; 55: 353-62.
14. Bojesen AM, Nielsen SS, Bisgaard M. Prevalence and transmission of haemolytic *Gallibacterium* species in chicken production systems with different biosecurity levels. *Avian Pathology* 2003; 32(5): 503-10.
15. Bojesen AM, Vásquez ME, Robles F, Gonzales C, Soriano EV, Olsen JE, Christensen H. Specific identification of *Gallibacterium* by PCR using primers targeting the 16S rRNA and 23S rRNA genes. *Veterinary Microbiology* 2007; 123(1-3): 262-8.
16. Koga Y, Zavaleta AI, Jimenez KL, Villacorta K. Identificación de cepas de *Gallibacterium anatis* aisladas en el Perú. En: 10<sup>th</sup> General Meeting; Canada: American Society for Microbiology; 2007. p. 732
17. Leon KP. *Gallibacterium anatis*. *World Poultry*. 2009; 27(6): 24-26.

18. García GE, Vaca S, Pérez MA, Ibarra CJ, Pérez MV, Tenorio V, Negrete AE. *Gallibacterium anatis*-secreted metalloproteases degrade IgG. *Avian Pathology* 2005; 34(5): 426-9.
19. Kristensen BM, Frees D, Bojesen A. GtxA from *Gallibacterium anatis*, a cytolytic RTX-toxin with a novel domain organization. *Veterinary Res.* 2010; 41(3): 25.
20. Zepeda A, Ramirez S, Vega V, Morales V. Hemagglutinating Activity of *Gallibacterium* Strains. *Avian Diseases* 2009; 53(1): 115-8.
21. Christensen H, Bisgaard M. Molecular classification and its impact on diagnostics and understanding the phylogeny and epidemiology of selected members of *Pasteurellaceae* of veterinary importance. *Berliner and Munchener* 2010; 1(2): 20-30.
22. Leotta G, Chinen I, Vigo G, Gugliada J, Rivas M. Evaluación de dos técnicas para subtipificación molecular para el estudio de *Pasteurella multocida*. *Revista Argentina de Microbiología* 2006; 38:190-8.
23. Schlüter M. Analysis of multilocus fingerprinting data sets containing missing data. *Molecular Ecology Notes* 2006; 6: 569-572.
24. Tamura K, Peterson D, Peterson N, Stecher G, Nei M, Kumar S. Molecular Evolutionary Genetics Analysis Using Maximum Likelihood, Evolutionary Distance, and Maximum Parsimony Method. *Molecular Biology and Evolution* 2011; 28: 2731-9.
25. Bojesen AM, Vasquez ME, Bager RJ. Antimicrobial Susceptibility and tetracycline resistance determinant genotyping of *Gallibacterium anatis*. *Veterinary Microbiology* 2011; 148: 105-110.