

Resistencia antimicrobiana de aislados cubanos de *Mycoplasma gallisepticum*

Antimicrobial resistance of *Mycoplasma gallisepticum* Cuban isolates

Ariadna Duque-Ortiz, Anisleidy Pérez-Castillo, Evelyn Lobo-Rivero[✉]

Laboratorio de diagnóstico de *Micoplasma* (MYCOLAB), Departamento de Microbiología-Epidemiología, Centro Nacional de Sanidad Agropecuaria (CENSA), Carretera de Tapaste y Autopista Nacional, CP 32700, San José de las Lajas, Mayabeque, Cuba.

RESUMEN: Los trastornos respiratorios constituyen una de las principales causas de muerte en el sector avícola. Dentro de estas patologías se encuentra la micoplasmosis aviar, enfermedad infecto-contagiosa de curso crónico. Aunque en este proceso participan varias especies de micoplasmas, se reconoce a *Mycoplasma gallisepticum* como la principal especie. Una de las medidas destinadas al control de esta enfermedad es el tratamiento con antibióticos, pues ayuda a mejorar los indicadores productivos y reducir las pérdidas económicas causadas por brotes clínicos. Entre los grupos de antibióticos que más se utilizan en la avicultura se encuentran las quinolonas, las tetraciclinas y los macrólidos, pues se reconocen como efectivos contra *Mycoplasma* spp. El objetivo de este trabajo fue determinar la actividad antimicrobiana *in vitro* de cinco agentes antimicrobianos frente a 10 aislados cubanos de *M. gallisepticum*, procedentes de diferentes granjas avícolas de la provincia Mayabeque destinadas a la producción de huevos. Para ello se utilizó el método de Concentración Mínima Inhibitoria (CMI) y como resultado se obtuvo una CMI de 2 µg/ml para Enrofloxacin; 32 µg/ml para la Ciprofloxacina; 0,0625 µg/ml para Tilosina; 0,5 µg/ml a la Oxitetraciclina y 0,031 µg/ml para Minociclina. Este resultado indica un incremento de la resistencia en estos aislados frente a los dos compuestos de la familia de las quinolonas que se usaron en el estudio; además, brinda una información práctica para el tratamiento de la infección contra *M. gallisepticum* en la avicultura.

Palabras clave: Micoplasmosis aviar, *Mycoplasma gallisepticum*, susceptibilidad antimicrobiana.

ABSTRACT: Respiratory disorders are a major cause of death in poultry. Avian mycoplasmosis which is a chronic infectious-contagious disease is within these pathologies. Although several species of mycoplasmas are involved in this process, *Mycoplasma gallisepticum* is recognized as the main etiological agent. One of the measures aimed at the control of this disease is the treatment with antibiotics, as it helps to improve the productive indicators and to reduce the economic losses caused by the clinical outbreaks. Among the groups of antibiotics most used in poultry are

[✉] Autor para correspondencia: Evelyn Lobo-Rivero. E-mail: elobo@censa.edu.cu

Recibido: 8/5/2016

Aceptado: 26/1/2017

quinolones, tetracyclines and macrolides, as they are recognized as effective against *Mycoplasma* spp. The objective of this work was to determine the *in vitro* antimicrobial activity of 5 antimicrobial agents against 10 Cuban isolates of *M. gallisepticum* from different poultry farms destined to egg production in Mayabeque province. For this purpose, the Minimum Inhibitory Concentration (MIC) method was performed, resulting in a MIC of 2 µg/ml for Enrofloxacin; 32 µg/ml for Ciprofloxacin; 0.0625 µg/ml for Tylosin; 0.5 µg/ml for Oxytetracycline, and 0.031 µg/ml for Minocycline. This result indicates an increase in resistance in these isolates compared to the two compounds of the quinolone family used in the study. It also provides practical information for the treatment of *M. gallisepticum* infection in poultry.

Key words: Avian mycoplasmosis, *Mycoplasma gallisepticum*, antimicrobial susceptibility.

INTRODUCCIÓN

La micoplasmosis aviar es una enfermedad infecto-contagiosa de curso crónico que afecta el sistema respiratorio de las aves; aunque en este proceso participan varias especies de micoplasmas, se reconoce a *Mycoplasma gallisepticum* como la principal especie (1). La enfermedad causa una disminución en la producción de huevos, un aumento de la mortalidad embrionaria y disminución de la convección alimentaria, lo que produce pérdidas económicas (2). *M. gallisepticum* se transmite verticalmente a través de los huevos infectados, y horizontalmente por la inhalación de aerosoles, así como por el contacto de ave a ave (3). En la actualidad el control de la micoplasmosis, mediante el uso de antibióticos es una de las principales medidas que se utilizan para disminuir las pérdidas ocasionadas por esta entidad (4).

Entre los grupos de antibióticos ampliamente usados en la avicultura podemos encontrar quinolonas, tetraciclinas y macrólidos, por ser efectivos contra *Mycoplasma* spp. (5). En tal sentido, es importante tener en cuenta que los micoplasmas, por la ausencia de una pared celular, son intrínsecamente resistentes a los antimicrobianos que tienen como diana a esta estructura, tal es el caso de las penicilinas, betalactámicos, glucopéptidos, polimixinas, rifampicina y sulfonamidas (6). Otros antimicrobianos como los aminoglucósidos y el cloranfenicol poseen poca actividad frente a los

micoplasmas (7). Esto presupone un problema en el momento de elegir el antimicrobiano adecuado en cada caso.

En Cuba la micoplasmosis aviar es una de las primeras causas de mortalidad en la avicultura, que se asocia a trastornos respiratorios y en su tratamiento también se utilizan los antibióticos pertenecientes a quinolonas, tetraciclinas y macrólidos (8). Las estrategias de medicación para su control consisten en programas preventivos y programas terapéuticos en los cuales se combinan un grupo importante de antibióticos de diferentes espectros (8,9). Sin embargo, hasta el presente se desconoce la susceptibilidad antimicrobiana que presentan los aislados cubanos de *M. gallisepticum* frente a los principales antimicrobianos usados en la avicultura. Por tanto, el objetivo de este trabajo fue determinar la actividad antimicrobiana *in vitro* de aislados cubanos de *M. gallisepticum* frente a cinco agentes antimicrobianos.

MATERIALES Y MÉTODOS

Periodo de estudio y selección de las muestras

El presente estudio comprendió el periodo enero/2014 a abril/2015, e incluyó seis granjas avícolas de la provincia Mayabeque con antecedentes de problemas respiratorios. El destino productivo de estas granjas es la producción de huevo. La toma de muestra se realizó por hisopaje traqueal y estos se depositaron en un medio de transporte. Por cada

granja, se seleccionaron 50 animales con sintomatología respiratoria, para un total de 300 muestras, según lo recomienda la Organización Mundial de Sanidad Animal (OIE) (9). Para el criterio de inclusión de los animales se tuvo en cuenta la presencia de síntomas respiratorios; la selección de las aves se realizó de manera tendenciosa.

Procesamiento de las muestras

Las muestras se trasladaron al Laboratorio de diagnóstico de micoplasmas (MYCOLAB) bajo condiciones de bioseguridad. Se sembraron en medio Jordan y se incubaron por cinco días a 37°C con 5% de CO₂ (6,10). Se realizó la lectura diaria de los cultivos. Donde hubo cambio de pH (en tubo) o la presencia de colonias en forma de huevo frito (en placas), se procedió a realizar los subcultivos correspondientes, según la metodología descrita por Poveda (11).

Identificación de *M. gallisepticum*

Se realizó por las siguientes pruebas bioquímicas: fermentación de la glucosa y reducción del tetrazolium y digitonina, según lo recomendado por Poveda (11). Como prueba confirmatoria se realizó la Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR) basada en la amplificación del gen *mgc2* de *M. gallisepticum* (12).

Susceptibilidad antimicrobiana a los aislados de *M. gallisepticum*

Se determinó por el método de Concentración Mínima Inhibitoria (CMI) (13) con el medio de cultivo descrito anteriormente (10,11). La concentración de los cultivos de cada aislado se ajustó a 10³ UFC/ml mediante conteo de UFC/ml por diluciones seriadas en base a 10. Se utilizaron placas de poliestireno de 96 pocillos de fondo plano y tapa de baja evaporación (FALCON Becton Dickinson). Se realizaron diluciones en base 2 (64 a 0,004 µg/ml) de los antibióticos Enrofloxacin (Fluka), Ciprofloxacina (Fluka), Tilosina

(SIGMA), Oxitetraciclina (SIGMA) y Minociclina (SIGMA) en el medio Jordan.

En cada pocillo se añadieron 200 µl de cada dilución del antibiótico y 100 µl del cultivo de cada aislado siguiendo la metodología descrita por Hannan (13). Las placas se sellaron e incubaron a 37°C por tres días. Como control positivo del ensayo se utilizaron los pocillos donde se encontraba el microorganismo en ausencia de antibiótico; en estos se observó un cambio de coloración (rojo a amarillo) a los tres días. Se realizaron dos réplicas biológicas para cada aislado. La CMI se definió como la menor concentración de antibiótico que inhibió el crecimiento del microorganismo y en la cual no ocurrió cambio de coloración de rojo a amarillo.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

La OIE y la Organización Mundial de la Salud (OMS) clasifican a los antimicrobianos de acuerdo a su importancia (14). En tal sentido, la OIE describe a los agentes antimicrobianos veterinarios en tres grupos: de importancia crítica, de importancia elevada o de importancia para la sanidad animal (15); de igual manera, la OMS clasifica a los agentes antimicrobianos en los de importancia crítica, de importancia elevada o de importancia para la medicina humana (16). Se consideran antimicrobianos de importancia crítica aquellos que, en primer lugar, se emplean para el tratamiento, la prevención y el control de infecciones graves de los animales con consecuencias importantes para la salud, el bienestar de los animales y la salud pública, o consecuencias importantes de índole económica y, en segundo lugar, para los que tienen poca o ninguna alternativa de sustituciones (14).

Los antibióticos que se emplearon en este estudio, además de estar entre los que más se utilizan en la avicultura en Cuba, clasifican como de importancia crítica tanto para uso veterinario como para uso humano, con excepción de la oxitetraciclina, que clasifica como de importancia elevada según la OMS (16). El único antibiótico que reconoce esta organización de importancia crítica es la

glicilciclina (tigeciclina), ya que representa una generación diferente en comparación con las otras tetraciclinas (14). La clasificación de los antibióticos que se utilizaron en la investigación pone de manifiesto la necesidad de realizar una vigilancia sobre la resistencia a antimicrobianos, determinar y aplicar medidas apropiadas de gestión para contener la extensión de la resistencia y preservar la eficacia de los medicamentos; todo esto con el consiguiente uso prudente de los antimicrobianos.

En el caso de las tetraciclinas, son antibióticos de amplio espectro y se utilizan para ampliar la acción y dar sinergia a micoplasmicidas de mayor especificidad (17,18). Debido al gran uso de estos antimicrobianos, a nivel internacional se describe una alta resistencia surgida como consecuencia de la adquisición de genes *Tet* (tetraciclina) y/o genes *Otr* (oxitetraciclina) por parte de las bacterias, tanto comensales como patógenas (19). Los resultados de este estudio no coinciden con otros reportes, pues al considerar el efecto de la oxitetraciclina (grupo de primera generación) y la minociclina grupo de segunda generación) sobre los aislados cubanos de *M. gallisepticum* se observó que los valores de CIM fueron 0,5 µg/ml y 0,031 µg/ml, respectivamente, para cada antibiótico.

Gautier-Bouchardon *et al.* (20) refieren que cuando la CIM de estas tetraciclinas es ≤ 1 µg/ml, los aislados se pueden considerar susceptibles; en cambio, cuando presentan valores ≥ 1 µg/ml se consideran resistentes. En tal sentido, se puede afirmar que los aislados, que se obtuvieron en el presente estudio son susceptibles a estos antibióticos. Una explicación posible a este comportamiento puede ser que en los últimos años se emplean con más frecuencia antibióticos como las quinolonas, lo que propicia una menor presión de selección sobre la microbiota bacteriana y, con ello, menor riesgo para la presentación del fenómeno de resistencia a las tetraciclinas. Resultados similares se reportaron por Rivera-Tapia (21).

Por otra parte, la tilosina pertenece al grupo de los macrólidos, moléculas que se emplean desde hace muchos años, son bacteriostáticos, inhiben los procesos de traslocación y transpeptidación de la síntesis proteínica y pueden presentar resistencia cruzada entre tilosina y eritromicina (22). Los principales mecanismos de resistencia a este grupo son alteraciones de la diana (el gen 23S rRNA), aumento de la expresión de sistemas de expulsión activa, disminución de la permeabilidad celular e inactivación enzimática (23). En micoplasmas se describen alteraciones en el gen 23S ARNr de *M. gallisepticum*; estas mutaciones están descritas como responsables de resistencia adquirida a macrólidos y lincosamidas (24).

Según el criterio microbiológico reportado por Hannan (13), las cepas de *M. gallisepticum* se consideran susceptibles cuando la CMI de la tilosina es ≤ 1 µg/ml. En el caso del presente estudio, los resultados coinciden con esta clasificación, pues se obtuvieron valores de la CIM de 0,0625 µg/ml. Cuando comparamos el comportamiento de la tilosina, se observa que este antibiótico demostró poseer un efecto inhibitorio *in vitro* más potente en comparación con el resto de los antimicrobianos probados. Estos resultados coinciden con lo señalado por Forrester *et al.* (25), quienes obtuvieron un comportamiento similar con valores de la CIM entre 0.008 µg/ml y 0.002 µg/ml; de igual manera coinciden con lo referido por Gião Antunes cuando estudió el comportamiento de la tilosina frente a diferentes cepas de micoplasmas (26).

Solo unos pocos estudios en *M. gallisepticum* informan la emergencia *in vitro* de resistencia a macrólidos; este fenómeno se debe a las interacciones de estos fármacos con la subunidad ribosomal 50S (27,28). Es importante señalar que el desarrollo de las estrategias terapéuticas eficaces depende de una comprensión precisa y detallada de los mecanismos de resistencia a antibióticos.

Las quinolonas son de origen sintético y uno de los grupos de antimicrobianos que más se

utilizan por su eficacia frente a los micoplasmas (29). Su mecanismo de acción interfiere con la replicación del ADN porque actúa sobre las topoisomerasas bacterianas. Actualmente, las mutaciones en las topoisomerasas bacterianas, el aumento de la expresión de sistemas de expulsión activa, las alteraciones en la permeabilidad celular y los plásmidos están reconocidos como los responsables de la resistencia adquirida a las quinolonas (30,31). Para los micoplasmas solamente se describen las mutaciones en las topoisomerasas y los sistemas de eflujo como los responsables de la disminución de la susceptibilidad a estos fármacos (29).

La CMI de la enrofloxacin y ciprofloxacina, frente a los aislados de campo de *M. gallisepticum*, fue de 2 µg/ml y 32 µg/ml, respectivamente. Cuando se comparan los resultados alcanzados con lo descrito por Hannan (13), se aprecia que ambos antimicrobianos presentan valores elevados relacionados con la resistencia. Estos resultados también coinciden con los descritos por otros autores, quienes reportan un incremento significativo de la resistencia de aislamientos de *M. gallisepticum* a la enrofloxacin y a la ciprofloxacina: Gerchman (32) obtuvo una CMI superior a 1 µg/ml en 23 aislados y Gharaibeh una CMI de 2 µg/ml en siete aislados de campo (33).

La Tabla 1 resume los valores medios de la CIM de *M. gallisepticum* a los antibióticos testados. Como puede observarse,

el comportamiento resultó variable, lo que evidencia la existencia de resistencias adquiridas a los antimicrobianos que se testaron. Esto se puede explicar debido a que en las producciones de aves existe una amplia utilización de antimicrobianos, lo que implica una gran presión selectiva sobre las poblaciones bacterianas y provoca la aparición con mayor facilidad de cepas resistentes.

Aunque son varios los trabajos que refieren la utilidad de una gran variedad de antibióticos para el control de *M. gallisepticum*, entre los que se incluyen estreptomycin, oxitetraciclina, eritromicina, espiramicina, tilosina y lincomicina debido a su susceptibilidad (1,17,21,25,27), también existen otros que reportan la aparición de aislados de *M. gallisepticum* altamente resistentes a estos fármacos (5,20,24). La aparición de microorganismos resistentes puede ocurrir durante o después de tratamientos, ya que los residuos de antibióticos pueden establecerse durante grandes periodos de tiempo posteriores al tratamiento, lo que favorece la inactivación de los antibióticos y la diseminación de genes de resistencia (22,33).

Los resultados de este estudio permitieron conocer la resistencia antimicrobiana de los aislados cubanos de *M. gallisepticum* frente a los diferentes antibióticos que se utilizan en la avicultura; además, brinda una información práctica sobre la conducta a seguir en el tratamiento de la infección contra este agente como parte de su control, específicamente en cuanto a la selección de fármacos con una actividad apropiada *in vitro*.

TABLA 1. Actividad *in vitro* de aislados de *M. gallisepticum* frente a oxytetraciclina, minociclina, tilosina, enrofloxacin y ciprofloxacina. *In vitro activities of M. gallisepticum isolates against oxytetracycline, minocycline, tylosin, enrofloxacin, and ciprofloxacina.*

Aislados	Inóculo concentración (UFC/mL)	Oxi	Min	Til	Enro	Cipro
		(µg/ml)				
MG	2.8 x10 ³	0,5	0,031	0,0625	2	32

Leyenda: Oxi: oxitetraciclina; Min: minociclina; Til: tilosina; Enro: enrofloxacin; Cipro: ciprofloxacina

REFERENCIAS

1. Ley DH, Yoder HW. Mycoplasma gallisepticum infection. In: Calnek BW, Barnes HJ, Beard CW, McDougald LR, Saif YM, editor. Diseases of Poultry. 10th ed. Iowa State Univ. Press 1997. pp. 194-207.
2. Ley D. *Mycoplasma gallisepticum* infection. In: Saif YM, BH, Glisson JR, Fadly AM, McDougald LR, Swayne DE, editor. Diseases of poultry. 11th ed. Iowa State University Press 2003. pp. 722-744.
3. McMartin D, Khan M, Farver T, Christie G. Delineation of the lateral spread of *Mycoplasma gallisepticum* infection in chickens. Avian Dis. 1987;814-819.
4. Hofacre C. Antimicrobial drug use in poultry. In: Giguere S PJ, Baggot JD, Walker RD, Dowling PM. Oxford: Wiley Blackwell, editor. Antimicrobial Therapy in Veterinary Medicine. 4 ed 2007. pp. 545-553.
5. Reinhardt A, Kempf I, Kobisch M, Gautier-Bouchardon A. Fluoroquinolone resistance in *Mycoplasma gallisepticum*: DNA gyrase as primary target of enrofloxacin and impact of mutations in topoisomerases on resistance level. J Antimicrob Chemoth. 2002;50(4):589-92.
6. Sader, H. Resistencia antimicrobiana en Latinoamérica. Rev Chil Infectol. 2002; 19: 5-13.
7. Ayling RD, Baker SE, Nicholas RA, Peek ML, Simon AJ. Comparison of in vitro activity of danofloxacin, florfenicol, oxytetracycline, spectinomycin and tilmicosin against *Mycoplasma mycoides* subspecies *mycoides* small colony type. Vet Rec. 2000;146(9):243-246.
8. IMV. Informe de Balance trimestral. Cuba: Instituto de Medicina Veterinaria IMV, 2015.
9. Organización Mundial de Sanidad Animal (OIE). Capítulo sobre Micoplasmosis aviar. 2014
10. Jordan F. Recovery and identification of avian mycoplasmas. Methods in mycoplasmaology. 1983;2:69.
11. Poveda JB. Biochemical characteristics in mycoplasma identification. Methods Mol Biol. 1998;104:69-78.
12. García M, Ikuta N, Levisohn S, Kleven S. Evaluation and comparison of various PCR methods for detection of *Mycoplasma gallisepticum* infection in chickens. Avian Dis. 2005;49(1):125-132.
13. Hannan PC. Guidelines and recommendations for antimicrobial minimum inhibitory concentration (MIC) testing against veterinary mycoplasma species. Vet Res. 2000;31(4):373-95.
14. Reunión Conjunta FAO/OMS/OIE de expertos sobre los antimicrobianos de importancia crítica. Informe de la reunión de expertos Sede de la FAO, Roma (Italia) del 26 al 30 de noviembre de 2007.
15. Organización Mundial de Sanidad Animal (OIE). Lista de antimicrobianos de importancia veterinaria de la OIE. Noviembre de 2007.
16. Comité de medicamentos para usos veterinarios (CVMP). Reunión conjunta FAO/OMS/OIE de expertos sobre la resistencia a los antimicrobianos de importancia crítica. Solicitud de datos e información. EMEA/CVMP/253620/2007, 14 de junio de 2007.
17. Saif Y. Diseases of Poultry 11th ed. Iowa State University Press 2003;56:719-743.
18. Miranda CD, Kerhenberg C, Ulep C, Schwarz S, Roberts M. Diversity of tetracycline resistance genes in bacteria from Chilean salmon farms. Antimicrob. Agents Chemother. 2003;47:883-888.
19. Chopra I, Roberts M. Tetracycline Antibiotics: Mode of Action, cations, molecular Biology, and Epidemiology of Bacterial Resistance. Microbiol Mol Biol Rev. 2001;65:232-260.
20. Gautier-Bouchardon A, Reinhardt AK, Kobisch M, Kempf I. In vitro development

- resistance to enrofloxacin, tylosin, tiamulin and oxytetracycline in *Mycoplasma gallisepticum*, *Mycoplasma iowae* y *Mycoplasmas synoviae*. Vet Mic. 2002;88:47-58.
21. Rivera-Tapia JA, Rodriguez N. Micoplasmas y antibioticos. Salud Pública Méx vol.48 n.1 Cuernavaca Jan./Feb. 2006. <http://dx.doi.org/10.1590/S0036-36342006000100002>
 22. Gerchman I, Levisohn S, Mikula I, Manso-Silván L, Lysnyansky I. Characterization of in vivo-acquired resistance to macrolides of *Mycoplasma gallisepticum* strains isolated from poultry. Vet Res. 2011;42:90.
 23. Stakenborg T, Vicca J, Butaye P, Maes D, Minion FC, Peeters J, De Kruif A, Haesebrouck F. Characterization of In Vivo acquired resistance of *Mycoplasma hyopneumoniae* to macrolides and lincosamides. Microb Drug Resist. 2005;11(3):290-294.
 24. Wu CM, Wu H, Ning, Y., Wang, J., Du, X., Shen, J., 2005. Induction of macrolide resistance in *Mycoplasma gallisepticum* in vitro and its resistance-related mutations within domain V of 23S rRNA. FEMS Microbiol. Lett. 247(2):199-205.
 25. Forrester CA, Bradbury J, Dare C, Domangue R, Windsor H, Tasker J, Mockett A. *Mycoplasma gallisepticum* in pheasants and the efficacy of tylvalosin to treat the disease. Avian Pathology. 2011;40(6):581-586
 26. Gião Antunes N.T. Mecanismos de resistencia a las quinolonas en *Mycoplasma mycoides subsp. mycoides* LC. Tesis doctoral. Universidad de Las Palmas de Gran Canaria.2007.
 27. Stipkovits, L. and Mockett, APA. Aivlosin granules for oral solution used for the treatment and prevention of mycoplasmosis due to *Mycoplasma gallisepticum*. Abstracts of the 15th Congress of the World Veterinary Poultry Association, Beijing, China. 2007; p. 537.
 28. Stuart AD, Brown, TDK, Imrie G, Tasker J.B, and Mockett APA. Intra-cellular accumulation and trans-epithelial transport of aivlosin, tylosin and tilmicosin. The Pig Journal.2007;60: 2635.
 29. Van Bambeke F, Michot JM, Van Eldere J, Tulkens PM. Quinolones in 2005: an update. Clin Microbiol Infect. 2005;11(4):256-280.
 30. Andersson MI, MacGowan AP. Development of the quinolones. J. Antimicrob. Chemother. 2003; 51 Suppl 1:1-11.
 31. Van Bambeke F, Glupezynski Y, Plésiat P, Pechère JC, Tulkens PM. Antibiotic efflux pumps in prokaryotic cells: occurrence, impact on resistance and strategies for the future of antimicrobial therapy. J Antimicrob Chemoth. 2003;51:1055-1065.
 32. Gerchman I, Lysnyansky I, Perk S, Levisohn S. In vitro susceptibilities to fluoroquinolones in current and archived *Mycoplasma gallisepticum* and *Mycoplasma synoviae* isolates from meat-type turkeys. Vet Microbiol. 2008;131(3):266-276.
 33. Gharaibeh S, Al-Rashdan M. Change in antimicrobial susceptibility of *Mycoplasma gallisepticum* field isolates. Vet Microbiol. 2011;150(3):379-383.
 34. Reinhardt AK, Gautier-Bouchardon AV, Gicquel-Bruneau M, Kobisch M, Kempf I. Persistence of *Mycoplasma gallisepticum* in chickens after treatment with enrofloxacin without development of resistance. Vet Microbiol. 2005;106(1-2):129-137.