



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

---

Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia  
División de Estudios Profesionales

Detección de  $\beta$ -lactamasas de espectro extendido tipo TEM, SHV Y CTX-M en  
cepas de *Pasteurella multocida*

T E S I S

Que para la obtención del título de  
MÉDICA VETERINARIA ZOOTECNISTA

P R E S E N T A

Valeria Orozco Tenorio

Dr. Carlos Julio Jaramillo Arango  
Dr. Rigoberto Hernández Castro



México D.F. 2009.



Universidad Nacional  
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

**Biblioteca Central**



**UNAM – Dirección General de Bibliotecas**  
**Tesis Digitales**  
**Restricciones de uso**

**DERECHOS RESERVADOS ©**  
**PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

## **Dedicatoria.**

A mi familia:

Por los mejores momentos de mi infancia, por hacerme feliz, por mostrarme lo dulce de la vida, gracias por existir abuelo y porque siempre vivirás en mi Teté. Los amo.

Este es un tributo a mis padres; por ser el norte de mi cielo y ser las estrellas que alumbran mi corazón, no hay mejor ejemplo que ustedes porque son quienes han alimentado y fortalecido mi espíritu, alentado cada paso de mi vida, impulsado mi carrera. Gracias porque soy el producto de su infinito amor. Sentirme parte de ustedes es lo mejor de mi vida. Me siento orgullosa de llevar su sangre.

A Gaby por ser mi segunda hermana y compartir conmigo lo malo, porque todo lo malo contigo se convierte en bueno.

A mi hermana por brindarme la oportunidad de creer en la magia de la vida, la cual está en Fátima y Uriel.

Simplemente gracias a cada uno de ustedes por creer en mí.

Duque, Reyna, Mirru, Luna, Almendra, Puchi, Chiquita, Güero, Chispin, Enano y Azabache porque en ustedes nació la inspiración y fuerza para estudiar esta carrera.

## **Agradecimientos**

Agradezco a la UNAM, y a la FMVZ por mi desarrollo profesional así como a cada uno de los profesores que intervinieron en mi formación.

A mis asesores: Dr. Carlos Julio Jaramillo Arango y Dr. Rigoberto Hernández Castro por darme seguimiento a todas las actividades necesarias para concluir este trabajo.

Agradezco al Programa de Apoyo a Proyectos de Investigación e Innovación Tecnológica de la UNAM por el financiamiento de esta tesis a través del proyecto PAPIIT IN 208708. Gracias por su confianza y sus consejos para alcanzar mi desarrollo profesional.

A mi honorable jurado por la revisión y mejoramiento de mi trabajo, en especial a la Dra. Beatriz Arellano Reynoso, en la cual además de encontrar una excelente profesora encontré una amiga.

Al Departamento de Medicina Preventiva por su apoyo en la elaboración de esta tesis.

Al Dr. Francisco Suárez Güemes y al Dr. José Ángel Gutiérrez Pabello por permitirme desarrollar parte de este trabajo en el laboratorio de brucelosis y tuberculosis, así como al Departamento de Microbiología e Inmunología.

Al Dr. Alberto Ramírez Guadarrama por ser mi ángel de la guarda y mi guía.

Gracias de todo corazón a mis compañeros de laboratorio, porque además de encontrar buenos compañeros me brindaron su amistad, gracias: Georgie, Pablito, Ariel, Yuliet, Elihu, Erika, Jorge, Alexis, Alan, Irasema, Rosalia, Víctor Manuel y Yanela.

Quiero hacer un reconocimiento especial a Lucía del Carmen Favila Humara, a Uziel Castillo Velásquez y a Alma Delia González Rodríguez quienes me apoyaron incondicionalmente en todo momento y circunstancia.

Gracias a todos mis amigos, por escucharme y apoyarme.

# CONTENIDO

RESUMEN .....	5
INTRODUCCIÓN .....	6
1.1 GENERALIDADES .....	6
1.2 FACTORES INVOLUCRADOS CON LA RESISTENCIA ANTIMICROBIANA .....	7
1.3 PANORAMA ACTUAL DE LA RESISTENCIA ANTIMICROBIANA EN EL MUNDO .....	8
1.4 CARACTERÍSTICAS DE P. MULTOCIDA .....	9
1.4.1 TRATAMIENTO DE PASTEURELOSIS NEUMÓNICA .....	10
1.5 ELEMENTOS QUE PARTICIPAN EN LA TRANSFERENCIA DE LA INFORMACIÓN GENÉTICA BACTERIANA .....	10
1.6 MECANISMOS DE RESISTENCIA ANTIMICROBIANA. ....	12
1.7 β-LACTAMASAS DE ESPECTRO EXTENDIDO (BLEES) .....	14
1.7.1 ORIGEN DE LAS BLEES .....	14
1.7.2 CLASIFICACION Y CARACTERISTICAS DE LAS BLEES .....	16
1.8 DISTRIBUCIÓN DE BLEES EN AISLAMIENTOS DE ORIGEN ANIMAL Y HUMANO .....	18
1.9 MÉTODOS DE DETECCIÓN DE β-LACTAMASAS .....	21
2 JUSTIFICACIÓN .....	23
3 HIPÓTESIS. ....	26
4 OBJETIVO GENERAL. ....	26
4.1 OBJETIVOS ESPECÍFICOS .....	26
5 MATERIAL Y MÉTODOS .....	26
5.1 CEPAS .....	26
5.2 EXTRACCIÓN DE ADN .....	27
5.3 DETECCIÓN DE GENES .....	27
5.4 DETECCIÓN DE RESISTENCIA FENOTÍPICA .....	28
5.5 ANÁLISIS ESTADÍSTICO DE LOS RESULTADOS. ....	29
6 RESULTADOS .....	29
7 DISCUSIÓN .....	33
7.1 CONCLUSIONES .....	41
REFERENCIAS .....	41

## RESUMEN

OROZCO TENORIO VALERIA. Detección de  $\beta$ -lactamasas por medio de PCR en cepas de *Pasteurella multocida* (Bajo la dirección del Dr. Carlos Julio Jaramillo Arango y el Dr. Rigoberto Hernández Castro).

Los antimicrobianos son poderosos elementos empleados en la profilaxis, metafilaxis, así como para el tratamiento de infecciones bacterianas ocasionadas por diversos microorganismos entre los cuales se encuentra *P. multocida*. Esta bacteria pertenece a la familia *Pasteurellaceae* y se encuentra asociada a la pasteurelisis neumónica bovina, causada por los serotipos capsulares A y D. Asimismo, *P. multocida* también se encuentra implicada en la fiebre de embarque como un agente secundario u oportunista. Los gastos asociados por el empleo de antimicrobianos en bovinos de explotaciones lecheras asociados a problemas respiratorios reportan grandes pérdidas económicas ocasionadas por el tratamiento antimicrobiano, donde destaca principalmente el uso de quimioterapéuticos  $\beta$ -lactámicos, ya que son estos los antimicrobianos de mayor prescripción en el mundo, lo cual, aunado al mal empleo de los mismos, ha ocasionado la presentación de resistencia antimicrobiana principalmente asociada a  $\beta$ -lactamasas de espectro extendido (BLEEs).

Los objetivos de este trabajo fueron determinar la resistencia a diversos quimioterapéuticos por medio de antibiogramas y detectar los genes que codifican para las BLEEs tipo TEM, SHV y CTX-M por medio de la PCR en 30 cepas de *P. multocida* obtenidas a partir de pulmones neumónicos de origen bovino provenientes de La Laguna (Durango y Coahuila). De acuerdo a los resultados obtenidos en los antibiogramas el 13% de las cepas fueron resistentes a ampicilina y el 87% fueron susceptibles; para la penicilina el 30% fueron resistentes, el 63% presentaron susceptibilidad intermedia y el 7% fueron susceptibles. Para el sulfametoxazol-trimetoprim, el 40% fueron resistentes, el 3.3% fueron intermedias y el 20% fueron medianamente resistentes. Para las tetraciclinas el 16% fueron susceptibles y el 83% fueron resistentes. El 86% mostraron susceptibilidad al ceftiofur y 10% fueron intermedias. El 83% de las cepas fueron resistentes a la novobiocina y 13% fueron susceptibles. Ante la vancomicina, el 100% fueron resistentes.

En cuanto a la detección molecular de genes de resistencia  $\beta$ -lactámica, en el 93% de las cepas se detectó el gen *bla*<sup>SHV</sup> y en el 85% se detectó el gen *bla*<sup>TEM</sup>. En ninguno de los aislamientos fue posible detectar el gen *bla*<sup>CTX-M</sup>. Se concluye que este es el primer reporte en el mundo sobre la detección de los genes *bla*<sup>TEM</sup> y *bla*<sup>CTX-M</sup> en cepas de *P. multocida* de origen animal. Es necesario analizar un mayor número de cepas en diferentes regiones del país para conocer de una forma general la distribución de genes  $\beta$ -lactámicos.

## INTRODUCCIÓN

### 1.1 GENERALIDADES

Uno de los descubrimientos más sobresalientes del siglo pasado fueron los antibióticos, los cuales han brindado beneficios incalculables a la salud y calidad de vida del hombre y animales.

Las penicilinas y cefalosporinas constituyen alrededor de la mitad de todos los antibióticos que se producen en el mundo. Estos fármacos, así como los carbapenems, monobactams y penems constituyen el grupo de antimicrobianos  $\beta$ -lactámicos, de los cuales los tres últimos no han sido introducidos en producción pecuaria ya que su alto costo no justifica su utilización en este rubro. Los  $\beta$ -lactámicos son los antibióticos con mayor prescripción en medicina humana y veterinaria; en animales, su uso se ha convertido en el pilar que sustenta la salud y bienestar en pequeñas especies, fauna silvestre y animales de abasto. Cabe destacar que el empleo de este grupo de antimicrobianos en el ámbito pecuario ha permitido alcanzar metas específicas de producción para generar alimentos de origen animal que son un recurso insustituible de proteínas, vitaminas y minerales.<sup>1</sup>

El abuso de éstos y otro tipo de antimicrobianos, ha traído consigo problemas irreversibles sobre poblaciones microbianas que pocos vislumbraron, ya que la constante exposición a los fármacos han forzado gradualmente la selección natural de cepas que han adquirido diversos mecanismos de resistencia, dando lugar a la supervivencia de poblaciones bacterianas resistentes, así como a la eliminación de poblaciones bacterianas susceptibles.<sup>2</sup>

La resistencia antimicrobiana perfila entre uno de los principales problemas de este siglo tanto en salud pública como en medicina veterinaria (principalmente en animales de producción) ya que la inocuidad alimentaria se ha visto afectada por un mal manejo en la densidad animal, contaminación toxicológica y microbiológica de los productos pecuarios por carencia de higiene, deficiencias en terapias antimicrobianas, así como en la utilización de heces como fertilizantes.<sup>3</sup>

El resultado del mal empleo de los antimicrobianos se refleja en el manejo inadecuado de las cefalosporinas, ya que deberían ser utilizadas exclusivamente en el tratamiento de infecciones severas como mastitis, metritis, enfermedades del aparato respiratorio de rumiantes, caballos y

cerdos, así como en la enteritis necrótica de las aves y en la septicemia causada por *Escherichia coli* en becerras, sin embargo; se emplean de manera indiscriminada en todo tipo de infecciones.<sup>4</sup> En medicina veterinaria, los antibióticos y antimicrobianos además de ser utilizados para atender enfermedades en animales de compañía, acuicultura y en animales de producción, se emplean también como una poderosa herramienta para prevenir y combatir enfermedades bacterianas, adicionalmente se utilizan como promotores de crecimiento en animales de consumo. Algunos antimicrobianos como la ampicilina, el ácido arsenílico, bacitracina, clortetraciclina, dihidroestreptomicina, efrotomicina, lasalocid, monensina, oleandomicina, penicilina, roxarsona, espectinomicina, tilosina y virginamicina son utilizados como facilitadores del crecimiento, los cuales se administran en el agua o alimento de animales jóvenes de diferentes especies, como cerdos, bovinos y aves de producción (pollos y pavos) que se crían en condiciones de confinamiento y cuyas dosis se manejan en niveles subterapéuticos.<sup>5,6</sup>

## **1.2 FACTORES INVOLUCRADOS CON LA RESISTENCIA ANTIMICROBIANA**

El régimen de tratamiento es uno de los factores que están más fuertemente vinculados con la resistencia antimicrobiana, ya que las concentraciones plasmáticas que cada producto antimicrobiano debe alcanzar dependen de variables farmacocinéticas como la vía de administración, el volumen de distribución, el tiempo de vida media del fármaco y su concentración máxima en el plasma.<sup>7</sup>

Un apropiado régimen antimicrobiano también contempla el intervalo de tiempo en la administración del fármaco y la duración del tratamiento. Todo este conjunto de variantes actuarán contra una población microbiana heterogénea, la cual mostrará diversos perfiles de resistencia implicando distintos requerimientos para inhibir su crecimiento.<sup>8</sup>

Posterior a que el antimicrobiano haya alcanzado su máxima concentración plasmática, declinarán sus niveles en el animal, ese decremento traerá como consecuencia la supervivencia de poblaciones bacterianas, cuya expresión fenotípica y genotípica hayan mostrado diversos rasgos característicos de resistencia.<sup>7</sup>



### 1.3 PANORAMA ACTUAL DE LA RESISTENCIA ANTIMICROBIANA EN EL MUNDO

La administración subterapéutica de antimicrobianos como promotores de crecimiento (penicilinas, tetraciclinas, cloranfenicol, aminoglicósidos, espectinomycinas, lincosaminas, macrólidos, nitrofuranos, nitroimidazoles, sulfonamidas, trimetoprim, polimixinas y quinolonas) en animales de producción, ha sido objeto de debates fundamentados en la correcta y meticulosa administración de diversos quimioterapéuticos, ya que debido al empleo de los mismos medicamentos para tratar y prevenir enfermedades de origen animal, también se han creado modificaciones genéticas en microorganismos de origen humano.<sup>6, 9</sup>

Debido a esta situación, el Comité de Swann recomendó que los antimicrobianos con valor terapéutico en el tratamiento de infecciones en humanos no pudieran ser aprobados como promotores de crecimiento en animales de abasto; sin embargo, el Comité no consideró que fármacos con poca significancia en medicina humana pudieran ser aprobados como promotores de crecimiento. Algunos de estos antimicrobianos como la virginamicina, avoparacina y avilamicina han cobrado importancia como el último recurso en el tratamiento de infecciones en animales y pertenecen a las mismas clases de fármacos de uso humano que la vancomicina, estreptograminas como quinupristin-dalfopristin (Synercid) y everniminomicinas (como el Ziracin), respectivamente.<sup>10</sup>

Una de las cuestiones más alarmantes es que actualmente, la perspectiva farmacológica humana, se ha visto reducida con la llamada “reserva antimicrobiana”, en la que solamente se incluyen los ketólidos, oxazolidonas y gliciliclinas, por ello, se ha dado un mayor enfoque e importancia en investigaciones referentes hacia resistencia antimicrobiana.<sup>11</sup>

Los estudios que reportan la resistencia antimicrobiana, en su mayoría se refieren a agentes que además de ser patógenos importantes en medicina veterinaria, también son parte de la microbiota de diversos animales, por lo cual, tienen una constante exposición a los antimicrobianos con los que son medicados los animales como *E. coli*, *Salmonella* spp. (como los más estudiados), *Actinobacillus pleuropneumoniae*, *Histophilus somni*, *Mannheimia haemolytica* y *Pasteurella multocida*.<sup>6</sup>

#### 1.4 CARACTERÍSTICAS DE *P. multocida*

La descripción fenotípica de *P. multocida* refiere un cocobacilo, Gram negativo, no móvil, no hemolítico cuyas colonias son pequeñas grisáceas y mucoides.

Las características bioquímicas corresponden a un microorganismo generalmente oxidasa y catalasa positivo, el cual crece en agar sangre a 37 °C en 18 horas, capaz de fermentar la glucosa, la fructosa, la galactosa y el manitol.<sup>12</sup> Esta bacteria pertenece a la familia *Pasteurellaceae* que actualmente comprende los géneros *Pasteurella*, *Haemophilus*, *Actinobacillus*, *Lonepidella*, *Mannheimia*, *Phocoenobacter*, *Gallibacterium*, *Histophilus*, *Voluvribacter*, *Avibacterium*, *Niconetella* y *Agregatibacter*.<sup>13, 14</sup>

*P. multocida* posee 16 serotipos somáticos y 5 serogrupos capsulares: A, B, D, E y F, de los cuales han sido reportados en México únicamente los serogrupos A y D.<sup>15</sup> *P. multocida* se divide en cuatro subespecies *multocida*, *gallicida*, *septica* y *tigris*, las que se caracterizan por fermentar D-sorbitol y dulcitol.<sup>16</sup>

*P. multocida multocida* es el miembro más estudiado, ya que forma parte de la flora normal de la orofaringe de diversas especies de animales, entre ellos los rumiantes, aves de producción, cerdos, conejos y animales de compañía como perros y gatos.

La pasteurelisis neumónica bovina causada por los serotipos capsulares A y D, se presenta principalmente en Europa y Norte América. *P. multocida* también se encuentra implicada en la fiebre de embarque (*M. haemolytica* 71.1%, *P. multocida* 21.1%, *H. somni* 7.8%) como un agente secundario u oportunista.<sup>17,18,19 20</sup> De hecho *M. haemolytica* es la bacteria más comúnmente asociada a esta enfermedad, pero el incremento en la presentación de casos fatales en bovinos productores de carne se atribuye principalmente a *P. multocida*.<sup>19</sup>

Esta enfermedad, se encuentra vinculada con el complejo respiratorio bovino, enfermedad multifactorial, donde además de estar implicada *P. multocida*, *M. haemolytica* e *H. somni*, también se encuentran asociados el virus de la Parainfluenza 3, así como el virus de la rinitis infecciosa bovina y el virus sincitial respiratorio.<sup>17</sup>

La pasteurelisis neumónica bovina presenta una morbilidad desde el 4.6-89% y una mortalidad del 1 al 13%, por ello, es la enfermedad económicamente más importante en ganado bovino productor de carne y en ganado bovino productor de leche es la segunda enfermedad en importancia después de los problemas gastrointestinales, particularmente en becerros

recientemente transportados o en animales de 1 a 5 meses. Los picos de presentación de esta enfermedad son estacionales, ya que la mayor parte de los casos se manifiestan en otoño e invierno debido al frío, cambios bruscos de temperatura, además de la presencia de polvo, el estrés ocasionado por hacinamiento, la transportación, la humedad y la deshidratación.<sup>19</sup>

Como fenómeno zoonótico la pasteurelosis adquiere relevancia en salud pública ya que perros y gatos pueden transmitir *P. multocida* al humano por mordedura e incluso, por contacto directo con secreciones de la cavidad oral, ocasionando en el hombre abscesos profundos, artritis séptica, meningitis, endocarditis, peritonitis, neumonía, sepsis e incluso se han reportado casos de infección del tracto urinario bajo<sup>21</sup>

#### **1.4.1 TRATAMIENTO DE PASTEURELOSIS NEUMÓNICA**

El tratamiento antimicrobiano de primera línea que se sugiere ante las infecciones ocasionadas por *P. multocida*, son las sulfas-trimetoprim (150-200mg/kg y la mitad de la dosis por cuatro días más), tetraciclinas (20 mg/kg en dos tomas por vía oral), estreptomycinas (10mg/kg cada 8 a 12 horas).<sup>22</sup>

#### **1.5 ELEMENTOS QUE PARTICIPAN EN LA TRANSFERENCIA DE LA INFORMACIÓN GENÉTICA BACTERIANA**

La colonización y supervivencia de *P. multocida* dependen principalmente de sus factores de virulencia, en los que se incluyen la presencia de fimbria y adhesinas, cápsula, lipopolisacárido (LPS), proteínas para la adquisición de hierro, enzimas extracelulares y plásmidos, que son los que llevarán a cabo la incorporación de genes de resistencia y serán los responsables del éxito en la incorporación y transferencia de dicha información.<sup>14</sup>

El éxito en la transferencia de información genética, radica en la utilización de elementos genéticos de la célula para el intercambio de su información con otras bacterias a través de bacteriófagos, plásmidos, transposones e integrones por mediación o por simple transformación a otra bacteria en la población.<sup>23</sup>

La conjugación se lleva a cabo a partir de una bacteria donadora a una receptora y es considerado el mecanismo de transferencia de resistencia más importante, ya que se ha estimado que aproximadamente el 85% en la falla de terapias antimicrobianas se debe a este tipo de mecanismo aunado a otros mecanismos como transformación y transducción.<sup>23</sup>

La conjugación se lleva a cabo por medio del plásmido *F* que se encuentra dentro de las células bacterianas como ácidos nucleicos de doble cadena y son considerados secuencias de ADN extracromosomal de forma circular, que se replican independientemente del cromosoma del hospedador.<sup>24, 25</sup>

Los plásmidos son unidades no necesarias para la supervivencia de las bacterias; sin embargo, confieren ventajas selectivas a las células que los portan, convirtiéndose en el elemento genético móvil más importante para la adquisición de resistencia y factores de virulencia. La conjugación requiere del contacto de bacterias que son *F* positivas (donadoras), las cuales poseen en su superficie de dos a tres apéndices llamados pilis, con bacterias *F* negativas (receptoras); seguido de este contacto, se lleva a cabo la transferencia del factor *F*. Si el factor *F* existe como un plásmido libre en la bacteria donadora, éste es transferido, y el proceso cambia a la bacteria receptora a un estado *F* positiva; sin embargo, si el factor *F* está integrado en el cromosoma de la bacteria donadora, el proceso de la transferencia de la información se llevará a cabo de forma integral, es decir, se transferirá no solo la información plasmídica, sino que también se incluirá la transferencia de información cromosomal.<sup>26</sup>

La información que los plásmidos pueden transportar se relaciona con determinantes de virulencia, adhesión y resistencia antimicrobiana; estos últimos reciben el nombre de plásmidos R o factores R y pueden ser clasificados de acuerdo a la forma de replicación en incompatibles y compatibles, plásmidos incompatibles son aquellos que utilizan formas diferentes de replicación y son capaces de converger en una misma bacteria.<sup>23</sup>

Los plásmidos que comparten las mismas formas de replicación o compatibles son incapaces de persistir en una misma bacteria por periodos prolongados. Además de todas las funciones anteriormente mencionadas, los plásmidos pueden servir como vehículos para transposones e integrones.<sup>24, 26, 25</sup>

Los transposones son secuencias de genes que se pueden mover del cromosoma al plásmido; están compuestos por una región IS (secuencias de inserción) y por una transposasa, que es la enzima responsable de la transposición. Los plásmidos y transposones (conjugativos y complejos) están involucrados en la transferencia de genes de resistencia de una célula a otra; sin embargo, una porción sustancial de la resistencia presente en los plásmidos y transposones de bacilos Gram negativos se encuentran integrados en elementos móviles de ADN llamados

integrones. Estos integrones existen como ADN circular con un peso aproximado entre 500-1000 pares de bases (pb) y están constituidos por dos segmentos conservados que flanquean una región central de ADN, en la cual se puede insertar cassetes de resistencia, estos cassetes no pueden ser expresados a menos que se unan a la región de su promotor.<sup>25, 27</sup>

## 1.6 MECANISMOS DE RESISTENCIA ANTIMICROBIANA.

La resistencia antimicrobiana que expresa *P. multocida* depende de la especie animal, año de los aislamientos, situación geográfica, tratamiento antimicrobiano de los animales, así como el acceso que tenga en la adquisición de genes de resistencia que posean otras bacterias.<sup>28</sup>

La mayoría de los genes de resistencia que actualmente se han reportado en *P. multocida* se encuentran en plásmidos de tamaño pequeño (4.1-4.4 Kb), así como en transposones no conjugativos. Los plásmidos conocidos con el nombre de “amplio rango de huésped” han sido capaces de replicarse en diferentes géneros bacterianos, como el plásmido R100, el cual transporta pequeñas copias de transposones no conjugativos. Los genes *catAIII* y *sulII*, se encuentran ampliamente distribuidos en la familia *Enterobacteriaceae* y otras bacterias Gram negativas, mientras que otros genes como *tet* (M) que codifica para la resistencia hacia tetraciclinas y *bla* ROB1 que confiere resistencia hacia la robenidina, aparentemente muestran compatibilidad entre bacterias Gram positivas y bacterias Gram negativas.<sup>29</sup>

El abuso en la utilización de diversos antimicrobianos, ha fungido como un factor relevante para que los genes responsables de la resistencia antimicrobiana se expresen en microorganismos patógenos, así como en la microbiota. La presión de selección ha dado como resultado la alteración del genoma de los microorganismos, ya sea por medio de mutaciones en el cromosoma, o bien por medio de la transferencia de estas alteraciones a otras bacterias.<sup>11</sup>

A pesar de los eficientes y elaborados mecanismos de transferencia de información extracromosomal, éstos no forman la totalidad de los elementos con los cuales las bacterias se han adaptado a su propio medio, ya que la resistencia además de ser adquirida, también puede ser constitutiva o inducible, todo depende de la presencia del gen que codifique para alguna función de resistencia inherente a la bacteria (constitutiva) o que la bacteria sea expuesta a un agente antimicrobiano para que sea expresado (inducible). Existen cuatro mecanismos de

resistencia inducible que pueden encontrarse en bacterias (principalmente en bacterias Gram negativas), los cuales pueden ser resumidos de acuerdo a diferentes mutaciones que se llevan a cabo en diversos genes con funciones fisiológicas e incluso, más de un mecanismo de resistencia puede encontrarse en una misma bacteria. El primero de ellos es la reducción en la permeabilidad de la célula por mutaciones en proteínas de la membrana externa (OMP), las cuales se expresan con el decremento del número de estructuras llamadas porinas, donde se lleva a cabo el intercambio entre sustancias del medio extracelular al espacio periplásmico, lo que conlleva a la reducción en la cantidad de antibiótico capaz de penetrar en la célula. La reducción en la permeabilidad celular, aunada a otros mecanismos bacterianos de supervivencia puede proveer a los microorganismos altos niveles de resistencia, aún sometidos a incrementadas dosis de antibióticos.<sup>30</sup>

El segundo mecanismo de resistencia es la alteración de los sitios blanco hacia los que se dirigen los  $\beta$ -lactámicos. Una de las principales características de los  $\beta$ -lactámicos es la afinidad por proteínas de unión a la penicilina (penicillin binding proteins o PBP) que son transpeptidasas y carboxipeptidasas, elementos involucrados en la formación de la pared celular bacteriana. Los  $\beta$ -lactámicos inhiben la síntesis final de peptidoglicano, en el cual algunas cepas sintetizan formas alteradas de PBP, que conlleva a la poca afinidad entre el antibiótico  $\beta$ -lactámico y la pared celular bacteriana. Otro tipo de mutación es la que se lleva a cabo en genes que codifican para la conformación del LPS, la cual puede cambiar de forma, así como también su carga molecular disminuyendo la unión de antibióticos catiónicos.<sup>30</sup>

El tercer mecanismo de resistencia se origina por mutaciones que ocurren en los genes efectores de la bomba de eflujo, con un incremento de la expresión de la proteína de eflujo tornándola más eficiente en la exportación del antimicrobiano fuera de la célula. La activación de los genes de la bomba de eflujo, generalmente originan resistencia a un antibiótico en particular o a varios, otorgándoles ventajas con la posibilidad de generar resistencia antimicrobiana múltiple. La transmisión de las bombas de eflujo puede ser mediante elementos genéticos, los cuales pueden estar expresados constitutivamente (resistencia constitutiva) o estar influenciadas por diversos factores del entorno bacteriano.<sup>31, 32</sup> La cuarta y más importante característica de resistencia bacteriana es la producción de enzimas que degradan o modifican los antibióticos por medio de la hidrólisis del anillo  $\beta$ -lactámico, dichas enzimas

reciben el nombre de  $\beta$ -lactamasas. Los  $\beta$ -lactámicos, pueden inducir también los tres mecanismos anteriormente descritos, generando mutaciones en las proteínas de unión a la penicilina, mutaciones en los genes que codifican para la producción de porinas, así como la regulación de las proteínas requeridas para el flujo de energía utilizadas en las bombas de eflujo.<sup>33</sup>

## **1.7 $\beta$ -LACTAMASAS DE ESPECTRO EXTENDIDO (BLEEs)**

### **1.7.1 ORIGEN DE LAS BLEEs**

Actualmente, se conoce que muchas bacilos Gram negativos poseen  $\beta$ -lactamasas cromosomalmente inducidas. Estas enzimas probablemente evolucionaron de las PBP, con las cuales sus secuencias mostraron homología. Estas enzimas fueron halladas en bacterias aisladas del suelo antes de 1950, y existe la teoría de que sobrevivieron gracias a la presión de selección ejercida en su propio medio. Debido a lo anterior se ha discutido sobre el origen de la resistencia antimicrobiana ya que la capacidad bacteriana para evadir antibióticos comenzó incluso antes de que la penicilina fuera descubierta.<sup>34</sup>

La creencia más popular acerca del origen de la resistencia antimicrobiana es que los microorganismos son capaces de producir mecanismos de defensa para protegerse de la producción de sus propios antibióticos (autotoxicidad). Esta hipótesis se ha corroborado al hallar enzimas modificadoras de aminoglicósidos en organismos productores de este tipo de antibióticos.<sup>34</sup>

Los primeros reportes acerca de resistencia antimicrobiana datan de 1920, cuando fueron identificados genes *ampC* que provenían de cepas de *Citrobacter freundii*, previo al uso clínico de los antibióticos.<sup>35</sup> Al inicio de 1930, la era de los antibióticos comenzaba con el descubrimiento de las sulfonamidas por Hagedorn y con ello, muchas vidas fueron salvadas. Posteriormente en 1939, Fleming descubrió el primer  $\beta$ -lactámico, denominado penicilina, el cual es el producto del metabolismo fungal secundario de *Penicillium chrysogenum*. Este antibiótico desempeñó un papel fundamental al inhibir incluso aquellas bacterias con resistencia a las sulfonamidas y mantener su actividad en el sitio de la infección. El mal empleo y el abuso de la penicilina, por sus bondadosas características trajo consigo la resistencia a la misma. Con el avance de la ciencia, nuevas investigaciones dieron paso a otras alternativas en

antibioterapia. Una de las nuevas opciones que los laboratorios farmacéuticos aportaron a la humanidad fue el descubrimiento de las cefalosporinas, antibiótico producido por el hongo *Cephalosporium*.<sup>36, 37</sup>

En respuesta hacia la resistencia antimicrobiana. Con el paso del tiempo también se desarrolló resistencia antimicrobiana contra las cefalosporinas, pero en la década de 1960 se desarrollaron penicilinas de amplio espectro como nuevos antimicrobianos, ya que debido a la inclusión de sustancias de origen sintético en su formulación, fue posible aumentar el espectro de las mismas. No obstante, en 1965, se detectó la primera  $\beta$ -lactamasa mediada por un plásmido, proveniente de un cultivo de *E. coli* aislado de la sangre de un paciente de Grecia, esta  $\beta$ -lactamasa fue denominada con el nombre de "TEM-1" (ya que se relacionó con el nombre del paciente: Temoniera). TEM-1 se diseminó con rapidez en otros géneros bacterianos como *Haemophilus influenzae*, *Neisseria gonorrhoeae*, y *Pseudomonas aeruginosa*.

<sup>38.</sup> Al mismo tiempo, otra  $\beta$ -lactamasa mediada por un plásmido fue descubierta en aislados de *Klebsiella spp* y *E. coli*. El nombre que esta enzima recibió fue el de "SHV-1", ya que es una variable sulfhidrilo. <sup>36</sup> El resultado de la aparición de estas enzimas dictó el desarrollo farmacológico de las siguientes décadas. En los años 80's, se crearon las cefalosporinas de tercera generación u oximino-cefalosporinas, las cuales mostraron una impresionante estabilidad contra las enzimas TEM y SHV. <sup>39</sup>

Se requirió un breve periodo de tiempo para que se generaran mutaciones que utilizarían como sustrato cefalosporinas de tercera generación en respuesta al uso reiterado de las mismas. El primer reporte referente a un plásmido que codificaba para una  $\beta$ -lactamasa capaz de hidrolizar con gran facilidad cefalosporinas de tercera generación se realizó en Alemania en el año de 1985, a partir de un aislamiento de *Klebsiella ozaenae*, por tal motivo, es considerada como la primera  $\beta$ -lactamasa de espectro extendido (extended spectrum  $\beta$ -lactamases o ESBL's), la cual fue denominada SHV-2. <sup>40</sup>

Posteriormente surgieron nuevos descubrimientos de enzimas de estas familias, donde únicamente cambiaban uno o dos aminoácidos en sus secuencias.

En 1986 en Japón se tuvo el primer reporte de una enzima que no era TEM ni SHV, a la cual se le nombro "FEC-1" en un aislado de *E. coli* resistente a cefotaxima proveniente de la microbiota fecal de una perro que era utilizado para estudios farmacocinéticos. <sup>41</sup>



Tres años después, en un cultivo de *E. coli* fue detectada una enzima con alta actividad a la cefotaxima, la cual recibió el nombre de “CTX-M -1”, debido a su alta capacidad hidrolítica hacia la cefotaxima.<sup>42</sup> Al mismo tiempo en Sudamérica (Argentina) se encontró una enzima con las mismas características. En 1992 se reportó en Francia una enzima denominada “MEN-1”, la cual fue aislada de una cepa de *E.coli* perteneciente a un paciente de nacionalidad italiana.<sup>43</sup> En 1993 en Japón se reportó nuevamente una cepa cefotaxima resistente a la cual llamaron Toho-1, que se aisló a partir de un cultivo de *E.coli*. Por medio de la secuenciación de estas enzimas en 1996 se reveló que Toho-1(CTX-M-2) es una variante de MEN-1 (CTX-M-1). Estas enzimas comparten 39% de identidad con TEM.<sup>44</sup>

### 1.7.2 CLASIFICACION Y CARACTERISTICAS DE LAS BLEEs

Las  $\beta$ -lactamasas han sido clasificadas en diversos grupos, donde las BLEEs ( $\beta$ -lactamasas de espectro extendido) se clasifican principalmente en dos. El primero de ellos, es el subgrupo 2b, de acuerdo a su capacidad hidrolítica, en el cual se incluyen aquellas que son capaces de hidrolizar aminotiazolexima y antibióticos beta-lactámicos de espectro extendido. Sin embargo la clasificación antes mencionada no es suficiente y por ello también requieren ser agrupadas de acuerdo a la clasificación de Ambler, en la cual pertenecen a la clase A, formando un grupo molecular heterogéneo que comparte del 20 al 99% de identidad en las secuencias de sus aminoácidos, que incluyen las enzimas SHV, TEM y CTX-M.<sup>45, 46</sup>

En la actualidad se han reconocido casi 400  $\beta$ -lactamasas y su evolución ha sido tan rápida que se han clasificado en 9 familias, basadas en las diferencias entre las secuencias de sus aminoácidos TEM, SHV, CTX-M, PER, VEB, GES, TLA, BES y OXA. De las cuales, las familias más grandes son TEM, SHV y CTX-M.<sup>45, 47</sup>

Las enzimas TEM y SHV fueron encontradas en *Klebsiella pneumoniae* y *E. coli* y son mutantes de las variantes estructurales de las penicilinasas TEM-1, TEM-2 y SHV-1, siendo muchas de estas enzimas ceftazidimasas y muy pocas cefotaximasas. Estas enzimas actualmente cuentan con alrededor de 130 variantes repartidas entre ambos grupos.<sup>48</sup>

Los alelos <sup>bla</sup>TEM confieren su ancestral habilidad de resistencia hacia penicilinas, sin embargo, dicha habilidad ha derivado actualmente en la resistencia hacia cefalosporinas de amplio espectro como cefalotina y cefaloridina, debido a ello se cree que la frecuencia de estos alelos

podría incrementar ya que confieren nuevas ventajas fenotípicas.<sup>49</sup> Por ello es importante mencionar que los genes TEM-1 y TEM-2 son acarreados por transposones, mientras que los genes que codifican para la familia SHV se acarrean en plásmidos transmisibles.<sup>50</sup>

El *bla*TEM-1 a menudo coexiste en el mismo plásmido en asociación con *bla*TEM-2, *bla*OXA-1 y *bla*SHV. Estos plásmidos también pueden acarrear genes que codifiquen para la resistencia múltiple a otros antibióticos, incluyendo aminoglucósidos, cloranfenicol, sulfonamidas, trimetoprim y tetraciclinas.<sup>51</sup>

Respecto a la familia CTX-M, actualmente se conocen 86 enzimas, con una identidad del 62-75% y guardan poca relación respecto a las familias TEM y SHV.<sup>52</sup> Estas enzimas han sido subclasificadas de acuerdo a la secuencia de sus aminoácidos en los grupos Kluc-1, CTX-M-1, CTX-M-9, CTX-M-8, CTX-M-25, CTX-M-2. Asimismo, la familia CTX-M, se encuentra cromosomalmente en *Serratia fonticola*, *Klebsiella oxytoca*, *Proteus vulgaris* y *Citrobacter koseri*.<sup>53,54</sup>

En cepas aisladas de casos clínicos, los genes que codifican para las enzimas CTX-M han sido localizados comúnmente en plásmidos que varían entre un tamaño de 7 kb a 160 kb.<sup>55, 56</sup>

Las características fenotípicas de estas  $\beta$ -lactamasas (TEM, SHV) proveen un amplio espectro de resistencia hacia aminopenicilinas (ampicilina o amoxicilina) carboxipenicilinas (carbencilina y ticarcilina), ureidopenicilinas (piperacilinas), cefalosporinas de bajo espectro, de primera y segunda generación, así como cefalosporinas de amplio espectro, de tercera y cuarta generación, sobre todo hacia la cefapima y cefpiroma, pero no hay actividad hidrolítica ante la cefoxitina.<sup>56, 57</sup>

La actividad hidrolítica ante la cefotaxima ejercida por la familia CTX-M es 35 veces mayor comparada con la actividad que estas enzimas muestran contra la ceftazidima. Una de las principales características que diferencian a estas enzimas de las familias TEM y SHV es la baja eficiencia hidrolítica que presentan ante la ceftazidima.<sup>54</sup>

También se ha encontrado que las enzimas CTX-M aisladas de bacterias de origen animal coinciden con plásmidos que alojan un gen *bla*TEM así como con genes que codifican para la resistencia hacia aminoglucósidos, cloranfenicoles, trimetoprim y tetraciclinas.<sup>54</sup>

Muchas BLEEs tienen la capacidad de ser inhibidas por el ácido clavulánico y el tazobactam; estos compuestos son combinados con penicilinas (amoxicilina-ácido clavulánico o piperacilina

tazobactam), pero desde que su falla terapéutica se ha reportado no es claro su efecto sobre estas enzimas.<sup>58</sup>

Debido a ello, muchos estudios han sugerido que la terapia asistida con carbapenems son la mejor alternativa para combatir bacterias productoras de BLEEs ya que son altamente estables ante la hidrólisis de estas enzimas, no obstante, una de sus desventajas, es que tienen un alto costo, y aunado a esto, en Japón se han reportado carbapenemasas.<sup>59</sup>

## **1.8 DISTRIBUCIÓN DE BLEEs EN AISLAMIENTOS DE ORIGEN ANIMAL Y HUMANO**

Las BLEEs actualmente se encuentran distribuidas mundialmente. La determinación en la epidemiología de estas enzimas depende de la región geográfica, de la especie animal y año en el que se realice el estudio entre otros factores.<sup>60,54</sup>

Respecto al hallazgo de BLEEs en cepas de origen humano, se ha reportado que en el 30.2% de las enterobacterias provenientes del este de Europa se han encontrado estas enzimas<sup>61</sup>

En el continente Americano los tipos de BLEEs que más frecuentemente se han detectado SHV-2, SHV-5, CTX-M-2 en Sudamérica, y no fue sino hasta el 2001 que se reportó por primera vez la primera CTX-M en Estados Unidos.<sup>62</sup>

En África las cifras expresan que tan solo en el 6.1% de las cepas de *K. pneumoniae* analizadas en un hospital de Kenya se detectaron BLEEs.<sup>57 63</sup>

En Australia las estadísticas indican que en los hospitales únicamente el 5% de las cepas aisladas de *Klebsiella pneumoniae* son productoras de BLEEs.<sup>64</sup>

En Asia, se han observado interesantes contrastes entre los porcentajes de BLEEs; en China del 20 al 40% de las cepas de *Klebsiella pneumoniae* examinadas resultaron como productoras de BLEEs de amplio espectro, entre las cuales perfilan varios linajes de estas enzimas como SHV-2 y SHV-5, mientras que la presencia de las enzimas de la familia CTX-M han sido reportadas en Corea, China, Japón y Taiwán. En Tailandia, Taiwán, Filipinas e Indonesia se han determinado porcentajes de un 12-24% de cepas productoras de BLEEs.<sup>65-67</sup>

Respecto a los aislamientos de origen animal los reportes de BLEEs no son tan numerosos, lo cual no permite plantear una distribución certera. A partir de 1986 en que se reportó por

primera vez una  $\beta$ -lactamasa de origen animal y desde entonces, se han identificado diferentes tipos de BLEES en aislamientos de enterobacterias.

En el cuadro No. 1 se muestra la distribución de diferentes  $\beta$ -lactamasas identificadas en distintas especies animales, todas ellas en enterobacterias. La mayoría de los hallazgos se han reportado en diferentes países de Europa, seguidos por Estados Unidos y Canadá en Norte América y Japón en Asia. Es evidente que no hay reportes ni en África ni en América Latina. Hasta la fecha no se han reportado hallazgos de BLEEs en aislamientos de *P.multocida*.<sup>60</sup>

**Cuadro 1.** Distribución de diferentes  $\beta$ -lactamasas (BLEEs) identificadas en distintas especies animales según año, país y especie bacteriana.<sup>60</sup>

Año	País	Especie animal	Especie bacteriana	$\beta$ -lactamasas identificadas
1986	Japón	Perro	<i>E. coli</i>	FEC-1
1992	Reino Unido	Ganado vacuno	<i>E. coli</i> y <i>Citrobacter freundii</i>	TEM -1
1998	Estados Unidos de Norteamérica	Ganado vacuno	<i>Salmonella</i>	CMY-2
1998-1999	Estados Unidos de Norteamérica	Ganado vacuno, cerdos	<i>Salmonella</i>	CMY-2
1998-2000	Estados Unidos de Norteamérica	Ganado vacuno, cerdos, aves de producción y productos cárnicos	<i>E. coli</i> y <i>Salmonella</i>	CMY-2
1998-2003	Reino Unido	Ganado vacuno, aves de producción , cerdos	<i>E. coli</i> y <i>Salmonella</i>	CMY-2
1999-2002	Japón	Gallinas	<i>E. coli</i>	CTX-M-2,CTX-M-18,TEM-1,PSE-1
2000-2001	España	Gallinas	<i>E. coli</i>	CMY-2,CTX-M14,SHV-12, ampC
2000-2002	Dinamarca	Ganado vacuno	<i>E. coli</i>	CTX-M-2
2001	Grecia	Ganado vacuno, aves de producción, cerdos	<i>Salmonella</i>	CTX-M-32
2001-2002	Holanda	Gallinas y susu productos	<i>Salmonella spp.</i>	-1,TEM20,TEM-52,TEM-63,ACC-1,CTX-M-2,CTXM-3,CTX-M-28SHV-12,TEM-
2002	Canadá	Carne de pollo, carne de res, carne de cerdo	<i>E. coli</i> y <i>Salmonella spp</i>	CMY-2
2002	China	Ganado vacuno, cerdo, y lechones	<i>E. coli</i>	CTX-M-3,CTM-13,CTX-M-14 Y CTX-M-24
2002-2003	Portugal	Carne de cerdo	<i>Salmonella</i>	OXA-30
2003	Francia	Gallinas y sus productos	<i>Salmonella spp</i>	CTX-M-9
2003	Francia	Carne de caballo (importada)	<i>Salmonella spp</i>	CMY-2
2003	Dinamarca		<i>Salmonella spp</i>	CTX-M-9
2003	Dinamarca	Cerdos (importados de Canadá)	<i>Salmonella spp</i>	CTX-M-9,SHV-12,,TEM1-b
2003-2004	España	Aves de producción y cerdos	<i>Salmonella spp</i>	CMY-2,SHV-12,TEM1-b
2003-2004	Estados Unidos de Norteamérica	Equinos	<i>Salmonella spp</i>	CTX-M-14,TEM-35
2004	Reino Unido	Ganado vacuno	<i>E. coli</i>	TEM-52
2004	Dinamarca	Carne importada de Alemania	<i>E. coli</i>	CTX-M-1
2005	Dinamarca	cerdos	<i>E. coli</i>	CMY-2
descococido	Reino Unido	Ganado vacuno	<i>E. coli</i>	CTX-M-1,CTX-M-9,CTX-M-14
No especificado	España	Aves comerciales, cerdos, conejos	<i>E. coli</i> y <i>Enterobacter cloacae</i>	SHV-2,SHV-5,TEM-52

## 1.9 MÉTODOS DE DETECCIÓN DE $\beta$ -LACTAMASAS

El *National Committee for Clinical Laboratory Standards*, (NCCLS) actualmente conocido como *Clinical and Laboratory Standards* (CLSI) establece que dentro del diagnóstico rutinario de microorganismos también se realice una prueba de resistencia y para ello recomienda la prueba de detección de susceptibilidad de antibióticos (screening test) como un buen método para la detección de BLEEs, para ello son utilizadas la cefpodoxima, ceftazidima, aztreonam, cefotaxima y ceftriaxona; de cualquier forma, el uso de más de uno de estos agentes es útil para mejorar la sensibilidad de la detección.<sup>68,69</sup> La CLSI también ha recomendado la detección de estas enzimas por medio de concentraciones mínimas inhibitorias (MICs, por sus siglas en inglés), en los cuales el aztreonam, la cefotaxima y la ceftazidima pueden ser utilizados a una concentración de 1  $\mu\text{g/ml}$ . Las cepas sospechosas que crezcan en estas concentraciones de antibióticos (2 $\mu\text{g/ml}$ ) serán aquellas cepas que necesariamente serán sometidas a una prueba fenotípica confirmatoria, ya que si alguna cepa logra crecer sometida a ciertas concentraciones de antibiótico, esto no significa que sea resistente.

Las pruebas fenotípicas también pueden ser realizadas por microdilución en caldo utilizando la ceftazidima (0.25-1.28 $\mu\text{g/ml}$ ), ceftazidima más ácido clavulánico (0.25-4  $\mu\text{g}$ ) y cefotaxima (0.25-644 $\mu\text{g/ml}$ ). En la prueba de microdilución se preparan una serie de tubos de cultivo, cada uno conteniendo un medio con una concentración diferente del agente, que inhibe completamente el crecimiento (turbidez) en los tubos. El tubo que contiene la menor concentración de agente que inhibe completamente el crecimiento del organismo usado como referencia.<sup>23</sup> La prueba confirmatoria de cepas fenotípicamente resistentes se conoce como prueba de aproximación de doble disco. El disco de susceptibilidad utilizado en esta prueba contendrá amoxicilina-ácido clavulánico, así como también constará de un disco que contenga una oxomino- $\beta$ -lactámico.<sup>68, 69</sup>

Otro método para la detección de organismos productores de BLEEs es la prueba tridimensional, la cual es muy difícil de realizar ya que es técnicamente muy laboriosa y requiere de una amplia experiencia en el ámbito microbiológico para interpretar los resultados.<sup>70</sup>

Las implicaciones en la detección de cepas fenotípicamente positivas a BLEEs, es que éstas serán determinadas como resistentes a todas las penicilinas, cefalosporinas (excepto cefamicinas, cefoxitinas y cefotetan) y al aztreonam.<sup>51</sup>

Para la detección específica de cada una de las  $\beta$ -lactamasas que puedan estar expresadas en un aislado clínico, los métodos de detección molecular son bastante específicos y son técnicas que se emplean principalmente en centros de investigación y laboratorios de microbiología clínica.<sup>51</sup>

También se utilizan métodos de detección molecular como PFGE (*pulsed field gel electrophoresis*) para analizar epidemiológicamente qué cepas se encuentran implicadas en infecciones causadas por BLEEs.<sup>48</sup>

## 2 JUSTIFICACIÓN.

La resistencia antimicrobiana se ha convertido en uno de los mayores problemas en medicina veterinaria, a causa de la ausencia en la identificación de las bacterias implicadas en las infecciones, errónea dosificación y elección de fármacos, lo que generalmente implica una antibioterapia empírica y un déficit en la actualización de nuevas estrategias en terapias combinadas y monoterapias, así como la nula detección de resistencia antimicrobiana, que en la mayoría de los casos puede presentarse como resistencia múltiple.<sup>16 71</sup>

Lo anterior representa en medicina veterinaria cuantiosas pérdidas económicas, ya que principalmente las bacterias Gram negativas están asociadas a un elevado índice de morbilidad y mortalidad, tal es el caso de *P. multocida*.<sup>72</sup>

Aunado a ello se conocen las propiedades morfológicas de *P. multocida*, clasificada dentro del grupo de bacterias Gram negativas, lo que indica la escasa cantidad de pared celular respecto a las bacterias Gram positivas, además de que son casi impermeables al antibiótico, debido a la presencia de LPS, hecho que le confiere una resistencia natural hacia la penicilina. Sin embargo,  $\beta$ -lactámicos semisintéticos como la ampicilina, oxacilina, meticilina, carbencilina y cefalosporinas de segunda, tercera y cuarta generación son considerados como antimicrobianos de amplio espectro, los cuales son capaces de penetrar en la pared celular inhibiendo la síntesis de la misma en las bacterias Gram negativas, por lo cual estos antimicrobianos han sido considerados como tratamiento de primera opción en el tratamiento de la pasteurelosis neumónica bovina.

La razón por la cual se cree que *P. multocida* es un microorganismo productor de BLEEs se debe a que se ha reportado que muchas bacterias Gram negativas, poseen de forma natural  $\beta$ -lactamasas cromosomalmente mediadas, por lo cual, se cree que la presencia de BLEEs pueda estar presente en este género bacteriano.<sup>51</sup>

En México no hay reportes sobre la detección de la resistencia antimicrobiana de *P. multocida*, sin embargo, se han realizado estudios en el ámbito económico, principalmente sobre los gastos asociados por el empleo de antimicrobianos en bovinos de explotaciones lecheras de Tijuana, Baja California, las cuales reportaron importantes pérdidas económicas, ocasionadas por el tratamiento



antimicrobiano, que oscilan entre \$83.25 y \$501.41 y los costos indirectos implican entre \$235.12 y \$301.07 por becerro.<sup>73</sup>

De acuerdo a los registros que se tienen sobre las ventas de antibióticos por la Federación Europea de Salud Animal (*European Federation for Animal Health*) en la unión Europea y Suiza se utilizan aproximadamente 5,460 Ton para uso humano, 3,465 Ton para salud animal y 1,575 Ton son utilizadas como promotores de crecimiento. En el Reino Unido el uso de las cefalosporinas en medicina veterinaria alcanzó 3 Ton en el 2003.<sup>74, 75</sup>

El impacto de las BLEES, no solo radica en la economía, sino también en salud pública debido al contacto del hombre con los animales que poseen bacterias productoras de genes de resistencia, ya que diversos análisis moleculares han reconocido plásmidos y transposones idénticos en bacterias de origen humano y animal.<sup>74</sup>

La resistencia antimicrobiana especialmente en agentes bacterianos zoonóticos, ocasiona una continua falla del tratamiento de las infecciones y dependiendo de la severidad del caso y del estado inmunológico del paciente, incluso puede provocar la muerte.<sup>76,6, 75</sup>

Algunas de las características de los microorganismos productores de BLEEs reside en su susceptibilidad *in vitro* a ciertos antibióticos, sin embargo, no se podrá asegurar la misma susceptibilidad *in vivo*.<sup>77</sup> es por ello que de acuerdo a la CLSI, la prevalencia de BLEEs ha sido minimizada. Por otra parte, no solo los organismos patógenos contienen o han adquirido genes de resistencia antimicrobiana, sino que también lo ha hecho la microbiota de humanos y animales, de tal forma reservorios importantes para los genes de resistencia podrían ser subestimados.<sup>74</sup>

El Programa Internacional de Supervivencia Antimicrobiana (*Sentry Antimicrobial Surveillance Program*), desarrollado para humanos, mostró que la prevalencia global de BLEEs es del 25% ocasionando una significancia clínica con rangos de mortalidad que van del 42% a un 100% y han sido pacientes infectados por organismos productores de BLEEs, los cuales fueron tratados con cefalosporinas.<sup>74</sup>

La detección de los organismos productores de estas enzimas puede ser difícil, ya que la presencia de BLEEs en una célula bacteriana no siempre produce resistencia fenotípica.<sup>78</sup>

El hecho de que las cepas BLEEs no puedan ser detectadas en la rutina antimicrobiana utilizada en muchos laboratorios, facilita la entrada de estas cepas a nuevos nichos microbiológicos.<sup>79</sup> Por lo anterior, surge la necesidad de establecer un adecuado entendimiento en la epidemiología molecular y generar información certera acerca de las  $\beta$ -lactamasas que participan en la resistencia de *P. multocida*, para realizar un programa de control de la enfermedad basado en rotación de antimicrobianos sustentado por bases científicas sólidas.<sup>78</sup>

La determinación de genes que codifican para BLEEs en cepas de *P. multocida* de origen bovino contribuirá a un mejor entendimiento de la epidemiología molecular de este microorganismo.

### **3 HIPÓTESIS.**

Es posible detectar los genes que codifican para las BLEEs tipo CTX-M, TEM y SHV en cepas de *P. multocida* aisladas de pulmones neumónicos de bovinos.

### **4 OBJETIVO GENERAL.**

Determinar la resistencia a quimioterapéuticos y la presencia de BLEEs tipo, TEM, SHV y CTX-M en cepas de *P. multocida*, de origen bovino.

#### **4.1 OBJETIVOS ESPECÍFICOS**

Determinar la resistencia antimicrobiana a diversos quimioterapéuticos por medio de antibiogramas.

Determinar la presencia de genes *bla*-TEM, *bla*-SHV y *bla*-CTX-M por medio de la PCR (reacción de la polimerasa en cadena).

## 5 MATERIAL Y MÉTODOS

### 5.1 CEPAS

Se utilizaron cepas de *P. multocida* ( $n=30$ ) provenientes de La Laguna en los estados de Durango y Coahuila; las cuales fueron obtenidas a partir de pulmones neumónicos de bovinos productores de leche, fueron sembradas en agar sangre, identificadas y caracterizadas en un estudio previo por medio de técnicas bioquímicas (API 20 NE), pruebas de acriflavina y hialuronidasa, y por medio de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) empleando iniciadores específicos de la región 2 del *loci* que codifica para la síntesis capsular de cada uno de los serogrupos de *P. multocida* (*hyaD*, *bcbD*, *dcbF*, *ecbJ* y *fcb1*).<sup>80</sup>

Como control positivo para la detección y estandarización del gen CTX-M fue utilizada una cepa de *Klebsiella pneumoniae* y para la detección y estandarización de los genes TEM y SHV fue empleada una cepa de *E. coli*, ambas provenientes de un cepario del Hospital General Doctor Manuel Gea González.

### 5.2 EXTRACCIÓN DE ADN

Las cepas fueron crecidas en caldo infusión cerebro corazón durante 18 h con agitación orbital (200 rpm). Posteriormente, se centrifugaron a 3,000 rpm y la pastilla bacteriana se suspendió en 550  $\mu$ l de solución de lisis (tiocianato de guanidina 3M, EDTA 0.1 M, sarkosyl 0.5%), se mezclaron de 5 a 10 min; posteriormente se agregaron 250  $\mu$ l de acetato de amonio (7.4 M) y se colocaron en hielo por 10 min.

Se agregaron 500  $\mu$ l de cloroformo-alcohol isoamílico (24:1) y se mezclaron durante 5 min, se centrifugaron a 65 *g* durante 5 min, el sobrenadante fue colocado cada uno en un tubo estéril. El ADN se precipitó con 0.7 volúmenes de isopropanol, y se resuspendió en agua estéril grado biología molecular.<sup>81</sup>

### **5.3 DETECCIÓN DE GENES**

Para la detección de los genes que codifican para las  $\beta$ -lactamasas de espectro extendido, TEM, CTX-M y SHV, se utilizaron los siguientes iniciadores: <sup>82</sup>

Para la amplificación del gen SHV se usaron los iniciadores 5' ATGCGTTATATTCGCCTGTG 3' y 5' TGCTTTGTTATTCGGGCCAA 3' que amplifican un producto de 723 pb.

Para la detección del gen TEM se emplearon los iniciadores 5' AAACGCTGGTGAAAGTA 3' y 5' AGCGATCTGTCTAT 3' que amplifican un producto de 717pb.

Para la amplificación del gen CTX-M se utilizaron los iniciadores 5' ATGATGACTCAGAGCATTGCGCGCT 3' y 5' TCAGAAACCGTGGGTTACGATTTTCG 3' que amplifican un producto de 550 pb.

Las condiciones de amplificación que se utilizaron para la detección de las enzimas de la familia SHV-1 consistieron en una desnaturalización inicial de 94°C por 4 min, desnaturalización de 94° C por 30 s, alineación de 59°C por 30 s, extensión de 72° C durante 45 s por 35 ciclos y una extensión final de 72°C por 7 min.

Para la familia TEM las condiciones empleadas fueron: desnaturalización inicial de 95°C por 5 min, desnaturalización de 94°C por 30 s, alineación de 46 °C por 30 s, una extensión de 72°C durante 45 s por 33 ciclos y una extensión final de 72° C por 7 min.

Para la amplificación de las enzimas de la familia CTX-M las condiciones de amplificación fueron: desnaturalización inicial de 94°C por 5 min, desnaturalización de 94°C por 30 s, alineación de 52°C por 45 s, extensión de 72°C durante 45 s por 35 ciclos y una extensión final de 72°C por 7 min.

Las reacciones de amplificación se evaluaron por electroforesis en geles de agarosa al 1.5% teñidos con bromuro de etidio (10 mg/ml) y visualizados bajo luz ultravioleta.

Las imágenes fueron captadas utilizando un digitalizador de imágenes Kodak Gel Logic.2000.

### **5.4 DETECCIÓN DE RESISTENCIA FENOTÍPICA**

Los antibiogramas se realizaron de acuerdo al protocolo que indica la CLSI, se emplearon sensidiscos de vancomicina [30  $\mu$ g], novobiocina [5  $\mu$ g], sulfametoxazol y trimetoprim [1.25  $\mu$ g], ampicilina [10  $\mu$ g], tetraciclina [30  $\mu$ g], penicilina sódica benzatínica [10  $\mu$ g], estreptomina [10  $\mu$ g]

y cefotaxima [30 µg]\*. Las colonias de cada cepa de *P. multocida* analizadas fueron resuspendidas en solución amortiguadora de fosfatos estéril (PBS 1x), todas las soluciones se ajustaron a 0.5 de la escala de McFarland, ( $5 \times 10^7$  UFC/ml) posteriormente se impregnaron hisopos estériles y se sembraron en agar Müller Hinton, se colocaron los sensidiscos en cada una de las placas las cuales se incubaron 24 hrs a 37°C bajo condiciones de aerobiosis y finalmente se realizó la lectura de las zonas de inhibición de acuerdo al diámetro del halo de inhibición.

\*Gibco BBL.USA.<sup>®</sup>

De acuerdo a este criterio, las cepas fueron clasificadas como susceptibles, resistentes, medianamente susceptibles y cepas intermedias.

## **5.5 ANÁLISIS ESTADÍSTICO DE LOS RESULTADOS.**

Con los datos obtenidos de los antibiogramas se calcularon las frecuencias de cepas en las que se detectó resistencia fenotípica clasificándolos como susceptibles (S), medianamente susceptibles (MS), intermedios ( I ) y resistentes (R). Para la PCR fueron calculadas las frecuencias de las cepas en las que se logró la amplificación de genes que codifican para las BLEEs; TEM, SHV y CTX-M y para ello se empleó estadística descriptiva mediante la elaboración de cuadros y gráficos pertinentes.

## **6 RESULTADOS**

### **6.1 DETERMINACIÓN DE RESISTENCIA FENOTÍPICA**

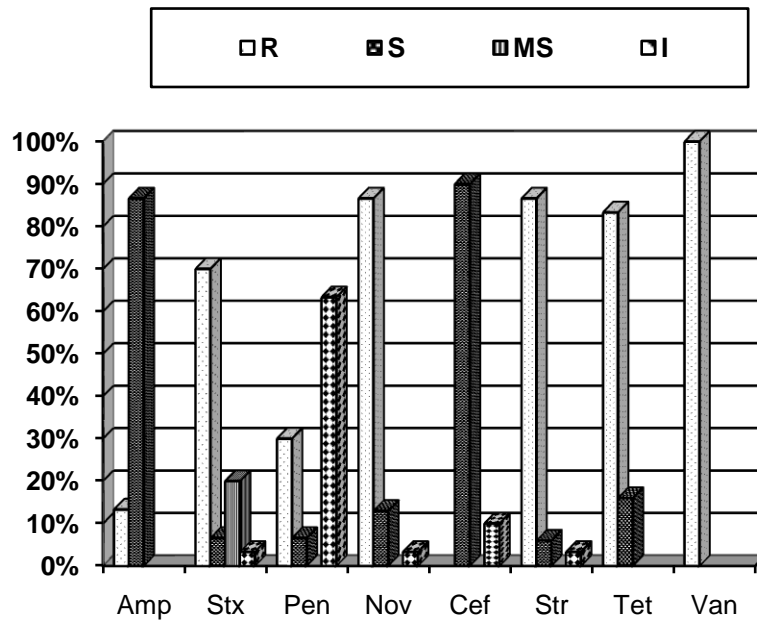
De acuerdo a los antibiogramas realizados para la ampicilina, el 13% (4/30) fueron resistentes, y el 87% (26/30) fueron susceptibles. El 90% (27/30) de los aislamientos mostraron susceptibilidad hacia el ceftiofur y 10% (3/30) presentaron susceptibilidad intermedia, para la penicilina el 30% (9/30) fueron resistentes, el 63% (19/30) presentaron susceptibilidad intermedia y el 7% (2/30) fueron susceptibles. Para el sulfametoxazol-trimetoprim, el 70% (21/30) fueron resistentes, el 3.3%

(1/30) presentaron susceptibilidad intermedia y el 20% (6/30) fueron medianamente resistentes y 6.6% (2/30) fueron susceptibles

Para las tetraciclinas 16% (5/30) fueron susceptibles y el 83% (25/30) se comportaron como resistentes.

Para la estreptomycinina el 86.6% (26/30) fueron resistentes, 6.6% (22/30) fueron susceptibles y el 3.3%(11/30) fueron intermedias.

El 86.6% (26/30) de las cepas fueron resistentes hacia novobiocina y 13% (4/30) fueron susceptibles. Ante la vancomicina, el 100% (30/30) se comportaron como resistentes.



**Figura 1.** Frecuencias de resistencia a quimioterapéuticos de cepas de *P. multocida* de origen bovino.

Amp = Ampicilina

R = Resistentes

Stx= Sulfametoxazol-trimetoprim

S = Susceptibles

Pen = Penicilina

MS = Medianamente susceptibles

Nov = Novobiocina

I = Intermedios

Cef = Cefalosporina

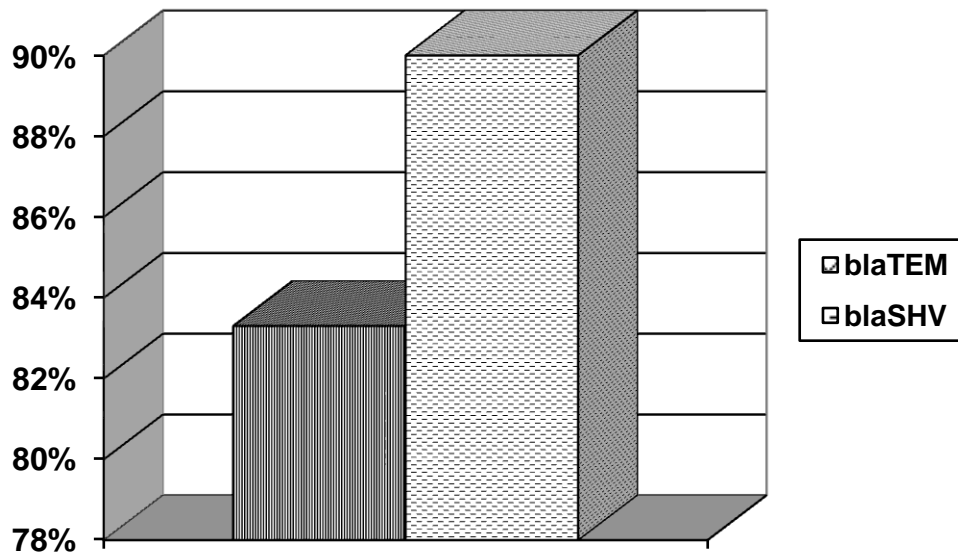
Str= Estreptomina

Tet = Tetraciclina

Van = Vancomicina

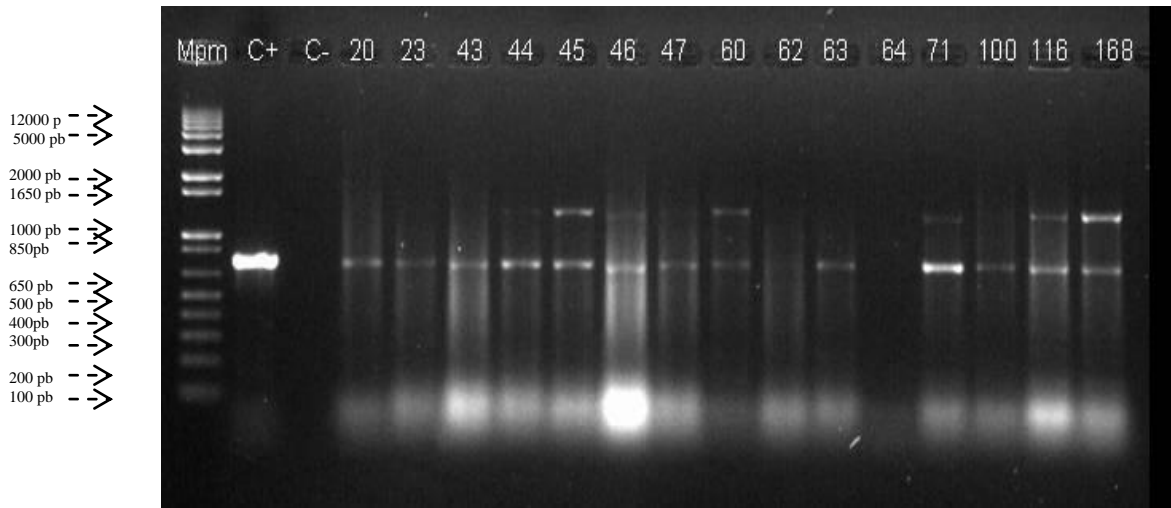
## 6.2 DETECCION DE GENES

Por medio de la PCR se logró detectar el gen *bla*<sup>SHV</sup> en el 93% (28/30) de las cepas y el gen *bla*<sup>TEM</sup> en el 85%(25/30) de los aislamientos (Figuras 2, 3 y 4). En ninguna de las cepas estudiadas fue posible detectar el gen *bla*<sup>CTX-M</sup>. Sin embargo, se amplificó un producto inespecífico de 180pb en 29 cepas (Figura 5). La banda se purificó utilizando el sistema Qiagen\* de acuerdo a las especificaciones del fabricante. Posteriormente los productos fueron secuenciados en ambos sentidos utilizando el método Taq FS Dye Terminator Cycle Sequencing Fluorescence–Based Sequencing en el equipo Perkin Elmer /Applied Biosystems Modelo 3730. La secuencia de nucleótidos fue comparada con la base de datos del GeneBank utilizando el programa BLAST y se encontró una homología del 90% con la subunidad A (+) –NADH quinona reductasa.

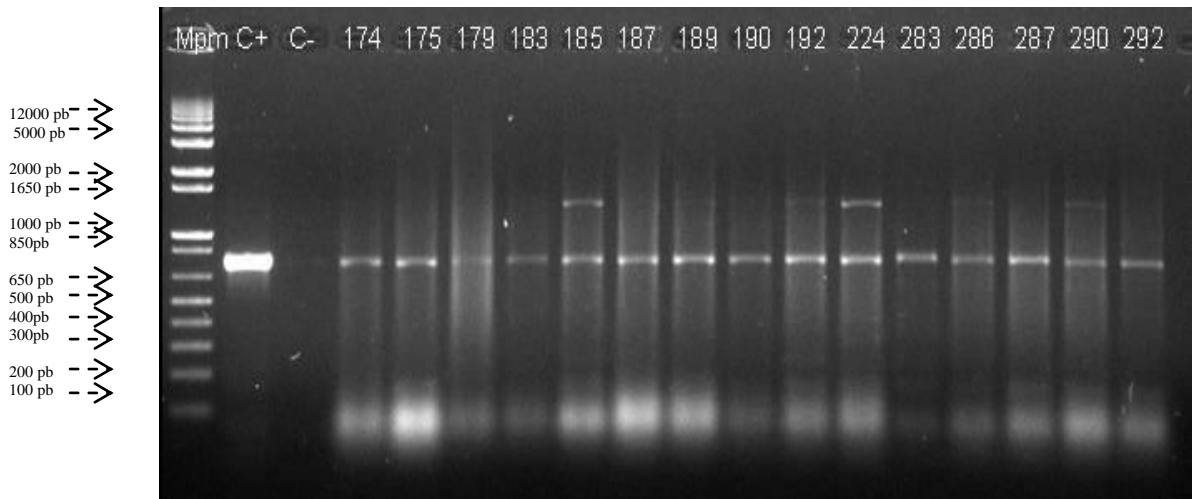


**Figura 2.** Frecuencias de cepas de *P. multocida* cuyos amplicones corresponden a los genes que codifican para BLEEs tipo *bla*<sup>TEM</sup> y *bla*<sup>SHV</sup>.

\*Qiagen, Ventura, CA. USA.

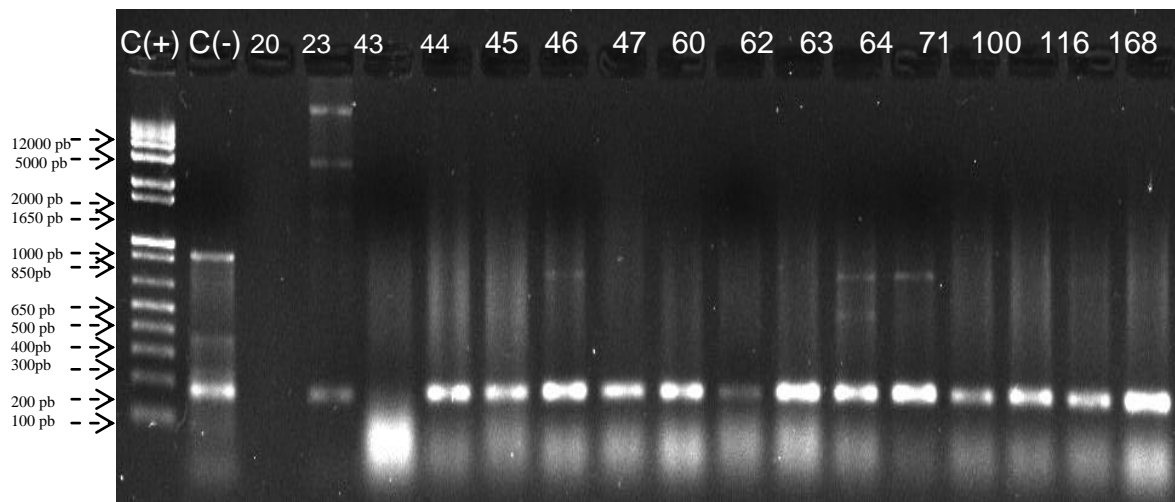


**Figura 3.** Gel de agarosa al 1.5% teñido con bromuro de etidio donde se observa la amplificación del gen *bla*<sup>SHV</sup>. Carril 1 Mpm: Marcador de peso molecular 1 Kb Plus; carril 2: control positivo C(+); cepa de *E. coli*, carril 3: control negativo C (-); carriles del 4-15: cepas de campo de *P. multocida*.





**Figura 4.** Gel de agarosa al 1.5% teñido con bromuro de etidio donde se observa la amplificación del gen *bla*<sup>TEM</sup>. Carril 1 Mpm: Marcador de peso molecular 1 Kb Plus; carril 2: control positivo C(+); cepa de E.coli, carril 3: control negativo C(-); carriles del 4-15: cepas de campo de *P. multocida*.



**Figura 5.** Gel de agarosa al 1.5% teñido con bromuro de etidio donde se observa la amplificación del producto inespecífico de 180 pb del gen *bla*<sup>CTX-M</sup>. Carril 1 Mpm: Marcador de peso molecular 1 Kb Plus; carril 2: control positivo C(+); cepa de *Klebsiella pneumoniae*, carril 3: control negativo C(-); carriles 4-15: cepas de campo de *P. multocida*.

## 7 DISCUSIÓN

Los antimicrobianos son poderosos elementos empleados en la profilaxis, metafilaxis, así como para el tratamiento de infecciones bacterianas ocasionadas por diversos microorganismos entre los cuales se encuentra *P. multocida*. La importancia en el empleo de dichos quimioterapéuticos radica

en que han sido y seguirán siendo una herramienta insustituible cuyo uso debe ser prudente para conservar su eficacia ante infecciones de origen bacteriano, de lo contrario, las consecuencias repercutirán en elevados porcentajes de mortalidad aunado a grandes pérdidas económicas, originadas por la resistencia antimicrobiana que estos microorganismos han logrado desarrollar y cuya génesis proviene del indiscriminado y mal empleo de los mismos.<sup>6, 76</sup>

Al hablar acerca de la resistencia antimicrobiana, es esencial comprender diversos mecanismos, uno de los más importantes es la producción de BLEEs, enzimas responsables de la resistencia  $\beta$ -lactámica, las cuales tienen la capacidad de hidrolizar el anillo  $\beta$ -lactámico. Estos quimioterapéuticos, constituyen el grupo con mayor prescripción en el mundo y también se encuentran reportados como uno de los tratamientos de primera elección ante la pasteurelisis neumónica bovina, dentro de los que se encuentran principalmente las penicilinas.<sup>6, 45, 76</sup>

Debido a lo anteriormente mencionado, los objetivos de este trabajo fueron determinar la resistencia a diversos quimioterapéuticos por medio de antibiogramas y detectar los genes que codifican para las BLEEs tipo TEM, SHV y CTX-M por medio de la PCR en 30 cepas de *P. multocida* obtenidas a partir de pulmones neumónicos de origen bovino provenientes de La Laguna (Durango y Coahuila).

El fenómeno de resistencia antimicrobiana es dinámico y depende de diversos factores como región geográfica, año de los aislamientos y criterio del médico veterinario en la utilización de distintos agentes quimioterapéuticos entre otros, por tal motivo no se esperaba encontrar semejanza en los resultados de los antibiogramas realizados en el presente trabajo en relación con los obtenidos por otros autores.<sup>76</sup>

La ampicilina y ceftiofur, fueron los quimioterapéuticos que mostraron las frecuencias de susceptibilidad más altas respecto a los otros antimicrobianos empleados para este estudio.

Las frecuencias de susceptibilidad obtenidas para la ampicilina (87%) y ceftiofur (100%), mostraron grandes similitudes con lo reportado por el Laboratorio de diagnóstico de Enfermedades de animales de Oklahoma<sup>22</sup> (1994-2002), donde se observó que de aislamientos obtenidos partir de pulmones neumónicos, se obtuvo un porcentaje de 76-100% en cepas que mostraron susceptibilidad hacia la ampicilina; mientras que datos de susceptibilidad obtenidos en Inglaterra,<sup>83</sup> indican susceptibilidad de dichas cepas en un 86.4% ante dicho antimicrobiano. Por otra parte, los porcentajes de susceptibilidad en aislamientos de *P. multocida* obtenidos hacia el ceftiofur, comprenden un 96-100% en ambos estudios.<sup>83</sup>

Pese a la información que se tiene acerca de los  $\beta$ -lactámicos como el grupo de antimicrobianos con mayor prescripción en el mundo; solamente Kehrenberg<sup>83</sup> proporciona datos de resistencia fenotípica en aislamientos de *P. multocida* hacia la penicilina, ya que estas cepas mostraron susceptibilidad de un 66-89%, dichos porcentajes son considerados mayores a los obtenidos en esta tesis, ya que la evaluación de la resistencia fenotípica de las cepas empleadas en este estudio fue del 63%. Es posible que dichos porcentajes se deban a la resistencia natural de las bacterias Gram negativas hacia las penicilinas, que son antibióticos o quimioterapéuticos de origen natural.

Debido a que las penicilinas no tienen gran efecto sobre las poblaciones de bacterias Gram negativas, algunas de las opciones para el tratamiento de las infecciones causadas por éstas (por ejemplo la pasteurelisis neumónica bovina) son los antimicrobianos de amplio espectro. Algunos de ellos fueron utilizados para este estudio en base a sus mecanismos de acción; por ejemplo las sulfonamidas, tienen la capacidad de inhibir el ácido p-aminobenzóico, precursor del DNA bacteriano y las tetraciclinas interfieren con la proteína que sintetiza la subunidad ribosomal 30S al igual que las estreptomycinas.

Los porcentajes de susceptibilidad obtenidos a partir de las cepas utilizadas para este estudio con respecto al sulfametoxazol-trimetoprim y tetraciclinas demuestran que estos quimioterapéuticos expresan la menor susceptibilidad comparados con otros trabajos.

En el en el 2004Reino Unido,<sup>22</sup> frecuencias de susceptibilidad del 96 al 100% han sido observadas en cepas de *P. multocida* hacia sulfas-trimetoprim, dicha susceptibilidad representa una importante diferencia respecto a los porcentajes obtenidos en este trabajo, ya que únicamente el 3.3% de los presentes aislamientos presentaron susceptibilidad intermedia ante dicho quimioterapéutico.

Es oportuno mencionar que los porcentajes de resistencia fenotípica encontrada en este estudio para el sulfametoxasol-trimetoprim fueron los más elevados respecto al resto de los quimioterapéuticos utilizados en este estudio, a pesar de ser considerado como uno de los principales antimicrobianos de elección para el tratamiento de la pasteurelosis neumónica bovina. Por ello que surgen interrogantes del por que se siguen utilizando como uno de los principales recursos en la terapia antimicrobiana para *P. multocida*.

Estudios hechos por Kehrenberg<sup>83</sup> detectaron rangos de susceptibilidad para las tetraciclinas que van del 57 al 89%, lo cual representa mayores valores de susceptibilidad, respecto a nuestros resultados, ya que solamente las cepas de La Laguna (Coahuila y Durango) empleadas para este estudio reportan un 16% de susceptibilidad.

Respecto a la estreptomicina, hasta la fecha no existen reportes que indiquen resistencia en cepas de de *P. multocida*; sin embargo, esta resistencia ha sido analizada en cepas de *M. haemolytica*, en la cual, se han reportado altos porcentajes de resistencia que van de un 70 a un 90 %en nuestro país.<sup>84</sup>

Para valorar la importancia que la resistencia antimicrobiana representa en un patógeno que forma parte de la microbiota de los bovinos (*P.multocida*), en este estudio se decidió incluir el análisis fenotípico de nuestras cepas hacia antimicrobianos que no son empleados usualmente en infecciones del aparato respiratorio del ganado vacuno, con el propósito de valorar las repercusiones y la magnitud que dicho fenómeno ha alcanzado.

A pesar de no existir algún reporte donde se haya evaluado la resistencia fenotípica de *P. multocida* hacia la vancomicina, son interesantes los resultados obtenidos de las cepas sometidas hacia este antimicrobiano, ya que el 100%, se comportaron como resistentes; este hecho refleja las repercusiones que ha tenido la resistencia antimicrobiana, ya que se han visto agotados los recursos farmacéuticos (reserva antimicrobiana) en terapias no convencionales para el tratamiento de infecciones de origen humano, ocasionado por el empleo indebido de antibióticos como la vancomicina, la cual es utilizada principalmente como promotor de crecimiento y pertenece a la misma familia que la virginamicina (de uso humano).<sup>60</sup>

Tampoco existen reportes en los que se haya estudiado previamente resistencia fenotípica a la novobiocina; el empleo de este fármaco se enfoca principalmente hacia patógenos que ocasionan mastitis y a pesar de ello, se observó en las cepas empleadas para este estudio un 83% de resistencia ante este antimicrobiano; estos resultados se deben probablemente a su frecuente uso ante las recurrentes infecciones con el género *Staphylococcus*.

En el presente estudio, se implementó la PCR para la detección de genes de resistencia  $\beta$ -lactámica tipo *bla*-TEM, *bla*-SHV y *bla*-CTX-M, donde únicamente se lograron detectar los genes *bla*-TEM en un 85% y *bla*-SHV en un 93% en las cepas sujetas de estudio, hecho que es considerado como el primer hallazgo molecular de origen animal para este microorganismo en el mundo<sup>85</sup> y corresponde con el trabajo de Jacoby G.<sup>86</sup>, quien menciona que los genes detectados con mayor frecuencia son los *bla*-SHV.

Varios linajes de los genes de la familia TEM han sido hallados previamente en enterobacterias, tal es el caso de *bla*-TEM-1, *bla*-TEM-20 y *bla*-TEM-52, todos ellos, detectados en ganado vacuno a excepción del gen *bla*-TEM-1 que también se ha reportado en gallinas y que de todos los anteriormente mencionados no es considerado como BLEE, debido a su baja actividad hidrolítica hacia cefalosporinas.

De acuerdo a los reportes que se tienen en animales respecto a la familia SHV, han sido detectados diversos linajes, de ellos, el que se ha hallado con más frecuencia, es el gen *bla*SHV-12, cuyos aislamientos fueron obtenidos a partir de especies como cerdos y aves de producción. De esta familia de BLEEs, también han sido reportados linajes como *bla*SHV-5 y *bla*SHV-2 obtenidos a partir de conejos cerdos y aves; cabe mencionar que los genes *bla*SHV-12 y *bla*SHV-5 también han sido reportados con gran frecuencia en humanos.

Los genes *bla*CTX-M no fueron detectados en nuestras cepas, por lo tanto, se propone al ceftiofur como una opción para el tratamiento contra *P. multocida*. Este hecho, convierte a la región de Gómez Palacios en un nicho donde aun no ha concluido la era de las cefalosporinas. Debido a ello se recomienda el monitoreo de BLEEs en esta región, ya que según la CLSS, la presencia de cepas productoras de estas enzimas debe ser reportada, lo que representaría el cese definitivo en el empleo de antimicrobianos  $\beta$ -lactámicos y con ello, podrían evitarse cuantiosas pérdidas económicas si se detecta resistencia previo al empleo de estos quimioterapéuticos.

Existen reportes de la década pasada que mencionan que los genes *bla*CTX-M fueron considerados los genes de distribución más rápida en el mundo en aislamientos provenientes de nosocomios humanos, ya que no solo representan problemas de resistencia hacia cefotaxima, sino también, hacia aminoglicosidos, quinolonas, metronidazol y sulfas trimetoprim, hecho que ha complicado en gran medida el tratamiento ante estos patógenos, (principalmente *K. pneumoniae*) y aunado a ello, las repercusiones consuman con una elevada tasa mortalidad que van del 42% a un 100% y han sido pacientes infectados por organismos productores de BLEEs, los cuales fueron tratados con cefalosporinas, por ello, se considera prudente la actualización respecto al tema de resistencia antimicrobiana, así como la rápida y certera detección de estos genes.<sup>87</sup>

Otros autores relacionan la presencia de genes *bla*CTX-M como un fenómeno endémico y restringido únicamente a patógenos como *Salmonella entérica s. typhimurium* y *E.coli*;<sup>54</sup>

Aunado a ello, en las regiones donde *bla*CTX-M está presente, suele ser el gen más frecuentemente encontrado.<sup>88</sup>

Ante el panorama anterior se ha implementado el tratamiento con compuestos inhibidores de  $\beta$ -lactamasas, sin embargo, no existen productos indicados para la administración en el ganado bovino que incluyan estas formulaciones; además, estos inhibidores se encuentran únicamente indicados cuando existe un solo tipo de BLEEs,<sup>87</sup> y por lo tanto, su empleo no sería útil para las cepas analizadas, ya que fueron detectados dos distintos tipos de genes de resistencia  $\beta$ -lactámica.

Respecto a la capacidad hidrolítica que producen los genes tipo *bla*TEM y *bla*SHV, que fueron detectados en este trabajo, se ha reportado que quimioterapéuticos como la ampicilina (que fue utilizada en este estudio), penicilina, oxaciclina y cefalosporinas como cefalotina y cefaloridina son uno de sus principales blancos, este hecho se ha observado principalmente en cepas de *K. pneumoniae* en donde la ampicilina ha sido hidrolizada por los genes *bla*SHV en más de un 20%, lo que comparado con nuestros resultados el mayor porcentaje las cepas de *P. multocida* analizadas resultaron susceptibles a dicho antimicrobiano. Sin embargo, es imposible relacionar las pruebas utilizadas en este estudio (antibiogramas y PCR), ya que la resistencia *in vitro* (antibiogramas) no será nunca igual a la resistencia *in vivo* y mucho menos podrá ser vinculada con la presencia de genes de resistencia implicados<sup>85</sup>, debido a que las bacterias en las pruebas *in vitro* no reflejan sus factores de virulencia y de evasión de la respuesta inmune del huésped, por ello, no son suficientes las técnicas y los amplios alcances con los que actualmente cuentan la microbiología y la epidemiología aplicadas para implementar un tratamiento antimicrobiano, ya que no basta con realizar una correcta identificación de los agentes etiológicos implicados en infecciones del tracto respiratorio bovino. Lo anteriormente mencionado, ha originado que la detección de BLEEs en la región de Durango y Coahuila sea un reto farmacológico y epidemiológico para establecer nuevas opciones que sirvan como una guía respecto al uso correcto de quimioterapéuticos  $\beta$ -lactámicos, sin embargo, los factores de transferencia de información y los evolucionados mecanismos de

resistencia bacterianos convierten a las BLEEs en elementos dinámicos y constantemente cambiantes respecto a la secuencia de sus aminoácidos.<sup>30</sup> Cabe mencionar que un solo cambio en dichas secuencias, sería capaz de transformar a estas enzimas en poderosas herramientas para combatir antibióticos otorgándoles un mayor espectro al actualmente conocido, por lo cual, debería implementarse año con año un programa de vigilancia epidemiológica de BLEEs.<sup>87</sup>

Respecto al conocimiento que ha generado este estudio, fue posible conocer la presencia de BLEEs, por ello en futuras investigaciones se propone conocer el tipo de *bla*SHV y *bla*TEM detectados en la región de Durango y Coahuila mediante la secuenciación de los productos amplificados y analizarlos en el banco de datos provenientes del Genbank para comparar las homologías existentes. Con ello, será posible determinar si se trata de una enzima previamente identificada o si se trata de una nueva, respecto a la secuencia de sus aminoácidos, ya que con ello, aumentaría el número de BLEEs actualmente identificadas. No obstante hay que recordar que otros agentes como *M. haemolytica* e *H. somni* se encuentran involucrados en neumonías bovinas y por ello es necesaria la detección particular de BLEEs de estos microorganismos.<sup>20</sup>

El tema de la resistencia antimicrobiana es extenso y dicha resistencia no está mediada únicamente por las BLEEs tipo TEM, SHV y CTX-M, también son de gran relevancia las enzimas AmpC, las que podrían ser detectadas mediante estudios moleculares en las cepas utilizadas para el presente estudio.<sup>35</sup>

El análisis molecular de la resistencia antimicrobiana, actualmente ha permitido detectar 176 genes de tipo *bla*TEM, 117 genes tipo *bla*SHV y 86 genes tipo *bla*CTX-M<sup>47</sup>, que son tres de los principales genes involucrados en la resistencia β-lactámica y que han sido detectados principalmente en enterobacterias.<sup>89</sup> Sin embargo, no hay estudios que reporten genes de resistencia β-lactámica en cepas de *P. multocida* de origen animal; pese a la distribución mundial y grandes repercusiones económicas que genera este microorganismo en el ganado bovino.<sup>60</sup>



Los únicos reportes moleculares de BLEEs en *P. multocida* que actualmente se conocen son de origen humano y corresponden a los plásmidos PJR1, PJR2<sup>90</sup> y a la publicación de la transmisión del gen *bla*-TEM-1 proveniente de un aislamiento de un hombre que fue mordido por un gato<sup>91</sup>. Dicha transferencia de información de resistencia antimicrobiana, se debe a elementos genéticos, que se modifican constantemente por la alta recombinación e intercambio de genes de resistencia y son además sofisticados mecanismos que forman parte de un proceso evolutivo, tal es el caso de los genes tipo ROB-1 hallados en *P. multocida*, *M. haemolytica* y en la cepa de *P. aerogenes* ATCC 27883<sup>92</sup> otro de los genes transferidos por movilización es el gen *dfrA20* que codifica para la resistencia de trimetoprim, reportado en el 2004 en *P. multocida*, así como el gen *floR*, responsable de la resistencia en *P. multocida* hacia el fluorfenicol y cloranfenicol reportado en el 2005,<sup>93</sup> mismo año en que se realizó la identificación del gen *aadA14* asociado a la resistencia de espectinomicina y estreptomina en *P. multocida* y por último podemos mencionar al gen *tet(M)*, reportado como el gen de resistencia más frecuentemente hallado en microorganismos Gram negativos y Gram positivos; dicho gen se ha aislado a partir de *P. multocida* de origen bovino en Francia y Estados Unidos.

## 7.1 CONCLUSIONES

- Los genes *bla*-TEM y *bla*-SHV han sido los primeros reportados en el género *P. multocida* provenientes de cepas de origen bovino en todo el mundo.
- No fue posible la amplificación de los genes *bla*-CTX-M en ninguna de las cepas sujetas de estudio.
- El perfil de resistencia fenotípica que mostraron las cepas de *P. multocida* con respecto a las cefalosporinas podría constituir una parte fundamental en la terapia antimicrobiana en la región lagunera siempre y cuando se justifique su uso con un detallado diagnóstico de la presencia de *P. multocida*, ya que este agente presentó un elevado porcentaje de susceptibilidad.
- Es necesario analizar un mayor número de cepas en diferentes regiones del país para conocer de una forma general la epidemiología de genes  $\beta$ -lactámicos.

## REFERENCIAS

- 1 Siu LK. Antibiotics: action and Resistance in gram–negative bacteria. J Microbiol Immunol Infect 2002; 35: 1-11.
- 2 Lathers CM, Schraeder PL. Clinical pharmacology: drugs as a benefit and/or risk in sudden unexpected death in epilepsy? J Clin Pharmacol 2002; 42 (2): 123-36.
- 3 Stark KD. Food safety achieved through herd management. Schweiz Arch Tierheilkd 2000; 142 (12): 673-8.
- 4 Batchelor M, Hopkins KL, Threlfall EJ, Clifton-Hadley FA, Stallwood AD, Davies RH, *et al.* Characterization of AmpC-mediated resistance in clinical *Salmonella* isolates recovered from humans during the period 1992 to 2003 in England and Wales. J Clin Microbiol 2005; 43 (5): 2261-5.
- 5 Lathers CM. Role of veterinary medicine in public health: antibiotic use in food animals and humans and the effect on evolution of antibacterial resistance. J Clin Pharmacol 2001; 41 (6): 595-9.
- 6 Prescott JF. Antimicrobial drug resistance and its epidemiology In: Prescott J, Baggot JD, Walter RD editors. Antimicrob Therapy in Veterinary Medicine. Ames, Iowa. USA: Iowa State University Press 2000.
- 7 Drlica K. Antibiotic resistance: can we beat the bugs? Drug Discov Today 2001; 6 (14): 714-15.
- 8 van den Bogaard AE, Stobberingh EE. Epidemiology of resistance to antibiotics. Links between animals and humans. Int J Antimicrob Agents 2000; 14 (4): 327-35.
- 9 Council NR. Veterinary Medicines Directorate 2006. Sales of antimicrobial products Authorized for use as Veterinary Medicines Antiprotozoals, antifungals, growth promoters and coccidiostats The use of drugs in food animals Benefits and risks. UK: National Research Council 1999
- 10 Swann M. Joint Committee on the use of Antibiotics in Animal Husbandry and Veterinary Medicine. ed. London: Her Majesty's Stationary Office 1969.
- 11 Schwarz S, Chaslus-Dancla E. Use of antimicrobials in veterinary medicine and mechanisms of resistance. Vet Res 2001; 32 (3-4): 201-25.
- 12 Holt JG, Krieg NS. Bergey's Manual of determinative bacteriology. 9<sup>th</sup> ed. Hagerstown, MD. USA Lippincott Williams and Wilkins publications; 2000.
- 13 Ewers C, Lubke-Becker A, Bethe A, Kiebling S, Filter M, Wieler LH. Virulence genotype of *Pasteurella multocida* strains isolated from different hosts with various disease status. Vet Microbiol 2006; 114 (3-4): 304-17.
- 14 Harper M, Boyce J, Adler B. *Pasteurella multocida* pathogenesis: 125 years after Pasteur. FEMS Microbiol Lett 2006; 265 (1): 1-10.
- 15 González RAD. Identificación molecular de *P. multocida* de origen bovino, mediante la detección de los genes *hyaD*, *hyaC* y *dcbF* del operon capsular. Universidad Nacional Autónoma de México México D.F., 2008.
- 16 Kang CI, Kim SH, Park WB, Lee KD, Kim HB, Kim EC, *et al.* Bloodstream infections caused by antibiotic-resistant gram-negative bacilli: risk factors for mortality and impact of inappropriate initial antimicrobial therapy on outcome. Antimicrob Agents Chemother 2005; 49 (2): 760-6.
- 17 Carriere PD, Maxie MG, Wilkie BN, Savan M, Valli VE, Johnson JA. Exposure of calves to aerosols of parainfluenza-3 virus and *Pasteurella haemolytica*. Can J Comp Med 1983; 47 (4): 422-32.
- 18 Fillion L, Mc Guire RL, Babuik LA. Non Specific Suppressive effect of Bovine Herpesvirus type 1 on bovine leukocyte functions. Infect Immun 1983; 42 (1): 106-12.
- 19 Welsh RD, Dye LB, Payton ME, Confer AW. Isolation and antimicrobial susceptibilities of bacterial pathogens from bovine pneumonia: 1994--2002. J Vet Diagn Invest 2004; 16 (5): 426-31.
- 20 Gyles CL, Prescott JF, Songer JG, Thoen CO. *Pasteurella and Mannheimia*. In: Wilkie I AB, Boyce JD editor. Pathogenesis of Bacterial Infectious in animals. Carlton Victoria 3053 Australia: Blackwell Publishing; 2004. p 273-93.

- 21 Liu W CR, Tuohy MJ, La Salvia MM, Procop GW. *Pasteurella multocida*, Urinary Tract Infection with Molecular Evidence of Zoonotic Transmission. Brief Report 2003; 36 (4): 58-60.
- 22 Kehrenberg C, Schulze-Tanzil G, Martel J, Chaslus-Dancla E, Schwarz S. Antimicrobial resistance in *Pasteurella* and *Manheimia*: epidemiology and genetic basis. Vet Res 2001; 32: 323-39.
- 23 Madigan M, Martinko J, Brock J. Biología de los microorganismos. 10<sup>o</sup> ed. España Prentice Hall/ Pearson; 2003.
- 24 Rychlik I, Gregorova D, Hradecka H. Distribution and function of plasmids in *Salmonella enterica*. Vet Microbiol 2006; 112 (1): 1-10.
- 25 Watanabe T, Fukasawa T. Episome-mediated transfer of drug resistance in *Enterobacteriaceae*. Transfer of resistance factors by conjugation. J Bacteriol 1961; 81: 669-78.
- 26 Carattoli A, Miriagou V, Bertini A, Loli A, Colinon C, Villa L, *et al.* Replicon typing of plasmids encoding resistance to newer beta-lactams. Emerg Infect Dis 2006; 12 (7): 1145-8.
- 27 Hall RM, Collins CM, Kim MJ, Partridge SR, Recchia GD, Stokes HW. Mobile gene cassettes and integrons in evolution. Ann NY Acad Sci 1999; 870: 68-80.
- 28 Caprioli A, Busani L, Martel JL, Helmuth R. Monitoring of antibiotic resistance in bacteria of animal origin: epidemiological and microbiological methodologies. Int J Antimicrob Agents 2000; 14 (4): 295-301.
- 29 Kerenberg C, Schuarz S. Genetic Basis of tetracycline resistance in *Pasteurella aerogens*. In: Press A editor. Abstracts of the 40th Interscience Conference on Antimicrobial Agents and Chemotherapy (ICAAC): ASM Press.; 2000. p 130.
- 30 Gootz TD. The forgotten Gram-negative bacilli: what genetic determinants are telling us about the spread of antibiotic resistance. Biochem Pharmacol 2006; 71 (7): 1073-84.
- 31 Piddock L. Clinically relevant chromosomally encoded multidrug resistance efflux pumps in bacteria. Clin Microbiol Rev 2006; 19 (2): 382-402.
- 32 Poole K. Efflux-mediated multiresistance in Gram-negative bacteria. Clin Microbiol Infect 2004; 10 (1): 12-26.
- 33 Poole K. Multidrug resistance in gram negative bacteria. Curr Opin Microbiol 2001; 4 (5): 500-08.
- 34 D'Costa VM, McGrann KM, Hughes DW, Wright GD. Sampling the antibiotic resistance. Science 2006; 311 (5759): 374-7.
- 35 Barlow M. Origin and evolution of the AmpC beta-lactamases of *Citrobacter freundii*. Antimicrob Agents Chemother 2002; 46 (5): 1190-98.
- 36 Pitton J. Mechanisms of bacterial resistance to antibiotics. Rev Physiol Biochem Pharmacol 1972; 65: 15-93.
- 37 Nakajima Y. Mechanisms of bacterial resistance to macrolide antibiotics. J Infect Chemother 1999; 5 (2): 61-74.
- 38 Datta N, Kontomichalou P. Penicillinase synthesis controlled by infectious R factors in *Enterobacteriaceae*. Nature 1965; 208 (5007): 239-41.
- 39 Neu HC. The new  $\beta$ -lactamase-stable cephalosporins. Ann Intern Med 1982; 97: 408-19.
- 40 Kliebe C, Nies BA, Meyer JF, Tolxdorff-Neutling R. Evolution of plasmid-coded resistance to broad-spectrum cephalosporins. Antimicrob Agents Chemother 1985; 28: 302-07.
- 41 Matsumoto Y, Ikeda F, Kamimura T, Yokota Y, Mine Y. Novel plasmid-mediated beta-lactamase from *Escherichia coli* that inactivates oxyimino-cephalosporins. Antimicrob Agents Chemother 1988; 32 (8): 1243-6.
- 42 Medeiros AA. Beta-lactamases. Br Med Bull 1984; 40 (1): 18-27.
- 43 Bernard H, Tancrede C, Livrelli V, Morand A, Barthelemy M, Labia R. A novel plasmid-mediated extended-spectrum beta-lactamase not derived from TEM- or SHV-type enzymes. J Antimicrob Chemother 1992; 29 (5): 590-2.
- 44 Barthelemy M, Perduzzi J, Bernard H, Tancredo C, Labia R. Close amino acid sequence relationship between the new plasmid-mediated extended-spectrum  $\beta$ -lactamases MEN-1 and chromosomally encoded enzymes of *Klebsiella oxytoca*. Biochim Biophys Acta 1992; 1122: 15-22.

- 45 Bush K. Classification of  $\beta$ -lactamases: Groups 1, 2a, 2b and 2b'. *Antimicrob Agents Chemother* 1989; 33 (3): 264-70.
- 46 Li XZ, Mehrotra M, Ghimire S, Adewoye L. Beta-lactam resistance and beta-lactamases in bacteria of animal origin. *Vet Microbiol* 2007; 121 (3-4): 197-214.
- 47 Amino Acid Sequences for TEM, SHV and OXA Extended-Spectrum and Inhibitor Resistant  $\beta$ -Lactamases [<http://www.lahey.org/studies/>].
- 48 Bradford PA. Extended-spectrum beta-lactamases in the 21st century: characterization, epidemiology, and detection of this important resistance threat. *Clin Microbiol Rev* 2001; 14 (4): 933-51, table of contents.
- 49 Queenan AM, Foleno B, Gownley C, Wira E, Bush K. Effects of inoculum and beta-lactamase activity in AmpC- and extended-spectrum beta-lactamase (ESBL)-producing *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae* clinical isolates tested by using NCCLS ESBL methodology. *J Clin Microbiol* 2004; 42 (1): 269-75.
- 50 Babini GS, Livermore DM. Are SHV beta-lactamases universal in *Klebsiella pneumoniae*? *Antimicrob Agents Chemother* 2000; 44 (8): 2230.
- 51 Gupta V. An update on newer beta-lactamases. *Indian J Med Res* 2007; 126 (5): 417-27.
- 52 Tzouvelekis LS, Tzelepi E, Tassios PT, Legakis NJ. CTX-M-type beta-lactamases: an emerging group of extended-spectrum enzymes. *Int J Antimicrob Agents* 2000; 14 (2): 137-42.
- 53 Arakawa Y, Ohta N, Kido M, Mori H, Ito T, Komatsu Y, *et al.* Chromosomal  $\beta$ -lactamase of *Klebsiella oxytoca*, a new class A enzyme that hydrolyzes broad spectrum  $\beta$ -lactams antibiotics *Antimicrob Agents Chemother* 1989; 33: 63-70.
- 54 Bonnet R. Growing group of extended-spectrum beta-lactamases: the CTX-M enzymes. *Antimicrob Agents Chemother* 2004; 48 (1): 1-14.
- 55 Kariuki S, Corkill JE, Revathi G, Musoke R, Hart CA. Molecular characterization of a novel plasmid-encoded cefotaximase (CTX-M-12) found in clinical *Klebsiella pneumoniae* isolates from Kenya. *Antimicrob Agents Chemother* 2001; 45 (7): 2141-3.
- 56 Pai H, Choi EH, Lee HJ, Hong JY, Jacoby GA. Identification of CTX-M-14 extended-spectrum beta-lactamase in clinical isolates of *Shigella sonnei*, *Escherichia coli*, and *Klebsiella pneumoniae* in Korea. *J Clin Microbiol* 2001; 39 (10): 3747-9.
- 57 Kariuki S, Corkill JE, Revathi G, Musoke R, Hart CA. Molecular characterization of a novel plasmid encoded cefotaximase (CTX-M-12) found in clinical *Klebsiella pneumoniae* isolates from Kenya. *Antimicrob Agents Chemother* 2001; 45: 2141-43.
- 58 Karas JA, Pillay DG, Muckart D, Sturm AW. Treatment failure due to extended spectrum beta-lactamase. *J Antimicrob Chemother* 1996; 37 (1): 203-4.
- 59 Senda K, Arakawa Y, Ichiyama S, Nakashima K, Ito H, Ohsuka S, *et al.* PCR detection of metallo-beta-lactamase gene (blaIMP) in gram-negative rods resistant to broad-spectrum beta-lactams. *J Clin Microbiol* 1996; 34 (12): 2909-13.
- 60 Xian-Zhi Li MM, Shiva Ghimire, Lateef Adewoye. Beta-lactam resistance and  $\beta$ -lactamases in bacteria of animal origin. *Vet Microbiol* 2007; 121: 197-214.
- 61 Albertini MT, Benoit C, Berardi I, Berrouane Y, Boisivon A, Cahen PC, *et al.* Surveillance of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) and *Enterobacteriaceae* producing Extended Spectrum beta-lactamase(ESBLE) in Northern France:a five -year multicentre incidence study. *J Hosp Infect* 2002; 52: 107-13.
- 62 Sader HS, Gales AC, Granacher TD, Pfaller MA, Jones RN. Prevalence of antimicrobial resistance among respiratory tract isolates in Latin America :results from SENTRY antimicrobial surveillance program. *Braz J Infect Dis* 2000; 4: 245-54.
- 63 Hanson ND, Smith Moland E, Pitout JD. Enzymatic characterization of TEM-63, a TEM-type extended spectrum beta-lactamase expressed in three different genera of *Enterobacteriaceae* from South Africa. *Diagn Microbiol Infect Dis* 2001; 40 (4): 199-201.
- 64 Bell JM, Turnidge JD, Gales AC, Pfaller MA, Jones RN. Prevalence of extended spectrum beta-lactamase(ESBL)-producing clinical isolates in the Asia-Pacific region and South Africa :regional results from SENTRY antimicrobial surveillance program (1997-98). *Diagn Microbiol Infect* 2002; 42: 193-98.

- 65 Yu Y, Zhou W, Chen Y, Ding Y, Ma Y. Epidemiological and antibiotic resistant study on extended spectrum beta-lactamase-producing *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae* in Zhejiang Province. Chin Med Res 2002; 115: 1479-82.
- 66 Lewis M, Yamaguchi K, Beidenbach DJ, Jones RN. *In vitro* evaluation of cefapime and other broad spectrum beta lactams in 22 medical centers in Japan: a Phase II trial comparing two annual organism samples. The Japan Antimicrob Resistance Study Group. Diagn Microbiol Infect Dis 1999; (35): 307-15.
- 67 Chanawong A, Zali FH, Heritage J, Xiong JH, Hawkey PM. Three cefotaximases CTX-M-9, CTX-M-13, CTX-M-14, among *Enterobacteriaceae* in the people's Republic of China J Infect Chemother 2002; 2001 (46): 630-367.
- 68 Sturenburg E, Mack D. Extended-spectrum beta-lactamases: implications for the clinical microbiology laboratory, therapy, and infection control. J Infect 2003; 47 (4): 273-95.
- 69 Standards. NCfcl. Methods for dilution antimicrobial susceptibility tests for bacterial that grow aerobically. Approved Standard M7-A5 and informational supplement M100-S10. National Committee for Clinical Laboratory Standards ed. Pennsylvania, USA; 2006.
- 70 Thompson KS. Detection of extended spectrum beta lactamases in members of the familia *Enterobacteriaceae* comparision of the double disk and the three dimensional tests Antimicrob Agentes Chemother 1992; 36: 1877-82.
- 71 Merz LR, Warren DK, Kollef MH, Fridkin SK, Fraser VJ. The Impact of Antibiotic Cycling Program on Emprical Therapy for Gram- Negative Infections. Chest 2006; 130 (6): 1672-78.
- 72 Hendriksen RS, Mevius DJ, Schroeter A, Teale C, Meunier D, Butaye P, *et al.* Prevalence of antimicrobial resistance among bacterial pathogens isolated from cattle in different European countries: 2002-2004. Acta Vet Scand 2008; 50: 28.
- 73 Piojan AP, Chávez DJA. Gastos provocados por neumonías en becerras lecheras para reemplazo, mantenidas bajo sistemas de alojamiento. Vet Mex 2003; 34 (4): 333-42.
- 74 Teuber M. Veterinary use and antibiotic resistance. Curr Opin Microbiol 2001; 4 (5): 493-9.
- 75 Paladino JA, Sunderlin JL, Price CS, Schentag JJ. Economic consequences of antimicrobial resistance. Surg Infect 2002; 3 (3): 259-67.
- 76 Council NR. The use of drugs in food animals. Benefits and risks; 1999.
- 77 Gniadkowski M. Evolution and epidemiology of extended-spectrum beta-lactamases (ESBLs) and ESBL-producing microorganisms. Clin Microbiol Infect 2001; 7 (11): 597-608.
- 78 Paladino JA, Sunderlin JL, Price CS, Schentag JJ. Economic consequences of antimicrobial resistance. Surg Infect (Larchmt) 2002; 3 (3): 259-67.
- 79 Colodner R, Raz R. Extended-spectrum beta-lactamases: the end of cephalosporins? Isr Med Assoc J 2005; 7 (5): 336-8.
- 80 Townsend K, Boyce J, Chung J, Frost A, Adler B. Genetic organization of *Pasteurella multocida* cap Loci and Development of a Multiplex Capsular PCR Typing System. J Clin Microbiol 2001; 39: 924-29.
- 81 Pitchner D, Saunders N, Owen R. Rapid extraction of bacterial genomic DNA with guanidium thiocyanate. Lett App Microbiol 1989; 8: 151-56.
- 82 Paterson D, Hujer K, Yeiser B, Bonomo M, Rice B, Bonomo R. Bloodstream isolates from seven countries: dominance and wide spread prevalence of SHV and CTX-M-Type  $\beta$ -lactamases. Antimicrob Agents Chemother 2003; 47 (11): 3554-60.
- 83 Catry B, Dewulf J, de Kruif A, Vanrobaeys M, Haesebrouck F, Decostere A. Accuracy of susceptibility testing of *Pasteurella multocida* and *Mannheimia haemolytica*. Microb Drug Resist 2007; 13 (3): 204-11.
- 84 Piojan AP, Aguilar RF. Resistencia y sensibilidad a antimicrobianos en cepas de *P. haemolytica*, *P. multocida* y *Haemophilus somni* aisladas en becerras lecheras en establos de Tijuana Vet Mex 200; 35 (2): 153-56.
- 85 Carattoli A. Animal reservoirs for extended spectrum beta-lactamase producers. Clin Microbiol Infect 2008; 14 (1): 117-23.
- 86 Jacoby G, Han P, Tran J. Comparative in vitro activities of carbapenem L-749,345 and other antimicrobials against multiresistant gram-negative clinical pathogens. Antimicrob Agents Chemother 1997; 41 (8): 1830-1.
- 87 Paterson D, Bonomo R. Extended-spectrum beta-lactamases: a clinical update. Clin Microbiol Rev 2005; 18 (4): 657-86.

- 88 Sabate´ M, Tarrago´ F, Navarro E, Miro´ C, Verge´s J, Barbe´ G. Cloning and sequence of the gene encoding a novel cefotaxime-hydrolyzing  $\beta$ -lactamase (CTX-M-9) from *Escherichia coli* in Spain. *Antimicrob Agents Chemother* 2000; 44: 1970–73.
- 89 Livermore DM. Defining an extended-spectrum beta-lactamase. *Clin Microbiol Infect* 2008; 14 (1): 3-10.
- 90 Wu JR, Shieh HK, Shien JH, Gong SR, Chang PC. Molecular characterization of plasmids with antimicrobial resistant genes in avian isolates of *Pasteurella multocida*. *Avian Dis* 2003; 47 (4): 1384-92.
- 91 Naas T, Benaoudia F, Lebrun L, Nordmann P. Molecular identification of TEM-1 beta-lactamase in a *Pasteurella multocida* isolate of human origin. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 2001; 20 (3): 210-3.
- 92 Manuel COV. Identificación Molecular de los Serogrupos Capsulares A y D de *Pasteurella multocida* en Bovinos de la Cuenca Lechera de Tizayuca México mediante PCR Múltiple. Mexico DF: UNAM; 2007.
- 93 Kehrenberg C, Shwarz S. Plasmid-borne florenicol resistance in *Pasteurella*. *Antimicrob Agentes Chemother* 2005; 55 (5): 773-75.