



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA  
DE MÉXICO**

**FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES  
CUAUTITLAN**

**DETERMINACIÓN DE LA RESISTENCIA  
ANTIMICROBIANA EN CEPAS DE *Mannheimia haemolytica*  
AISLADAS DE EXUDADO NASAL DE BOVINOS  
CLINICAMENTE SANOS DE NEUMONIA.**

**T E S I S**

**QUE PARA OBTENER EL TITULO DE:  
MÉDICO VETERINARIO ZOOTECNISTA**

**P R E S E N T A:  
JOSÉ LUIS CONTRERAS JACOBO**

**ASESOR:  
DR. CARLOS JULIO JARAMILLO ARANGO**

**COASESORES:  
DR. FRANCISCO AGUILAR ROMERO  
DR. JESUS VAZQUEZ NAVARRETE**



Universidad Nacional  
Autónoma de México



**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 la Universidad Nacional Autónoma de México y en especial a la Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán campo 4 por permitirme una formación profesional.

A mis padres por el apoyo incondicional que siempre me brindan, por su comprensión, y sobre todo por su amor que me han dado.

#### AGRADECIMIENTO:

A Dios: Por permitirme dar otro paso en mi vida.

A mis hermanos: Juan Carlos, Jonathan y Leslie, por estar conmigo, darme su amistad y apoyo.

A ti Itzel: La mujer que engrandece mi vida con tu amor y por siempre mi alma gemela.  
A ti Danna Abril: Mi hija, lindo motivo para seguir adelante cada día.

A mis asesores:

Dr. Carlos Julio Jaramillo Arango  
Por su paciencia, tiempo, su apoyo y sus conocimientos.

A mis Coasesores:

Dr. Francisco Aguilar Romero  
Dr. Jesús Vázquez Navarrete  
Por su apoyo incondicional.

## INDICE

Resumen.....	1
Introducción.....	2
Características generales de <i>Mannheimia haemolytica</i> .....	2
Patógena pasteurelosis neumónica.....	3
Signos clínicos pasteurelosis neumónica.....	4
Tratamiento utilizado en tizayuca hidalgo CAIT.....	4
Conjugación.....	5
Transformación.....	5
Transposición .....	5
Trasducción.....	5
Justificación.....	6
1. Objetivos.....	7
2. Material y Métodos.....	8
Técnica Kirby-Bauer.....	8
Concentración Mínima Inhibitoria.....	9
Extracción de ADN cromosómico.....	10
Reacción en cadena de la polimerasa.....	11
3. Análisis de resultados.....	11
4. Resultados.....	12
5. Discusión .....	17
6. Conclusiones.....	21
7. Literatura citada.....	22

## RESUMEN

En la industria mundial ganadera anualmente se presentan grandes pérdidas económicas por causa de las neumonías, entre las cuales sobresale la pasteurelisis, en la cual se ve involucrada *Mannheimia haemolytica*. En el tratamiento se utilizan una amplia gama de antimicrobianos como la penicilina, tetraciclina, cloranfenicol, eritromicina, estreptomicina, trimetoprim, sulfonamidas, tilmicocina; en los cuales se ha observado resistencia antimicrobiana. En el presente trabajo se emplearon un total de 123 cepas de *Mannheimia haemolytica* aisladas de exudado nasal de bovinos clínicamente sanos de neumonía, obtenidas en el complejo lechero de Tizayuca, Hidalgo, México. Realizándoles las pruebas de difusión en agar, para determinar la resistencia a los diferentes antimicrobianos utilizados en este complejo lechero. El antimicrobiano que presentó mayor resistencia fue a la estreptomicina (83.74%), seguido por la gentamicina (21.13%) y por último la eritromicina (10.57%), todas las cepas fueron susceptibles a los betalactámicos utilizados, y a trimetoprim con sulfametoxazol. También se determinó la concentración mínima inhibitoria (MIC) a las cepas que presentaron resistencia a tres o más antimicrobianos en la prueba de difusión en agar. Los rangos obtenidos en MIC fueron amplios (estreptomicina 8-256 µg/ml; gentamicina 8-128 µg/ml; eritromicina 4-128 µg/ml). Se realizó la prueba de PCR para buscar la presencia del gen *strA* que codifica a la enzima aminoglycoside-3-fosfotransferasa que proporciona una resistencia a estreptomicina. Del total de las cepas estudiadas (n=123) el 18.7% presentaron el gen *strA*, de los cuales 20.8% presentaron resistencia.

**DETERMINACIÓN DE LA RESISTENCIA ANTIMICROBIANA EN CEPAS DE  
*Mannheimia haemolytica* AISLADAS DE EXUDADO NASAL DE BOVINOS  
CLÍNICAMENTE SANOS DE NEUMONÍA.**

**INTRODUCCION**

En la industria mundial ganadera anualmente se presentan grandes pérdidas económicas por causa de las neumonías entre las que podemos encontrar; los gastos por vacunaciones, tratamientos, disminución en la eficacia de la conversión alimenticia y las muertes provocadas por estas enfermedades<sup>1,2,3,4</sup>. Una de las neumonías que sobresale es la pasteurelosis neumónica enfermedad llamada así puesto que los que los microorganismos relacionados con este padecimiento son las familias del género *Pasteurella spp.* (En mayor importancia *Mannheimia haemolytica* (antes *Pasteurella haemolytica*). Esta enfermedad respiratoria se desarrolla principalmente en becerros recién destetados o en animales jóvenes, pero se puede presentar a cualquier edad<sup>5,6</sup>.

Para que la pasteurelosis neumónica se presente se ven relacionados varios factores como lo son, situaciones de estrés y agentes infecciosos virales, como el virus de la rinotraqueitis infecciosa bovina (IBR), el virus de la parainfluenza tipo tres (PI-3), el virus respiratorio sincitial bovino (VRSB), y varios más. Comúnmente son los microorganismos primarios. También se ven relacionado con las neumonías las bacterias siendo estas agentes secundarias complicándolo el cuadro infeccioso. *M. haemolytica* es la bacteria en una frecuencia mayor en los casos de procesos neumónicos por ello se le relaciona como el principal ente con la pasteurelosis neumónica debido a que esta causa los problemas y signos característicos de esta enfermedad. Esta bacteria pertenece a la familia *Pasteurellaceae*, se encuentra como parte de la microbiota normal de las vías respiratorias altas de los rumiantes, por lo general no causa problemas y únicamente daña al hospedador inmunodeprimido<sup>5,6,7</sup>.

*M. haemolytica* es una bacteria Gram negativa, cocobacilar pleomórfica, no es móvil, se encuentra encapsulada, mide entre 0.2-2 $\mu$ , crece formando colonias de 1-3 mm de diámetro de color blancas-grisáceas, produce  $\beta$ -hemólisis en agar sangre de ovino, puede crecer en agar MacConkey. Bioquímicamente es negativa a ureasa e indol, es positiva a la producción de

oxidasa, produce ácido a partir de la fermentación de la lactosa, sucrosa, maltosa y xilosa; en medio TSI no produce ácido sulfhídrico<sup>8,9</sup>.

Esta bacteria ha sido reclasificada varias veces, primero era llamada *Bacterium bipolare multocidum* en 1885, después como *Pasteurella haemolytica* en 1932, entre los años de 1959 y 1961 se descubrieron dos biotipos el A y el T, cimentados en la habilidad de fermentar la arabinosa y la trehalosa respectivamente<sup>10</sup>. Dentro del biotipo A fueron encontrados los serotipos A1, A2, A5-A9, A12-A14, A16 y A17 de acuerdo a antígenos capsulares. El biotipo T contaba con cuatros serotipos el T3, T4, T10 y T15, estos últimos fueron reclasificados como *Pasteurella trehalosi* en 1990. Nueve años después *Pasteurella haemolytica* fue reclasificada como *Mannheimia haemolytica* basado en estudios de hibridación ADN-ADN y secuenciación de la subunidad 16S ribosomal. El serotipo A11 fue reclasificado como *Mannheimia glucosida*. El nombre de *Mannheimia* es en honor al biólogo investigador alemán Walter Mannheim<sup>11</sup>.

De los serotipos mencionados anteriormente hay dos que se aíslan con más frecuencia en problemas neumónicos, los cuales son el A1 en bovinos y el A2 en ovinos, también se ha informado sobre aislamientos no tipificables<sup>12,13,14,15,16</sup>.

Entre los factores de estrés que favorecen la infección por *M. haemolytica* se encuentran el transporte prolongado, destete, hacinamiento, cambios bruscos de temperatura, altas concentraciones de amoníaco en los corrales, etc<sup>7</sup>. Además de la presencia de agentes virales ya antes mencionados. Estos últimos aunados a los factores estresantes provocan un estado de inmuno-depresión del hospedador, lo que promueve una interacción virus-bacteria, ocasionando un efecto citopático en el aparato respiratorio, además de reducir la remoción de bacterias y la capacidad fagocitaria del macrófago alveolar, favoreciendo a que *M. haemolytica* colonice fácilmente y pueda llegar a pulmón evadiendo las defensas del hospedador mediante los factores de virulencia como la cápsula y la leucotoxina (LTX), aunque se pueden encontrar presentes otros factores de virulencia que favorecen su supervivencia y patogenicidad, como lo son el lipopolisacarido (LPS), las proteínas de membrana externa (OMPs) y las proteasas. La leucotoxina se considera como el principal factor de virulencia de *M. haemolytica* factor que se produce en la fase de crecimiento logarítmico, este factor ocasiona daño tisular en pulmón debido a que promueve la activación y destrucción de los neutrófilos polimorfonucleares<sup>5,6,17,18,19,20,21</sup>.

La pasteurelosis neumónica es de curso agudo y se caracteriza por una pleurobronconeumonía fibrinosa severa, los signos clínicos que se observan en animales afectados por esta enfermedad respiratoria son anorexia, decaimiento, apatía, fiebre de 40 °C, aumento del murmullo vesicular y de ruidos bronquiales en zona anteroventral, disnea, y secreción nasal<sup>18,21</sup>. La infección por *M. haemolytica* presenta una morbilidad del 50% y una mortalidad desde el 1 al 10%.<sup>8</sup>

La prevención de la pasteurelosis neumónica es complicada puesto que es multifactorial, por lo cual se recomienda disminuir lo más posible las prácticas de manejo que puedan ocasionar estrés, evitar los cambios bruscos de temperatura y mantener un buen calendario de vacunación contra los principales agentes infecciosos relacionados con el aparato respiratorio<sup>22,23,24</sup>.

En el tratamiento se utilizan una amplia gama de antimicrobianos como la penicilina, tetraciclina, cloranfenicol (Prohibido en México NOM-061-ZOO-1999), eritromicina, estreptomina, trimetoprim, sulfonamidas, tilmicocina, entre otros<sup>21,25,26,27</sup>. En el Complejo Lechero de Tizayuca, Hidalgo, se ha estado utilizando en los últimos años un cuadro amplio de antimicrobianos entre los que se encuentran la penicilina, eritromicina, estreptomina, trimetoprim con sulfametoxazol, ceftiofur, ampicilina, tetraciclina y gentamicina. La utilización de varios antimicrobianos en una sola ubicación geográfica, se debe a la búsqueda de una mayor eficacia contra los microorganismos que puedan causar enfermedad, debido a que se ha encontrado resistencia a algunos antimicrobianos, estas resistencias se deben a mal uso de los antimicrobianos en los tratamientos o probablemente por el uso de éstos como promotores de crecimiento en la producción ganadera<sup>26,27,28</sup>. La resistencia que *M. haemolytica* y otras bacterias han adquirido es el resultado de una incorporación de material genético que trae por consecuencia una alteración fisiológica o cambios estructurales en las mismas, por ejemplo: la producción de enzimas como la  $\beta$ -lactamasa, la disminución de la permeabilidad, alteración de los receptores donde la acción antimicrobiana se inhibe, entre otros<sup>28,29</sup>.

Dichos cambios se deben a una modificación en la estructura genética, que pueden ocasionarse por una mutación o la adquisición de elementos móviles como lo son los plásmidos que pueden contener genes específicos de resistencia a los antimicrobianos. Las principales formas de intercambio de material genético son la conjugación, transformación, transposición y la trasducción<sup>28, 30,31</sup>.



La conjugación es el intercambio unilateral de material genética entre bacterias del mismo o diferente género. Esto se lleva a cabo por un factor de fertilidad (F) que provoca una la extensión de las fimbrias o pelos sexuales de la célula donadora hacia a una receptora. Este proceso es más común verlo en bacterias Gram negativas<sup>28, 30,31</sup>.

Transformación es donde el ADN desnudo pasa de una célula a célula de otra especie y altera así su genotipo<sup>28, 30,31</sup>.

La transposición es cuando dentro de la célula bacteriana puede ocurrir la transferencia de secuencias cortas de ADN (transposones) entre un plásmido y otro, o entre un plásmido y una porción del cromosoma bacteriano<sup>28, 30,31</sup> ..

En el caso de la trasducción es el proceso donde el ADN del plásmido se encierra en un virus bacteriano (bacteriófago) y el virus lo transfiere a otra bacteria de la misma especie<sup>28, 30,31</sup> ..

Un ejemplo de la adquisición de un elemento móvil por medio de la conjugación, es la transferencia de plásmidos, que son material genético extracromosómico que se replica independientemente del cromosoma y que no son indispensables para la viabilidad de la bacteria que los posee. Hay plásmidos crípticos que no dan ningún fenotipo detectable (función desconocida), pero existen muchos plásmidos que codifican funciones como resistencia a antibióticos o a metales pesados, virulencia a plantas o animales, capacidad de fijar nitrógeno atmosférico, entre otros. En el caso de *M. haemolytica* puede contener en el citoplasma el plásmido pMSHCSI y otros plásmidos relacionados, dentro de los cuales pueden contenerse los genes *strA* que pueden codificar resistencia a la estreptomicina mediante la producción de la enzima aminoglucoside-3-fosfotransferasa localizadas en otros géneros bacterianos<sup>30,31,32,33, 34</sup>,

Para determinar los perfiles de resistencia antimicrobiana en cepas de *M. haemolytica*, se utilizan técnicas *in vitro* como la difusión en agar (Kirby-Bauer) donde una suspensión de la bacteria en estudio se inocula sobre la superficie de una placa de agar. Posteriormente se colocan sobre la superficie del agar discos de papel de filtro impregnados con cantidades estandarizadas de agentes antimicrobianos. Luego del período de incubación se mide el diámetro de la zona de inhibición alrededor de los discos<sup>35,36,37,38,39,40</sup>. La concentración mínima inhibitoria (CMI), se

trata de la dosis mínima con la que un fármaco inhibe el crecimiento de un determinado patógeno y es indicativa de la eficacia del antibiótico<sup>40,42,43</sup>. Una vez que se han obtenido los perfiles de resistencia, es posible deducir la presencia de genes que codifiquen a la misma, lo cual se puede determinar a través de la técnica de reacción en cadena de la polimerasa (PCR), esta técnica nos permite duplicar un número ilimitado de veces de un fragmento de DNA, en este caso, nos permitirá amplificar los genes específicos a resistencia como lo es *strA*, el cual codifica resistencia a la estreptomicina<sup>30</sup>.

En México existe escasa información sobre la resistencia antimicrobiana en cepas de *M. haemolytica* aisladas de bovinos sanos, por ejemplo, solo se pudo recopilar la investigación realizada por Pijoan *et al*<sup>25</sup>. Por lo cual se elaboró este trabajo con el propósito de generar información que ayude a diseñar esquemas de tratamientos adecuados y evitar pérdidas económicas en nuestro sector ganadero a causa de esta enfermedad.

## **1. OBJETIVO GENERAL:**

- 1.1 Determinar la resistencia antimicrobiana de cepas *M. haemolytica* aisladas de exudado nasal de bovinos clínicamente sanos de neumonía en una cuenca lechera de México.

## **OBJETIVOS ESPECÍFICOS:**

- 1.1 Determinar perfiles de resistencia antimicrobiana mediante la prueba de difusión en agar (Antibiograma). (Kirby-Bauer).
- 1.2 Determinar la Concentración Mínima Inhibitoria (CMI) en las cepas que presenten multiresistencia antimicrobiana.
- 1.3 Determinar la presencia de los genes *strA* que proporcionan resistencia a estreptomicina usando la técnica de Reacción en Cadena de la Polimerasa.

## 2. MATERIAL Y MÉTODO

### 2.1 OBTENCIÓN DE LAS CEPAS

Se emplearon 123 cepas de *M. haemolytica* aisladas de exudado nasal de bovinos clínicamente sanos de neumonía, de una cuenca lechera en México ubicada en Tizayuca Hidalgo, de las cuales 30 (24.4%) eran serotipo A1, 7 (5,69%) A6 y 86 (69.9%) no tipificables (NT) que fueron obtenidas de un estudio previo que se realizó en el Centro Nacional de Investigación Disciplinaria en Microbiología Animal (CENID-Microbiología) del Instituto Nacional de Investigaciones Forestales, Agrícolas y Pecuarias (INIFAP), y la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia de la UNAM como parte del proyecto CONACyT G-38590-B

### 2.2 MANEJO Y PROCESAMIENTO DE LAS CEPAS.

Se realizó en los laboratorios de bacteriología del CENID-Microbiología; las cepas de *M. haemolytica* fueron resembradas en agar sangre de ovino<sup>a</sup> en un lapso de 10 días entre resiembra para mantenerlas viables para las diferentes pruebas a las que fueron sometidas.

### 2.3 TÉCNICA DE DIFUSIÓN EN AGAR (DA) (TÉCNICA KIRBY-BAUER)

Para cada aislamiento se preparó un inóculo a una concentración de  $10^8$  UFC/ml en el espectrofotómetro<sup>b</sup> a 75% de transmitancia y 610 nm de longitud de onda. Posteriormente se inocularon 2 ml de esta suspensión en agar sangre de ovino en donde se colocaron los sensibilizadores<sup>c,35,36,37</sup> los cuales fueron seleccionados de acuerdo a los quimioterapéuticos usados en la cuenca lechera. Estos fueron: ampicilina (10 µg), ceftiofur (30 µg), penicilina (10 UI), tetraciclina (30 µg), sulfametoxazol- trimetoprim (23.75/1.25 µg), estreptomicina (300 µg), gentamicina (10 µg), eritromicina (15 µg), con una distancia aproximada de 30 mm entre ellos. Se incubaron 24 horas a 37°C y la lectura se determinó con un vernier con el cual se midió el diámetro del halo de inhibición<sup>38,39,40</sup>. Los valores de interpretación de los halos de inhibición se

---

<sup>a</sup> Becton Dickinson de México

<sup>b</sup> Bocharach. Coleman, Modelo 35

<sup>c</sup> Becton Dickinson and Company CBD, BBL®

detallan en la tabla 1, de acuerdo a lo establecido por el National Committee for Clinical Laboratory Standards (NCCLS)<sup>39</sup>.

**Tabla 1. INTERPRETACIÓN DE ESTÁNDARES PARA LA PRUEBA DE SUSCEPTIBILIDAD PARA DIFUSIÓN EN AGAR\*.**

Antimicrobiano	Zona de inhibición diámetro (mm)		
	R	I	S
Ampicilina (AM)	≤13	14-16	≥17
Tetraciclina (TE)	≤14	15-18	≥19
Penicilina (P)	≤14	12-21	≥15
Ceftiofur (XNL)	≤17	18-20	≥21
Estreptomina (St)	≤11	12-14	≥15
Gentamicina (GM)	≤12	13-14	≥15
Sulfametoxazol-trimetoprim (SXT)	≤10	11-15	≥16
Eritromicina (E)	≤13	14-22	≥23

R (Resistentes), I (Intermedio), S (Susceptible).

\* De acuerdo a lo establecido por el Nacional Committee for Clinical Laboratory Standards (NCCLS)<sup>38</sup>.

#### 2.4 CONCENTRACIÓN MÍNIMA INHIBITORIA (CMI)

Se prepararon cultivos bacterianos de 24 horas, para posteriormente inocular 3 ó 4 colonias en 5 ml en caldo de Tripticasa soya, ajustando la turbidez con solución salina fisiológica o caldo de cultivo estéril a la concentración correspondiente a  $10^8$  UFC/ml en el espectrofotómetro. Se realizaron diluciones al 1/100 de cada inóculo (0.2 ml de este inóculo en 19.8 ml de caldo BHI<sup>d</sup>, para obtener inóculo de  $10^6$  UFC/ml).

Se prepararon 15 tubos con 1 ml de caldo BHI y otro con 1.8 ml. Se preparó una solución madre de cada quimioterapéutico al cual resultaron resistentes los aislamientos en la prueba de difusión (estreptomina, gentamicina, sulfametoxazol, penicilina<sup>e</sup>) a una concentración de 512 µg/ml. Se añadieron 0.2 ml de solución madre del antibiótico al tubo que contiene 1.8 ml de caldo y a partir

<sup>d</sup> Laboratorio Merck

<sup>e</sup> Laboratorios Sigma

de este tubo se prepararon diluciones dobles seriadas tomando 1 ml del primer tubo y transfiriéndolo al segundo, después de mezclar bien el contenido del segundo tubo se transfirió con una pipeta diferente 1 ml al tercer tubo y así sucesivamente hasta el tubo 14 del cual se tomó 1 ml y se descartó, obteniendo así diluciones dobles seriadas de 512 µg/ml hasta 0.0625 µg/ml, se incubaron los tubos a 37°C en agitación a 100 rpm por 24 horas, y la lectura se llevó a cabo tomando en cuenta en qué dilución no hubo crecimiento bacteriano<sup>35,37,39,40</sup>. El criterio para considerar a una cepa susceptible o resistente a determinado quimioterapéutico se basó en los parámetros enlistados en la (Tabla 2) propuesto por el National Committee for Clinical Laboratory Standards (NCCLS)<sup>39</sup>.

**Tabla 2. INTERPRETACIÓN DE ESTÁNDARES PARA LA PRUEBA DE CONCENTRACIÓN MÍNIMA INHIBITORIA.**

ANTIMICROBIANO	µg/ml	
	SUSCEPTIBLE	RESISTENTE
Gentamicina	≤ 4	≥ 16
Estreptomina	≤ 64	≥ 128**
Eritromicina	≤ 0.5	≥ 8
Tetraciclina	≤ 4	≥ 16

\*De acuerdo a lo establecido por el National Committee for Clinical Laboratory Standards (NCCLS) y al Manual of clinical Microbiology. \*\* De acuerdo a Kchrenberg, S. Schwars/ FEMS Microbiology letters 205(2001) 283-290

## 2.5 EXTRACCIÓN DE ADN CON TIOCIANATO DE GUANIDINA.

De un cultivo en placa de *M. haemolytica* se obtuvieron el mayor número de colonias colocándolas en un tubo eppendorf de 1.5 ml y se agregaron 550 µl de solución de lisis (tiocianato de guanidina<sup>f</sup> 5M, EDTA<sup>g</sup> 0.1 M y sarcocyl<sup>h</sup> 0.5%), se agregaron 250 µl de acetato de amonio 7.5 M, posteriormente se colocaron en hielo por 10 minutos, se adicionaron 500 µl de cloroformo alcohol isoamílico<sup>i</sup> (25:1) y se mezclaron, se centrifugó<sup>j</sup> a 4,500 x g durante 5 minutos, se tomó el sobrenadante y volvió a lavar con cloroformo alcohol isoamílico, el

<sup>f</sup> Laboratorios Merck

<sup>g</sup> Laboratorios Sigma

<sup>h</sup> Laboratorios. TECSIQUIM; SA de CV

<sup>i</sup> Reactivo Becker<sup>®</sup>

<sup>j</sup> Centífuga Eppendorf. Modelo 59410

sobrenadante se precipitó con 0.7 de volumen de isopropanol<sup>k</sup> por 15 minutos, se centrifugó a 6,500 x g por 10 minutos, se desechó el sobrenadante, se adicionaron 200 µl de etanol absoluto y se mezcló; posteriormente se centrifugó a 8,000 x g durante 15 minutos, se decantó y eliminó el sobrenadante, se dejó evaporar el etanol<sup>44</sup>. El residuo final (ADN) se resuspendió en 100 µl de agua destilada estéril y para corroborar la obtención de el ADN de buena calidad se visualizó la muestra de 10 µl en gel de agarosa al 1% con bromuro de etidio y Tris/borato como buffer de acuerdo a los protocolos de electroforesis, la imagen se registró en un digitalizador UVP. La muestra se almacenó a -20° C hasta su uso.

## 2.6 PCR PARA IDENTIFICACIÓN DE LOS GENES *strA* (*str1-str2*)

Se elaboró una premezcla con buffer 10x con MgCl<sub>2</sub> 1-5mM (5µl), 2µl de dNTPS, 1.5µl de oligonucleótido *str1* (5' TGA CTGGTTGCCTGTCAGAGG 3'), 1.5 µl de oligonucleótido *str2* (5' CCAGTTGTCTTCGGCGTTAGCA 3'), 0.5 µl de Taq polimerasa<sup>l</sup> y 36.5 µl de H<sub>2</sub>O destilada<sup>m</sup>, se midieron 3 µl de ADN que se mezclaron con 47µl de la premezcla posteriormente se proceso en el termociclador con el siguiente protocolo. El primer ciclo duró 3 minutos con una temperatura de 94°C seguido por 30 ciclos de 45 segundos a una temperatura de 94°C, 35 ciclos de 62° C de 45 segundos, 35 ciclos de 72°C por 45 segundos y un último ciclo de 72°C por 5 minutos en el termociclador<sup>n,30</sup>.

Se visualizó la muestra de 10 µl en gel de agarosa<sup>o</sup> al 1% con bromuro de etidio y TAE como buffer de acuerdo a los protocolos de electroforesis, se visualizó en un digitalizador UVP<sup>p</sup>.

---

<sup>k</sup> Laboratorio Merk®

<sup>l</sup> PCR Master Mix, Laboratorios Quigen

<sup>m</sup> PCR Master Mix, Laboratorios Quigen

<sup>n</sup> PERKIN ELMER Gene Ampl. PCR System 2400.

<sup>o</sup> INVITROGENE, Ultrapure 500mg y BIXON de México.

<sup>p</sup> UVP Bioluminescence systems, EPI CHEM II Darkroom

### **3. ANÁLISIS DE RESULTADOS**

Los datos obtenidos se analizaron mediante estadística descriptiva empleando además la prueba de  $X^2$  cuadrada de Pearson para una sola muestra o Fisher, según características de los datos, para evaluar si existía diferencia significativa entre las frecuencias de cepas sensibles o resistentes a los diferentes antimicrobianos<sup>41</sup>. El análisis estadístico se realizó con el programa EPI-INFO versión 3.3.2 para Windows (Centers for Disease Control and Prevention, CDC, Atlanta, USA, 2004)



## 4. RESULTADOS

### 4.1. DIFUSIÓN EN AGAR (TÉCNICA KIRBY-BAUER)

Los resultados de las cepas de *M. haemolytica* que presentaron resistencia a los antimicrobianos analizados que se presentan en la tabla 3. Sólo se encontró resistencia para St, GM, E y TE.

Los antimicrobianos para los que hubo mayor resistencia fueron la St (83.74%) para las cepas A1, A6 y NT y la GM (21.13%) para las cepas A1 y NT. (Tabla 3 y figura 1).

Al considerar la resistencia de las cepas según su serotipo, llama la atención la mayor frecuencia de cepas resistentes a la St en los serotipos A1 y A6 (93%; 42.8%) y en las NT (83.7%). Las diferencias entre las frecuencias de cepas resistentes para los diferentes antimicrobianos en cada uno de los serotipos, sólo fueron significativas para las A1 y las NT ( $p \leq 0.05$ ). (Tabla 3).

Al considerar cada uno de los antimicrobianos para los que hubo resistencia, destaca que para la St y la GM el mayor porcentaje de cepas resistentes fue de las NT (69.9% y 80.7%), en tanto que para la E fue de cepas A1 (76.9%). Estas diferencias sólo fueron significativas para estos tres antimicrobianos ( $p \leq 0.05$ ). (Tabla 3).

**Tabla 3.**  
RESISTENCIA A DIFERENTES QUIMIOTERAPÉUTICOS DE CEPAS DE *M. haemolytica* SEGÚN SEROTIPO.

Serotipo	cepas estudiadas	ANTIMICROBIANOS			
		St	GM	E	TE
		No. (%)	No. (%)	No. (%)	No. (%)
A1	30	28 (93.33)* (27.18)**	5 (16.67)* (19.23)**	10 (33.33)* (76.92)**	1 (3.33)* (100)**
A6	7	3 (42.85)* (2.91)**	0 (0)* (0)**	0 (0)* (0)**	0 (0)* (0)**
NT	86	72 (83.72)* (69.90)**	21 (24.42)* (80.76)**	3 (3.49)* (23.07)**	0 (0)* (0)**
Total	123	103 (83.74)*** (100)**	26 (21.13)*** (100)**	13 (10.57)*** (100)**	1 (0.81)*** (100)**

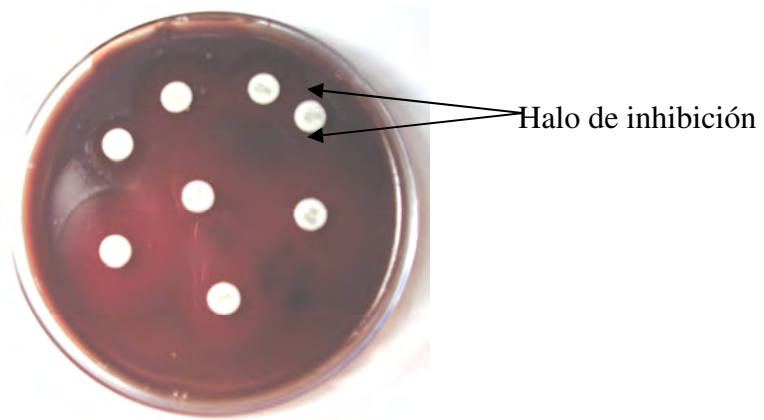
St (estreptomicina); GM (Gentamicina); E (eritromicina); y TE (tetraciclina).

\* Porcentaje con respecto a las filas (serotipo).

\*\* Porcentaje con respecto a las columnas (antimicrobiano).

\*\*\* Porcentaje total de cepas resistentes a los antimicrobianos en estudio.

El 5.6% (7/123) de las cepas presentaron multiresistencia ( $\geq 3$  antimicrobianos), de las cuales el 71.43% (5/7) fue el serotipo A1 y el 28.57% (2/7) fue NT.



**Figura 1.** Halo de inhibición producido por el sensidisco de estreptomina.

#### 4.2 CONCENTRACIÓN MÍNIMA INHIBITORIA. (CMI)

De las 7 cepas que presentaron multiresistencia a los antimicrobianos en la técnica de difusión en agar, al determinar la CMI, 6 resultaron resistentes a la GM, 4 a St (figura 2), 6 a E y 1 a TE. Sólo 4 cepas presentaron resistencia tanto en CMI como en DA. (Tabla 4).

**Tabla 4.**

#### CONCENTRACIÓN MÍNIMA INHIBITORIA EN CEPAS DE *M. haemolytica* CON MULTIRESISTENCIA MEDIANTE DIFUSIÓN EN AGAR

Cepa	St		GM		E		TE	
	CMI		CMI		CMI		CMI	
	µg/ml	R/S	µg/ml	R/S	µg/ml	R/S	µg/ml	R/S
1	8	S	128	R	4	S	---	---
2	32	S	32	R	16	R	---	---
7*	256	R	32	R	16	R	---	---
21*	128	R	64	R	32	R	---	---
35*	256	R	64	R	16	R	256	R
155	16	S	8	S	32	R	---	---
159*	256	R	256	R	128	R	---	---

St (estreptomina); GM (gentamicina); E (eritromicina); TE (tetraciclina); CMI (Concentración Mínima Inhibitoria); DA (Difusión en agar); S (susceptible); R (resistente).

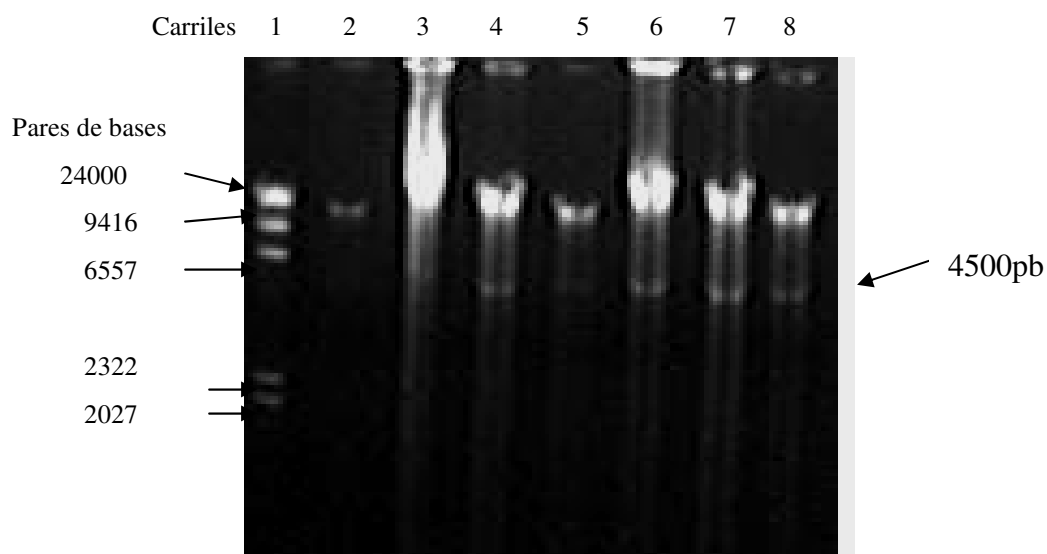
\* Cepas resistentes tanto en CMI como en DA.



**Figura 2.** CMI de un aislamiento de *M. haemolytica*. Tubo 1. Control negativo, 2. Dilución 512  $\mu\text{g/ml}$ , 3. Dilución 256 $\mu\text{g/ml}$ , 4. Dilución 128 $\mu\text{g/ml}$ , 5. Dilución 64  $\mu\text{g/ml}$ , 6. Dilución 32  $\mu\text{g/ml}$ , 7. Dilución 16  $\mu\text{g/ml}$ , 8. Dilución 8  $\mu\text{g/ml}$ , 9. Dilución 4  $\mu\text{g/ml}$ , 10. Dilución 2  $\mu\text{g/ml}$ , 11. Dilución 1 $\mu\text{g/ml}$ , 12. Dilución 0.5  $\mu\text{g/ml}$ , 13. Dilución 0.25 $\mu\text{g/ml}$ , 14. Dilución 0.125  $\mu\text{g/ml}$ , 15. Dilución 0.062  $\mu\text{g/ml}$

#### 4.3. EXTRACCIÓN DE ADN CROMOSÓMICO CON TIOCIANATO DE GUANIDINA.

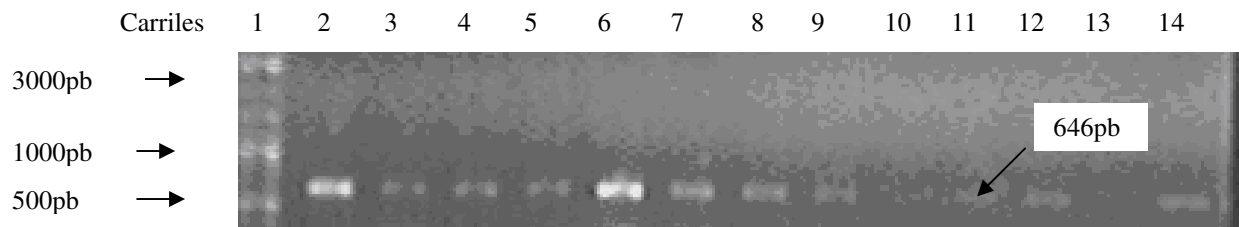
La técnica utilizada para la obtención de ADN fue rápida, eficaz y fácil, cabe destacar que algunas cepas presentaron un fragmento de aproximadamente 4500 pb por debajo del ADN cromosomal. (Figura 3).



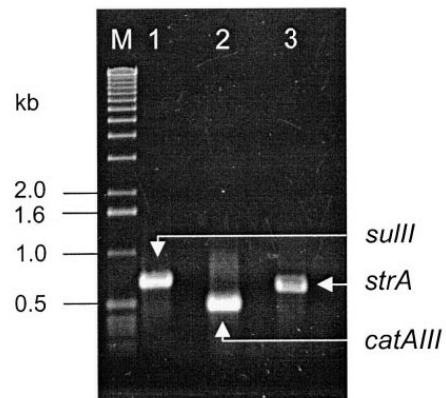
**Figura 3.** ADN de cepas de *M. haemolytica* en gel de agarosa al 1% en TAE 1X, teñido con bromuro de etidio. 1. Marcador de peso molecular  $\lambda$  24000 pb; 2-8, diferentes aislamientos de *M. haemolytica*.

#### 4.4 AMPLIFICACIÓN DEL GENE *strA*.

Debido a que en la técnica de DA se pudo observar una alta frecuencia a la resistencia a St (83.7%) se decidió buscar el gen *strA*. El 18.69% (23/123) de las cepas amplificó un fragmento de 646 pb (Figura 4) aproximadamente con las mismas características descritas por Kcherenberg *et al* (2001) (Figura 5).



**FIGURA 4.** Amplificación del gene de resistencia a la estreptomicina *StrA* de las cepas en estudio 1. Marcador de peso molecular 2 log, 2-12 cepas de *M. haemolytica*, 13. *E. coli* como control negativo, 14. Cepa de *M. haemolytica* como control positivo



**Figura 5.** Amplificaciones de los genes *sullI* (carril 1), *catAIII* (carril 2) y *strA* (carril 3), informado por Kcherenberg *et al* 2001.

Entre las cepas que fueron resistentes a St y presentaron el gen *strA*, sobresale el serotipo A1 con un 14.56%. Sobresale que en las cepas resistentes y sensibles sólo se observó una diferencia significativa en los serotipos A1 y NT en las frecuencias de la presencia del gen *strA* ( $p \leq 0.05$ ) (Tabla 5).

Entre los serotipos que fueron sensibles a la St y no amplificaron el gen *strA*, llama la atención que las cepas NT fueron las que presentaron el mayor porcentaje (70%). Vale la pena mencionar que en las cepas resistentes y sensibles se observó diferencia significativa en los serotipos A1 y NT entre las frecuencias con la ausencia del gen *strA* ( $p \leq 0.05$ ) (Tabla 5).

**Tabla 5.**

CEPAS DE *M. haemolytica* RESISTENTES A ESTREPTOMICINA Y AMPLIFICACIÓN DEL GENE *strA*, SEGÚN SEROTIPO Y NO TIPIFICABLES.

DA con estreptomicina	No. de cepas .	Serotipo				NT	
		A1		A6		Gen <i>strA</i>	
		Gen <i>strA</i>		Gen <i>strA</i>		Gen <i>strA</i>	
		( + )	( - )	( + )	( - )	( + )	( - )
		No. (%)	No. (%)	No. (%)	No. (%)	No. (%)	No. (%)
R	103	15 (14.56)	13 (12.62)	1 (0.97)	2 (1.95)	5 (4.85)	67 (65)
S	20	2 (10)	0 (0)	0 (0)	4 (20)	0 (0)	14 (70)
TOTAL	123	17 (13.81)	13 (10.57)	1 (0.81)	6 (4.87)	5 (4.07)	81 (65.85)

Llama la atención que solo el 20% de las cepas resistentes a St presentaron el gene *strA*, pero el 90% de las cepas sensibles no presentaron dicho gene. Estas diferencias no fueron significativas. ( $p \geq 0.05$ ) (Tabla 6).

**Tabla 6.**

FRECUENCIA DE CEPAS DE *M. haemolytica* DE ACUERDO A PRESENCIA DEL GEN *strA* SEGÚN RESISTENCIA O SENSIBILIDAD EN LA TÉCNICA DE KIRBY- BAUER.

Técnica Kirby-Bauer Estreptomicina	No. Cepas estudiadas	Gen <i>strA</i>	
		( + )	( - )
		No. (%)	No. (%)
R	103	21 (20.38)	82 (79,61)
S	20	2 (10)	18 (90)
TOTAL	123	23	100

R: Resistente; S: sensible

## 5. DISCUSIÓN

*Mannheimia haemolytica* está relacionada frecuentemente con procesos neumónicos en rumiantes, tanto domésticos como de vida silvestre.

Se han realizado estudios en distintos países observándose que el serotipo aislado con mayor frecuencia en bovinos con signos neumónica es el serotipo A1, con un rango que va del 37 al 100%<sup>12,13,14,15,16</sup>, diferenciándose estos porcentajes con los resultados obtenidos en la presente investigación, donde el dato obtenido fue 24.34%.

Otra diferencia con estos autores, es que se menciona una frecuencia de aislamientos de cepas de *M. haemolytica* no serotificables (7 al 40%)<sup>12,13</sup>, lo que representa un valor menor al encontrado en este tema de tesis (70%).

Hay que recordar que estas cepas fueron serotificadas en un estudio previo realizado en la FMVZ, UNAM en conjunto con el INIFAP, Palo Alto, a través de la técnica de hemoaglutinación indirecta. Las diferencias con los demás trabajos pudieron haber variado debido a las distintas zonas geográficas.

Se sabe que *M. haemolytica* cuenta con más serotipos que pueden ocasionar infección, como lo es el serotipo A6, el cual ha sido reportado en Japón<sup>48</sup>, como un serotipo que va incrementando su prevalencia. En tanto que en Estados Unidos de América se reportó una incidencia del 26%<sup>13,49</sup>. En otro estudio se aisló este mismo serotipo en bisontes que presentaron un proceso neumónico, el aislamiento de este serotipo representó una frecuencia del 75%<sup>50,13,49,50</sup>, lo cual contrasta con el presente trabajo, puesto que se estudió un 5.7% de esta serovariedad.

*M. haemolytica* también ha sido estudiada en muchas partes del mundo con respecto a la determinación de la resistencia a diferentes antimicrobianos por el método de difusión en agar (Kirby-Bauer), por ejemplo en México<sup>25</sup> y en Estados Unidos de América<sup>27,42</sup>, donde los autores mencionan una alta resistencia antimicrobiana a la estreptomicina que va del 70 al 90% de las cepas estudiadas, lo cual coincide con el presente trabajo donde se observó un 83.7% de cepas resistentes a este mismo antimicrobiano.

Se puede considerar que la resistencia a la estreptomicina tiene una distribución mundial, puesto que varios autores mencionan distintos tipos de resistencia a estreptomicina, como lo son los

diferentes algunos genes que están dentro plásmidos (pYFC1, pIGI, pMSHCSI en *M. haemolytica*, pPSRI en *Ps. siryngae*), tranposones (Tn5393) por ejemplo<sup>32,33, 35,51</sup>.

Otro de los quimioterapéuticos utilizados en el presente estudio que presentó una similitud con los trabajos citados fue la eritromicina puesto que estos autores mencionan una frecuencia de resistencia del 9% y del 16%<sup>25,27,42</sup>, en el presente trabajo se observó una frecuencia del 10.7%.

En el caso de la resistencia a la gentamicina, Fales *et al*<sup>42</sup> y Pijoan *et al*<sup>25</sup> comentan que el 2% y el 12.9 % de las cepas estudiadas respectivamente presentaron este fenómeno, lo cual difiere con el resultado obtenido en este trabajo, el cual fue del 21.13%, lo que representa un valor más alto que los anteriores mencionados.

En este trabajo se pudo determinar que la cepas de *M haemolytica* fueron susceptibles a los  $\beta$ -lactámicos (penicilina, ampicilina y ceftiofur) utilizados en la prueba de difusión en agar, observándose una susceptibilidad del 100% a estos antimicrobianos, lo cual contrasta con lo reportado por Fales *et al*<sup>42</sup>, Chang *et al*<sup>27</sup> y Pijoan *et al*<sup>25</sup>, ya que estos autores mencionan un rango de resistencia a estos antibióticos que va del 28.3 al 85.7%.

Gioia *et al*<sup>46</sup> ha reportado que *M haemolytica* cuenta con los genes (AMH\_2752) que promueven la activación de una Zn- $\beta$ -lactamasas para inhibir los efectos de este grupo antimicrobianos, lo que pudiera indicar que este factor de resistencia puede estar presente en el genoma de la bacteria, pero en este trabajo no se logró comprobar.

Hay que tomar en cuenta que cuando se realizan las técnicas *in vitro* las bacterias están “desnudas” contra los antibióticos, por lo que pueden entrar a la bacteria con mayor facilidad y así poder obtener su efecto bactericida; otra de las causas que pudieran explicar dichos resultados es que *M. haemolytica* produce la Zn-  $\beta$ -lactamasa, pero al exponer a la bacteria directamente al antibiótico, éste pudiera entrar en gran cantidad al interior de la bacteria y así sobrepasar la producción de Zn-  $\beta$ -lactamasa, lo que ocasionaría que esta enzima no lograra inhibir la reacción y así evitar su destrucción bacteriana.

Además se observó el 0.81% de cepas resistentes a la tetraciclina, diferenciándose con los estudios realizados por Fales *et al*<sup>42</sup> (21%), Chang *et al*<sup>27</sup> (25.1%) y Pijoan *et al*<sup>25</sup> (19.4%), Gioia *et al*<sup>46</sup> quienes mencionan la presencia de los genes *Teth-Tetr* que codifica un tipo de proteína de

resistencia a la tetraciclina. Esto puede explicarse dado a que las cepas ya tenían más de 150 pases en promedio, lo cual pudo evitar la expresión de estos genes, puesto que la bacteria no está en estrés continuo como en condiciones *in vivo*<sup>45,52</sup>.

Los rangos en las concentraciones mínima inhibitoria de los diferentes antimicrobianos utilizados contra las 7 cepas de *M. haemolytica* que resultaron multiresistentes en la prueba de difusión en agar, fueron muy altos (estreptomicina 8-256 µg/ml; gentamicina 8-128 µg/ml; eritromicina 4 - 128 µg/ml) lo cual contrasta con los estudios realizados por Esaki *et al*<sup>26</sup>, (0.25 a 2 µg/ml gentamicina), y Watts *et al*<sup>43</sup> (0.06 a 8 µg/ml eritromicina).

*M. haemolytica* cuenta con factores de resistencia para la tetraciclina, β-lactámicos y estreptomicina. Sin embargo, también se han reportado otros factores de resistencia a diferentes antimicrobianos en su genoma, como son los genes *AcrAB* y *AcrAR* los cuales promueven un sistema de expulsión a través de un tipo de encapsulamiento del antimicrobiano desde el interior de la célula bacteriana al exterior, este sistema es denominado “Bomba de eflujo” (Gioia *et al*<sup>46</sup>), además de contar también con transportadores de multiresistencia antimicrobiana (MarC). Otros métodos de resistencia son los genes que se encuentran en varios plásmidos y transposones; estos elementos genéticos pueden contener no solo uno sino varios cassettes que pudieran originar una multiresistencia a diferentes antimicrobianos<sup>30,32,33,51,52</sup>. Otro mecanismo que pudiera ayudar a que la bacteria no sea susceptible a los antibióticos es una mutación espontánea que en cualquier tipo de cambio estructural del ADN puede complicar el acoplamiento de la molécula dando como resultado la inhibición de la actividad antimicrobiana<sup>47</sup>.

Los trabajos o estudios que denotan resistencia a los antimicrobianos en *M. haemolytica* utilizaron cepas aisladas de animales que presentaron el proceso neumónico<sup>25,26,27,42</sup> en el presente estudio se utilizaron cepas aisladas de bovinos clínicamente sanos.

Derosa *et al*<sup>53</sup> realizó un estudio comparando cepas aisladas del tracto respiratorio alto contra cepas aisladas en pulmones neumónicos, en el que se encontró una similitud del 70 al 100% de la susceptibilidad y resistencia a diferentes antimicrobianos, lo cual puede estudiarse en la cuenca lechera de Tizayuca Hidalgo, utilizando cepas aisladas de pulmones neumónicos y diferenciar los perfiles de resistencia con las cepas aisladas de bovinos sanos.



En este trabajo el 18.70% del total de cepas estudiadas amplificaron el gene *strA*; de las cuales el 10% de las cepas fueron sensibles a estreptomicina en la técnica de difusión en agar; dicho fenómeno puede deberse a la falta de estímulo a la expresión del gene, otorgada por algunos factores de crecimiento *in vivo* (temperatura, Ph y la concentración de  $Fe^{++}$ ) los cuales aumentan la expresión de genes<sup>45</sup>.

El 79.9% de las cepas en estudio que resultaron resistentes a estreptomicina en la técnica de difusión en agar, no amplificaron el gen *strA*. Esto puede variar porque existen otros mecanismos de resistencia, como lo son en el caso de la estreptomicina los plásmidos pYFC1<sup>32</sup> (este plásmido codifica la dihidropterato sintetasa (29.8 kDa) y la estreptomicina quinasa las cuales inhiben la acción farmacéutica de la estreptomicina), y el plásmido pMSHCS1<sup>30</sup> que cuentan con los genes *strA*. Otra de las causas que pueden ocasionar la resistencia a estreptomicina es una mutación que codifica una proteína ribosomal S12 (*rpsL*), esto sucede en *Brucella melitensis*, Cloeckert *et al*<sup>47</sup>, entre otras, por ello puede deducirse que no solamente la presencia del gen va a codificar la resistencia a determinado antibiótico, si no quizás otros mecanismos de defensa antibacterial activen o disminuyan la expresión del gen *strA*.

La multiresistencia observada en el presente estudio es del 4.6% lo cual amplificó el gen similar al descrito por Kcherenber *et al*<sup>30</sup>, quien aisló el gen *strA* del plásmido pMSHCS1, que en comparación a este trabajo se aisló de ADN puro (crudo); esta puede ser una diferencia que puede tomarse en cuenta, y proponer un estudio en el que se purifique a dicho plásmido, y posteriormente identificar al gen por PCR y así demostrar si la presencia del gen se eleva o por el contrario verificar que exactamente no se amplificó el gen por que estaba ausente.

## 6. CONCLUSIONES

- Los antimicrobianos que pueden ser recomendados en el tratamiento en contra la pasteurelisis neumónica en la Cuenca lechera de Tizayuca Hidalgo son la penicilina, ampicilina, ceftiofur, trimetoprim con sulfametoxazol.
- y la tetraciclina puesto que de las 123 cepas solo una cepa fue resistente a este antimicrobiano.
- Recomendándose en menor grado el uso de la gentamicina y la eritromicina, puesto que mostraron un nivel de resistencia superior al diez por ciento (21.7% y 10.57% respectivamente)
- El antimicrobiano que no se recomendaría sería la estreptomina ya que esta mostró un porcentaje alto de resistencia (83.74%).
- La amplificación del gen *strA* no siempre será directamente proporcional a la resistencia hacia la estreptomina puesto que hubo cepas que presentaron el gen *strA* y fueron sensibles; y cepas resistentes que presentaron el gen *strA*
- Existe escasa información sobre este tema en México por lo que este trabajo sirve como base para trabajos posteriores para determinar la diferencia que existe entre la resistencia a los antimicrobianos en cepas aisladas de animales sanos y enfermos,
- Se lograron cumplir los objetivos específicos propuestos en este trabajo.

## 7. LITERATURA CITADA

1. Griffin D. Economic impact associated with respiratory disease in beef. *Vet Clin North Am Food Anim Pract.*1997; 13(3): 367-377.
2. Bowland SL and Shewen PE. Bovine respiratory disease: commercial vaccines currently available in Canada. *Can Vet J* 2000; 41(1): 33-48.
3. Griffin D, Perino LJ, Wittum TE. Feedlot respiratory disease: cost, value of preventives and intervention. In: *Proceedings of 27th Annual Convention of American Association of Bovine Practitioners Pittsburgh, PA, 1995. 22–25, 1994: 157–160.*
4. Pijoan, AP, Chavez DJA. Costos provocados por neumonías en becerras lecheras para reemplazo mantenidas bajo dos sistemas de alojamiento. *Vet. Mex* 2003; 34(4): 333-342
5. De León AM, Loyola RY. Análisis de la presentación de la pasteurelosis bovina, *Rev Prod Anim* 2000;14 (2): 57-60.
6. Trigo FJ. Patogénesis y aspectos inmunológicos de la pasteurelosis pulmonar bovina. Sección científica. *Vet Mex* 1991; XXII (2): 131-134.
7. Wernicki A, Urban-Chmiel R, Mikucki P, Puchalski A, Kankofer. The influence of transport stress on the humoral immunological response of calves induced by *Mannheimia haemolytica* leukotoxin. *Pol J Vet Sci* 2003; 6(1):41-5.
8. Quin PJ, Carter ME, Markey B, Carter GR. *Clinical veterinary microbiology*, 5<sup>th</sup> ed. edit. Mosby. Toronto Canadá. 255-258. 2003.
9. Biberstein DVM, Yuan CZ. *Tratado de Microbiología Veterinaria*. Edit: Acribia, 77-96, Zaragoza, España, 1995.
10. Smith GR. The characteristics of two types of *Pasteurella haemolytica* associated with different pathological conditions of sheep. *J Pathol Bacteriol* 1961. 81: 431-140

11. Angen O, Mutters R, Caugant DA, Olsen JE and Bisgaard Magne. Taxonomic relationships of the (*Pasteurella*) *haemolytica* complex as evaluated by DNA-DNA hybridizations and 16S rRNA sequencing with proposal of *Mannheimia haemolytica* gen. Nov., comb. Nov., *Mannheimia granulonatis* comb. Nov., *Mannheimia ruminalis* sp. Nov., *Mannheimia varigena* spp. Nov. Int J Syst Bacteriol 1999. 49 Pt 1: 67-86.
12. Angen O, Ahrens P, Bisgaard M. Phenotypic and genotypic characterization of *Mannheimia (Pasteurella) haemolytica*-like strains isolated from diseased animals in Denmark, Vet Microbiol 2002: 84(1-2): 103-14.
13. Al-Ghamdi GM, Ames TR, Baker JC, Walker R, Chase CC, Frank GH, Maheswaran SK. Serotyping of *Mannheimia (Pasteurella) haemolytica* isolates from the upper Midwest United States. J Vet Diagn Invest 2000: 12(6):576-8.
14. Blanco-Viera FJ, Trigo FJ, Jaramillo-Meza L, Aguilar-Romero F. Serotypes of *Pasteurella multocida* and *Pasteurella haemolytica* isolated from pneumonic lesions in cattle and sheep from Mexico. Rev Latinoam Microbiol. 1995: 37(2): 121-6.
15. Ball HJ, Connolly M, Cassidy J. *Pasteurella haemolytica* serotypes isolated in Northern Ireland during 1989-1991. Br Vet J 1993: 149(6):561-70.
16. Visser IJ, Zalsman C, Wouda W. *Pasteurella haemolytica* serotypes in cattle. Tijdschr Diergeneesk. 1992: 117(2):35-7.
17. Brogden KA, Lehmkuhl HD, Cutlip RC. *Pasteurella haemolytica* complicated respiratory infections in sheep and goats. Vet Res. 1998 29(3-4): 233-54.
18. Zecchinon TF, Desmecht D. How *Mannheimia haemolytica* defeats host defense through a kiss of death mechanism. Vet Res 2005: 36: 133- 156.
19. Highlander KS. Molecular genetic analysis of virulence in *Manheimia haemolytica*. Frontiers in Bioscience. 2001: 6: 128-1150.

20. Weekly LB, Veit HP. and Eyre P. Bovine pneumonic pasteurellosis. Part I. Pathophysiology. 1998: 20(1): 33-46.
21. Weekly LB, Veit HP and Eyre P. Bovine pneumonic pasteurellosis. Part II. Clinical presentation and treatment 1998: 20(2): 56-62.
22. Mosier DA, Panciera RJ, Rogers DP, Uhlich GA, Butine MD, Confer AW, Basaraba RJ. Comparison of serologic and protective responses induced by two *Pasteurella* vaccines. Can J Vet Res. 1998: 62(3): 178-82.
23. Schimmel D, Erler W, Feist H. Results of experimental immunization of calves with different *Pasteurella* antigens. Dtsch Tierarztl Wochenschr. 1992: 99(5): 204-6.
24. Speer N.C. Young and Roeber. The importance of prevention bovine respiratory disease: a beef industry review. Bovine Pract. 2001: 35(2): 189-196.
25. Pijoan AP, Aguilar RF. Resistencia y sensibilidad a antimicrobianos en cepas de *Pasteurella haemolytica*, *Pasteurella multocida* y *Haemophilus somnus* aisladas en becerras lecheras en establos de Tijuana. Vet Mex. 2000: 31(2): 153-156.
26. Esaki H, Asai T, Kojima A, Ishihara K, Morioka A, Tamura Y, Takahashi T. Antimicrobial susceptibility of *Mannheimia haemolytica* isolates from cattle in Japan from 2001 to 2002. J Vet Sci. 2005: 67:1:75-77.
27. Chang WH, M S and Carter GR. Multiple Drug resistance in *Pasteurella multocida* and *Pasteurella haemolytica* from cattle and swine. J Am Vet Med Assoc. 1976 169(7): 710-712.
28. Ruiz CJG, Hernández AI. Farmacología para Médicos Veterinarios Zootecnistas. 2<sup>a</sup> Edit UNAM. México. 223-295: 2005.

29. Murray, Patrick R., Baron EJ., Pfaller AM., Tenover CF., Tenover CF., Tenover CF., Yolken RH.: Mechanisms of resistance to antimicrobial agents, in Manual of clinical Microbiology. ASM PRESS. 7<sup>th</sup> ed. 1505-1519: 1999.
30. Kcherenberg C, Schwarz S. Occurrence and linkage of genes coding for resistance to sulfonamides, streptomycin and chloramphenicol in bacteria of the genera *Pasteurella* and *Mannheimia*. FEMS Microbiology Letters 2001: 105: 283-290.
31. Iañez E. Recombinación. Curso de microbiología general de Enrique Iañez [serial online] 1998.[cited 2006 Mar 8]; 1 (24): [12 screens]. Available from: URL: <http://fai.unne.edu.ar/biologia/microgeneral/micro-ianez/>
32. Fedorova ND, Highlander SK. Plasmids for heterologous expression in *Pasteurella haemolytica*. Gene. 1997; 28:186(2): 207-11.
33. Sundin GW. Distinct recent lineages of the *strA*- *strB* streptomycin-resistance genes in clinical and environmental bacteria. Curr Microbiol. 2002; 45(1): 63-9.
34. Sundin GW, and Bender CL. Expression of StrA-StrB streptomycin resistance genes in *Pseudomonas syringae* and *Xanthomonas campestris* and characterization of IS6100 in *X. campestris*. Appl Environ Microbiol. 1995; 61(8): 2981-2897.
35. Ronald M, Atlas, and Mosby.: Principles of Microbiology. 1995: 87-98, 364-366. E.U.
36. Díaz R, Gamazo C, López-Goñi. Determinación de la sensibilidad de una bacteria a agentes antimicrobianos: antibiograma, en Manual Práctico de Microbiología. Ed. Masson, Barcelona España. 136-140: 1999.
37. Lennette, EH. Dilution sensibility test: Agar and macro-broth dilution procedures, en Manual of clinical microbiology. American Society for Microbiology. Washington . 453-473. 1980
38. Bauer AW, Kirby MM, Sherris JC, Tenover CF. Antibiotic susceptibility testing by standardized single disk method. Am J Clin Pathol 1960; 45: 493-496.

39. National Committee for Clinical Laboratory Standards. Approved standard M2-A8. Performance standard for antimicrobial disk susceptibility tests, NCCLS, Wayne, Pa. 2003.
40. Díaz R, Gamazo C, López-Goñi. determinación de la concentración mínima inhibitoria y de la concentración mínima bactericida, en Manual Práctico de Microbiología. Ed. Masson, Barcelona España. 141-147: 1999.
41. Castilla SL, Cravioto J. Estadística simplificada para la investigación en ciencias de la salud. Edit. Trillas. 1991. México.
42. Fales WH, Selby LA, Webber JJ, Hoffman LJ, Smith DK. Antimicrobial resistance among *Pasteurella* spp recovered from Missouri and Iowa cattle with bovine respiratory disease complex. J AM Vet Med Assoc. 1982: 181(5)477-479.
43. Watts JL, Yancey RJ, Salmon SA. Case CH. 1994. A 4-year survey of antimicrobial susceptibility trends for isolates from cattle with Bovine Respiratory Disease in North America. J Clin Microbiol 1994; 32(3): 725-731.
44. Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis T. Molecular Cloning.: A laboratory manual. Second edition, USA. Cold Spring Laboratory Press. 1989.
45. Lo RYC, Sathiamoorthy S and Shewen PE. Analysis of in vivo expressed genes in *Mannheimia haemolytica* A1. FEMS Microbiol Lett, 2006: 265: 18-25.
46. Gioia J, Xiang Q, Jiang H, Clinkenbreard k, Lo RYC, Yamei L, Foxet GE. The genome sequence of *Mannheimia haemolytica* A1: Insights into virulence natural competence and *Pasteurellaceae* phylogeny. J Bacteriol. 2006: 188(20):7257-7266.
47. Cloeckaert A, Grayon M, and Grepinet O. Identification of *Brucella melitensis* vaccine strain Rev. 1 by PCR-RFLP based on a mutation in the rpsL gene. Vaccine. 2002. 20: 2546-2550.

48. Katsuda K, Kamiyama M, Kohmoto M, Kawashima K, Tsunemitsu H, Eguchi M. Serotyping of *Mannheimia haemolytica* isolates from bovine pneumonia. *Vet J.* 2007 1987-2006.
49. Rice JA, Carrasco-Medina L, Hodgins DC, Shewen PE. *Mannheimia haemolytica* and bovine respiratory disease. *Anim Health Res Rev.* 2007 ;8(2):117-28
50. Dyer NW, Ward ACS. Pneumonic pasteurellosis associated with *Pasteurella hemolytica* serotype A6 in American bison (*Bison bison*). *J Vet Diagn Invest* 1998; 10: 360–362
51. Chang YF, Ma DP, Bai HQ, Young R, Struck DK, Shin SJ, Lein DH. Characterization of plasmids with antimicrobial resistant genes in *Pasteurella haemolytica A1*. *DNA Seq.* 1992;3(2):89-97.
52. Kehrenberg C, Schwarz S. *dfrA20*, A novel trimethoprim resistance gene from *Pasteurella multocida*. *Antimicrob Agents Chemother.* 2005; 49(1):414-7.
53. Derosa DC, Mechor GD, Staats JJ, Chengappa MM and Shryock TR. Comparison of *Pasteurella spp.* Simultaneously Isolated from Nasal and Transtracheal Swabs from Cattle with Clinical Signs of Bovine Respiratory Disease. *J Clin Mmicrobiol.* 2000: 38(1): 327–332