



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA
DE MÉXICO**

**MAESTRÍA EN CIENCIAS DE LA PRODUCCIÓN
Y DE LA SALUD ANIMAL**

Identificación de los diferentes tipos de β -lactamasas
presentes en cepas de *Mannheimia haemolytica* A1, A6 y A11

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL GRADO DE:
MAESTRO EN CIENCIAS

PRESENTA:
Víctor Manuel Campuzano Ocampo

Tutor:
Dr. Carlos Julio Jaramillo Arango

Comité Tutoral:
Dr. Rigoberto Hernández Castro
Dr. Francisco Suárez Güemes



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 la **Universidad Nacional Autónoma de México**

A la **Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia**

A mis Padres

Por todo su amor y apoyo incondicional. Gracias a ustedes he conseguido una meta más en mi vida.

A Araceli Campuzano

Sé que siempre puedo compartir contigo mis ilusiones y triunfos. Un placer el poder ser tu hermano.

A Julia Alejandra Ríos

Gracias por toda tu paciencia y consejo en momentos de debilidad, por enseñarme que la felicidad existe, pero sobre todo por darme tanto amor.

AGRADECIMIENTOS

- A Joshua y Joselyn por darme momentos de alegría que me permitieron tener la paciencia para terminar.
- A Ulises, Lucy, Rosalía, Nidia, Karla, Adrián, Marian y José Antonio por brindarme su amistad y apoyo.
- A todos los miembros del Anexo de Medicina Preventiva
- A Carlos Julio y Rigoberto por no dejarme caer nunca y tomarse el tiempo para impulsarme a trabajar.
- A mi Comité Tutoral y miembros de mí jurado por sus consejos y aportaciones para la realización de este trabajo.
- Al Departamento de Medicina Preventiva y Salud Pública por permitirme trabajar en sus instalaciones.
- Al Laboratorio de Genómica Bacteriana de la Facultad de Medicina, en especial a la Dra. María del Rosario Morales Espinosa, a la M en C Gabriela Delgado Sapien, al Biol. José Luis Méndez Sánchez y la Biol. Delia Licona Moreno por su apoyo en la realización de las pruebas de MIC y por su amistad.
- Al CONACYT por la beca otorgada durante mis estudios de posgrado.
- A los proyectos PAPIIT IN 208708 y CONACYT CB-104031 por el apoyo brindado para la realización de esta tesis

INDICE

1 RESUMEN.....	1
1.1 Abstract	2
2 INTRODUCCIÓN.....	3
2.1 Pasteurellosis pulmonar bovina.....	4
2.2 Factores inductores de estrés	4
2.3 Factores anatomofisiológicos	5
2.4 Patógenos virales.....	5
2.5 Patógenos bacterianos	6
2.6 <i>Mannheimia haemolytica</i>	6
2.6.1 Taxonomía	6
2.6.2 Características morfológicas.....	8
2.6.3 Mecanismos de patogenicidad.....	7
2.6.4 Lesiones macroscópicas y microscópicas	9
2.6.5 Diagnóstico y tratamiento	10
2.7 Resistencia a quimioterapéuticos	11
2.7.1 Mecanismos de resistencia a quimioterapéuticos	13
2.8 β -lactamasas	14
2.8.1 β -lactamasas de espectro extendido (BLEE).....	15
3 JUSTIFICACIÓN.....	18
4 HIPÓTESIS	19
5 OBJETIVO GENERAL	19
5.1. OBJETIVOS ESPECIFICOS.....	19
6 MATERIAL Y MÉTODOS	20
6.1 Origen y características de las cepas bacterianas	20
6.2 Determinación de la Concentración Mínima Inhibitoria (MIC).....	20
6.3. Extracción de ADN total	23
6.4. Extracción de ADN plasmídico.....	24
6.5 Reacción en cadena de la polimerasa (PCR).....	25
6.6 Análisis estadístico.....	26

7 RESULTADOS.....	27
7.1 Determinación de la concentración mínima inhibitoria	27
7.2 Extracción de ADN total	29
7.3 Extracción de ADN plasmídico.....	30
7.4 Identificación de los genes <i>bla_{SHV}</i> , <i>bla_{TEM}</i> y <i>bla_{CTX-M}</i>	30
8 DISCUSIÓN	33
9 CONCLUSIONES	40
10 ABREVIATURAS Y SIGLAS USADAS.....	41
11 REFERENCIAS.....	42

ÍNDICE DE CUADROS Y FIGURAS

Cuadro 1. Principales patógenos bacterianos de PPB y sus factores de virulencia.....	7
Cuadro 2. Clasificación de β -lactamasas de Bush, Jacoby y Medeiros.....	16
Cuadro 3. Origen y características de las cepas de <i>M. haemolytica</i>	20
Cuadro 4. Listado de quimioterapéuticos, potencia y peso utilizados en la prueba de MIC	21
Cuadro 5. Lista de quimioterapéuticos y sus respectivos disolventes y diluyentes.....	22
Cuadro 6. Iniciadores utilizados en la prueba de PCR.....	25
Cuadro 7. Condiciones para la prueba de PCR	26
Cuadro 8. Puntos de corte de los quimioterapéuticos utilizados en la MIC.....	27
Cuadro 9. Número de aislamientos que presentaron inhibición de crecimiento a diferentes concentraciones de quimioterapéuticos.....	28
Figura 1. Frecuencia de aislamientos de <i>M. haemolytica</i> según resistencia o susceptibilidad a diferentes quimioterapéuticos.....	29
Figura 2. Gel de agarosa al 1% teñido con bromuro de etidio, carriles 1 a 11, extracción de ADN de cepas de <i>M. haemolytica</i> en el que se observan perfiles sugerentes a plásmidos.....	29
Figura 3. Gel de agarosa al 2% teñido con bromuro de etidio. Carriles 1-5 y 8,9 plásmidos de cepas de <i>M. haemolytica</i> , carriles 6, 7, 10 cepas de <i>M. haemolytica</i> negativas a la extracción de plásmidos.....	30
Figura 4. Producto de amplificación de PCR a partir de ADN plasmídico de aislamientos de <i>M. haemolytica</i> en el que se observa la amplificación del gen <i>bla_{SHV}</i>	30
Figura 5. Producto de amplificación de PCR a partir de ADN plasmídico de aislamientos de <i>M. haemolytica</i> en el que se observa la amplificación del gen <i>bla_{TEM}</i>	31
Figura 6. Frecuencia de cepas de <i>M. haemolytica</i> en las que se identificaron los genes <i>bla_{SHV}</i> y <i>bla_{TEM}</i>	31
Figura 7. Frecuencia de cepas de <i>M. haemolytica</i> en las que se identificaron los genes <i>bla_{TEM}</i> y <i>bla_{SHV}</i> de acuerdo con el origen de las cepas.....	32

1 RESUMEN

La pasteurelosis pulmonar es una enfermedad multifactorial donde interaccionan factores que provocan estrés en el animal, la susceptibilidad individual, patógenos respiratorios virales y bacterianos de los cuales *M. haemolytica* y *P. multocida* son los principales patógenos responsables de este padecimiento. Actualmente se sabe que muchos de los genes de resistencia que se encuentran presentes en cepas de *Pasteurella* y *Mannheimia* están asociados con elementos genéticos móviles. Se ha demostrado la presencia en cepas de *M. haemolytica* de un plásmido que codifica β -lactamasas. Por lo que se buscó identificar los genes que codifican para β -lactamasas tipo TEM, SHV y CTX-M en cepas de *M. haemolytica*. Después de definir los puntos de corte se encontró que para la penicilina, el 80.31% (102/127) de los aislamientos fue susceptible, el 18.89% (24/127) intermedio y el 0.78% resistente. Para la tetraciclina el 81.10% (103/127) susceptible, el 15.74% (20/12) intermedio y 3.14% (4/127) resistente. Para la estreptomycinina el 70.86% (90/127) susceptible, el 25.98% (33/127) intermedio y 3.14% (4/127) resistente. Para la eritromicina el 80.31% (102/127) susceptible y el 19.68% (25/127) intermedio; para la neomicina el 99.21% (126/127) susceptible y el 0.78% (1/127) intermedio. Para la ampicilina, gentamicina, amoxicilina, tetraciclina, enrofloxacinina, cloranfenicol y sulfametoxazol el 100% (127/127) de los aislamientos fue susceptible. Considerando el total de cepas estudiadas (n= 127) en el 75.59% (96/127) se detectó el gen *bla*_{SHV} y en el 66.14% (84/127) el gen *bla*_{TEM}. Considerando el origen de las cepas, para el CAIT el 54.68% (35/64) presentó el gen *bla*_{SHV} y el 62.5% (40/64) el gen *bla*_{TEM}, para la CLALA el 77.77% (49/63) presentó el gen *bla*_{SHV} y el 88.88% (56/63) el gen *bla*_{TEM}. Este trabajo representa el primer resultado molecular en la identificación de los genes *bla*_{TEM} y *bla*_{SHV}, en cepas de *M. haemolytica* en bovinos productores de leche a nivel nacional.

Palabras clave: *Mannheimia haemolytica*, quimioterapéuticos, resistencia, β -lactamasas, TEM, SHV y CTX-M

1.1 Abstract

Pneumonic pastereulosis is a multifactorial disease where factorial interaction causes animal stress, individual susceptibility, and viral and bacterial respiratory pathogens, of which *M. haemolytica* and *P. multocida* are mainly responsible. Currently, it is known that many of the resistance genes that are found present in *Pasteurella* and *Mannheimia* strains are associated with motile genetic elements. The presence of a plasmid that encodes β -lactamase in *M. haemolytica* strains has been demonstrated; therefore, the aim was to identify the genes that encode β -lactamase type TEM, SHV and CTX-M in *M. haemolytica* strains. After defining the cut-off points, it was found that for penicillin, 80.31% (102/127) of the isolates was susceptible, 18.89% (24/127) intermediate and 0.78% resistant. For tetracycline, 81.10% (103/127) was susceptible; 15.74% (20/127) intermediate and 3.14% (4/127) resistant. For streptomycin, 70.86% (90/127) was susceptible, 25.98% (33/127) intermediate and 3.14% (4/127) resistant. For erythromycin, 80.31% (102/127) was susceptible and 19.68% (25/127) intermediate. For neomycin, 99.21% (126/127) was susceptible and 0.78% (1/127) intermediate. Regarding ampicillin, gentamicin, amoxicillin, tetracycline, enrofloxacin, chloramphenicol and sulfamethoxazole, 100% (127/127) of the isolates were susceptible. Considering the total of strains studied (n = 127), gene *bla*_{SHV} was detected in 75.59% (96/127) and gene *bla*_{TEM} in 66.14% (84/127). Taking into account the origin of the strains, for CAIT, 54.68% (35/64) showed gene *bla*_{SHV} and 62.5% (40/64) gene *bla*_{TEM}. For CLALA, 77.77% (49/63) showed gene *bla*_{SHV} and 88.88% (56/63) gene *bla*_{TEM}. This work represents the first molecular result in the identification of genes *bla*_{TEM} and *bla*_{SHV}, in *M. haemolytica* strains in dairy cattle at national level.

Key words: *Mannheimia haemolytica*, chemotherapeutics, resistance, β -lactamases, TEM, SHV y CTX-M

2 INTRODUCCIÓN

A pesar de los avances de la medicina veterinaria que involucran mejoras en las prácticas de bienestar animal, la disponibilidad de vacunas contra diversos patógenos, la aparición de nuevos antimicrobianos y de un mayor conocimiento de la patogénesis, las enfermedades respiratorias de los bovinos siguen siendo una de las principales causas de morbilidad y mortalidad, así como de pérdidas económicas en la industria ganadera en todo el mundo. En particular los patógenos respiratorios pueden causar serios brotes de neumonías agudas, en becerros neonatos, destetados y en crecimiento; en animales adultos las infecciones crónicas conllevan a debilidad, disminución en el rendimiento y sacrificio (Panciera *et al.*, 2010; Gorden *et al.*, 2010).

El impacto económico que representan los problemas respiratorios en el ganado bovino es de suma importancia, ya que afecta directamente el proceso productivo de manera importante en la economía de los productores y del país. En los Estados Unidos de América la National Animal Health Monitoring System (NAHMS), en el año 2004 ha estimado las pérdidas anuales asociadas a los problemas respiratorios en aproximadamente un billón de dólares (aproximadamente 13 billones de pesos). Estas pérdidas se deben principalmente a la mortandad, costos por tratamientos médicos, ajustes en el manejo, servicios veterinarios, decomisos en rastro, menor producción de carne y leche, resultando en un aumento en los costos totales de producción (Griffin, 1997; Zecchinon, 2005).

En México, la información sobre el impacto económico que este problema genera es escaso, Pijoan *et al.*, 1999; en un estudio realizado en Tijuana, Baja California, calcularon que los costos directos por este problema en bovinos productores de leche van desde los \$83.25 a \$501.41 pesos por becerro de reemplazo, y los costos indirectos oscilan de los \$235.12 a \$301.07 pesos.

Se calcula que aproximadamente el 25% de los becerros experimentan al menos un episodio de enfermedad respiratoria en el primer año de vida, siendo mayor la incidencia en machos que en hembras en las etapas de destete y engorda, estas neumonías representan

alrededor del 75% de los casos clínicos de una producción. Los porcentajes de morbilidad y mortalidad son variables aunque oscilan alrededor de 15 a 45% y de 45 a 55% respectivamente. Estos datos fluctúan de acuerdo al país de procedencia, tipo de producción, edad de los animales y época del año en que se realiza el estudio (Zecchinon, 2005).

2.1 Pasteurelisis pulmonar bovina

De los problemas respiratorios frecuentemente son aislados microorganismos de la familia *Pasteurellaceae* motivo por el cual esta enfermedad se ha denominado pasteurelisis pulmonar bovina, también llamada mannheimiosis, que se caracteriza por una pleuroneumonía fibrinosa severa, que representa una de las tres principales causas de desecho de bovinos y la principal causa de pérdidas en la industria lechera en todo el mundo. La pasteurelisis pulmonar resulta de un complejo multifactorial donde interaccionan factores que provocan estrés en el ganado, la susceptibilidad individual, patógenos respiratorios virales y bacterianos (Trigo, 1991; Griffin *et al.*, 2010).

2.2 Factores inductores de estrés

La demanda de abasto de productos y subproductos de origen animal y en particular los provenientes del ganado bovino favorecen condiciones de estrés en los animales. La mayoría de los terneros son destetados y enviados a lotes de engorda, donde son mezclados con bovinos con diferente condición de salud. Los terneros transportados por largas distancias son expuestos a factores de estrés adicionales como los gases producidos por el escape de los vehículos, condiciones atmosféricas cambiantes, deshidratación, hambre y agotamiento. Una vez en el corral de engorda los terneros son expuestos al manejo, nuevamente a la mezcla de animales, ambientes con polvo e introducción de nuevos alimentos. La transportación y los factores productores de estrés provocan una elevación transitoria de los niveles de cortisol en plasma y un decremento de la actividad del complemento, lo que incrementa la susceptibilidad a problemas respiratorios (Griffin *et al.*, 2010).

2.3 Factores anatomofisiológicos

Los bovinos, comparados con otras especies, son más susceptibles de padecer enfermedades respiratorias, debido a factores anatomofisiológicos. Tienen una pleura gruesa y poco distensible, por lo tanto requieren de un mayor esfuerzo para captar aire, pulmones pequeños en relación al peso corporal, un ángulo traqueo-bronquial casi recto que ocasiona que las secreciones se acumulen en este lugar ocasionando una obstrucción y dificultad tanto para respirar como para expectorar. Menor número de macrófagos alveolares en relación a otras especies lo que representa una menor capacidad de defensa contra patógenos respiratorios, menor presión del intercambio gaseoso; estas características favorecen la incidencia de problemas respiratorios y representan una gran dificultad para corregirlos (Gorden, *et al.*, 2010).

2.4 Patógenos virales

La neumonía bacteriana es precedida por una infección respiratoria viral, generalmente por los virus de la diarrea viral bovina (VDVB), herpesvirus bovino 1 (HVB-1), virus de la parainfluenza 3 (PI-3) y el virus respiratorio sincicial bovino (VRSB). De los virus antes mencionados el VDVB es el más frecuentemente asociado a la pasteurelisis neumónica bovina. HVB-1, PI-3, VRSB y VDVB pueden causar problemas respiratorios agudos. HVB-1 es reconocido como causante de severas lesiones del tracto respiratorio alto, que van desde membranas hemorrágicas hasta diftéricas. Con la excepción de ciertas formas de BRSV, no se reportan casos fatales asociados a estas infecciones, en cambio su papel es propiciar un ambiente favorable para la colonización y multiplicación de bacterias patógenas resultando en una neumonía. Esto se da a través de dos mecanismos principalmente. El primero es por daño en la superficie mucosa, de tal manera que la adhesión bacteriana a células es mejor en áreas de erosión inducida por virus, que en la mucosa intacta. La segunda es una modificación de la respuesta inmune innata y adaptativa, que resulta de la alteración en la función de los macrófagos alveolares, supresión en la proliferación de linfocitos e inducción de la apoptosis, y finalmente la modificación de la

liberación de citocinas y mediadores de la inflamación (Panciera *et al.*, 2010 y Ridpath, 2010).

2.5 Patógenos bacterianos

Se identifican a *Mannheimia haemolytica* (anteriormente *Pasteurella haemolytica*) y *Pasteurella multocida* como los dos principales patógenos bacterianos responsables de la pasteurelisis pulmonar bovina. Sin embargo *Histophilus somni* (anteriormente *Haemophilus somnus*), *Arcanobacterium pyogenes*, *Mycoplasma bovis* y más recientemente, *Bibersteinia trehalosi* (anteriormente *Pasteurella trehalosi*) han sido también reportados como agentes asociados con casos en los procesos neumónicos de los bovinos. Estas bacterias ubicuas en el ganado bovino, son comensales habituales de la nasofaringe, sin embargo, después de condiciones de estrés o infecciones virales pueden proliferar y ser inhaladas a los pulmones. Cada una tiene sus propios mecanismos de virulencia incluyendo la formación de biopelícula, cápsula, adhesinas, toxinas, y enzimas que mejoran la habilidad para colonizar las vías respiratorias bajas, además evaden el sistema inmune, causan destrucción de tejidos y propician una intensa respuesta inflamatoria (Cuadro 1). En el pulmón, la respuesta del hospedador a la bacteria varía dependiendo del organismo y de su grado de patogenicidad. *M. haemolytica* es considerado el más virulento de los agentes bacterianos y es el más asociado con la morbilidad que ocurre después del arribo de los bovinos a la engorda. (Boyce *et al.*, 2004; Rice *et al.* 2007; Panciera *et al.*, 2010)

2.6 *Mannheimia haemolytica*

2.6.1 Taxonomía

Este organismo es un miembro de la familia *Pasteurellaceae*, género *Mannheimia* anteriormente clasificada como *P. haemolytica*, que históricamente se ha dividido en 2 biotipos A y T, de acuerdo con la capacidad de fermentar arabinosa o trealosa. Mediante estudios de hibridación y secuenciación de la subunidad 16S ribosomal, todos los biotipos A fueron nombradas como *M. haemolytica* y los biotipos T inicialmente se designaron

como *Pasteurella trehalosi*, actualmente reconocida como *Bibersteinia trehalosi*. Así en la actualidad el género *M. haemolytica* comprende los serotipos A1, A2, A5, A6, A7, A8, A9, A12, A13, A14, A16 y A17 (Biberstein *et al.*, 1960; Carter *et al.*, 1967; McNeil *et al.*, 2003).

Los estudios realizados en México muestran la importancia de los serotipos A1 y A2 en bovinos y los serotipos A1, A2, A5 y A9 en corderos. En trabajos realizados con cepas obtenidas de bovinos en dos complejos lecheros uno en la región norte central de México y el otro en el valle central de México, se obtuvo que el principal serotipo identificado fue el serotipo A1 (48%) seguido del A6 (2.4%) y un alto porcentaje de cepas no tipificables (49.3 %) (Trigo 1987; Morales *et al.*, 1993; Jaramillo, 2007).

Cuadro 1

Principales patógenos bacterianos de PPB* y sus factores de virulencia

<i>Bacteria</i>	<i>Capsula</i>	<i>Endotoxina</i>	<i>Exotoxina</i>	<i>Proteínas adhesinas</i>	<i>Enzimas secretadas</i>	<i>Otros factores</i>
<i>Mannheimia haemolytica</i>	si	LPS	LKT	OmpA Lipoproteína-1 N-acetil -d-glucosamina Proteínas de unión al fibrinógeno	Neuroaminidasa Sialoglycoproteasa	Biopelícula
<i>Pasteurella multocida</i>	Si	LPS	Rara vez	OpmA Fimbria tipo IV FHA	Neuroaminidasa	Biopelícula
<i>Histophilus somni</i>	No	LOS	No	No	No	Biopelícula IgBPs Histamina
<i>Mycoplasma bovis</i>	No	No	Toxina polisacarida	VSPs	No	Biopelícula Peróxido de hidrógeno
<i>A .pyogenes</i>	No	No	Pilosina	Proteínas de unión al colágeno	Proteasas DNAsas	Biopelícula
<i>Bibersteinia trehalosi</i>	Si	Si	LKT	2 OmpA Proteínas de unión al fibrinógeno	Proteasa Superóxido dismutasa	

Traducido de Panciera RJ, Confer AW 2010

*PPB Pasteurelosis pulmonar bovina

2.6.2 Características morfológicas

M. haemolytica es un residente normal del tracto respiratorio alto de los rumiantes domésticos y silvestres. Es un organismo comensal que habita la nasofaringe y mantiene una relación simbiótica con el hospedero. Es una bacteria Gram-negativa, inmóvil, que no forma esporas, fermenta la glucosa y otros carbohidratos produciendo ácido pero no gas, oxidasa positiva, indol negativa, aerobia y anaerobia facultativa, con forma cocobacilar de 1 a 3 μm de diámetro, encapsulada, es negativa a la pruebas de rojo de metilo, gelatinasa, Voges-Proskauer. Crece en agar MaC Conkey, en medios enriquecidos como agar chocolate y agar sangre produciendo β -hemólisis y formando colonias de color blanco grisáceo (Boyce *et al.*, 2004; Rice *et al.*, 2007; Ewers, 2004).

2.6.3 Mecanismos de patogenicidad

Los mecanismos con los que cuenta *M. haemolytica* para establecerse y diseminarse durante la infección incluyen la presencia de una leucotoxina (Lkt), lipopolisacárido (LPS), proteínas de membrana externa (PME), proteínas reguladoras de hierro (PRH), enzimas (neuraminidasa, proteasas, metaloglicoproteasas), adhesinas, cápsula, fimbria y lipoproteínas (Highlander, 2001; Jaramillo *et al.*, 1999).

Los dos factores de virulencia preponderantes en la patogénesis de la PPB y las lesiones características de la enfermedad son la Lkt y LPS. La adhesina, cápsula, fimbria, sialoglicoproteasa y neuraminidasa, juegan un papel importante en la unión y colonización de *M. haemolytica* a las células del tracto respiratorio de los becerros. (Burrows *et al.*, 1993; Jaramillo *et al.* 1999; Lo *et al.* 2001; Davies *et al.* 2003)

La Lkt de *M. haemolytica* es una exotoxina ampliamente difundida entre las familia de la citolisinas bacterianas RTX, a diferencia de muchas citolisinas de este grupo, la Lkt exhibe un estrecho rango de células blanco, los efectos biológicos son restringidos a leucocitos y trombocitos bovinos. Altas concentraciones de Lkt inducen citólisis en neutrófilos y macrófagos, como consecuencia del daño a la membrana debido a la formación de poros de 0.9 a 3 nm de diámetro que atraviesan la membrana ocasionando un rápido ingreso de

potasio y agua e hinchamiento de la célula. Estos poros hacen que la membrana celular sea permeable a iones, lo que origina la lisis celular previniendo efectivamente la fagocitosis al destruir a este tipo de células. A bajas concentraciones la Lkt es un potente activador de macrófagos alveolares y estimula la secreción del factor de necrosis tumoral alfa (TNF α), interleucina 1 beta (IL1 β) y oxígeno derivado de radicales libres. La Lkt activa neutrófilos, los que inducen la secreción de ácido araquidónico y metabolitos como el leucotrieno B₄. La Lkt a bajas concentraciones induce apoptosis en los leucocitos (Narayanan S *et al.*, 2002; Lafleur RL *et al.*, 2001).

El LPS es una típica endotoxina de bacterias Gram-negativas, contribuye a la patología de la PPB a través de una variedad de mecanismos incluyendo la activación del complemento y la cascada de la coagulación, reclutamiento de neutrófilos y efectos tóxicos directos sobre el endotelio pulmonar. El LPS estimula la síntesis y liberación de una diversidad de mediadores inflamatorios, mediadores de leucocitos bovinos incluyendo TNF α , interleucina 8, óxido nítrico, histamina, leucotrieno B₄, y prostaglandina E₂. Estos mediadores contribuyen a la inflamación pulmonar severa que es característica de la pasteurelosis pulmonar. (Lafleur *et al.*, 2001; Poulsen *et al.*, 1990)

2.6.4 Lesiones macroscópicas y microscópicas

La lesión característica que produce *M. haemolytica*, es una pleuroneumonía antero ventral con exudado fibrinoso e infiltración de neutrófilos y macrófagos, trombosis capilar y focos necróticos que son rodeados por bacterias. En contraste, *P. multocida* es generalmente menos virulenta que *M. haemolytica* y son necesarios muchos organismos para iniciar una infección primaria.

La rápida diseminación de *M. haemolytica* es debida a los efectos del LPS en la integridad vascular, al severo efecto citolítico de la Lkt en los leucocitos y a la destrucción de los tejidos por la liberación de enzimas, radicales oxígeno y mediadores de la inflamación durante este proceso. La patología macroscópica incluye una extensa deposición de fibrina en los pulmones y en la superficie de las pleuras. La neumonía fibrinosa es bilateral, de

distribución anteroventral, con una consolidación roja y consistencia firme. El septo interlobulillar se encuentra con edema y fibrina coagulada. Los lóbulos consolidados tienen una apariencia jaspeada, focos grandes de necrosis de color rosa. Histológicamente se muestra una pleuroneumonía fibrinosa, los bronquios y bronquiolos se encuentran inflamados, con exudado rico en células polimorfonucleares. Los vasos sanguíneos y linfáticos pueden mostrar inflamación y trombosis (Panciera *et al.*, 2010).

2.6.5 Diagnóstico y tratamiento

El diagnóstico se integra en base a los datos de la historia clínica referente al manejo, cambios de clima, transporte de animales o cualquier acción estresante para el animal, anamnesis, signos clínicos, hallazgos de la necropsia, aislamiento bacteriano e histopatología. La mejora de las prácticas de manejo para hacer frente a los factores inductores de estrés y animales susceptibles puede disminuir la incidencia y severidad de los casos de enfermedad respiratoria. Una práctica común en el tratamiento de este problema es la metafilaxis la cual se define como el tratamiento masivo de poblaciones animales antes de la aparición evidente de la enfermedad. La metafilaxis puede ser considerada como un tratamiento preventivo y curativo de los signos de pasteurelosis pulmonar bovina antes del arribo de los animales al centro de producción (Edwards 2010).

Esta práctica de manejo está basada en el concepto del tratamiento a todo el ganado en una sola ocasión y con la finalidad de disminuir la carga de patógenos en los casos clínicos y subclínicos. El tratamiento de las poblaciones es a menudo preferible a la selección individual para terapia debido a los desafíos de diagnóstico de identificación de la PPB. Los antimicrobianos más utilizados para el control de los procesos respiratorios en el ganado bovino incluyen a la penicilina, gentamicina, amoxicilina, tetraciclina, estreptomycin, eritromicina, ampicilina, enrofloxacin, cloranfenicol, neomicina, aztreonam y sulfametoxazol (Apley , 1997; Cooper *et al.*, 2010; Nickell *et al.*, 2010).

2.7 Resistencia a quimioterapéuticos

Se ha demostrado la presencia de plásmidos de resistencia a quimioterapéuticos en la familia *Pasteurellaceae*, ésta no es una característica entre todas las especies, sin embargo algunas poseen un pequeño plásmido de aproximadamente 4.2 kb que es responsable de la resistencia a estreptomicina y sulfonamidas. En trabajos con cepas de *M. haemolytica* A1 se logró el aislamiento de un plásmido que codifica para β -lactamasas. Algunas cepas presentan resistencia a quimioterapéuticos que no se encuentra asociada a la presencia de plásmidos si no que se encuentra relacionada con la leucotoxina u otros factores de virulencia. (Livrelli *et al.*, 1991)

La resistencia a β -lactámicos en cepas de *M. haemolytica* frecuentemente se encuentra determinada por un plásmido de 4.2 a 5.2 kb. También se han secuenciado genes *bla*_{ROB1} a partir de cepas de *M. haemolytica*; las β -lactamasas ROB1 forman parte de la clase A de la clasificación de Ambler que son altamente sensibles a inhibidores de las β -lactamasas y son los mediadores de la resistencia a penicilinas y cefalosporinas de primera generación. Las enzimas ROB1 exhiben una alta similitud a las β -lactamasas de bacterias Gram-positivas y parecen formar un vínculo entre las β -lactamasas de Gram-negativas y Gram-positivas. También se ha identificado un plásmido de menos de 10 kb asociado con la resistencia a aminoglicósidos así como uno de 113 kb de resistencia a estreptomicina, kanamicina, tetraciclinas y sulfonamidas; de igual manera, el gen de resistencia a estreptomicina (*strA*) se ha encontrado tanto en plásmidos como en el cromosoma de *M. haemolytica* (Kehrenberg *et al.*, 2001).

Actualmente se sabe que muchos de los genes de resistencia que se encuentran presentes en cepas de *Pasteurella* y *Mannheimia* están asociados con elementos genéticos móviles, ya que sólo pocos de los genes de resistencia parecen ser propios de estas bacterias. Los aislados de estos dos géneros pueden adquirir genes de resistencia de otras bacterias por transmisión horizontal (Kehrenberg *et al.*, 2001).

El control de las infecciones producidas por *Mannheimia*, es complicado por dos razones: 1) en muchas de las infecciones respiratorias *Mannheimia* no es el único agente causal, y a pesar de que se puede controlar fácilmente no se logra eliminar esta enfermedad, 2) las bacterias del género *Mannheimia* muestran un incremento en la resistencia a un gran número de agentes antimicrobianos disponibles para el uso en las especies animales (Caprioli *et al.*, 2000).

Los quimioterapéuticos son empleados intensamente en la industria ganadera en los intentos por prevenir y tratar las enfermedades respiratorias. Estos raramente son seleccionados con base a la sensibilidad *in vitro* de los aislados bacterianos provenientes de aislamientos de hisopos nasales y faríngeos. Comúnmente una sucesión de fármacos antimicrobianos han sido eficaces contra problemas neumónicos bajo condiciones de campo incluyendo a la penicilina, oxitetraciclina, trimetoprim/sulfadoxina, ampicilina, tilmicosin y florfenicol. Aunque todos estos antimicrobianos han sido exitosos en el tratamiento de las enfermedades respiratorias, muchos aislados de *M. haemolytica* son ahora resistentes a la penicilina, ampicilina, tetraciclina, sulfonamidas y tilmicosina (Rice *et al.*, 2007)

Trabajos realizados en nuestro país con cepas provenientes de animales sanos y clínicamente enfermos de neumonía mostraron que en los animales sanos, el antimicrobiano que presentó mayor resistencia fue la estreptomina (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 al trimetoprim con sulfametoxazol. Mientras que para los animales enfermos las frecuencias más altas en la resistencia a antimicrobianos se presentaron en la estreptomina (80%), y en la gentamicina (30%), todas las cepas fueron susceptibles a la ampicilina y a la tetraciclina. La penicilina y la oxitetraciclina han sido usadas a dosis más altas que las recomendadas por los fabricantes para mejorar la eficacia, sin tener que recurrir a antibióticos más costosos, propiciando mantener elevadas concentraciones en carne y leche (Samaniego BML, 2007; Contreras, 2008; Apley, 1997).

Las pruebas de susceptibilidad son los métodos más comúnmente utilizados para medir la actividad de un agente antimicrobiano frente a un patógeno. El método de la concentración mínima inhibitoria (MIC), es el más ampliamente utilizado para determinar *in vitro* la actividad de un agente antimicrobiano. La dilución en agar o microdilución son los métodos más utilizados para la determinación de la MIC. La actividad *in vitro* de cada agente antimicrobiano es indicada por la MIC y los valores están dictados por la habilidad del agente de penetrar en la célula bacteriana y de su capacidad de interactuar con el sitio de acción de dicho agente (mecanismo de acción). Estos valores no pueden ser tomados por sí solos como un indicador de la eficacia de un componente ya que existen otros factores que se deben de considerar, como los parámetros farmacocinéticos y farmacodinámicos, así como la eficacia clínica. La actividad *in vitro* asociada a parámetros farmacocinéticos y farmacodinámicos y dosis apropiadas aprobadas recientemente, han demostrado ser efectivas en los estudios clínicos de la PPB (Watts *et al.*, 2010).

El uso imprudente de antimicrobianos genera una alta probabilidad de resistencia bacteriana y de diseminación de genes de resistencia localizados en plásmidos y transposones, y consecuentemente, reducen la eficacia de los agentes antimicrobianos de reciente incorporación en el tratamiento de las enfermedades de los animales (Kehrenberg *et al.*, 2001).

2.7.1 Mecanismos de resistencia a quimioterapéuticos

En general son tres los mecanismos con los que cuentan las bacterias para resistir la acción de los agentes antimicrobianos: el primero es una modificación del agente antimicrobiano inactivándolo: ejemplo de este mecanismo de resistencia es la hidrólisis de las penicilinas a ácido peniciloico y la inactivación del cloranfenicol a acetil cloramfenicol. En estos casos las enzimas convierten al agente antimicrobiano en un compuesto inactivo. El segundo mecanismo de resistencia es la alteración del sitio blanco de unión con el antimicrobiano. El tercer mecanismo de resistencia implica una reducción en la acumulación del antimicrobiano. Este puede consistir un eflujo activo del fármaco fuera de la célula

bacteriana o alteraciones en la porinas de las proteínas de membrana externa que disminuyen la entrada del mismo a la bacteria (Smith *et al.*, 1993).

Para comprender mejor la resistencia bacteriana, se debe conocer la naturaleza de los antimicrobianos y sus mecanismos de acción. Los antibióticos son sustancias químicas producidas por varias especies de microorganismos (bacterias y hongos) que suprimen el crecimiento de otros microorganismos y originan su destrucción. Los betalactámicos son uno de los grupos de antibióticos más usados en la práctica médica, poseen una gran eficacia terapéutica y no son tóxicos para los animales ya que actúan bloqueando las enzimas biosintéticas del peptidoglicano que sólo se encuentra en las bacterias (procariotas) y no tiene homólogo en las células animales (eucariotas), ambas características hacen de estos antibióticos, uno de los mejores grupos terapéuticos. La estructura básica de estos compuestos es el anillo β -lactámico, esencial para su actividad antibacteriana. Entre los betalactámicos se encuentran: 1) las penicilinas (penicilina, amoxicilina, ticarcilina y piperacilina), 2) las cefalosporinas (1^{ra} generación: cefalotina, cefazolina, cefalexina, cefradina; 2^{da} generación: cefaclor, cefamandol, cefuroxina; 3^{ra} generación: cefpodoxima, cefoperazona, ceftibuten, cefotaxina, ceftriaxona, 3) los monobactams (aztreonam), 4) los carbapenems (imipenem y meropenem), y 5) los inhibidores de β -lactamasas (ácido clavulánico, sulbactam y tazobactam) (Siu, 2002; Marín, 2003).

2.8 β -lactamasas

Desde el descubrimiento de las penicilinas en 1940, hasta nuestros días, la resistencia bacteriana ha venido en aumento y hoy en día origina una de las mayores preocupaciones de la medicina. En el año de 1944 Kirby, demuestra que ciertas cepas de *Staphylococcus aureus* eran resistentes a las penicilinas. Con el tiempo se fueron presentando más informes de resistencia de gérmenes, tanto en Gram-positivos como en Gram-negativos, a los antimicrobianos betalactámicos, provocado por la producción de enzimas llamadas penicilinasas, que posteriormente fueron llamadas β -lactamasas, ya que no solo hidrolizan las penicilinas sino también a las cefalosporinas, así como a los monobactámicos y más recientemente a los carbapenémicos. Esta familia de enzimas, en continuo crecimiento, en

la actualidad suma más de 190 tipos y se agrupan de acuerdo a sus características funcionales y genotípicas, mediante la clasificación de Bush, Jacoby y Medeiros y su correlación con la clasificación molecular de Ambler (Cuadro 2) (Gniadkowski, 2001; Siu, 2002).

A pesar de que las β -lactamasas han sido descritas tanto en bacterias Gram-positivas como en Gram-negativas, la mayoría de las enzimas se presenta en estas últimas, por otra parte, la mayor incidencia en las Gram-positivas se reportan en *Staphylococcus aureus*.

2.8.1 β -lactamasas de espectro extendido (BLEE)

Las β -lactamasas de espectro extendido (BLEE), también llamadas de espectro ampliado (BLEA), son enzimas producidas por los bacilos Gram-negativos, fundamentalmente enterobacterias especialmente frecuentes en *Klebsiella pneumoniae* y *Escherichia coli*. Son capaces de inactivar, además de a las penicilinas y a las cefalosporinas de primera y segunda generación, a las oximino-cefalosporinas y al aztreonam.

Una mutación en la β -lactamasa SHV-1 de amplio espectro provocó la aparición de la primera BLEE SHV-2 aislada de una cepa de *Klebsiella pneumoniae*. A partir de este mismo microorganismo se aisló a TEM-3, producto de mutaciones en TEM-1. Estas β -lactamasas 2b poseen actividad penicilinasas y son, en su mayoría inhibidas por el ácido clavulánico. Las mutaciones en el centro activo de estas enzimas 2b, han determinado la aparición de estas otras β -lactamasas BLEE, capaces de hidrolizar también a las cefalosporinas de tercera generación y a los monobactámicos. Las BLEE, por tanto, se clasifican dentro de ese gran grupo 2b, constituyendo el subgrupo 2be. Hasta la fecha se han descrito más de cien variantes distintas de BLEE, derivadas de las β -lactamasas TEM-1 o TEM-2 y más de cincuenta de las derivadas de SHV-1 (Gniadkowski, 2001; Bush *et al.*, 2011),

Cuadro 2

Clasificación de β -lactamasas de Bush, Jacoby y Medeiros

<i>Grupo funcional y subgrupo</i>	<i>Clase molecular</i>	<i>Características</i>
1	C	Cefalosporinas, a menudo cromosómicas, pero pueden ser plasmídicas. Resistencia a todos los β -lactámicos, excepto carbapenémicos (a no ser que coexistan alteraciones en las porinas). No inhibidas por el ácido clavulánico.
2	A,D	Penicilinas, cefalosporinas o ambas. La mayoría son inhibidas por el ácido clavulánico (salvo casos de hiperproducción o subgrupos determinados).
2a	A	Penicilinas. Incluye las de <i>Enterococcus</i> y <i>Staphylococcus</i> . Resistencia a penicilinas. Inhibidas por ácido clavulánico.
2b	A	β -lactamasas de amplio espectro (penicilinas y cefalosporinas), incluyendo TEM-1 y SHV-1.
2be	A	β -lactamasas de espectro extendido (BLEE). Resistencia a oximino-cefalosporinas y a monobactámicos (aztreonam).
2br	A	β -lactamasas tipo IRT (<i>InhibitorResistant</i> TEM). Resistentes a los inhibidores de β -lactamasas ácido clavulánico y sulbactam, pero sensible a tazobactam.
2c	A	Enzimas hidrolizantes de carbenicilina fundamentalmente, con algún efecto sobre cloxacilina.
2d	D	Enzimas hidrolizantes de cloxacilina (oxacilina) fundamentalmente, con algún efecto sobre carbenicilina. Inhibidas escasamente por ácido clavulánico. Algunas son BLEE (BLEE tipo OXA).
2e	A	Cefalosporinas y aztreonamas. Inhibidas por ácido clavulánico.
2f	A	Serina- β -lactamasas. Carbapenemasas. Inhibidas por ácido clavulánico.
3a, 3b, 3c	B	Metallo (Zn)- β -lactamasas. Resistencia a carbapenémicos y a todos los β -lactámicos, excepto los monobactámicos. No inhibidas por ácido clavulánico.
4		Miscelánea. Penicilinas no incluidas en los otros grupos. No inhibidas por ácido clavulánico

Bush K, *et al.*, 1995, Grupo funcional 1 cefalosporinas, 2 serin β -lactamasas, 3 metalobectamasas y 4 penicilinas inhibidas por el ácido clavulánico. Clase molecular A serin-penicilinas, B metaloenzimas, C serin-cefalosporinasas y D serin-oxazilinasas

Las distintas BLEE confieren un grado de resistencia muy variable. La intensidad de hidrólisis de un determinado antibiótico difiere según las cepas consideradas, pudiendo incluso no tener efecto fenotípicamente detectable en algunos casos en los que únicamente tiene lugar un aumento de la CMI, pero permaneciendo en el intervalo de sensibilidad.

El problema epidemiológico que representan las BLEEs es muy importante debido a que los elementos móviles que transfieren genes de una célula bacteriana a otra en la llamada transmisión horizontal, son los plásmidos bacterianos, específicamente los plásmidos conjugativos, es decir aquellos capaces de promover su propia transferencia y la transferencia de otros plásmidos de una célula bacteriana a otra, posibilitando la diseminación de este mecanismo de resistencia no sólo entre distintas cepas de la misma especie, sino también entre diferentes especies bacterianas. Además, las BLEEs frecuentemente se incluyen en transposones o integrones, lo cual establece, su asociación con otros determinantes genéticos de resistencia transferibles, lo que hace que la diseminación de estos factores de resistencia se presente a gran velocidad convirtiéndose en un verdadero problema a nivel mundial (Gniadkowski, 2001; Bennett, 2008).

JUSTIFICACIÓN

El uso indiscriminado de los quimioterapéuticos en el control de las enfermedades respiratorias de los bovinos, ha generado la aparición de cepas multiresistentes, lo cual dificulta el control de dichas enfermedades, aumenta los costos de tratamientos y por ende un incremento en los costos de producción a nivel nacional. En nuestro país no se tienen datos publicados sobre la presencia de β -lactamasas en cepas de *M. haemolytica*, por lo que resulta importante conocer la situación epidemiológica de las mismas. El material biológico con el que se cuenta para la realización de esta investigación está constituido por cepas nativas obtenidas de dos de las más importantes cuencas lecheras de México, con lo que se podrá obtener un panorama de la situación de resistencia a quimioterapéuticos (betalactámicos) en el ganado lechero del país. Los resultados obtenidos contribuirán a proponer medidas más eficientes y eficaces para el control y tratamiento de problemas respiratorios en los bovinos productores de leche particularmente respecto a la manheimiosis.

4 HIPÓTESIS

Los aislamientos de *M. haemolytica* provenientes de animales clínicamente sanos y enfermos de neumonía presentarán genes que codifiquen para la síntesis de β -lactamasas de espectro extendido.

5 OBJETIVO GENERAL

Identificar los genes que codifican para la síntesis de β -lactamasas de espectro extendido TEM, SHV y CTX-M en cepas de *M. haemolytica* serotipos A1 y A6 a partir de cepas aisladas de bovinos clínicamente sanos y enfermos de neumonía.

5.1 Objetivos específicos

- Identificar fenotípicamente la susceptibilidad a quimioterapéuticos por medio de la concentración mínima inhibitoria (MIC)
- Identificar plásmidos de resistencia a antibióticos en cepas de *M. haemolytica*.
- Identificar los genes *bla_{SHV}*, *bla_{TEM}* y *bla_{CTX-M}* que codifican para β -lactamasas mediante la reacción en cadena de la polimerasa.

6 MATERIAL Y MÉTODOS

6.1 Origen y características de las cepas bacterianas

Las cepas de *M. haemolytica* fueron obtenidas en un estudio previo realizado en dos complejos lecheros, uno en el Complejo Agropecuario e Industrial de Tizayuca (CAIT), Hidalgo, del que se obtuvieron 64 cepas (55 serotipo A1 y 9 serotipo A6) y el otro en la región de La Laguna (CLALA) en Torreón, Coahuila, y Gómez Palacio, Durango en la que se obtuvieron 63 cepas (60 serotipo A1 y 3 serotipo A6) (Cuadro 3). Se decidió trabajar sólo con los serotipos A1 y A6 debido a que el objetivo del estudio era trabajar con cepas de *M. haemolytica* y las cepas del serotipo A11 pertenecen a otra especie, *M. glucosida*, que fue reclasificada por Angen *et al.*, 1999. Otro factor que llevó a tomar esta decisión fue el escaso número de cepas con el que se contaba para la realización de este estudio.

Cuadro 3
Origen y características de las cepas de *M. haemolytica*

Origen	Sanos			Enfermos			Total de cepas
	Serotipos			Serotipos			
	A1	A6	Total	A1	A6	Total	
CAIT	30	7	37	25	2	27	64
CLALA	54	3	57	6	0	6	63
Total	84	10	94	31	2	33	127

6.2 Determinación de la Concentración Mínima Inhibitoria (MIC)

Se realizó la prueba de MIC a 127 cepas mediante un sistema automatizado, en el que se probaron los siguientes quimioterapéuticos: penicilina, gentamicina, amoxicilina, tetraciclina, estreptomina, eritromicina, ampicilina, enrofloxacin, cloranfenicol, neomicina, aztreonam y sulfametoxazol.

Para cada uno de los quimioterapéuticos se calculó y peso la cantidad de la sal pura necesaria para realizar la prueba (cuadro 4), dicha cantidad fue expresada en mg utilizando la siguiente fórmula:

$$\text{Peso mg} = \frac{(\text{volumen/mL}) (\text{concentración } \mu\text{g/mL})}{\text{Potencia } \mu\text{g/mg}}$$

Dónde: Volumen= volumen final de la dilución del quimioterapéutico siempre (8 mL)

Concentración= la concentración inicial a partir de la cual se comenzaron las diluciones para la prueba.

Potencia = la potencia del quimioterapéutico proporcionada por el fabricante (Sigma-Aldrich).

Cuadro 4

Listado de quimioterapéuticos, potencia y peso utilizados en la prueba de MIC

<i>Quimioterapéutico</i>	<i>Potencia (unidades por mg)</i>	<i>Peso (mg)</i>
Penicilina	1593	12.58
Gentamicina	660	31.03
Amoxicilina	994	20.60
Tetraciclina	980	20.89
Estreptomicina	771	26.56
Eritromicina	952	21.51
Ampicilina	982	20.85
Enrofloxacin	980	20.89
Cloranfenicol	1000	20.48
Neomicina	689	29.72
Aztreonam	980	20.89

Posteriormente se prepararon los disolventes para obtener una solución, después se diluyeron con su respectivo diluyente para obtener un volumen de 8 mL (cuadro 5). Todos los quimioterapéuticos fueron filtrados utilizando una membrana de 0.22 μ y se hicieron diluciones hasta obtener las concentraciones requeridas: 256, 128, 64, 32, 16, 8, 4, 2, 1, 0.5, 0.25 y 0.125 μ g/mL.

Cuadro 5
Lista de quimioterapéuticos y sus respectivos disolventes y diluyentes.

<i>Quimioterapéutico</i>	<i>Disolvente</i>	<i>Diluyente</i>
Penicilina	Agua	Agua
Gentamicina	Agua	Agua
Amoxicilina	Buffer de fosfato pH 8.0, 0.1 mol/L	Buffer de fosfato pH 6.0 mol/L
Tetraciclina	Agua	Agua
Estreptomina	Agua	Agua
Eritromicina	Etanol 95%	Agua
Ampicilina	Amortiguador de fosfato pH 8.0, 0.1 mol.	Amortiguador de fosfato pH 6.0, 0.1 mol.
Enrofloxacin	½ volumen de agua añadir 1 mol/L NaOH	Agua
Cloranfenicol	Etanol 95%	Agua
Neomicina	Agua	Agua
Aztreonam	Solución saturada de bicarbonato de sodio	Agua
Sulfametoxazol	Ácido hipoclorhídrico 10% del volumen final	Agua

De cada una de las concentraciones obtenidas se transfirieron 3 mL en un tubo con 24 mL de agar Müeller Hinton, además se adicionaron 3 mL de sangre de bovino, se homogenizó esta mezcla y después se vació en placas omni tray de 68 x 128 mm. Se incubaron 24 horas para realizar prueba de esterilidad.

El cultivo bacteriano se resembró en medio agar Müeller Hinton con 5% de sangre, durante 18-24 horas de incubación a 37°C, a partir de esta placa de agar se realizó una suspensión que se estandarizó a 0.5 en la escala de Mc Farland, para después hacer una dilución 1:10 en solución salina estéril. De esta última suspensión se tomaron 200 mL y se depositaron en una placa de 96 pozos. Esta placa con el cultivo bacteriano, se colocó en un replicador automatizado, el cual inoculara en cada placa omni tray (Thermo Scientific) que contiene diferentes concentraciones de quimioterápico. Una vez inoculadas las placas fueron incubadas de 18-24 horas para realizar la lectura.

La lectura se realizó al establecer la concentración del quimioterápico en la placa omni tray en donde ya no se observó crecimiento bacteriano.

En todas las pruebas realizadas se incluyeron controles de *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853, *Escherichia coli* ATCC 25922, *Staphylococcus aureus* ATCC 29213 y *Enterococcus faecalis* ATCC 29212, para evitar interpretaciones erróneas de los resultados. Además de incluir dos placas una inicial y una final sin quimioterápico para establecer que el crecimiento de las bacterias fue normal durante todo el procedimiento.

6.3 Extracción de ADN total

Las cepas se cultivaron en cajas de agar sangre de bovino al 5% a 37°C durante 18 a 24 h, después se transfirió una colonia de cada uno de los asilamientos a tubos con 10 mL de caldo infusión cerebro corazón (BHI por sus siglas en inglés) y se incubaron durante 18 a 24 h a 37°C, en agitación orbital a 250 rpm. Los cultivos ya crecidos se centrifugaron a 5000xg durante 10 min. Se retiró el sobrenadante y la pastilla resultante se resuspendió por pipeteo suave en 500 µL de solución de lisis (Tiocianato de guanidina 5M, EDTA 0.1 M, Sarkosil 0.5% P/V) y se mezcló por inversión durante 5 min para lisar las células, el contenido fue transferido a tubos de 1.5 mL. Posteriormente, se agregaron 250 µL de

acetato de amonio 7.4 M, se mezclaron por inversión y se colocaron en hielo por 10 min, se adicionaron 500 μ L de ProCipitate™ (Biotech Support Group LLC.) y se colocaron nuevamente en hielo por 10 min, se centrifugaron a 4500xg rpm por 5 min, una vez separadas las fases, se tomó la fase acuosa y se transfirió en tubos de 1.5 mL y se precipitó con etanol absoluto llevando el volumen a 1.5 mL, se mezcló por inversión para obtener el ADN y se centrifugó a 6500xg por 10 min. Se realizaron dos lavados con etanol al 70%, centrifugando a 6500xg durante 10 min. Finalmente se eliminó el etanol por decantación, los tubos se colocaron boca abajo en papel absorbente para dejar secar la pastilla toda la noche. Por último el ADN se resuspendió en aproximadamente 200 μ L de agua destilada (dependiendo de la cantidad de ADN obtenida). Una vez resuspendida la pastilla se calentó a 65°C, por 35 min para inactivar DNAsas.

La visualización del ADN se realizó mediante electroforesis en geles de agarosa al 1%, teñidos con bromuro de etidio (10 μ g/ml), que se corrieron a 80 volts en una solución de TAE (Tris, Ácido acético glacial, EDTA). La visualización de estos geles se hizo en un transiluminador y posteriormente se fotodocumentó y cuantificó el número de aislamientos que presentó un perfil sugerente a ADN plasmídico.

6.4 Extracción de ADN plasmídico

Las cepas se incubaron en 10 mL de BHI en agitación orbital a 250 rpm durante 24 h a 37°C, se centrifugaron a 12000 x g durante 5 min y se decantó el sobrenadante. La extracción se realizó por medio del sistema comercial AxyPrep Plasmid Miniprep (Axigen, Unión City), siguiendo las instrucciones del fabricante: la pastilla fue resuspendida en 250 μ L de buffer de suspensión adicionado con RNAsas y se mezcló mediante agitación en vórtex, posteriormente se adicionaron 250 μ L de buffer de lisis mezclándolo por inversión de 4 a 6 veces. Se agregaron 350 μ L de buffer de neutralización que se mezcló por inversión de 3 a 6 veces, posteriormente se centrifugó a 12000 x g durante 10 min, la solución obtenida se transfirió a una columna y ésta se centrifugó a 12000 x g durante 1 min; se añadieron 500 μ L de solución de buffer de lavado W1 y se centrifugó nuevamente a 12000 rpm durante 1 min, posteriormente se colocaron 700 μ L de buffer concentrador y

se centrifugaron a 12000 rpm durante 1 min. Se transfirió la columna a un tubo de 1.5 mL y se agregaron 60 μ L de eluente en el centro de la membrana y se mantuvo a temperatura ambiente durante 1 min, finalmente se centrifugó a 12000 x g durante 1 min. Se realizó la visualización de los patrones plasmídicos mediante electroforesis a 80 V por 30 min en un gel horizontal de agarosa al 2% preparado con solución TAE teñido con bromuro de etidio (10 μ g/ml). La visualización de los geles se realizó en un transiluminador de luz UV, las imágenes fueron fotodocumetadas en un digitalizador.

6.5 Reacción en cadena de la polimerasa (PCR)

El ADN plasmídico se utilizó como template en las reacciones de PCR, para la amplificación de los genes *bla_{SHV}*, *bla_{TEM}*, *bla_{CTX-M}* que codifican para las β -lactamasas SHV, TEM y CTX-M. Se utilizaron un par de iniciadores para cada uno de los tipos de β -lactamasas que se amplificaron (cuadro 6).

Cuadro 6
Iniciadores utilizados en la prueba de PCR

<i>Genes de la familia</i>	<i>Iniciador delantero</i>	<i>Iniciador reverso</i>
SHV	5'-ATGCGTTATATTCGCCTGTG-3'	5'-TGCTTTGTTATTCGGGCCAA-3'
TEM	5'-AAACGCTGGTGAAAGTA-3'	5'-AGCGATCTGTCTAT-3'
CTX-M	5'-CGCTTTGCGATGTGCAG-3'	5'-ACCGCGATATCGTTGGT-3'

Se estandarizaron las condiciones para la detección de cada uno de los genes que codifican para la síntesis de las β -lactamasas SHV, TEM Y CTX-M (Cuadro 7).

Cuadro 7			
Condiciones para la prueba de PCR			
Condiciones	β -lactamasas		
	SHV	TEM	CTX-M
Desnaturalización inicial	94°C por 4 min	94°C por 5 min	94°C por 5 min
Desnaturalización	94°C por 30 s	94°C por 30 s	94°C por 30 s
Alineación	59 °C por 1 min	46°C por 30 s	69°C por 40 s
Extensión	72°C por 1 min	72°C por 1 min	72°C por 1 min
Ciclos	35ciclos	33 ciclos	35 ciclos
Extensión final	72°C por 7 min	72°C por 7 min	72°C por 7 min.

Estas condiciones fueron procesadas en un termociclador MAXIGENE Thermal Cycler Therm-1000 (AXYGEN scientific). Los productos esperados de la PCR fueron de 723 pb para SHV, 717 pb para TEM y 550 pb para CTX-M. Los productos de PCR se visualizaron en geles de agarosa al 2% teñido con bromuro de etidio (10 μ g/ml) y fotodocumentados en un digitalizador de imágenes Kodak Gel Logic 2000.

6.6 Análisis estadístico

Los datos obtenidos se analizaron por medio de estadística descriptiva mediante el cálculo de frecuencias absolutas y relativas, para conocer la proporción de aislamientos que presentaron resistencia a los quimioterapéuticos utilizados en la prueba, así como para conocer la proporción de cepas que presentaron β -lactamasas tipo TEM, SHV Y CTX-M.

7 RESULTADOS.

7.1 Determinación de la concentración mínima inhibitoria

Para determinar la concentración mínima inhibitoria se establecieron los puntos de corte para definir resistencia y susceptibilidad a los diferentes quimioterapéuticos (cuadro 8). Se realizó la prueba de MIC al total de los aislamientos de las dos cuencas lecheras, incluyéndose 11 quimioterapéuticos a 12 diferentes concentraciones (cuadro 9).

Cuadro 8			
<i>Puntos de corte de los quimioterapéuticos utilizados en la MIC</i>			
<i>Antimicrobiano</i>	<i>Rango</i>	<i>Antimicrobiano</i>	<i>Rango</i>
Cloranfenicol	≥ 32	Ampicilina	≥ 32
Eritromicina	0.25-2	Enrofloxacina	≥ 2
Gentamicina	0.03-8	Amoxicilina	≥ 32
Penicilina G	0.03-0.125	Tetraciclina	0.125-0.25
Estreptomicina	≥ 8	Neomicina	0.25-128
Sulfametoxazole	≥ 512		

Cuadro 9
Número de aislamientos que presentaron inhibición de crecimiento a diferentes concentraciones de quimioterapéuticos

<i>Antimicrobiano</i>	<i>Concentración de MIC (mg/ml)</i>											
	<i>0.125</i>	<i>0.25</i>	<i>0.5</i>	<i>1</i>	<i>2</i>	<i>4</i>	<i>8</i>	<i>16</i>	<i>32</i>	<i>64</i>	<i>128</i>	<i>256</i>
Penicilina	37	65	24				1					
Gentamicina					88	2	37					
Amoxicilina	3	111	11	1		1						
Tetraciclina		103	20			1	1		1	1		
Estreptomina							90	32		1	1	2
Eritromicina	1				101	24		1				
Ampicilina	111	15		1								
Enrofloxacina	117			10								
Cloranfenicol			11	114				1	1			
Neomicina			1			86	39					1
Sulfametoxazol								4	2		13	108

Después de definir los puntos de corte se encontró que para la penicilina, el 80.31% (102/127) de los aislamientos fue susceptible, el 18.89% (24/127) intermedio y el 0.78% (1/127) resistente; para la tetraciclina el 81.10% (103/127) susceptible, el 15.74% (20/127) intermedio y 3.14% (4/127) resistente; para la estreptomina el 70.86% (90/127) susceptible, el 25.98% (33/127) intermedio y 3.14% (4/127) resistente; para la eritromicina el 80.31% (102/127) susceptible y el 19.68% (25/127) intermedio; para la neomicina el 99.21% (126/127) susceptible y el 0.78% (1/127) intermedio; para la ampicilina, gentamicina, amoxicilina, tetraciclina, enrofloxacina, cloranfenicol y sulfametoxazol, el 100% (127/127) de los aislamientos fue susceptible (Figura 1).

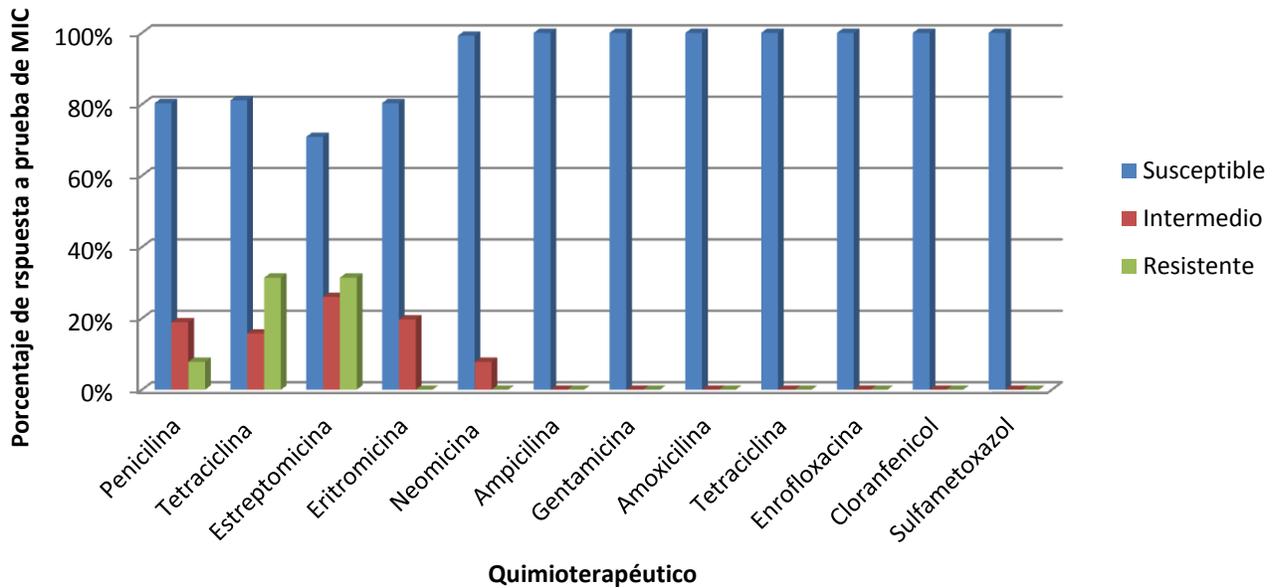


Figura 1. Frecuencia de aislamientos de *M. haemolytica* según resistencia o susceptibilidad a diferentes quimioterapéuticos.

7.2 Extracción de ADN total.

De acuerdo a la extracción del ADN, se pudo identificar un perfil que sugería la presencia de plásmidos en el 93.7% (119/127) de las cepas (Figura 2).

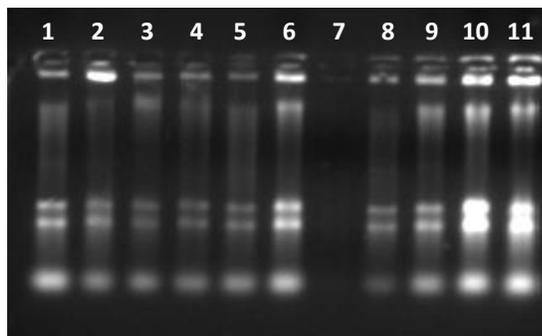


Figura 2. Gel de agarosa al 1% teñido con bromuro de etidio, carriles 1 a 11, extracción de ADN de cepas de *M. haemolytica* en el que se observan perfiles sugerentes a plásmidos.

7.3 Extracción de ADN plasmídico

De las 119 cepas que presentaron perfil sugerente a ADN plasmídico, en 111 (93.27%) se consiguió la extracción de plásmidos (Fig. 3).

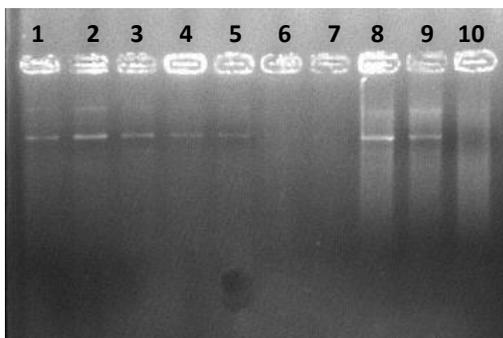


Figura 3. Gel de agarosa al 2% teñido con bromuro de etidio. Carriles 1-5 y 8,9 plásmidos de cepas de *M. haemolytica*, carriles 6, 7, 10 cepas de *M. haemolytica* negativas a la extracción de plásmidos.

7.4 Identificación de los genes *bla_{SHV}*, *bla_{TEM}* y *bla_{CTX-M}*

En las 111 cepas que presentaron ADN plasmídico, por medio de la PCR se logró detectar el gen *bla_{SHV}* en el 86.4% (96/111) de las cepas (figura 4) y el gen *bla_{TEM}* en el 75.6% (84/111) (figura 5). En ninguna de las cepas se pudo amplificar el gen *bla_{CTX-M}*.

Considerando el total de cepas estudiadas (n= 127) en el 75. 59% (96/127) se detectó el gen *bla_{SHV}* y en el 66.14% (84/127) el gen *bla_{TEM}*.

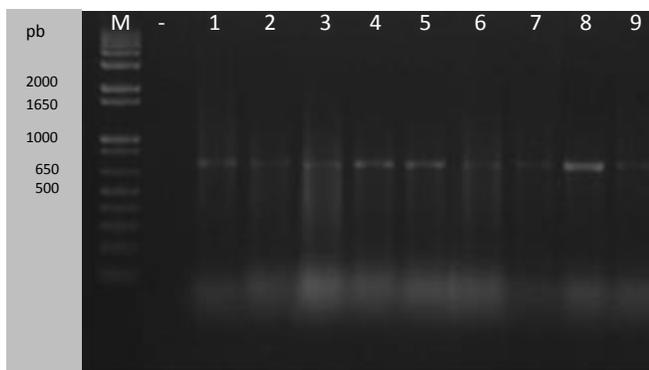


Figura 4. Producto de amplificación de PCR a partir de ADN plasmídico de aislamientos de *Mannheimia haemolytica* en el que se observa la amplificación del gen *bla_{SHV}*. Gel de agarosa al 2%

teñido con bromuro de etidio (M) marcador peso molecular, (-) control negativo, (1-9) cepas de *M. haemolytica*

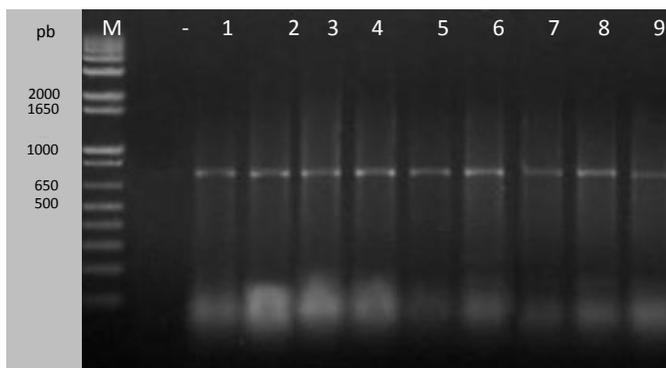


Figura 5. Producto de amplificación de PCR a partir de ADN plasmídico de aislamientos de *M. haemolytica* en el que se observa la amplificación del gen *bla*_{TEM}. Gel de agarosa al 2% teñido con bromuro de etidio (M) marcador peso molecular, (-) control negativo, (1-9) cepas de *M. haemolytica*

Considerando el total de cepas estudiadas (n= 127) en el 75. 59% (96/127) se detectó el gen *bla*_{SHV} y en el 66.14% (84/127) el gen *bla*_{TEM} (Figura 6).

Considerando el origen de las cepas, para el CAIT el 54.68% (35/64) presentó el gen *bla*_{SHV} y el 62.5% (40/64) el gen *bla*_{TEM}, para la CLALA el 77.77% (49/63) presentó el gen *bla*_{SHV} y el 88.88% (56/63) el gen *bla*_{TEM} (Figura 7).

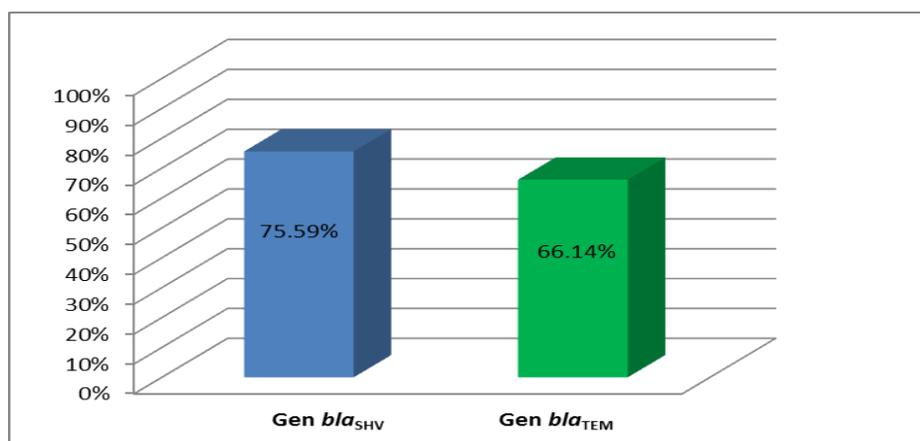


Figura 6. Frecuencia de cepas de *M. haemolytica* en las que se identificaron los genes *bla*_{SHV} y *bla*_{TEM}

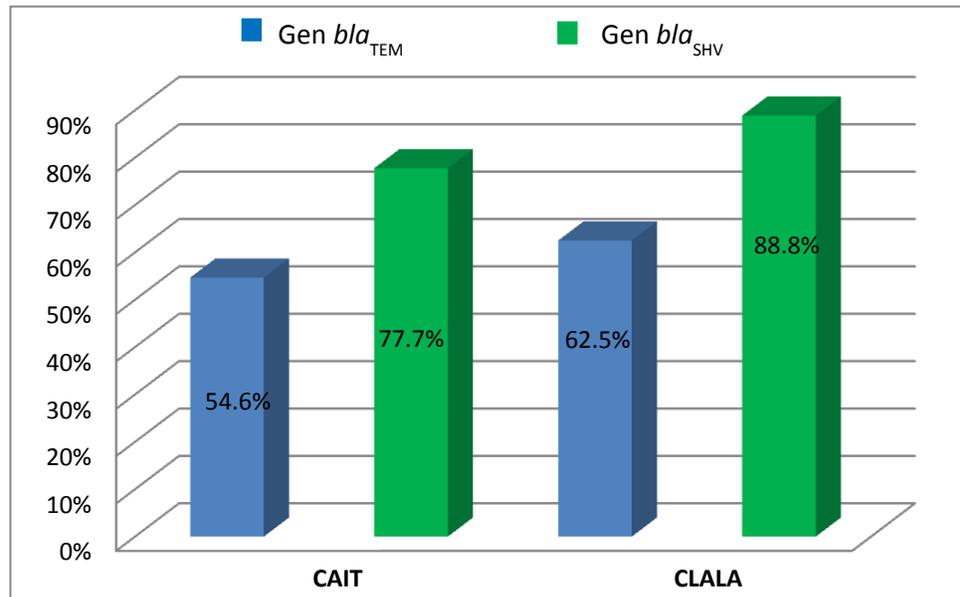


Figura 7. Frecuencia de cepas de *M. haemolytica* en las que se identificaron los genes *bla*_{TEM} y *bla*_{SHV} de acuerdo con el origen de las cepas.

CAIT. Complejo Agropecuario e Industrial de Tizayuca

CLALA. Complejo Lechero de La Lagunera

8 DISCUSIÓN

El uso de agentes antimicrobianos en el ganado es a menudo necesario y en ocasiones indispensable. Con mayor frecuencia se administran quimioterapéuticos para las enfermedades entéricas y respiratorias en terneros y ganado de engorda, y en infecciones reproductivas en los hatos de cría. Aunque el tratamiento terapéutico es más costoso que la prevención en todas las producciones animales, los antibióticos se utilizan por tres principales razones:

1. Terapéuticamente, para el tratamiento de las enfermedades existentes.
2. Como profilaxis, en concentraciones subterapéuticas
3. Subterapéuticamente para la mejora de la producción (mejora de la conversión alimenticia) (Edwards , 2010).

El uso terapéutico generalmente ocurre después del diagnóstico de una enfermedad y el tratamiento se rige por la prescripción del médico veterinario o por las instrucciones de la etiqueta del medicamento. Dosis subterapéuticas son utilizadas cuando se sabe que los agentes patógenos se encuentran en el ambiente o cuando los animales se encuentran en situaciones de gran estrés y son más susceptibles a los patógenos, administrándose dosis subterapéuticas que son menores a las requeridas para el tratamiento de infecciones establecidas. También son utilizados compuestos desarrollados exclusivamente como potenciadores de la producción, los cuales no tienen ninguna finalidad terapéutica (Edwards, 2010; Council, 1999).

La aplicación inadecuada y el uso indiscriminado de los quimioterapéuticos en las prácticas cotidianas de manejo de las producciones animales han traído como consecuencia un incremento en la resistencia bacteriana, debido principalmente a la producción de enzimas y siendo las β -lactamasas las más ampliamente difundidas alrededor del mundo. Estas enzimas se encargan de inactivar a los betalactámicos que son los quimioterapéuticos de primera elección en el tratamiento de los problemas respiratorios y principalmente en la pasteurelosis pulmonar bovina que es producida por *M. haemolytica* y otras bacterias

pertenecientes a la misma familia (Bush, 2011). Este fenómeno de resistencia al tratamiento puede observarse por un incremento en la mortalidad o en un número mayor de animales que no responden a dicho tratamiento.

Jim *et al*, 1992 determinaron que la mayoría de los bovinos con problemas respiratorios fueron tratados con una dosis insuficiente de algún agente antimicrobiano o la terapia fue suspendida antes de completar el tratamiento. Una apropiada terapia a una adecuada concentración y con un tiempo de exposición debería de minimizar el desarrollo de la resistencia en las poblaciones bacterianas.

Debido a lo citado anteriormente el objetivo del presente trabajo fue identificar las principales β -lactamasas de espectro extendido tipo TEM, SHV y CTX-M presentes en aislamientos de *M. haemolytica* de los principales serotipos presentes en nuestro país A1 y A 6, provenientes de dos de las más importantes cuencas lecheras del país CAIT y CLALA.

Los mecanismos de resistencia con los que cuentan las bacterias, las prácticas de manejo de animales, la zona geográfica, época del año en el que se realizan los muestreos y el manejo de los aislamientos, llevan a que los resultados de MIC publicados por distintos autores sean diferentes entre sí y con los obtenidos en este trabajo.

Para la prueba de MIC se utilizaron los principales quimioterapéuticos utilizados en la industria ganadera para combatir diversos problemas de salud de los bovinos entre ellos los problemas respiratorios y en especial la pasteurellosis neumónica bovina, estos quimioterapéuticos pertenecen a las familias de los betalactámicos, aminoglucósidos, sulfas, tetraciclinas y quinolonas.

Los resultados en el presente estudio indican escasa resistencia antimicrobiana de las cepas de *M. haemolytica* obtenidas por medio de hisopo nasal. Sin embargo algunas cepas mostraron resistencia a la penicilina 1 (0.78%), tetraciclina 4 (3.14%) mismas que presentaron resistencia a la estreptomina. Todas estas cepas fueron obtenidas de animales clínicamente enfermos de neumonía y provenían de animales de la CLALA, mientras que

las cepas obtenidas de animales provenientes del CAIT no mostraron resistencia a los quimioterapéuticos obtenidos, solo mostraron un perfil intermedio para la eritromicina y tetraciclina.

Las cepas identificadas en este estudio con una resistencia intermedia hacia la penicilina (18.89%), tetraciclina (15.75%), estreptomicina (25.98%), eritromicina (19.68%) y neomicina (0.78%), representan un problema potencial porque requieren de concentraciones mayores para lograr su inhibición, de tal manera que in vivo se necesitarán dosis mayores de agentes antimicrobianos para poder contener la enfermedad.

Para todos los quimioterapéuticos mencionados anteriormente, los porcentajes de susceptibilidad fueron elevados con rangos que van de 70.86% hasta 99.21%. Los quimioterapéuticos a los que las cepas presentaron mayor susceptibilidad (100%) fueron la ampicilina, gentamicina, amoxicilina, enrofloxacin, cloranfenicol y sulfametoxazol.

En nuestro país son escasos los trabajos publicados en los que se refiera la situación de resistencia y susceptibilidad de cepas de *M. haemolytica* a quimioterapéuticos, por lo que no se cuenta con un marco sólido de referencia nacional con los cuales poder comparar los resultados obtenidos en esta tesis.

Los resultados de resistencia encontrados en este trabajo comparados con otros reportados con anterioridad por diversos autores muestran que, para la penicilina, los resultados de resistencia son variados siendo mayores los porcentajes alrededor del 0 al 10%. Hendriksen *et al.*, 2008 muestran resultados para la tetraciclina que van desde la ausencia de resistencia hasta porcentajes del 40%. Estos resultados muestran mucha variabilidad pero se presentan mayormente porcentajes bajos que van de 0 al 3.0%. La baja resistencia de las cepas de *M. haemolytica* a la tetraciclina pueden deberse al mecanismo de acción que se basa en la inhibición de la síntesis de proteínas. Hendriksen *et al.*, 2008 y Catry., *et al.*, 2005 reportan elevados porcentajes a los reportados por otros autores que van de 46 hasta el 91%. Estos porcentajes tan elevados pueden deberse al tipo de muestra tomada, ya que estos provenían

de animales que habían muerto de neumonía aguda (Pijoan, 2000; Hendriksen *et al.*, 2008; Mohammadi *et al.*, 2006).

Para la ampicilina los porcentajes de resistencia reportados en trabajos realizados por Catry *et al.*, 2005; Catry *et al.*, 2007 y Watts *et al.*, 1994 en los que los porcentajes de resistencia son bajos o nulos, son similares a los encontrados en esta tesis, mostrando que la ampicilina resulta en un quimioterapéutico que puede ser usado en la industria bovina para el control de la pasteurelosis neumónica (Catry *et al.*, 2005; Catry *et al.*, 2007 y Watts, *et al.*, 1994). Hendriksen, *et al.*, 2008 al probar la amoxicilina en cepas de *M. haemolytica* mostró porcentajes bajos de resistencia que apenas alcanzan el 2.0%, resultados similares a los encontrados en este trabajo, que muestran ser un medicamento eficaz para el tratamiento de la pasteurelosis neumónica bovina

Respecto de la estreptomycinina, se tiene reportado solo un trabajo realizado con cepas obtenidas en el país, donde se describen porcentajes elevados de resistencia a este quimioterapéutico que fluctúan del 70 al 90%. Estos valores son diferentes de los encontrados en este trabajo, donde los valores de resistencia son bajos (Piojan *et al.*, 2000).

Para evaluar la importancia y la magnitud en la propagación del fenómeno de resistencia a quimioterapéuticos en cepas de *M. haemolytica*, bacteria que forma parte de la microbiota normal del bovino, se decidió incluir para sus análisis, antimicrobianos que no son rutinariamente utilizados para el tratamiento de problemas respiratorios en el ganado bovino. Los resultados encontrados para estos quimioterapéuticos indican una escasa o nula resistencia y sugieren que la propagación de este problema no ha sido tan rápidamente difundida como sucede con otras bacterias. Pese a los resultados obtenidos se deben de seguir realizando monitoreos continuos de resistencia a quimioterapéuticos en las diferentes regiones del país a fin de identificar la diseminación de resistencia en cepas de la misma familia o de diferentes familias.

Es frecuente la resistencia de cepas de *M. haemolytica* y se presenta hacia varios quimioterapéuticos utilizados en el control de la PPB. Las variaciones en los porcentajes de

resistencia/susceptibilidad dependen del país o región donde se obtuvieron los aislamientos y el tipo de muestras, ya que la resistencia es mayor en cepas provenientes de pulmones neumónicos que la obtenida a partir de isopos nasales. La mayoría de los autores han utilizado la prueba de sensibilidad en disco debido a la practicidad que representa esta prueba; pero la prueba de microdilución en agar ofrece mejores resultados en cuanto a sensibilidad y especificidad se refiere. (Kei, 2002; Pijoan *et al*, 2000; Watts *et al*, 1994)

Se empleó la técnica de PCR para la detección de los genes *bla*_{TEM}, *bla*_{SHV} y *bla*_{CTXM} que codifican para la síntesis de las betalactamasas de espectro extendido tipo TEM, SHV y CTM-M. Los resultados en este estudio detectaron los genes *bla*_{TEM}, *bla*_{SHV}; los genes *bla*_{CTX-M} no pudieron ser amplificados.

A menudo los plásmidos de resistencia pueden llevar varios genes que confieren resistencia a antibióticos y cada vez es más común el encontrar más de un plásmido de resistencia en bacterias causantes de problemas clínicos. La implicación clínica de este fenómeno se debe a la presión de selección causada por la resistencia provocada por el uso inadecuado de los quimioterapéuticos que puede derivar en una resistencia múltiple. Estos plásmidos multirresistentes son extremadamente difíciles o imposibles de erradicar completamente por 2 razones. La primera, es difícil eliminar simultáneamente toda la presión de selección. Segundo los plásmidos de resistencia son estables porque un número pequeño de plásmidos permanecen dentro de la bacteria y son reactivados cuando la presión de selección reaparece. (Smith *et al.*, 1993; Hawkey, 2008)

Se han descrito plásmidos de resistencia en cepas de *M. haemolytica* responsables de la resistencia a ampicilina, estreptomicina, sulfonamidas, y kanamicina. La resistencia transmisible mediada por plásmidos, puede propiciar la resistencia horizontal intraespecies, interespecies e intergénero. Los plásmidos son usualmente los principales portadores de resistencia en patógenos y son la mayor causa de preocupación por la rápida propagación de la resistencia en todo el mundo (Jaramillo *et al.*, 2010).

En la actualidad se han descrito más de 400 betalactamasas que han sido clasificadas según Jacoby, Bush y Ambler. De acuerdo a esta clasificación en el grupo A se encuentra una amplia familia de enzimas entre las cuales se encuentran penicilinasas, enzimas tipo TEM, SHV y CTX-M (Caratolli, 2008).

Una de las más ampliamente distribuidas son las betalactamasas tipo TEM que catalizan la hidrólisis de ampicilina y están relacionadas con las piperacina y carbenicilina. Se han asociado con la transferencia por medio de plásmidos. Los genes de las betalactamasas TEM son rápidamente diseminados no solo entre diferentes especies de enterobacterias sino también en *Pseudomonas*, *Haemophilus* y *Neisseria*. En animales se han descrito varios linajes de la familia TEM como es el caso de TEM-1, TEM-20 y Tem-52, las cuales se han reportado en bovinos productores de carne, conejos, perros y principalmente en aves de corral (Caratolli A, 2008).

Las β -lactamasas tipo SHV derivan de una manera similar a las TEM que son resultado de la evolución por mutación. Las enzimas más ampliamente distribuidas alrededor del mundo corresponden a los tipos SHV-12, SHV-5 y SHV-2, que han sido identificadas en humanos y en animales domésticos tal es el caso de aves de corral, perros y cerdos; aislándose a partir principalmente de bacterias como *E.coli* y *Salmonella* (Paterson *et al.*, 2003)

Los genes *bla*_{TEM} y *bla*_{SHV} detectados en este trabajo que codifican para la síntesis de las β -lactamasas TEM y SHV respectivamente tienen un efecto hidrolítico sobre la penicilina, ampicilina, cefalotina y cefaloridina, los dos primeros utilizados en este trabajo representan el principal blanco para la acción de estas enzimas. La identificación de estos genes se muestran en aumento y los porcentajes fluctúan desde el 38 hasta el 90% (Bonnet, 2004); datos similares fueron registrados en esta tesis.

Las técnicas utilizadas (prueba de MIC y PCR) no pueden ser correlacionadas adecuadamente debido a que la susceptibilidad *in vitro* no es la misma que la resultante en condiciones *in vivo*, ya que las bacterias no exhiben adecuadamente sus factores de patogenicidad, ni de virulencia entre ellos los de resistencia, incluso las condiciones del

medio que le proporcionamos a las bacterias para su crecimiento propician que no exhiban dichos mecanismos de patogenicidad. Tampoco se puede atribuir completamente la resistencia a la presencia de genes, puesto que la resistencia en cepas de *M. haemolytica* puede deberse a factores como la Lkt y al LPS entre otros. (Paterson *et al*, 2005; Griffin *et al*, 2010, Klima, *et al*, 2011)

Las betalactamasas CTX-M han evolucionado de una ruta completamente diferente a las SHV/TEM ya que son el resultado de la movilización de una anomalía cromosómica de betalactamasas encontradas en diferentes especies de *Kluyvera* spp; las cuales se presume que por conjugación fueron transmitidas a *Klebsiella* y *E. coli*. En cepas provenientes de animales, estas enzimas se han informado en perros, cerdos, aves de corral, conejos y ganado bovino. A pesar de que en la década pasada estos genes *bla*_{CTX-M} fueron considerados los de más rápida distribución en el mundo, en este trabajo no pudieron ser detectados en las cepas de estudio provenientes de los complejos agropecuarios del CAIT y del CLALA. Algunos autores consideran la presencia de genes *bla*_{CTX-M} como un fenómeno endémico y restringido únicamente a enterobacterias como *E. coli* y *Salmonella enterica*. La ausencia de estos genes en nuestros resultados, muestran que bajo un uso responsable sigue siendo factible la aplicación de tratamientos con quinolonas, aminoglucósidos, cefalosporinas, sulfas y trimetoprim y en infecciones bacterianas en el ganado bovino. Debido a que estos quimioterapéuticos representan el principal blanco para las enzimas tipo CTX-M (Bonnet, 2004).

Sin embargo los resultados encontrados podrían cambiar rápidamente dado el incremento en los informes de este fenómeno alrededor el mundo. Algunas β -lactamasas se han confinado a ciertas regiones geográficas mientras que otras son más difundidas. El incremento en la frecuencia de detección de determinantes específicos de resistencia no parece estar determinado por la multiplicación bacteriana, sino más bien a la transmisión horizontal de genes mediada por plásmidos, promoviendo la diseminación en áreas específicas. Los esfuerzos deben de enfocarse en conocer los vínculos y la transmisión de resistencia en ambientes naturales. En estudios posteriores se deberá de trabajar en la

secuenciación de los genes de las β -lactamasas SHV y TEM para lograr su caracterización y clasificación y continuar con la búsqueda de los genes para CTX-M.

9 CONCLUSIONES.

- Este trabajo representa el primer resultado en la identificación molecular de los genes *bla*_{TEM} y *bla*_{SHV}, en cepas de *M. haemolytica* en bovinos productores de leche a nivel nacional.
- No fue posible la identificación de los genes *bla*_{CTX-M}
- A pesar de que en este estudio los resultados de resistencia a quimioterapéuticos fueron bajos, es necesario tener mayor control en la administración de los mismos, debido a que las dosis a las que deben de ser administrados son cada vez más elevadas.
- Es necesario determinar rutinariamente los patrones de resistencia a quimioterapéuticos en las distintas zonas productivas del país.

10 ABREVIATURAS Y SIGLAS USADAS.

NAHMS	National Animal Health Monitoring System
VDVB	Virus de la Diarrea Viral Bovina
HVB-1	Herpesvirus Bovino 1
PI-3	Virus de la Parainfluenza 3
VRSB	Virus Respiratorio Sincicial Bovino
Lkt	Leucotoxina
LPS	Lipopolisacárido
PME	Proteínas de membrana externa
PRH	Proteínas Reguladoras de Hierro
PPB	Pasteurellosis Pulmonar Bovina
MIC	Concentración Mínima Inhibitoria
BLEE	β -lactamasas de espectro extendido
CAIT	Complejo Agropecuario e Industrial de Tizayuca
CLALA	Complejo Lechero de La Laguna

11 REFERENCIAS

- ANGEN O MUTTERS R, CAUGANT DA, OLSEN JE, BISGAARD M. Taxonomic relationships of the (*Pasteurella*) *haemolytica* complex as evaluated by DNA-DNA hybridizations and 16 rRNA sequencing with proposal of *Mannheimia haemolytica* gen. nov., comb. nov., *Mannheimia granulomatis* comb. Nov., *Mannheimia glucosida* sp. nov., *Mannheimia ruminalis* sp. nov., and *Mannheimia varigena* sp. nov. *Int J Syst Bacteriol* 1999; 49: 67-86
- APLEY M. Antimicrobial therapy of bovine respiratory disease. *Vet Clin North Am Food Anim Pract* 1997; 13: 549-574.
- BENNETT PM. Plasmid encoded antibiotic resistance: acquisition and transfer of antibiotic resistance genes in bacteria. *Br J Pharmacol* 2008; 153 Suppl 1:S347-357.
- BIBERSTEIN EL, GILLS M, KNIGHT H. Serological types of *Pasteurella hemolytica*. *Cornell Vet* 1960; 50: 283-300.
- BONNET R. Growing group extended-spectrum β -lactamases: the CTX-M enzymes *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 2004; 48: 1-14
- BOYCE J, *et al.* *Pasteurella* and *Mannheimia* In: Giles C, Prescott J, Songer J, et al., eds. *Pathogenesis of Bacterial Infections in Animals*. Carlton, Australia: Blackwell Publishing, 2004; 273-294.
- BURROWS LL, OLAH-WINFIELD E, LO RY. Molecular analysis of the leukotoxin determinants from *Pasteurella haemolytica* serotypes 1 to 16. *Infect Immun* 1993; 61 Mechanisms of pathogenicity and adhesion in *Pasteurella*: 5001-5007.
- BUSH K, FISHER JF. Epidemiological expansion, structural studies, and clinical challenges of new β -lactamases from Gram-negative bacteria. *Annu Rev Microbiol* 2011; 65: 455-478.
- BUSH K, JACOBY GA, MEDEIROS AA. A functional classification scheme for beta-lactamases and its correlation with molecular structure. *Antimicrob Agents Chemother* 1995; 39: 1211-1233.
- CAPRIOLI A, *et al.* Monitoring of antibiotic resistance in bacteria of animal origin: epidemiological and microbiological methodologies. *Int J Antimicrob Agents* 2000; 14: 295-301.
- CARATTOLI A. Animal reservoirs for extended spectrum β -lactamase producers *Clin Microbiol Infect* 2008; 14: 117-123.
- CARTER GR. Pasteurellosis: *Pasteurella multocida* and *Pasteurella hemolytica* *Adv Vet Sci* 1967; 11: 321-379.
- CATRY B, *et al.* Accuracy of susceptibility testing of *Pasteurella multocida* and *Mannheimia haemolytica* *Microbial Drug Resistance* 2007; 13: 204-211
- CATRY B, *et al.* Variability in acquired Resistance of *Pasteurella* and *Mannheimia* isolates from the nasopharynx of calves, with particular reference to different herd types *Microbial Drug Resistance* 2005; 4: 387-394
- CONTRERAS JLL. Determinación de la resistencia antimicrobiana en cepas de *Mannheimia haemolytica* aisladas de exudado nasal de bovinos clínicamente sanos

de neumonía. (Tesis de licenciatura). Cuautitlán Izcalli, (Edo. de México) México: Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán. Universidad Nacional Autónoma de México, 2008.

- COOPER VL, BRODERSEN BW. Respiratory disease diagnostics of cattle. *Vet Clin North Am Food Anim Pract* 2010; 26: 409-416.
- COUNCIL NR. The use of drugs in food animals. Benefits and risk; 1999
- DAVIES RL, PASTER BJ, DEWHIRST FE. Phylogenetic relationships and diversity within the *Pasteurella haemolytica* complex based on 16S rRNA sequence comparison and outer membrane protein and lipopolysaccharide analysis. *Int J System Bacteriol* 1996; 46(3): 736-744.
- EDWARDS LA. Control methods for bovine respiratory disease for feedlot cattle. *Vet Clin Food Anim* 2010; 26: 273-284
- EWERS C, LUBKE-BECKER A, WIELER LH. *Mannheimia haemolytica* and the pathogenesis of enzootic bronchopneumonia. *Berliner und Münchener Tierärztliche Wochenschrift* 2004: 97-115.
- GNIADKOWSKI M. Evolution and epidemiology of extended-spectrum beta-lactamases (ESBLs) and ESBL-producing microorganisms. *Clin Microbiol Infect* 2001; 7: 597-608.
- GORDEN PJ, PLUMMER P. Control, management, and prevention of bovine respiratory disease in dairy calves cows. *Vet Clin North Am Food Anim Pract* 2010; 26: 243-259.
- GRIFFIN D, CHENGAPPA MM, KUSZAK J, MCVEY DS. Bacterial pathogens of the bovine respiratory disease complex *Vet Clin North Am Food Anim Pract* 2010; 26: 381-394.
- GRIFFIN D. Economic impact associated with respiratory disease in beef cattle. *Vet Clin North Am Food Anim Pract* 1997; 13: 367-377.
- HAWKEY PM. Molecular epidemiology of clinically significant antibiotic resistance genes *British Journal of Pharmacology* 2008; 153: 406-413
- HENDRIKSEN RS *et al.* Prevalence of antimicrobial resistance among bacterial pathogens isolated from cattle in different European countries: 2002-2004 *Acta Veterinaria Scandinavica* 2008; 50: 1-10.
- HIGHLANDER SK. Molecular genetic analysis of virulence in *Mannheimia (pasteurella) haemolytica*. *Front Biosci* 2001; 6: 1128-1150.
- JARAMILLO AC, HERNÁNDEZ CR, SUÁREZ GF, TRIGO TFJ. Prevalence of *Mannheimia haemolytica* isolated from bovine nasal exudates and associated factors, in dairy farms in the North-Central of Mexico. *J Anim Vet Adv* 2007; 6: 404-409.
- JARAMILLO ML, ZENTENO E, TRIGO FJ. *haemolytica*. *Rev Latinoam Microbiol* 1999; 41: 105-116.
- JARAMILLO ACJ, TRIGO TFJ, SUÁREZ GF. Mannheimiosis bovina: etiología, prevención y control. *Vet Méx* 2009; 40: 293-314.

- JIM GK, BOOKER CW, GUICHON PT. Comparison of a combination of axfendazole and fenthion versus ivermectin in feedlot calves. *Can Vet J* 1992; 33:599-604.
- KEHRENBURG C, *et al.* Antimicrobial resistance in *Pasteurella* and *Mannheimia*: epidemiology and genetic basis. *Vet Res* 2001; 32: 323-339.
- KEI, SL. Antibiotics: action and resistance in gram negative bacteria. *J Microbiol Immunol Infect* 2002; 35: 1-11
- KLIMA CL, *et al.* Genetic characterization and antimicrobial susceptibility of *Mannheimia haemolytica* isolated from the nasopharynx of feedlot cattle. *Vet Micro* 2001;149: 390-398.
- LAFLEUR RL, *et al.* Lipopolysaccharide enhances cytolysis and inflammatory cytokine induction in bovine alveolar macrophages exposed to *Pasteurella (Mannheimia) haemolytica* leukotoxin. *Microb Pathog* 2001; 30: 347-357.
- LIVRELLI V, PEDUZZI J, JOLY B. Sequence and molecular characterization of the ROB-1 beta-lactamase gene from *Pasteurella haemolytica*. *Antimicrob Agents Chemother* 1991; 35: 242-251.
- LO RY, MCKERRAL LJ, Hills TL, *et al.* Analysis of the capsule biosynthetic locus of *Mannheimia (Pasteurella) haemolytica* A1 and proposal of a nomenclature system. *Infect Immun* 2001; 69: 4458-4464.
- MARÍN M FG. Antibióticos betalactámicos. *Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica* 2003; 21: 42-55.
- MCNEIL HJ, Shewen PE, Lo RY, *et al.* Novel protease produced by a *Pasteurella trehalosi* serotype 10 isolate from a pneumonic bighorn sheep: characteristics and potential relevance to protection. *Vet Microbiol* 2003; 93: 145-152.
- MOHAMMADI GR, GHAZVINI K, ABBAS PANAH H. Antimicrobial resting of *Mannheimia haemolytica* and *Pasteurella multocida* isolated from calves with dairy calf pneumonia. *Archives of Razi Institute* 2006; 61:91-96
- MORALES A J F. JML, OROPEZA V Z, TÓRTORA P J L, TRIGO TFJ. Evaluación experimental de un inmunógeno de *Pasteurella haemolytica* en corderos *Vet Méx* 1993; 24: 97-105.
- NARAYANAN S, *et al.* Leukotoxins of gram-negative bacteria. *Vet Microbiol* 2002; 84: 337-356.
- NICKELL JS, WHITE BJ. Metaphylactic antimicrobial therapy for bovine respiratory disease in stocker and feedlot cattle. *Vet Clin North Am Food Anim Pract.* 2010; 26: 285-301.
- PANCIERA RJ, CONFER AW. Pathogenesis and pathology of bovine pneumonia *Vet Clin North Am Food Anim Pract.* 2010; 26: 191-214.
- PATERSON D, BONOMO R. Extended-spectrum beta-lactamases: a clinical update *Clin Microbiol Rev* 2005; 18: 657-86
- PATERSON D, HUJER K, YEISER B, BONOMO M, RICE B, BOROMO R. Bloodstream isolates from seven countries dominance and wide spread prevalence of SHV and CTX-M type β -lactamases *Antimicrob Agents Chemother* 2003; 47: 3552-60

- PIJOAN 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 2000; 35 (2): 153-56.
- PIJOAN AP, AGUILAR R, MORALES A. Caracterización de los procesos neumónicos en becerros lecheros de la región de Tijuana, Baja California. Vet Méx 1999; 30: 149-155.
- POULSEN D, *et al.* *Pasteurella haemolytica* lipopolysaccharide-induced arachidonic acid release from a neutrophil adherence to bovine pulmonary artery endothelial cells. Am J Vet Res 1990; 51: 1635-1639.
- RICE JA, *et al.* *Mannheimia haemolytica* and bovine respiratory disease. Anim Health Res Rev 2007; 8: 117-128.
- RIDPATH J. The contribution of infections with bovine viral diarrhoea viruses to bovine respiratory disease. Vet Clin North Am Food Anim Pract 2010; 26: 335-348.
- SAMANIEGO BML, Determinación de Resistencia a antimicrobianos en cepas de *Mannheimia haemolytica* aisladas de muestras de exudado nasal de bovinos clínicamente enfermos de neumonía. (Tesis de licenciatura). Cuautitlán Izcalli, (Edo. de México) México: Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán. Universidad Nacional Autónoma de México, 2007.
- SIU LK. Antibiotics: action and resistance in gram-negative bacteria. J Microbiol Immunol Infect 2002; 35:1-11.
- SMITH JT, LEWIN CS. Mechanisms of antimicrobial resistance and implications for epidemiology. Vet Microbiol 1993; 35: 233-242.
- TRIGO T. El complejo respiratorio infeccioso de los bovinos y ovinos. Ciencia Veterinaria 1987; 4: 1-36.
- TRIGO T. Patogénesis y aspectos inmunológicos de la pasteurelisis pulmonar bovina. Vet Méx 1991; 22: 131-134.
- WATTS J, YANCEY RJ, SARAH A, Case C, Case S. A 4-year survey of antimicrobial susceptibility trends for isolated from cattle with bovine respiratory disease in North Am J of Clin Microbiol 1994; 32: 725-731.
- WATTS LJ, SWEENEY TM. Antimicrobial resistance in bovine respiratory disease pathogens: measures, trends, and impact on efficacy. Vet Clin North Am Food Anim Pract. 2010; 26: 79-8.
- ZECCHINON L, FETT T, DESMECHT D. How *Mannheimia haemolytica* defeats host defence through a kiss of death mechanism. Vet Res 2005; 36: 133-156.