

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE MEDICINA VETERINARIA  
Y ZOOTECNIA

“DETERMINACIÓN DE LA PRESENCIA DE LOS GENES DE LA  
INTEGRASA TIPO 1 Y TIPO 2, ASOCIADOS A PERFIL DE  
RESISTENCIA ANTIMICROBIANA EN *Histophilus somni*  
AISLADA DE BOVINOS Y OVINOS”.

TESIS  
QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE  
**MÉDICA VETERINARIA ZOOTECNISTA**

PRESENTA

**PMVZ. ITZEL ALVAREZ MARTINEZ**

Asesores:

MVZ. Dr. C. Francisco Aguilar Romero  
MVZ. Dr. C. Jesús Vázquez Navarrete

México, D.F.

2006



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.

## **DEDICATORIAS**

### **A MIS PADRES**

Por su cariño y ánimo para aprender a volar y dar los primeros pasos en este camino largo y hermoso que es mi vida.

### **A MIS HERMANAS**

De quienes aprendí la tolerancia, comprensión, apoyo y solidaridad.

### **A MIS FAMILIARES**

Quienes me apoyaron en momentos difíciles

### **A MIS AMIGOS**

Porque fueron mi fuente de la cual pude llenarme de energía cuando más débil me sentía.

### **NEGRO**

Porque te lo prometí nunca te olvidaré.

### **A TODOS LOS QUE CREYERON EN MI**

Eso me lleno de valor.

### **A MI PAIS**

## **AGRADECIMIENTOS**

Al MVZ. DC Francisco Aguilar Romero quien me guió y apoyó durante estos últimos años para este trabajo y desenvolvimiento académico.

Al MVZ. DC. Jesús Vázquez Navarrete por orientarme y transmitirme sus conocimientos para concretar este trabajo.

A Sara Nieto Landaverde por instruirme desde el principio en el trabajo de laboratorio y su amistad.

A la Sra. Ernestina Canchola por su apoyo incondicional.

A todo el personal de Bacteriología, INIFAP, Palo Alto, por apoyarme, animarme y guiarme.

A mis queridas Brujas y amigos sin ustedes no hubiera llegado hasta aquí.

A Jimena Mendoza Villalobos porque lo logramos juntas.

A Viviana, Francisco, Juan Carlos, Roy, por su apoyo y por creer en mí.

A José Luís Contreras por tu tiempo, dedicación y tolerancia.

Al Dr. Reyes Díaz Ordaz por su colaboración y paciencia.

A los integrantes de mí jurado por su orientación, tiempo y trabajo.

El presente trabajo fué realizado en el Centro Nacional de Investigación Disciplinaria en Microbiología Animal, INIFAP, Palo Alto, Km. 15.5 carretera México-Toluca. Col. Palo Alto. Del. Cuajimalpa, México, Distrito Federal, parcialmente financiado por los proyectos SEP- CONACyT G38590-B y 43-93, y SAGARPA- CONACyT No. 12406.

# CONTENIDO

	<b>Página</b>
<b>TITULO</b> _____	I
<b>DEDICATORIAS</b> _____	II
<b>AGRADECIMIENTOS</b> _____	III
<b>ABREVIATURAS</b> _____	V
<b>CONTENIDO</b> _____	VI
<b>ÍNDICE DE CUADROS</b> _____	VIII
<b>ÍNDICE DE FIGURAS</b> _____	IX
<b>RESUMEN</b> _____	1
<b>1. INTRODUCCIÓN</b> _____	2
1.1. Hipótesis _____	10
1.2. Objetivo general _____	11
1.3. Objetivos _____	11
<b>2. MATERIAL Y MÉTODOS</b> _____	12
2.1. Cepas y condiciones de cultivo _____	12
2.2. Extracción de ADN con tiosinato de guanidina _____	12
2.3. PCR para subunidad 16S ribosomal _____	13
2.4. Prueba de difusión en agar _____	14
2.5. Concentración Mínima Inhibitoria _____	15
2.6. PCR para Integrasa Tipo 1 _____	16
2.7. PCR para Integrasa Tipo 2 _____	17
2.8. Análisis estadístico _____	17
<b>3. RESULTADOS</b> _____	19
3.1. Identificación de las cepas _____	19
3.2. Extracción de ADN _____	21
3.3. Identificación de la subunidad 16S ribosomal _____	21
3.4. Prueba de difusión en agar _____	22
3.5. CMI _____	24
3.6. Identificación del gene de la Integrasa tipo 1 y 2 _____	26
3.7. Análisis estadístico _____	28
<b>4. DISCUSIÓN</b> _____	32
<b>5. CONCLUSIONES</b> _____	36
<b>6. PERSPECTIVAS</b> _____	37

<b>7. RECOMENDACIÓN</b>	<b>37</b>
<b>8. LITERATURA CITADA</b>	<b>38</b>

## ÍNDICE DE CUADROS

	Pág.
<b>CUADRO 1.</b> PRODUCCIÓN PECUARIA EN MÉXICO 2000-2004 _____	4
<b>CUADRO 2.</b> INVENTARIO NACIONAL OVINO _____	5
<b>CUADRO 3.</b> IMPORTACIONES DE OVINO _____	5
<b>CUADRO 4.</b> PARÁMETROS UTILIZADOS PARA DETERMINAR SI LAS BACTERIAS SON SUSCEPTIBLES, INTERMEDIAS Y RESISTENTES _____	14
<b>CUADRO 5.</b> PARÁMETROS UTILIZADOS PARA DETERMINAR LA CMI _____	16
<b>CUADRO 6.</b> NÚMERO DE CEPAS Y ANIMAL DE PROCEDENCIA CON ÓRGANO DE MESTREO _____	19
<b>CUADRO 7.</b> HALOS DE INHIBICIÓN EN MILÍMETROS _____	22
<b>CUADRO 8.</b> AISLAMIENTOS RESISTENTES _____	23
<b>CUADRO 9.</b> PRUEBA DE CMI CON AISLAMIENTOS RESISTENTES EN LA PRUEBA DE DIFUSIÓN EN AGAR _____	25
<b>CUADRO 10.</b> VALORES DE $Kappa, p$ , CONCORDANCIA PARA LA RELACIÓN ENTRE QUIMIOTERAPÉUTICOS RESISTENTES EN PRUEBAS DE LA DIFUSIÓN EN AGAR Y EL GENE DE LA INTEGRASA TIPO 1 _____	29
<b>CUADRO 11.</b> VALORES OBTENIDOS EN LA PRUEBA ESTADÍSTICA PARA MEDIR RELACIÓN ENTRE RESULTADOS DE RESISTENCIA A QUIMITERAPÉUTICOS Y PRESENCIA DEL GENE DE LA INT. TIPO 2 _____	30
<b>CUADRO 12.</b> RESULTADOS DE ANÁLISIS ESTADÍSTICO ENTRE QUIMIOTERAPÉUTICOS (CMI) Y RELACIÓN CON EL GENE DE LA INTEGRASA TIPO 1 _____	31
<b>CUADRO 13.</b> RESULTADOS DE $kappa, p$ Y CONCORDANCIA BRUTA ENTRE RESISTENCIA EN LA PRUEBA DE CMI Y LA PRESENCIA DEL GENE DE LA INTEGRASA TIPO 2 _____	31



## ÍNDICE DE FIGURAS

	Págs.
<b>FIGURA 1.</b> ESTRUCTURA, FUNCIONAMIENTO Y SIGNIFICADO DE LOS INTEGRONES BACTERIANOS_____	9
<b>FIGURA 2.</b> AISLAMIENTO DE <i>H. somni</i> EN PLACA DE AGAR CHOCOLATE_____	20
<b>FIGURA 3.</b> ACERCAMIENTO DE AISLAMIENTO DE <i>H. somni</i> EN PLACA_____	20
<b>FIGURA 4.</b> ADN DE CEPAS DE <i>H. somni</i> _____	21
<b>FIGURA 5.</b> AMPLIFICACIÓN DE LA SUBUNIDAD 16S RIBOSOMAL PARA IDENTIFICAR <i>H. somni</i> _____	21
<b>FIGURA 6.</b> PORCENTAJE DE RESISTENCIA DE DIFERENTES QUIMIOTERAPÉUTICOS_____	23
<b>FIGURA 7.</b> PORCENTAJE DE AISLAMIENTOS MULTI-RESISTENTES_____	24
<b>FIGURA 8.</b> CMI DE UN AÍSLAMIENTO <i>H. somni</i> _____	25
<b>FIGURA 9.</b> PORCENTAJE DE AISLASMIENTOS QUE AMPLIFICARÓN EL GENE DE LA INTEGRASA TIPO 1_____	26
<b>FIGURA 10.</b> AMPLIFICACIÓN DE LA INTEGRASA TIPO 1_____	27
<b>FIGURA 11.</b> PORCENTAJE DE AISLAMIENTOS QUE AMPLIFICARÓN AL GENE DE LA INTEGRASA TIPO 2_____	27
<b>FIGURA 12.</b> AMPLIFICACIÓN DEL GENE DE LA INTEGRASA TIPO 2_____	28

(1)

## RESUMEN

ALVAREZ MARTÍNEZ ITZEL. "Determinación de la presencia de los genes de la Integrasa tipo 1 y 2, asociados a perfil de resistencia antimicrobiana en *Histophilus somni* aislada de bovinos y ovinos". (Bajo la dirección del: Dr. Francisco Aguilar Romero y el Dr. Jesús Vázquez Navarrete).

Investigaciones recientes demostraron que *Haemophilus somnus*, *Haemophilus agni* e *Histophilus ovis* representan la misma especie, por lo que se reclasificaron en *Histophilus somni*. Este género se ha asociado a enfermedades respiratorias y reproductivas en bovinos y ovinos, además de asociarse a casos de meningoencefalitis tromboembólica; su tratamiento consiste en penicilinas, ampicilinas, cefalosporinas, tetraciclinas, gentamicina, eritromicina y sulfas-trimetoprim principalmente; su uso es indiscriminado por lo que han desarrollado resistencia a los mismos; el objetivo del presente trabajo fue determinar la presencia de los genes de la integrasa tipo 1 y tipo 2 así como su relación con la resistencia a quimioterapéuticos en aislamientos de *H. somni* obtenidos de bovinos productores de leche enfermos y tracto reproductor de ovinos jóvenes clínicamente sanos. Las cepas previamente identificadas como *H. somni* fueron sembradas en placas de agar chocolate e incubadas en atmósfera de 10% de CO<sub>2</sub> durante 48 horas. Posteriormente se realizó la PCR para amplificar un segmento de 407 pb de la subunidad 16S ribosomal que confirmó la identificación de *H. somni*. Se elaboraron pruebas de difusión en placa, y pruebas de CMI para determinar el perfil de resistencia antimicrobiana. Posteriormente se hizo la PCR para amplificar fragmentos de genes de la integrasa tipo 1 y 2. Las cepas presentaron patrones de multiresistencia antimicrobiana en un 54.16%. Además de encontrarse una relación en un análisis estadístico de concordancias; los resultados fueron buena concordancia entre penicilina (0.818), sulfametoxazol-trimetoprim (0.750), tetraciclina (0.875) y eritromicina (0.833) con el gene de la integrasa tipo 1; y de la estreptomomicina con el de la integrasa tipo 2 (0.833). Estos fragmentos amplificados por PCR tienen un peso aproximado de 1000 pb y 570 pb respectivamente. Se concluye que existe relación concordante de los genes de la integrasa tipo 1 y 2 con la resistencia a quimioterapéuticos.

## 1. INTRODUCCIÓN

La producción mundial de leche de vaca se concentra en pocos bloques de naciones, la Unión Europea (UE) y la Federación Rusa (FR) con el 31.9 % y 7.8% respectivamente así como en naciones como EUA con el 18.9%, la India con el 9% así como en Brasil y China, con aportes superiores al 5.0 % cada una. En el caso de México su aportación a la producción total mundial fue en 2004 de 2.4%<sup>1</sup> Independientemente de los niveles de producción, entre los primeros lugares a nivel mundial se encuentran naciones cuya producción, por importante que sea, es deficitaria para cubrir su demanda interna, siendo el caso de China y México y otros países, cuya producción sobrepasa sus necesidades y se ubican como importantes exportadores, siendo el caso de la UE, EUA, y Nueva Zelanda<sup>1</sup>.

En México las actividades pecuarias mantienen una gran importancia en el contexto socioeconómico del país, han servido de base al desarrollo de la industria nacional, ya que proporcionan alimentos, materias primas, divisas, empleo, distribuyen ingresos en el sector rural y utilizan recursos naturales que no tienen cualidades adecuadas para la agricultura u otra actividad productiva. La ganadería es la actividad productiva más diseminada en el medio rural, pues se realiza sin excepción en todas las regiones ecológicas del país y aún en condiciones adversas de clima, que no permiten la práctica de otras actividades productivas<sup>2</sup>.

Se estima que en total la superficie aprovechada por la ganadería es superior a los 110 millones de Ha, representando aproximadamente el 60% de la superficie del territorio nacional, en donde 107.8 millones de Ha corresponden a pastizales y más de 2 millones son superficies agrícolas cuyo producto se

destina fundamentalmente al consumo animal (granos forrajeros y forrajes de corte)<sup>2</sup>.

La población de ganado bovino en 1989 se estimó en 32, 536, 000 de cabezas de las cuales el 80.53 % corresponde a ganado productor de carne y el 19.47% corresponden a ganado productor de leche.

De 1990 a 1999, la producción total de carnes pasó de 2.7 millones de Ton a 4.2 millones, lo que implicó un crecimiento relativo del 56%; y un crecimiento absoluto de 1.5 millones de toneladas<sup>2</sup>.

Por su parte, el precio medio de la carne bovina en canal creció 3.4% a nivel nacional, alcanzando 23,348 pesos por Ton en el 2002 contra 22,588 por Ton en 2001.

En la producción nacional de leche de vaca en el 2004 fue de 9,974.7.8 millones de litros (Cuadro 1) lo que marcó una moderada diferencia de 0.9 % con respecto a la producción del año 2003. Con base a este datos la TMCA es del 3.0% en los últimos 10 años. <sup>3</sup>

Siendo los estados con mayor producción cárnica Chihuahua, Sonora, Zacatecas y los mayores productores de leche Chihuahua, Baja California Norte e Hidalgo.

**Cuadro 1.**  
**PRODUCCIÓN PECUARIA EN MÉXICO 2000-2004, 2004\* ESTIMADO**  
 1/ MILES DE TONELADAS, 2/ MILLONES DE LITROS. ÚLTIMA ACTUALIZACIÓN: 06/05/05<sup>4</sup>.

**Producción pecuaria en México 2000 - 2004**

	2000	2001	2002	2003	2004*
Leche 2/	9,442.6	9,640.6	9,804.8	9,936,197	9,974.7
Bovino	9,311.4	9,500.7	9,658.3	9,784.4	9,813.7
Carne 1/	4,359.5	4,483.0	4,720.9	4,804.5	4,920.7
Bovino	1,408.6	1,428.4	1,467.6	1,503.8	1,532.0
Ovino	38.8	36.0	38.2	42.2	42.3

En México el inventario ovino ha ascendido lentamente (Cuadro 2) así como la producción total de carne ovina en rastros municipales lo cual se vio reflejado como un aumento en el 2002 de 37.9 miles de Ton, con respecto al año anterior con 32.0 miles de Ton, sin embargo la producción de esta especie en el país es deficiente ya que las importaciones de cabezas y carne de ovino se observan en ascenso (Cuadro 3) ya que la participación de la producción ovina nacional en el consumo ha descendido, lo cual puede observarse del año 1998 con el 46.9% al 2001 con un porcentaje de 37.9%.

Los principales Estados productores ovinos son: el Estado de México, Hidalgo, Puebla, San Luís Potosí y Zacatecas en el 2003<sup>5</sup>.

**Cuadro 2.**  
INVENTARIO NACIONAL OVINO

<b>Año</b>	<b>Miles de cabezas</b>	<b>Año</b>	<b>Miles de cabezas</b>
1991	5877	1996	6186
1992	5705	1997	6272
1993	6366	2000	6045
1994	6457	2001	6164
1995	6195		

**Cuadro 3.**  
IMPORTACIONES DE OVINO

<b>Año</b>	<b>Cabezas (Miles)</b>	<b>Carne (Miles/TON)</b>
1997	295.3	21.5
1998	310.1	26.9
1999	333.9	33.7
2000	381.5	44.3
2001	398.0	48.8

La ganadería y ovinocultura mexicanas cuentan con diferentes sistemas de producción, los cuales están asociados principalmente a: rangos tecnológicos, adaptación a las áreas geográficas en donde se desarrollan, la afinidad productiva y las tendencias ancestrales de producción.

Existe en México una gran variedad de sistemas productivos que se diferencian entre sí por el nivel de tecnología aplicada, el nivel de integración vertical y horizontal y los mercados que atienden, los cuales de acuerdo a sus principales características se agrupan en tres categorías: tecnificado, semi-tecnificado y de traspatio o de autoabastecimiento<sup>1-5</sup>.

La distribución se ve influida por productores de tipo progresista en el Norte del país, así como por la capacidad económica de inversión, en donde también es superior en los estados del Centro y Norte de México, aunque en los últimos años se observa un desarrollo sustantivo de empresas tecnificadas e integradas en la región Sureste del país<sup>1-5</sup>.

Uno de los aspectos que guarda importancia en la producción de carnes y otros alimentos de origen ganadero es la sanidad animal, debido a que la presencia de enfermedades zoonóticas y otras que representan elevados costos en la producción, tanto por la aplicación de tratamientos para su control o eliminación, así como por la reducción de la productividad y la pérdida por muerte del ganado<sup>6</sup>.

Entre las causas que afectan al ganado se encuentran las enfermedades respiratorias y las enfermedades reproductivas.

En este complejo de enfermedades participan factores del medio ambiente como temperatura y humedad, y factores de manejo como hacinamiento, nutrición y agentes infecciosos. Su conocimiento es fundamental para lograr un control eficiente además de la adopción de medidas preventivas como la inmunización, corrección de condiciones de manejo y nutrición<sup>6</sup>.

Lo anterior ha conllevado a que desde hace muchos años las autoridades se aboquen a su control y erradicación bajo diferentes esquemas. El más reciente, ha conjugado la participación del gobierno Federal con la de los estatales y los productores, bajo la modalidad de campañas zoonitarias.

Para la realización de las diferentes acciones que conforman estas campañas, las autoridades federales, estatales y los productores, conjuntan sus recursos y esfuerzos a través del programa Alianza para el Campo con el objetivo de

establecer pruebas diagnósticas, aplicación de biológicos, actividades de difusión, monitoreo en estados libres y en erradicación, atención en caso de brotes, constatación y capacitación, entre otras<sup>6</sup>.

Sin embargo poco puede referirse a estudios sobre el impacto económico que tienen las enfermedades respiratorias y reproductivas en la producción de ganado ya que para hablar de ello tendrían que existir herramientas suficientes como censos ganaderos actualizados, registros epidemiológicos de todo el país, y un estudio comparativo entre ellos, el cuál no existe.

Se debe prestar especial atención a los animales en las tres primeras semanas de incorporación a la producción. Para realizar los tratamientos en forma eficiente es aconsejable realizar la necropsia de algún animal no tratado y representativo del problema para estudios patológicos, identificación del agente etiológico y realización de pruebas de susceptibilidad a los quimioterapéuticos<sup>6</sup>.

Entre los agentes relacionados a dichas enfermedades se encuentra *Histophilus somni* (*Haemophilus somnus*) el cual se ha reconocido como un agente involucrado en diferentes patologías del ganado bovino y ovino.

Entre ellas: bronconeumonías además de involucrarse en el complejo respiratorio bovino, vaginitis, endometritis, abortos, cervicitis, orquitis, epididimitis, miocarditis, otitis, poliartritis y mastitis<sup>7-20</sup>.

Además de ser reconocido como agente causal de la meningoencefalitis tromboembólica (METE)<sup>21-23</sup>.

*H. somni* se ha descrito como un cocobacilo pleomorfo, Gram negativo, micro-aerófilo (10% de CO<sub>2</sub>), inmóvil, con colonias de color blanco-amarillento. No requiere de factores X (nicotinamida-adenin-dinucleótido) ni V (porfirinas), es



catalasa negativo, con hemólisis variable, indol variable, ureasa negativo, glucosa positivo, reducción de nitratos positivo, lactosa negativo, manitol positivo, ornitina-descarboxilasa positivo y arginina-dihidrolasa negativo<sup>24-26</sup>.

Taxonómicamente ha sido reorganizado dentro de la familia *Pasteurellaceae*; lo cuál se logró a través del análisis de la secuenciación de la subunidad 16S ARNr y del gen *rpoB* de cepas previamente examinadas a través de hibridación de ADN- ADN demostrando que *Haemophilus somnus*, *Haemophilus agni* e *Histophilus ovis* son la misma especie por lo que han sido reclasificadas como *Histophilus somni*<sup>27,28</sup>.

Existe poca información sobre el impacto económico que produce *H. somni* en la industria ganadera tanto en México como a nivel mundial; sin embargo se sabe que participa en forma conjunta con otros microorganismos produciendo enfermedades reproductivas y respiratorias, por lo que puede estimarse que afecta de forma importante a las explotaciones tanto bovina como ovina, repercutiendo en una baja productividad.

Para el control de este tipo de enfermedades se utilizan de forma rutinaria quimioterapéuticos como penicilinas, ampicilinas, cefalosporinas, tetraciclinas, gentamicina, eritromicina y sulfas-trimetoprim<sup>29-32</sup>, sin embargo su uso es indiscriminado, lo que origina como consecuencia que los microorganismos expuestos adquieran factores de resistencia a través de varios mecanismos genéticos, como lo son: conjugación, transducción y transformación. *H. somni* lleva a cabo frecuentemente procesos de conjugación para transferir genes de resistencia por medio de plásmidos<sup>26</sup>.

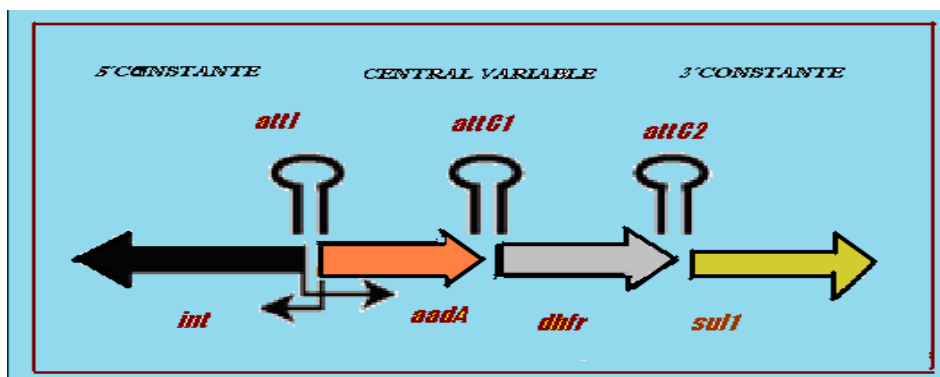
Los plásmidos que se relacionan con la resistencia se les llama plásmidos R los cuales suponen problemas serios ya que tienen características tales como:

evolución en respuesta a presiones selectivas ambientales y exposición a quimioterapéuticos, así como la capacidad de conferir varias características que de resistencia simultáneamente a la célula receptora. Otros elementos genéticos son los transposones que tienen la capacidad de adquirir nuevos cassettes a partir de otras especies.<sup>33-36</sup>

Dentro de los transposones se han encontrado mecanismos de resistencia independientes; los integrones y las integrasas. Un integrón se puede definir como un elemento genético dinámico en el cual se reconocen mayoritariamente genes de resistencia a quimioterapéuticos para lo cual se requiere una recombinasa sitio-específica la cual es llamada integrasa. Para lo que resulta importante mencionar la estructura de un integrón; el cual se divide fundamentalmente en tres regiones<sup>35,36</sup>.

- Una región constante 5´ que contiene el gen de la integrasa.
- Una región central variable en la que se localizan los genes del integrón (fundamentalmente genes de resistencia a quimioterapéuticos).
- Otra región constante 3´ en la que se encuentra un gen de resistencia a sulfamidas y otros dos marcos abiertos de lectura.

#### ESQUEMA DE LA ESTRUCTURA DE UN INTEGRÓN



**Figura 1. ESTRUCTURA, FUNCIONAMIENTO Y SIGNIFICADO DE LOS INTEGRONES BACTERIANOS.<sup>36</sup>**

Existen tres clases de integrones relacionados con la resistencia a quimioterapéuticos, los cuales difieren en la secuencia aminoacídica de sus integrasas<sup>36</sup>.

Los integrones clase 1 son los más estudiados y mejor caracterizados principalmente por su alta diseminación, esta clase de integrones poseen un segmento conservado en el extremo 3' (3'CS) donde se ubican los genes *qacE*<sub>1</sub> y *sul1* que codifican resistencia a compuestos de cuaternario de amonio, y sulfonamidas, respectivamente, los integrones clase 2, cuyo gene *intl* posee sólo un 42 % de similitud con el de la integrasa clase 1 y no tiene la secuencia 3'CS, posee una mutación puntual que genera un codón de término hacia el final de la secuencia del gene *intl 2*, generando una proteína truncada con limitada eficiencia en su función, esta clase de integrones se han asociado con Tn7 y Tn5<sup>36</sup>. Finalmente la integrasa clase 3 posee 62% de similitud con la integrasa clase 1 y sólo ha sido descrita en algunas cepas aisladas en Japón<sup>38</sup>. Dado que en México se usan los quimioterapéuticos de forma indiscriminada tanto en terapéutica como en forma de aditivos en alimento para animales, es muy factible que se desarrolle resistencia a los mismos, por lo que se puede plantear la siguiente hipótesis:

## 1.1. HIPÓTESIS

Las cepas de campo de *Histophilus somni* obtenidas de ovinos y bovinos, presentan el gen de la integrasa tipo 1 y tipo 2, por lo tanto resistencia a diversos quimioterapéuticos.

## 1.2. OBJETIVO GENERAL

Determinar el perfil de resistencia a quimioterapéuticos y la presencia de genes de la integrasa tipo 1 y 2 en aislamientos de *H. somni* obtenidos de bovinos y ovinos y encontrar relación entre éstos.

## 1.3. OBJETIVOS

1. Identificar cepas resistentes a diferentes quimioterapéuticos por medio de difusión en agar y concentración mínima inhibitoria (CMI).
2. Por medio de PCR amplificar un segmento de 407 pb de la subunidad 16S ARNr en *H. somni*.
3. Reconocer mediante PCR al gene de la integrasa tipo 1.
4. Reconocer mediante PCR al gene de la integrasa tipo 2.
5. Determinar la relación entre las cepas resistentes a diferentes quimioterapéuticos con las que contengan el gene de la integrasa tipo 1 y 2.
6. Analizar y correlacionar el patrón de resistencia con respecto a la presencia del gene de la integrasa tipo 1 y 2.

## 2. MATERIAL Y MÉTODOS

### 2.1. Cepas y condiciones de cultivo.

Se trabajó con 24 cepas de *H. somni*, de las cuales 13 fueron recuperadas de prepucio y vagina de ovinos jóvenes clínicamente sanos de rebaños del Estado de México y 11 de origen bovino, de las cuales 6 se aislaron de pulmones neumónicos, 4 de casos de metritis y 1 de prepucio. También se trabajó con una cepa tipo de la ATCC como control.

Las cepas se incubaron en agar chocolate<sup>1</sup> en ambiente micro-aerofílico<sup>2</sup> (10% de CO<sub>2</sub>) por 24 horas, para posteriormente conservarlas en refrigeración a 2 °C y resemebrarse cada 8 días.<sup>24-26,39</sup>

### 2.2. Extracción de ADN con tiocinato de guanidina.

De un cultivo en placa se obtuvieron el mayor número de colonias y se agregaron 550 µl de solución de lisis (tiocinato de guanidina<sup>3</sup> 5M, EDTA<sup>4</sup> 0.1 M y sarcocyl<sup>5</sup> 0.5) , se agregaron 250 µl de acetato de amonio<sup>6</sup> 7.4 M, posteriormente se colocaron en hielo por 10 minutos, se adicionaron 500 µl de cloroformo alcohol isoamílico<sup>7</sup> (25:1) y se mezclaron, se centrifugó<sup>8</sup> a 4,500 g durante 5 minutos, se tomó el sobrenadante y volvió a lavarse con cloroformo alcohol isoamílico, se tomó el sobrenadante y se precipitó con 0.7 de volumen de isopropanol<sup>9</sup> por 15 minutos, se centrifugó a 6,500 g por 10 minutos , se

---

<sup>1</sup> Nutrient broth bactoagar, y extracto de levadura de Laboratorios DIFCO y sangre de bovino, ovino y equino.

<sup>2</sup> NUAIRE™ US AUTOFLOW CO<sub>2</sub> Water-Jacketed Incubator, Accesolab.

<sup>3</sup> Laboratorio SIGMA-ALDRICH, ≥97%

<sup>4</sup> Sambrook, Maniatis T. Molecular Cloning. A laboratory manual Second Edition, USA: Cold Spring Harbor Laboratory Press: 1989.

<sup>5</sup> Laboratorios SIGMA-ALDRICH. N. Lauroulsarcosine sodium ultra ≥94%

<sup>6</sup> ANASOL<sup>MR</sup> reactivo analítico, lab TECSIQUIM; SA de CV.

<sup>7</sup> Cloroformo-alcohol isoamílico 1:25, Reactivo Baker®

<sup>8</sup> Centrífuga EPPENDORF modelo 5410.

<sup>9</sup> Laboratorio Merk

desechó el sobrenadante, se adicionaron 200  $\mu\text{l}$  de etanol absoluto<sup>10</sup> y se mezcló, posteriormente se centrifugó a 8,000 g durante 15 minutos, se decantó y eliminó el sobrenadante, se dejó evaporar el etanol, se resuspendió en 100  $\mu\text{l}$  de agua destilada estéril, se almacenó a  $-20^{\circ}\text{C}$ .

### **2.3. PCR para identificar subunidad 16S ribosomal.**

Del ADN extraído se utilizaron 2  $\mu\text{l}$  para adicionarse a 48  $\mu\text{l}$  de una mezcla de 10mM Tris/HCl pH 8.3, 50 mM MgCl (5  $\mu\text{l}$ ), por 2  $\mu\text{l}$  de desoxirribonucleótidos trifosfatos (100 $\mu\text{M}$ )<sup>11</sup>, con 1.5  $\mu\text{l}$  del oligonucleotido 1 (3´GAAGGCGATTAGTTTAAGAG5´) y 1.5  $\mu\text{l}$  del oligonucleotido 2 (5´TTCGGGCACCAAGTATTCA3´), 0.5  $\mu\text{l}$  de Taq polimerasa y 36  $\mu\text{l}$  de H<sub>2</sub>O.

El primer ciclo de desnaturalización es a  $94^{\circ}\text{C}$  por 3 minutos y se sometió a 35 ciclos de desnaturalización a  $95^{\circ}\text{C}$  por 1 minuto, alineó a  $55^{\circ}\text{C}$  por 1 minuto y se extendió a  $72^{\circ}\text{C}$  por un minuto en el termociclador<sup>12</sup>.

Se visualizó la muestra de 10  $\mu\text{l}$  en gel de agarosa<sup>13</sup> al 1% con bromuro de etidio<sup>14</sup> y con Tris/borato como buffer de acuerdo a los protocolos de electroforesis, se visualizó en un digitalizador de UVP<sup>15</sup>, finalmente se buscó amplificar un segmento de 407 pb.<sup>27,28</sup>

---

<sup>10</sup> Reactivo Baker®

<sup>11</sup> PCR Master Mix ,Lab QUIAGEN

<sup>12</sup> PERKIN ELMER Gene Ampl. PCR System 2400.

<sup>13</sup> INVITROGENE, Ultrapure 500gm y BIXON de México.

<sup>14</sup> Laboratorio SIGMA

<sup>15</sup> UVP BIOLMAGING SYSTEMS, EPI CHEM II Darroom.

## 2.4. Prueba de difusión en agar (Antibiograma).

Para cada aislamiento se preparó un inóculo en dilución en el espectrofotómetro<sup>16</sup> a 75% de transmitancia a 610 nm de longitud de onda da una concentración de 10<sup>8</sup> UFC/ml. Posteriormente se inocularon 2 ml de ésta suspensión en agar chocolate en donde se colocaron los sensidiscos<sup>17</sup> de ampicilina (10 µg), ceftiofur (30 µg), penicilina (10 UI), tetraciclina (30 µg), sulfametoxazol- trimetoprim (23.75/1.25 µg), estreptomina (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 llevó a cabo con un vernier midiendo el diámetro del halo de inhibición. El criterio para considerar a una cepa susceptible o resistente a determinado terapéutico se basó en los parámetros enlistados en la siguiente tabla (Cuadro 4)<sup>39-41</sup>.

**Cuadro 4.**  
PARÁMETROS UTILIZADOS PARA DETERMINAR SI LAS BACTERIAS SON SUSCEPTIBLES, INTERMEDIAS O RESISTENTES.

Quimioterapéutico	Zona de inhibición resistente (mm)	Zona de inhibición intermedia (mm)	Zona de inhibición susceptible (mm)
Ampicilina	11 ó menos	12-13	14 ó más
Tetraciclina	14 ó menos	15-18	19 ó más
Penicilina	11 ó menos	12-21	22 ó más
Cetiofur	17 ó menos	18-20	21 o más
Estreptomina	11 ó menos	12-14	15 ó más
Gentamicina	13 ó menos	-----	13 ó más
Sulfametoxazol-trimetoprim	16 ó menos	-----	16 ó más
Eritromicina	13 ó menos	14-17	18 ó más

<sup>16</sup> BACHARACH. Cole man, modelo 35.

<sup>17</sup> Becton.Dickinson and Company (BD,BBL®)

## 2.5. Concentración mínima inhibitoria (CMI).

Se prepararon cultivos bacterianos de 24 horas, para posteriormente inocular 3 ó 4 colonias aisladas en 5 ml en solución salina fisiológica ajustando la turbidez correspondiente a  $10^8$  UFC/ml en el espectrofotómetro. Se realizaron diluciones al 1/100 de cada inóculo (0.2 ml de éste inóculo en 19.8 ml de caldo BHI para *H. somni*), para obtener inóculo de  $10^6$  UFC/ml. Se prepararon 15 tubos con 1 ml de caldo BHI para *H. somni*<sup>18</sup> y otro con 1.8 ml. Se preparó una solución madre de cada quimioterapéutico<sup>37</sup> al cual resultaron resistentes los aislamientos (estreptomicina, gentamicina, sulfametoxazol, penicilina)<sup>19</sup> de acuerdo a el tipo de dilución establecido por el National Committee for Clinical Laboratory Standards (NCCLS) a una concentración de 5.120 µg/ml. Se añadieron 0.2 ml de solución madre del antibiótico<sup>39</sup> al tubo que contiene 1.8 ml de caldo y a partir 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 que tubo no hubo crecimiento bacteriano. El criterio para considerar a una cepa susceptible o resistente a determinado terapéutico se basó en los parámetros enlistados en la Cuadro

5.<sup>31, 32,41</sup>

---

<sup>18</sup> BHI caldo 37gr de lab Merk, TRIS 1gr Cpb 1L Lab BBL, Almidon soluble 1gr y Acetato de sodio Reactivo Baker® esterilizar por calor húmedo y enfriar, Tiamina monofosfatada 1µg/ml Lab Merk esteril por filtración.

<sup>19</sup> Laboratorio SIGMA



**Cuadro 5.**

PARÁMETROS UTILIZADOS PARA DETERMINAR LA CMI.

QUIMIOTERAPÉUTICO	SUSCEPTIBLE µg/ml	RESISTENTE µg/ml
Sulfametoxazol-trimetoprim	<2	>4
Penicilina	<2	>4
Gentamicina	0.78	6.25
Estreptomicina	1.56	>100
Eritromicina	<1	>8
Tetraciclina	<4	>16

## 2.6. PCR para identificación de la integrasa tipo 1.

Se elaboró una premezcla con buffer 10x con MgCl<sub>2</sub> 1-5mM (5µl), 2µl de dNTPS, 1.5µl de oligonucleótido 3 cs (5´GGC ATC CAA GCA GCA AGC3´), 1.5 µl de oligonucleotido 5 cs (5´AAG CAG ACT TGA CCT GAT3´), 0.5 µl de Taq polimerasa<sup>20</sup>, y 36.5 µl de deH<sub>2</sub>O destilada<sup>21</sup>.

Se mezclaron 3 µl de ADN con 47µl de la premezcla. El primer ciclo duró 5 minutos con una temperatura de 94 °C seguido por 35 ciclos de 45 segundos a una temperatura de 94 °C, 35 ciclos de 50 °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.

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, se visualizó en un digitalizador UVP. Se espera amplificar un segmento de 1000 pb<sup>42</sup>.

<sup>20</sup> PCR Master Mix , laboratorio QUIAGEN

<sup>21</sup> PCR Master Mix , laboratorio QUIAGEN

## 2.7. PCR para identificación de la integrasa tipo 2.

Se elaboró una premezcla<sup>†</sup> con buffer 10x con MgCl<sub>2</sub> 1-5mM (5µl), 2µl de dNTPS, 1.5µl de oligonucleótido INBR1 (5'ATCGCAATAGTTGGCGAGT3'), 1.5 µl de oligonucleotido INBR2 (5'GCAAGGCGGAAACCCGCGCC3'), 0.5 µl de Taq polimerasa, y 36.5 µl de H<sub>2</sub>O destilada<sup>u</sup>.

Se midieron 3 µl de ADN que se mezclaron con 47µl de la premezcla. El primer ciclo dura 3 minutos con una temperatura de 94 °C seguido por 30 ciclos de 45 segundos a una temperatura de 94 °C, 35 ciclos de 53 °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.

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, se visualizó en un digitalizador UVP. Se espera amplificar un segmento de 233 pb<sup>43</sup>.

## 2.8. Análisis estadístico.

Los resultados de la prueba de resistencia antimicrobiana, CMI, la identificación de la integrasa tipo 1 y la integrasa tipo 2 se evaluaron a través de un análisis estadístico descriptivo en porcentajes en Excel.

Además de calcularse la concordancia,  $\rho$ ,  $kappa$  y prueba de hipótesis en el programa estadístico epidemiológico Epi Info (Epidat) con un intervalo de confianza del 95%. Tomando en cuenta que el valor máximo de un índice Kappa es 1, que se produce cuando existe un acuerdo total entre ambas variables, el valor mínimo no es cero sino que puede ser negativo indicando que el valor observado es menor que el esperado por el azar.

La concordancia se considera muy débil cuando los valores del índice Kappa son inferiores al 0.20, débil si está entre el 0.21-0.40, moderada entre 0.41-0.60, buena entre 0.61-0.80 y muy buena si es superior a 0.80.<sup>44</sup>

Además de observar que la prueba de hipótesis se basa en la nulidad de diferencias simbolizadas por  $H_0$  que se conoce como hipótesis de nulidad y  $H_a$  que se basa en la no nulidad de las diferencias  $H_0: K=0$ .

Por lo que se estableció que:

$H_0$ : Existe relación entre resistencia a cada quimioterapéutico y la presencia de el gene de la integrasa tipo 1.

$H_a$ : No existe relación entre resistencia a cada quimioterapéutico y la presencia del gene de la integrasa tipo 1.

Y la segunda hipótesis:

$H_0$ : Existe relación entre resistencia a cada quimioterapéutico y la presencia de el gene de la integrasa tipo 2.

$H_a$ : No existe relación entre resistencia a cada quimioterapéutico y la presencia del gene de la integrasa tipo 2.

Tomando en cuenta que pudieran ocurrir los cuatro casos siguientes:

1. Que  $H_0$  sea cierta y que la prueba estadística la acepte (rechace  $H_a$ ).
2. Que  $H_0$  sea cierta, pero que la prueba estadística la rechace (acepte a  $H_a$ ).

Para lo que se establece:  $H_0$  se acepta si la probabilidad de error es mayor de 5% ( $p \leq 0.05$ ), en cuyo caso se dice que la diferencia no es significativa.

### 3. RESULTADOS

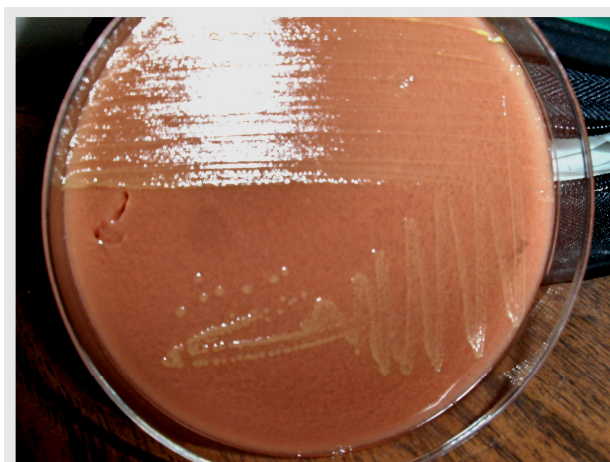
#### 3.1. Identificación de las cepas

De un total de 24 aislamientos se identificaron el 100% como *H. somni* (Cuadro 6). Encontrando así coco bacilos pleomórficos, Gram negativos, no móviles, micro-aereofílicos, con pigmento amarillo, y colonias de 0.2-0.5 mm de diámetro, convexas (figura. 2 y 3).

**Cuadro 6.**

NÚMERO DE CEPAS, EN TOTAL 24, SE INDICA SI EL FROTIS SE OBSERVÓ SI EL MICROORGANISMO ERA COCO BACILO GRAM NEGATIVO COMO +, Y EL ANIMAL DE PROCEDENCIA CON ÓRGANO DE MUESTREO.

Número	Nombre	Frotis	Procedencia
1	35♀	+	Ovino, vagina
2	54♂	+	Ovino prepucio
3	55♂	+	Ovino prepucio
4	56♂	+	Ovino prepucio
5	63♂	+	Ovino prepucio
6	71♂	+	Ovino prepucio
7	78♂	+	Ovino prepucio
8	122♂	+	Ovino prepucio
9	145♀	+	Ovino, vagina
10	73 B	+	Bovino pulmón
11	HS139	+	Bovino metritis
12	HS12	+	Bovino pulmón
13	HS16	+	Bovino pulmón
14	HS26	+	Bovino metritis
15	HS439	+	Bovino metritis
16	76♂	+	Ovino prepucio
17	79♂	+	Ovino prepucio
18	HSV585	+	Bovino metritis
19	HS11P	+	Bovino pulmón
20	HS1	+	Bovino pulmón
21	HS7	+	Bovino pulmón
22	HS27	+	Bovino prepucio
23	66♂	+	Ovino prepucio
24	ATCC	+	Referencia



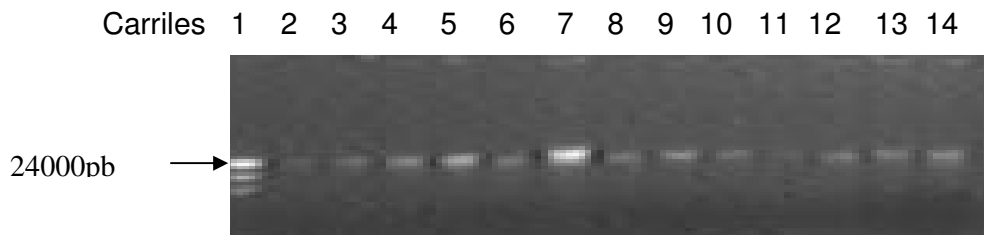
**Figura 2.** AISLAMIENTO DE *H. somni* EN PLACA DE AGAR CHOCOLATE



**Figuras 3.** ACERCAMIENTO DE AISLAMIENTO DE *H. somni* EN PLACA.

### **3.2. Extracción de ADN**

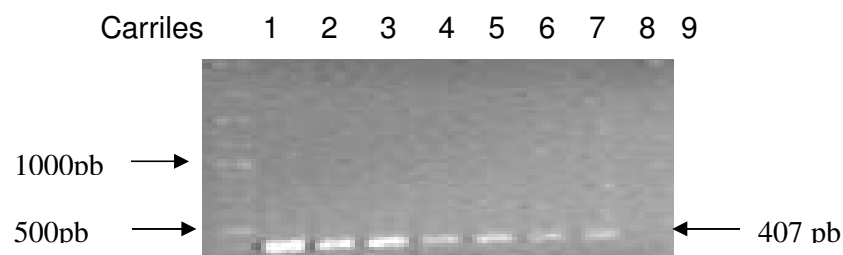
La extracción del ADN de los aislamientos a través del método de tiosinato de guanidina, se visualizó en un gel de agarosa al 1% lo cual se observa en la figura 4.



**Figura 4.** ADN DE CEPAS DE *H. somni*. 1. MARCADOR DE PESO MOLECULAR  $\lambda$  de pm 24000pb; 2-14. DIFERENTES AISLAMIENTOS DE *H. somni*

### 3.3. Identificación de la subunidad 16S ribosomal

En la PCR especie-específica todos los aislamientos amplificaron un segmento de 407 pb que corresponde a la subunidad 16S ribosomal (figura 5) igual que el obtenido con la cepa tipo (ATCC) de *H. somni*, por lo que se identificaron en forma definitiva como *H. somni*. Las cepas usadas como control negativo no se observó ninguna amplificación.



**Figura 5.** AMPLIFICACIÓN DE LA SUBUNIDAD 16S RIBOSOMAL PARA IDENTIFICAR *H. somni*. 1. MARCADOR DE PESO MOLECULAR 2 LOG; 2-7, AISLAMIENTOS DE *H. somni*; 8, ATCC (CONTROL+); 9, CONTROL NEGATIVO.

### 3.4. Prueba de difusión en agar.

Con los sensidiscos con quimioterapéuticos se observaron halos de inhibición los cuales se midieron y fueron sometidos a un estudio analítico que ayudó a definir aislamientos resistentes y susceptibles lo cuál se indica en la Cuadro 7.

**Cuadro 7.**  
**HALOS DE INHIBICIÓN EN MILÍMETROS, AM- AMPICILINA, TE- TETRACICLINA, P- PENICILINA, XNL- CEFTIOFUR, S- ESTREPTOMICINA, GM- GENTAMICINA, SXT- SULFAMETOXASOL TRIMETOPRIM, E- ERITROMICINA.**

<b>No.</b>	<b>AM</b>	<b>Te</b>	<b>P</b>	<b>XNL</b>	<b>S</b>	<b>GM</b>	<b>SXT</b>	<b>E</b>
1	27	27	30	30	17	14	30	18
2	29	24	25	25	11	12	23	23
3	30	23	28	30	11	18	21	26
4	23	25	17	23	9	12	15	23
5	30	25	24	26	18	17	22	26
6	24	24	30	24	10	11	20	16
7	27	22	20	22	13	13	15	20
8	30	20	26	24	10	14	12	14
9	27	26	26	26	11	16	30	20
10	30	21	30	30	10	13	20	24
11	27	22	25	22	13	14	26	27
12	27	18	25	27	14	14	22	25
13	24	24	28	23	8	17	22	23
14	30	25	25	30	14	17	26	20
15	27	22	29	23	11	14	15	22
16	30	30	30	30	10	16	30	25
17	30	25	23	23	10	11	20	20
18	30	25	29	28	12	19	24	30
19	30	26	30	30	0	14	26	28
20	30	27	28	30	12	18	24	22
21	27	21	26	30	10	12	18	25
22	30	30	30	30	15	20	30	30
23	28	23	30	30	13	17	22	23
ATCC	30	25	30	30	23	20	30	25

Esto indica la resistencia principalmente a estreptomicina, en segundo lugar a la gentamicina, y tercero para el sulfametoxasol-trimetoprim (Cuadro 8).

**Cuadro 8.**

AISLAMIENTOS RESISTENTES, COINCIDEN EN ESTREPTOMICINA Y GENTAMICINA MAYORITARIAMENTE, SIGUIENDO UN PATRÓN, ENCONTRANDO EN ALGUNAS MULTI-RESISTENCIA (MÁS DE 2). CONTROL ATCC NO PRESENTA NINGUNA RESISTENCIA. DEL TOTAL DE 24 SÓLO 1 NO PRESENTA RESISTENCIA LO QUE EQUIVALE A 0.1%

No.	Resistente a	No.	Resistente a	No.	Resistente a
1	GM	9	S,GM,E	16	S
2	GM, S	10	S,GM	17	S, GM
3	S	11	S,GM	18	S
4	P,S,GM, SXT	12	Te, S,GM	19	S, GM
5	-----	13	S	20	S
6	S,GM,E	14	S	21	S, GM
7	P,S, GM, SXT	15	S,GM,SXT	22	S
8	S,GM,SXT	ATCC	-----	23	S

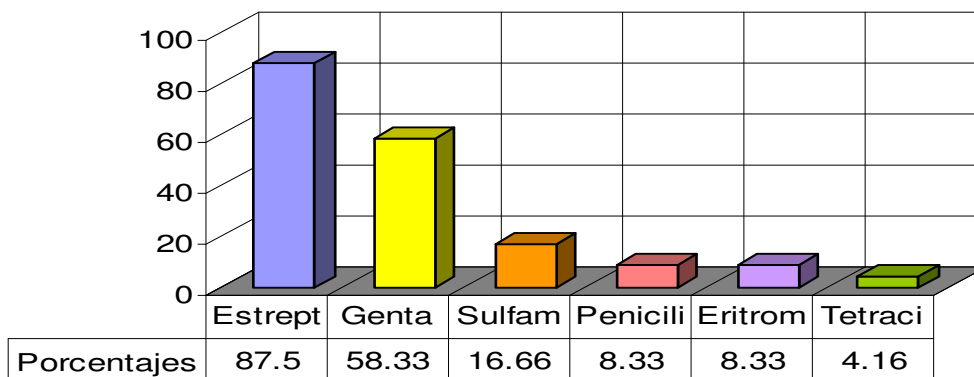
AM- AMPICILINA, TE- TETRACICLINA, P- PENICILINA, XNL- CEFTIOFUR, S- ESTREPTOMICINA, GM- GENTAMICINA, SXT- SULFAMETOXASOL TRIMETOPRIM, E- ERITROMICINA.

Lo que respecta a los aislamientos resistentes se encontró que el 87.5% fue resistente a estreptomicina, para gentamicina el 58.33%, en sulfametoxazol el 16.66%, para penicilina y eritromicina 8.33%, y 4.16% para tetraciclina, Sólo el 0.1 % del total de las cepas no presentó resistencia a ningún quimioterapéutico

(Figura

6).

### RESISTENCIA ANTIMICROBIANA

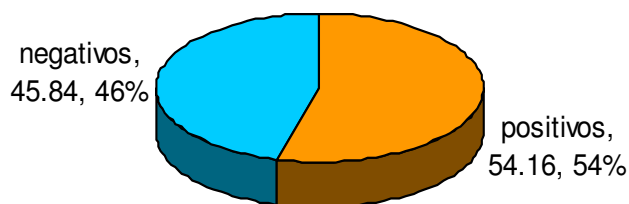


**Figura 6.** SE MUESTRA EL PORCENTAJE DE RESISTENCIA DEL TOTAL DE LAS CEPAS A LOS DIFERENTES QUIMIOTERAPÉUTICOS. EN ESTE CASO SE HA ENCONTRADO QUE MAYORITARIAMENTE LAS CEPAS SON RESISTENTES EN PRIMER LUGAR A ESTREPTOMICINA, SECUNDARIAMENTE A GENTAMICINA



De un total de 24 cepas a muestrear, se determinó a través de la prueba de difusión en agar 13 aislamientos multirresistentes a diferentes antibióticos, correspondiendo a un 54.16% total de cepas analizadas (Figura 7).

### MULTI-RESISTENCIA



**Figura 7.** PORCENTAJE DE AISLAMIENTOS MULTIRRESISTENTES, EL 100% CORRESPONDE A LOS 24 AISLAMIENTOS

### 3.5. Concentración Mínima inhibitoria

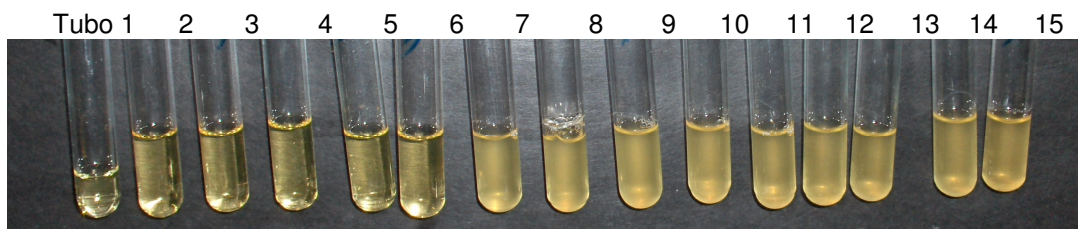
Los aislamientos resistentes en la prueba de difusión en agar se encontraron cero resistentes a estreptomina de un total de 14 aislamientos positivos a resistencia en la prueba de difusión en agar. La CMI de gentamicina para los 7 aislamientos indicó 3 aislamientos resistentes. Para el caso de la CMI con sulfametoxazol- trimetoprim los 2 aislamientos que en la prueba de difusión en agar fueron resistentes en CMI. Para la CMI de penicilina se utilizaron los 2 aislamientos resistentes en la prueba de difusión en placa, los resultados obtenidos para ambos aislamientos fueron susceptibles al quimioterapéutico.

En el caso de tetraciclina y eritromicina sólo se utilizaron 2 colonias cada una correspondiente a los ya citados quimioterapéuticos lo que indicó

susceptibilidad del aislamiento a tetraciclina y susceptible a la eritromicina (Cuadro 9, Figura 8).

**Cuadro 9.**  
PRUEBA DE CMI CON AISLAMIENTOS RESISTENTES EN LA PRUEBA DE DIFUSIÓN EN AGAR.

Aislamiento No.	Estreptomici na $\mu\text{g/ml}$	Gentamicina $\mu\text{g/ml}$	Penicilina $\mu\text{g/ml}$	Sulfametoxasol - trimetoprim $\mu\text{g/ml}$	Eritroicima $\mu\text{g/ml}$	Tetraciclina $\mu\text{g/ml}$
1	-----	16	-----	-----	-----	-----
2	4	32	-----	-----	-----	-----
3	8	-----	-----	-----	-----	-----
4	1	8	-----	8	4	-----
7	4	-----	-----	4	1	-----
9	2	0.5	-----	-----	No creció	-----
12	0.5	0.12	-----	-----	-----	-----
13	4	0.5	-----	-----	-----	No creció
14	1	-----	-----	-----	-----	-----
15	1	-----	-----	-----	-----	-----
18	1	-----	-----	-----	-----	-----
20	0.125	-----	-----	-----	-----	-----
24	0.25	0.06	-----	-----	-----	-----
25	No creció	-----	-----	-----	-----	-----
26	4	-----	-----	-----	-----	-----

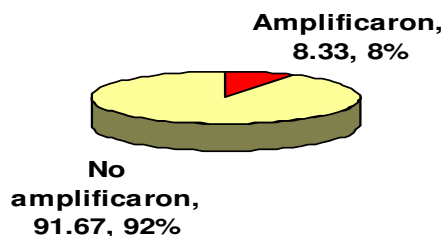


**Figura 8.** CMI DE UN AISLAMIENTO DE *H. somni*. TUBO 1. CONTROL NEGATIVO, 2. DILUCIÓN 512  $\mu\text{g/ml}$ , 3. DILUCIÓN 256 $\mu\text{g/ml}$ , 4. DILUCIÓN 128 $\mu\text{g/ml}$ , 5. DILUCIÓN 64  $\mu\text{g/ml}$ , 6. DILUCIÓN 32  $\mu\text{g/ml}$ , 7. DILUCIÓN 16  $\mu\text{g/ml}$ , 8. DILUCIÓN 8  $\mu\text{g/ml}$ , 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  $\mu\text{g/ml}$ .

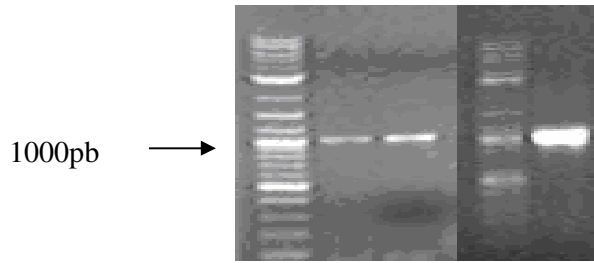
### 3.6. Identificación del gene de la integrasa tipo 1 y 2.

Dado que en los resultados obtenidos en las pruebas de difusión en agar y CMI se encontró multi-resistencia se procedió a amplificar el gene de la integrasa tipo 1 para relacionársele con la resistencia a quimioterapéuticos, sin embargo solo el 8.33% de las cepas amplificaron a dicho gene, siendo una de las dos cepas que amplificaron susceptible a diferentes quimioterapéuticos en la prueba de difusión en placa y la segunda cepa que amplificó el gene sólo susceptible a estreptomycin, se corroboró la presencia de dicho gene con el control positivo de una colonia de E. coli positiva de otros trabajos (Vázquez NJ)<sup>46</sup> (Figuras 9 y 10).

### Integrasa Tipo 1

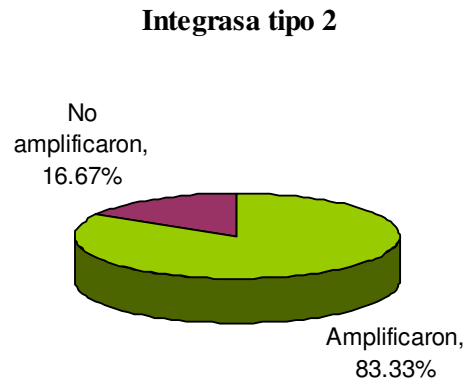


**Figura 9.** PORCENTAJE DE AISLAMIENTOS QUE AMPLIFICARON EL GENE DE LA INTEGRASA TIPO 1 (8.33%)



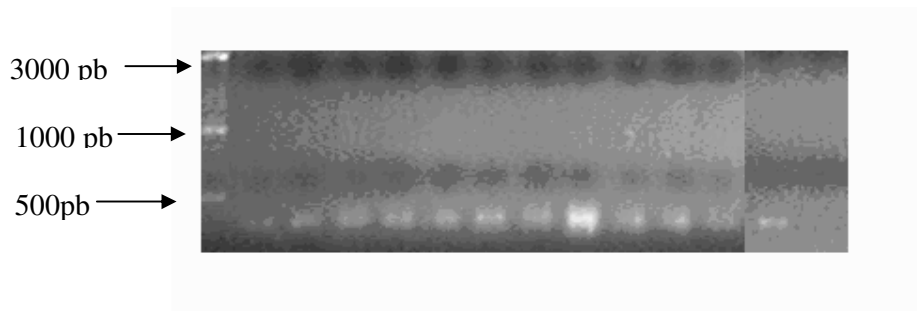
**Figura 10.** AMPLIFICACIÓN DEL GENE DE LA INTEGRASA TIPO 1.  
 1.CARRILES: 1.MARCADOR DE PESO MOLECULAR 2 LOG, 2 Y 3 CEPAS *H.somni*, 4. MARCADOR DE P.M.5. *E.coli* D1210 PDB126 RP4 COMO CONTROL POSITIVO.

Al observar los resultados de la integrasa tipo 1, se decidió hacer la PCR para el gene de la integrasa tipo 2, por lo que a todas las cepas se les hizo dicha prueba, encontrándose un mayor porcentaje de cepas que amplificaron el gene de la integrasa tipo 2 (83.33% (20 cepas)), al compararla con el cuadro 10, nos lleva a observar una relación estrecha de la Integrasa tipo 2 con la multi-resistencia de las cepas de *Histophilus somni*. Lo cual es objeto de estudio en el análisis estadístico (Figura 11 y 12).



**Figura 11.** PORCENTAJE DE AISLAMIENTOS QUE AMPLIFICARON AL GENE DE LA INTEGRASA TIPO 2 (83.16%).

Carriles    1   2   3   4   5   6   7   8   9   10   11   12   13   14



**Figura 12.** AMPLIFICACIÓN DEL GENE DE LA INTEGRASA TIPO 2. 1.-MARCADOR DE PESO MOLECULAR 2 LOG, 2-12. CEPAS DE *H. somni*, 13. *E.coli* COMO CONTROL POSITIVO, 14. CONTROL NEGATIVO.

### 3.7. Análisis estadístico.

La comparación entre las figuras 6, 7, 9 y 11 y cuadro 8, indica que en apariencia se encuentran relacionadas las variables resistencia a quimioterapéuticos- Integrasa tipo 2, dado que los porcentajes coinciden en el caso de cepas resistentes 87.5% (cuadro 10) con la figura 11 de presencia del gene de la integrasa tipo 2 con un porcentaje de 83.16%.

Sin embargo, al calcularse la correlación entre todas las variables y su concordancia en el programa Epi Info se observaron los siguientes datos:

Entre la prueba de difusión en placa y la CMI, indica una concordancia débil, con poca significancia dado el valor de  $p=0.34739$  y el valor de  $kappa$  es de 0.071 que indica nula relación.

Al medirse los valores de  $kappa$ ,  $p$ , y concordancia bruta con respecto a estreptomycin, gentamicina, penicilina, sulfametoxazol-trimetoprim, tetraciclina y eritromicina con integrasa tipo 1 se encontró que existe relación entre: penicilina, sulfametoxazol, tetraciclina y eritromicina con el gene de la integrasa tipo 1 pero no es significativa. Lo que se observa en el cuadro 10.

**Cuadro 10.**

VALORES DE Kappa, P, CONCORDANCIA BRUTA Y OBSERVACIONES PARA LOS QUIMIOTERAPÉUTICOS RESISTENTES EN LA PRUEBA DE DIFUSIÓN EN AGAR CON RELACION A EL GENE DE LA INTEGRASA TIPO 1.

Quimioterapéutico	Kappa	P	Concordancia bruta	Observaciones
Estreptomicina	-0.077	0.093	0.125	Valor de p indica que el valor es significativo, pero la concordancia es débil
Gentamicina	-0.170	0.08051	0.333	El valor de p indica significancia y la concordancia es débil
Penicilina	-0.100	0.63903	0.818	La concordancia es muy buena pero no es significativa dado el valor de p es mayor a 0.05.
Sulfametoxazol-trimetoprim	-0.125	0.508	0.750	La concordancia es buena pero no es significativa por el valor de p mayor a 0.05
Tetraciclina	-0.058	0.758	0.875	La concordancia es muy buena pero el valor de p mayor a 0.05, indica que no es significativa.
Eritromicina	-0.090	0.65605	0.833	La concordancia es muy buena pero no es significativa porque p es mayor a 0.05.

Sin embargo la hipótesis de que existe relación entre integrasa tipo 1 y resistencia a quimioterapéuticos no es rechazada ya que en todos los casos  $H_0=K=0$ .

La correlación entre aislamientos multi-resistentes en el antibiograma y la presencia del gene de la integrasa tipo 1 no existe de acuerdo al valor de  $kappa = -0.168$  y no es significativa porque el valor de  $p = 0.10832$ , y la concordancia bruta es de 0.375 es débil.

En el caso de las pruebas de resistencia de los quimioterapéuticos relacionados al gene de la integrasa tipo 2 se obtuvieron los datos del cuadro 11.

Cuadro 11.

VALORES OBTENIDOS EN LA PRUEBA ESTADÍSTICA PARA MEDIR RELACIÓN ENTRE RESULTADOS OBTENIDOS DE RESISTENCIA A QUIMIOTERAPÉUTICOS Y PRESENCIA DEL GENE DE LA INTEGRASA TIPO 2.

Quimioterapéutico	Kappa	P	Concordancia bruta	Observaciones
Estreptomina	0.407	0.03664	0.833	La concordancia es muy buena y el valor de p indica que es significativa
Gentamicina	-0.200	0.26939	0.458	El valor de p es mayor a 0.05, no hay significancia y la concordancia bruta es moderada
Penicilina	0.046	0.44860	0.291	El valor de p mayor a 0.05 indica que la prueba no es significativa y la concordancia es débil
Sulfametoxazol-trimetoprim	0.100	0.26105	0.375	El valor de p es mayor a 0.05 y la concordancia es débil
Tetraciclina	0.022	0.60026	0.250	El valor de p es mayor a 0.05 por lo que no es significativo y la concordancia es débil
Eritromicina	-0.177	0.00398	0.125	El valor de p indica que la concordancia débil es significativa

En todos estos casos la hipótesis de que existe relación entre la resistencia a dichos quimioterapéuticos y la presencia del gene de la integrasa tipo 2 no es rechazada ya que  $H_0=K=0$ .

Al calcular la relación entre el gene de la integrasa tipo 2 y la multi-resistencia se obtuvo que:  $Kappa = -0.051$ ,  $p = 0.7685$  y concordancia bruta de 0.500 por lo que puede determinarse que no existe relación entre el gene de la integrasa tipo 2 y la multi-resistencia observada en el antibiograma, pero la  $H_0: K=0$  indican que no se rechaza que exista una relación entre éstas.

En el caso de la correlación entre los resultados de CMI e integrasa tipo 1 el valor de  $kappa$  es  $-0.056$  que indica que no hay relación, sin embargo, el valor de  $p$  es igual a  $0.76344$  por lo que no hay significancia, y la concordancia bruta tiene un valor de  $0.880$  que indica que la concordancia es muy buena y la  $H_0$  no es descartada. Lo puede complementarse al medir por separado la concordancia entre Sulfametoxazol-Trimetoprim y Gentamicina de la prueba de

CMI con la presencia del gene da la integrasa tipo 1 (cuadro 12) En donde la  $H_0$  no es descartada ya que  $H_0: K=0$ .

**Cuadro 12.**

RESULTADOS DE ANALISIS ESTADÍSTICO ENTRE QUIMIOTERAPÉUTICOS (CMI) Y RELACION CON EL GENE DE LA INTEGRASA TIPO 1.

Quimioterapéutico	<i>Kappa</i>	<i>P</i>	Concordancia Bruta	Observaciones
Sulfametoxazol-Trimetoprim	-0.090	0.65605	0.833	La concordancia bruta es muy buena pero el valor de <i>p</i> indica que no hay significancia.
Gentamicina	-0.111	0.57664	0.791	La concordancia bruta es buena pero el valor de <i>p</i> indica que no hay significancia al ser mayor de 0.05

Al observarse la relación estadística entre la multi-resistencia en la CMI y la presencia del gene de la integrasa tipo 2 se encontró que el valor de *kappa* es de 0.022, *p* es igual a 0.60026, y la concordancia bruta es de 0.250, lo que habla de nula relación, una concordancia débil y poca significancia. Que cambia al observarse en cada quimioterapéutico resistente en la prueba de CMI con relación a él gene de la integrasa tipo 2 (cuadro 13).

**Cuadro 13.**

RESULTADOS DE *Kappa*, *P* Y CONCORDANCIA BRUTA ENTRE RESISTENCIA EN LA PRUEBA DE CMI Y LA PRESENCIA DEL GENE DE LA INTEGRASA TIPO 2.

Quimioterapéutico	<i>Kappa</i>	<i>p</i>	Concordancia Bruta	Obsevaciones
Sulfametoxazol-Trimetoprim	0.046	0.44860	0.219	El valor de <i>p</i> es mayor a 0.05 y la concordancia es débil
Gentamicina	-0.159	0.03664	0.166	La concordancia es débil y significativa.

#### 4. DISCUSIÓN

*H. somni* es un género poco estudiado en México, ya que presenta varias dificultades, por ejemplo, su identificación es laboriosa debido a que al realizar



pruebas, se basan en bioquímicas por lo cual los resultados no se obtienen en el tiempo y forma rutinaria como en la mayoría de las bacterias, ya que la degradación de los sustratos los realiza de forma lenta o débil, además de tener una variabilidad en sus resultados; situación que ya ha sido informada por varios autores<sup>8, 18, 24-27</sup>, por lo que es importante utilizar otras herramientas para solventar este aspecto como lo es una identificación precisa y rápida, lo que nos lleva a contemplar el uso de técnicas de biología molecular y evitar así el uso indiscriminado de quimioterapéuticos de amplio espectro.

En el presente estudio se utilizaron cepas de campo aisladas de diferentes fuentes y regiones de México; se utilizaron de casos clínicos de bovinos lecheros y de ovinos clínicamente sanos y de esta forma se pretendió ampliar la información del comportamiento de éstas.

El número de cepas utilizado para éste trabajo fueron las disponibles en el cepario del Laboratorio de Bacteriología del CENID-Microbiología INIFAP en donde se realizó la investigación, además de ser un número similar de cepas utilizadas en otros trabajos<sup>31, 47y 48</sup>. La identificación confirmatoria de *H. somni* se realizó a través de la PCR para amplificar un segmento de 407pb como previamente se ha reportado<sup>27, 28</sup> siendo esta una herramienta que permite identificar *H. somni* a nivel molecular de forma precisa y rápida, además de demostrar que dicha metodología puede estar disponible de forma rutinaria como una opción útil en los trabajos de diagnóstico e investigación relacionados con este microorganismo.

Por otra parte la resistencia observada en los aislamientos de *H. somni* a quimioterapéuticos como estreptomicina (87.5%), eritromicina (8.33 %) y sulfametoxazol-trimetoprim (16.66 %) en la prueba de difusión en agar

coincide con resultados en trabajos previos de *M. haemolytica*, *P. multocida* y *H. somni* en México<sup>47</sup>. En estos se observa rangos de resistencia a quimioterapéuticos del 66 a 100% en el caso de estreptomicina, 9 a 9.1% en eritromicina y 12 a 84% a sulfametoxazol-trimetoprim. Cabe mencionar que en el caso de sulfametoxazol el rango más bajo es del trabajo hecho en México<sup>48</sup> y el rango más alto fué observado en Estados Unidos<sup>49</sup>.

Con respecto a la CMI, en esta investigación se encontró un menor número de cepas resistentes a los quimioterapéuticos, lo que puede compararse con trabajos anteriores<sup>30</sup> donde se encuentra que existe resistencia a sulfonamidas (31 a 100%). En el caso de gentamicina, no se encontraron informes al respecto, sin embargo el porcentaje de aislamientos resistentes encontrados en el presente trabajo puede servir como referencia para futuros estudios.

La información encontrada sobre resistencia antimicrobiana con *H. somni* en diversas publicaciones informan de resultados con pruebas cualitativas como la prueba de difusión en placa y la CMI<sup>30-32</sup>, sin embargo no fueron localizadas publicaciones que utilicen técnicas moleculares como en el presente trabajo.

En trabajos realizados con bacterias como *Shigella spp.*, *Salmonella spp.*, e incluso *H. somni* puede observarse que existe poca o nula relación entre la prueba de difusión en placa y concentración mínima, sin embargo la información útil y aplicable es que esta multi-resistencia a quimioterapéuticos ayuda a elaborar un perfil de resistencia y por lo tanto la elección de posibles alternativas como tratamiento de las entidades patológicas en donde intervienen dichos microorganismos.

Al no encontrar información específica y abundante sobre éste tema con *H. somni* se tomó la determinación de adaptar metodologías previamente

estandarizadas con otro tipo de bacterias como *Salmonella*, *E. coli* y *Shigella* spp<sup>33, 42, 43</sup>, que han sido estudiadas ampliamente al respecto con la detección de la presencia los genes que codifican para la producción de las integrasas tipo 1 y 2, recordando que dichos genes son fácilmente transferidos de bacteria a bacteria<sup>50, 51</sup>.

Es importante aclarar que dichas bacterias están poco relacionadas taxonómicamente con *H. somni*, por lo que la información que se genere con la metodología usada en enterobacterias podría no ser concluyente de forma tajante y traspolar los resultados obtenidos en el género bacteriano en estudio en el presente trabajo se podría sugerir o pensar en la existencia de otros genes que codifiquen para la resistencia antimicrobiana en géneros que si estén relacionados con *H. somni* como lo son *M. haemolytica* y *P. multocida*<sup>46-54</sup>.

Al realizarse el análisis estadístico epidemiológico de cada uno de los quimioterapéuticos en la prueba de difusión en agar (antibiograma) con respecto a el gene de la integrasa tipo 1, se encuentra una concordancia buena que ayuda a definir el contenido de cassettes de resistencia a penicilina, sulfametoxazol-trimetoprim, tetraciclina, eritromicina relacionados con el gene, como lo refiere Gavin D. Recchia<sup>50</sup>, sin embargo debe recordarse que el valor no fue significativo pero que la hipótesis nula ( $H_0$ ) no fue rechazada.

Al observarse una concordancia del 83% entre el gene de la integrasa tipo 2 y estreptomycinina y un valor significativo de  $p$  se reafirma la presencia de cassettes de resistencia a estreptomycinina asociados a dicho gene<sup>50</sup>. En el caso de la eritromicina la concordancia es débil pero significativa que no coincide

con la literatura antes citada<sup>50</sup> por lo que debe sugerirse su estudio en posteriores trabajos.

En el caso de la prueba de CMI pudo comprobarse la concordancia entre la presencia del gene de la integrasa tipo 1 y los quimioterapéuticos utilizados (83% con sulfametoxazol-trimetoprim y 79% con gentamicina), sin embargo ambos datos no son significantes pero se siguió sin rechazar la hipótesis de que existe una relación entre éstos dado que  $H_0: K=0$ .

Para la Integrasa tipo 2, sólo la gentamicina tuvo un valor significativo pero débil (16% de concordancia) de acuerdo a la prueba de CMI.

La sensibilidad de la prueba de CMI, no favorece la relación entre ésta y los genes de la integrasa tipo 1 y 2, talvez por la concentración de quimioterapéutico que *in Vitro* es aparente pero en campo muy probablemente variaría.

Resultados similares o coincidentes están informados en trabajos realizados con los géneros *Salmonella*, *E. coli*, y *Shigella* spp; lo que sugiere la presencia de cassettes genéticos que codifican para resistencia antimicrobiana<sup>33,42,43</sup> pero que podrían encontrarse vacíos y por lo tanto no presentar dicha resistencia<sup>35</sup>.

## P5. CONCLUSIONES

En México existe poca información acerca de la resistencia antibacteriana en patógenos que afectan a los animales y mucho menos información con respecto a *H. somni*, sin embargo al probar cepas procedentes de bovinos productores de leche enfermos y ovinos clínicamente sanos se puede concluir que:

- Los aislamientos de *H. somni*, pueden identificarse a través de la PCR con amplificación del segmento de 407 pb de la subunidad 16S ribosomal.
- Se cumplió con el objetivo de establecer el perfil de resistencia a quimioterapéuticos en las cepas aisladas, identificadas y sometidas a pruebas de resistencia antimicrobiana en el que los aislamientos de *H. somni* son resistentes principalmente a estreptomina, gentamicina y sulfametoxazol.
- La relación de dicha resistencia con los genes de la integrasa tipo 1 y 2 es moderada de acuerdo al análisis estadístico.
- La resistencia observada se deba probablemente a la transferencia de material genético en *H. somni* posiblemente a través de plásmidos, o elementos móviles como los transposones.

## 6. PERSPECTIVAS

- Identificar la presencia de plásmidos que porten genes de resistencia a quimioterapéuticos.
- Buscar la presencia de otros genes de la integrasa (tipo 3 y 4).
- Secuenciar el gen que codifica para las integrasas.
- Identificar la región variable en los integrones.

## 7. RECOMENDACIÓN

- Hace falta realizar más estudios de este tipo con la finalidad de diseñar esquemas de tratamiento más efectivos lo que reduciría el tiempo de recuperación de los animales y encontrar tratamientos más específicos lo que finalmente repercute en la productividad de cualquier empresa ganadera.

## LITERATURA CITADA

1. Villamar AL, Olivera CE: Situación actual y perspectiva de la producción de leche de bovino en México 2005. SAGARPA 2006.
2. Villamar AL, Segura MC, Barrera WMA, Guzmán VH, Domínguez IR: La producción de carnes en México y sus perspectivas 1990-2000. SAGARPA. Enero 2006.
3. Instituto Nacional de Estadística Geografía e Informática (INEGI). Estadística agropecuaria 2004.
4. Sistema de información y estadística agroalimentaria y pesquera (SIAP) [serial on line] 2004 [cited 2006 mar]:1(1): [1 screen].  
Avialable  
from:URL:<http://www.sagarpa.gob.mx/Dgg/prod0001.htm>
5. Apuntes de Producción Ovina (CD-ROM): Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia, Universidad Nacional Autónoma de México, 2005.
6. Gardner CE. Grupo de Sanidad Animal. Estación Experimental Agropecuaria Balcarce. Bioseguridad práctica en la lechería actual [serial online] 2003 [cited 2006 Jan 10];1(1):[5 screens].  
Avialable from: URL: [http://www.vet-uy.com/articulos/artic\\_bov/003/bov\\_003.htm](http://www.vet-uy.com/articulos/artic_bov/003/bov_003.htm)
7. Andrews JJ., Anderson T.D., Slife L.N., Stevenson G.W.: Microscopic lesions associated whit the isolation of *Haemophilus somnus* from pneumonic bovine lungs, Vet. Pathol, 22:131-136(1985).

8. Aguilar RF, Trigo TE, Jaramillo ML, Sánchez- Mejorada PH.: Aislamiento de *Haemophilus somnus* a partir de pulmones neumónicos de bovinos. Tec. Pec. Méx., 52:67-73 (1986).
9. Stephens LR, Little PB, Slee P, Poullton P, Lancombe M, Kosior E.: Investigation of purulent vaginal discharge in cows with particular reference to *Haemophilus somnus*. Aust. Vet. J, 63:182-185 (1986).
10. Miller RB, Barnum DA, Mc Entee KE.: *Haemophilus somnus* in the reproductive tracts of slaughtered cows: location and frequency of isolations and lesions. Vet. Pathol, 20: 515-521 (1983).
11. Widders PR, Paisley LG, Gogolewski RP, Evermann JF, Smith JW, Corbel LB.: Experimental abortion and the systemic immune response to *Haemophilus somnus* in cattle. Infect. Immun, 54: 555-560 (1986).
12. Scarcelli E, Élide GM, Vasconcellos CM, Ribeiro CF, Miyashiro S, Piatti RM, Teixeira SL.: Abortamento e morte embrionária em receptoras bovinas por *Histophilus somni* (*Haemophilus somnus*). Acta Scientiae Veterinariae, 32(1): 59 –64 (2004).
13. Van Dreumel AA, Kierstead MA.: Abortion associated with *Haemophilus somnus* in a bovine fetus. Can. Vet. J., 16:367-370 (1975).
14. Patterson RM, Hill JF, Shiel MJ, Humphrey JD.: Isolation of *Haemophilus somnus* from vaginitis and cervicitis in dairy cattle. Austr. Vet. J., 61:301-302(1984).



15. Miller RB, Lein DH, Hall CE, Shin S.: *Haemophilus somnus* infection of the reproductive tract of cattle: a review. J. Am. Vet. Med. Assoc., 182:1390-1392(1983).
16. Metz AL, Haggard DL, Hakomaki MR.: Chronic suppurative orchiepididymitis associated with *Haemophilus somnus* in a calf. J. Am. Vet. Med. Assoc., 184: 1507-1508(1984).
17. Moisan PG, Fitzgerald SD.: *Haemophilus somnus* myocarditis in feedlot cattle. Agri-Practice. , 16(4):21-24(1995).
18. Harris FW, Janzen ED.: *Haemophilus somnus* disease complex (haemophilosis): a review. Can. Vet. Res., 30: 816-822(1989).
19. Hazlett MJ, Little PB, Barnum DA.: Experimental production of mastitis with *Haemophilus somnus* in the lactating bovine mammary gland. Can. Vet. J., 24: 135-136(1983).
20. Higgins R, Martin JR, Larouche Y, Goyette G.: Mastitis caused by *Haemophilus somnus* in a dairy cow. Can. Vet. J., 28: 117-119(1987).
21. Stephens LR, Little PB, Wilkie N, Barnum DA.: Infectious Thromboembolic Meningoencephalitis in cattle: A review. J. Am. Vet. Med. Assoc., 178:378-384 (1981).
22. Philbey AW, Glastonbury JR, Rothwell JT, Link IJ, Searson JE.: Meningoencephalitis and other conditions associated with *Histophilus ovis* infection in sheep. Aust. Vet. J., 68 (12): 387-390 (1991).
23. Cassidy JP, McDowell SW, Reilly GA, Mc Conell WJ, Foster F, Lawler D.: Thrombotic meningoencephalitis associated with

- Histophilus ovis* infection in lambs in Europe. Vet. Rec., 140(8): 193-195(1997).
24. Humphrey JD, Stephens LR.: *Haemophilus somnus*: a review. Vet. Bull. 53: 987-1004(1983).
25. Garcia –Delgado GA, Little PB, Barnum DA.: A comparison of various *Haemophilus somnus* strains. Can. J. Comp. Med., 41:380-388 (1977).
26. Biberstein DVM, Yuan CZ.: Tratado de Microbiología Veterinaria. Edit: Acribia, 77-96, Zaragoza, España, (1995).
27. Angen O, Ahrens P, Tegtmeier C.: Development of a PCR test for identification of *Haemophilus somnus* in pure and mixed cultures. Vet. Microbiol, 63:39-48 (1998).
28. Angen O, Ahrens P, Kuhnert P, Christensen H, Mutters R.: Proposal of *Histophilus somni* gen. nov., sp. nov. for the three species incertae sedis *Haemophilus somnus*, *Haemophilus agni* and *Histophilus ovis*. Int. J. Syst. Evol. Microbiol, 53:1449-14 (2003)
29. Quinn PJ.: Clinical Veterinary Microbiology. Edit: Mosby, 276. Toronto, Canada, 2002.56(2003).
30. Watts JL, Yancey RJ, Salmon SA, Case CH.: A 4- year survey of antimicrobial susceptibility trends for isolates from cattle with Bovine Respiratory Disease in North America. Journal of clinical Microbiology, 32(3): 725-731 Mar (1994).
31. Sugimoto C, Mitani K, Nakasawa M, Sekizaki T, Terakado N, Isayama Y.: In Vitro Susceptibility of *Haemophilus somnus* to 33 Antimicrobial

- Agents. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 23(1), 163-165, Jan (1983).
32. Aarestrup F, Mette SA, Angen O.: Antimicrobial susceptibility of *Haemophilus parasuis* and *Histophilus somni* from pigs and cattle in Denmark. *Vet. Microbiology* 101: 143-146(2004).
33. Muñoz AJ, Bello TH, Domínguez YM, Mella MS, Zemelman R, González RG.: Integrones y cassettes genéticos de resistencia a antimicrobianos en cepas de *Shigella flexneri*. Tesis Maestría Universidad San Sebastián, Facultad de Ciencias Biológicas. Chile. (2005).
34. 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/>
35. Heikkala E, Sundstrom L, Skumik M, Huovinen P, Analysis of genetic localization of type 1 trimethoprim resistance gene from *Escherichia coli* isolated in Finland. *Antimicrob Agents Chemother* 35: 1562-1569(1991).
36. García LJM.: Estructura y funcionamiento y significado de los integrones bacterianos. *Actualidad* 28:18, 28:22 (2000).
37. Levesque C, Piche L, Larose C, Roy P.: PCR mapping of integrons reveals several novel combinations of resistance genes. *Antimicrob Agents Chemother* 39:185-191 (1995).
38. Arakawa Y, Murakami M, Suzuki K, Ito H, Wacharotayanjun R, Orsuka S.: a novel integron element carrying the metallo *B*-

- lactamase* gene *blaIMP*, *Antimicrob Agents Chemother*,39: 1612-1615 (1995).
39. Ronald M.: *Principles of Microbiology*. Edit. Atlas Mosby, 364-366, 1995.
40. Díaz R, Gamazo C, López G.: *Manual práctico de microbiología*. Edit. Masson, Barcelona España, (1995).
41. Barley, Scott, Finegold SM, Baron JE.: *Diagnóstico microbiológico*. 7a edición, Edit. Medica Panamericana, Buenos Aires Argentina, (1989).
42. Daly M, Fanning S.: *Characterization and chromosomal Mapping of Antimicrobial Resistance Genes in Salmonella enterica Serotype typhimurium*. *Applied and environmental Microbiology*. 66:11: 4842-4848 (2000).
43. Goldstein C, Lee MD, Sanchez S, Hudson C, Phillips B, Register B, Grady M, Liebert C, summers AO, White DG, Maurer JJ.: *Incidence of Class 1 and 2 Integrases in Clinical and Comensal Bacteria from Livestock, Companion Animals, and Exotics*. *Antimicrob Agents Chemother*. Mar. 23-26 (2001).
44. Argimon PJM, Jiménez VJ.: *Métodos de investigación clínica y epidemiológica*. 3ª edición, editorial ELSEVIER, Madrid, España, 341-343 (2004).
45. Reyes CP.: *Bioestadística aplicada*, 1ª edición, edit. Trillas, México, 95-97 (1980).
46. Vázquez NJ, Córdova BC, López VY, Mancera MA.: *Identificación del gene de la integrasa Tipo I y perfil de resistencia*

antimicrobiana en *Salmonella enteritidis*. Artículo 001.Vet-UY (2006).

47. Pijoan AP, Aguilar RF, Resistencia y sensibilidad a antimicrobianos en cepas de *Pasteurella haemolytica*, *P. multocida* y *Haemophilus somnus*, aisladas en becerras lecheras en establos de Tijuana.: Vet Méx, 31:2:153-156 (2000).
48. 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.67:1:75-77(2005).
49. Fales WH., Selby LA, Webber JJ, Hoffman LJ, Kintner LD, Nelson SL, Millar RB, Thorne JG, McGinity JT, Smith DK.: Antimicrobial resistance among *Pasteurella* spp recovered from Missouri and Iowa cattle with bovine respiratory disease complex, LAVMA, sep, 9:477-479(1982).
50. Recchia GD, Hall MR.: Gene cassettes: a new class of mobile element. Microbiology, 141:3015-3027(1995).
51. Recchia GD, Hall MR.: Origins of the mobile gene cassettes found in integrons. Trends in Microbiology, 5:10:388-394(1997).
52. Kehrenberg C, Werckenthin C, Schwarz S.: *Tn5706*, a Transposon-Like Element from *Pasteurella multocida* mediating tetracycline resistance. Antimicrobial Agents Chemotherapy, Aug, 2116-2118(1998).
53. Kehrenberg C, Salmon AS, Watts JL, Schwarz S.: Tetracycline resistance genes in isolates of *Pasteurella multocida*, *Mannheimia*

*haemolytica*, *Mannheimia glucosida* and *Mannheimia varigena* from bovine and swine respiratory disease: intergeneric spread of the *tet* (H) plasmid pMHT1. J, Antimicrobial Chemotherapy.48:631-640(2001).

54. Vassort BC, Lesage DMC, Martel LJ, Lafont PJ, Chaslus DE.: CAT III chloramphenicol resistance in *Pasteurella haemolytica* and *Pasteurella multocida* isolated from calves. J. Antimicrobial Chemotherapy, 38:205-213(1996).