



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA  
DE MÉXICO**

---

**FACULTAD DE MEDICINA VETERINARIA Y ZOOTECNIA**

**Estudio de la capacidad de producción de biopelícula y  
resistencia a antimicrobianos en cepas de *Pasteurella multocida*,  
*Mannheimia haemolytica* e *Histophilus somni***

**T E S I S**

**QUE PARA OBTENER EL TITULO DE MEDICO VETERINARIO  
ZOOTECNISTA**

**P R E S E N T A:**

**NELSON ADRIAN PÉREZ ROMERO**

**Tutores**

**DR. FRANCISCO AGUILAR ROMERO**

**Dr. RIGOBERTO HERNANDEZ CASTRO**

**México D. F.**

**2010.**



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.

## **AGRADECIMIENTOS**

A mis asesores, Dr. Francisco Aguilar Romero y Dr. Rigoberto Hernández Castro, por el apoyo y los conocimientos brindados durante la elaboración del presente trabajo.

A todos mis compañeros del CENID-Microbiología Animal del INIFAP, por su ayuda, sus consejos, pero sobre todo por hacerme parte de un grupo de trabajo y hacerme pasar vivencias inolvidables.

Al Dr. Carlos Julio Jaramillo Arango por facilitarme el cepario con el que realice la investigación del presente estudio.

A mis compañeros de la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia, Hugo y Mario, por su amistad, su apoyo y sus bromas que me ayudaron a ser más llevaderos momentos difíciles.

## DEDICATORIAS

A mis Papas, Manuel y María Luisa y mis Hermanos, Emmanuel y Milton por su incondicional amor, apoyo y comprensión a lo largo de toda mi vida; en verdad que se han convertido en pilares que sostienen lo que soy, por ello les pido se sientan partícipes de los logros que he obtenido, incluyendo el presente trabajo.

A ti Abuelita Leo† que físicamente ya no me acompañas, pero que en recuerdos aun eres parte de mis motivaciones.

A Isabel y Fer, por convertirse en parte de mi vida y ser una razón más para seguir creciendo y mejorando todos los días.

INDICE	Página
Resumen	
Abstract	
I. Introducción.....	1
II. Justificación.....	7
III. Hipótesis de trabajo.....	8
IV. Objetivo general.....	8
4.1. Objetivos particulares.....	9
V. Materiales y métodos.....	9
5.1. Aislamientos bacterianos.....	9
5.2. Determinación de la capacidad de producción de biopelícula.....	10
5.2.1. Método en tubo de Christensen (safranina).....	10
5.2.2. Siembra de colonia en agar de rojo Congo.....	10
5.2.3. Ensayo de producción de biopelícula en microplaca de 96 pozos.....	11
5.3. Susceptibilidad a quimioterapéuticos mediante la técnica de Bauer <i>et al.</i> .....	12
5.4. Determinación de Concentración Mínima Inhibitoria.....	12
5.5. Determinación de la biopelícula mediante microscopia electrónica de barrido.....	13
5.6. Análisis de concordancia entre la producción de biopelícula y la resistencia antimicrobiana.....	15
VI. Resultados.....	15
6.1 Determinación de la capacidad de producción de biopelícula.....	15
6.1.1. Método en tubo de Christensen (safranina).....	15
6.1.2. Siembra de colonia en agar de rojo Congo.....	15

6.1.3. Ensayo de producción de biopelícula en microplaca de 96 pozos.....	16
6.2. Susceptibilidad a quimioterapéuticos mediante la técnica de Bauer <i>et al.</i> .....	19
6.3. Determinación de Concentración Mínima Inhibitoria.....	19
6.4. Determinación de la biopelícula mediante microscopia electrónica de barrido .....	22
6.5. Análisis de concordancia entre la producción de biopelícula y la resistencia antimicrobiana .....	25
VII. Discusión.....	30
VIII. Conclusiones.....	38
IX. Literatura citada.....	39

## RESUMEN

La biopelícula es una comunidad de microorganismos cubierta por una matriz de exopolímeros, adherida a diversas superficies animadas o inanimadas formando microcolonias. Estos agregados incrementan la resistencia a los mecanismos de defensa del hospedero, a los antibióticos y biocidas. El objetivo del presente trabajo fue determinar la capacidad de producción de biopelícula en 20 aislamientos de *P. multocida*, 20 de *M. haemolytica* y 10 de *H. somni* obtenidos de pulmones neumónicos de bovino y de tracto reproductor de ovino. Para evidenciar la formación de biopelícula, a cada uno de los aislamientos fueron probados por el método de Christensen, la siembra en agar de rojo Congo y el ensayo en microplacas de polivinil de 96 pozos. Los resultados fueron evaluados con análisis de varianza ( $P < 0.05$ ) para determinar la diferencia estadística entre los aislamientos a probar y las cepas de *E. coli* y *E. coli K-12* usadas como controles positivo y negativo respectivamente. En el caso de *P. multocida* y *M. haemolytica* se determinó que los 40 aislamientos produjeron biopelícula, de los cuales cuatro de *P. multocida* y tres de *M. haemolytica* resultaron ser altos formadores; para *H. somni* se determinó que los 10 aislamientos son productores y que dos de ellos son altos formadores. A los aislamientos mayores productores de biopelícula, se le realizó microscopía electrónica de barrido. Por otra parte a los 50 aislamientos se les realizó la prueba de Bauer *et al* y MIC con gentamicina, tetraciclina, ampicilina, penicilina y estreptomina. Los aislamientos de *P. multocida* mayores productores de biopelícula fueron resistentes a gentamicina y tetraciclina; los de *M. haemolytica*, presentaron resistencia a gentamicina y estreptomina y los de *H. somni*, a penicilina y estreptomina. Los resultados fueron analizados mediante pruebas de Kappa, dando valores de 0.61 a 1.0, lo que permitió establecer que existió concordancia entre la formación de biopelícula y la resistencia a antimicrobianos.

Tesis de licenciatura parcialmente financiada por el proyecto CONACyT 90731, realizada en el CENID-Microbiología Animal, Instituto Nacional de Investigación Forestal, Agrícola y Pecuaria.

## **Abstract**

The term biofilm refers to a community of microorganisms covered by a matrix of exopolymers, adhered to various animated or inanimated surfaces forming microcolonies. These aggregates increase resistance to host defense mechanisms, antibiotics and biocides. The aim of this study was to determine the ability of biofilm production in 20 isolates of *P. multocida*, 20 of *M. haemolytica* and 10 *H. somni* obtained from pneumonic cattle lungs and sheep reproductive tract. In order to demonstrate the formation of biofilm, each of the isolates were tested by the Christensen method, Congo red agar culture and assay in polyvinyl microplates of 96 wells. The results were evaluated by analysis of variance ( $P < 0.05$ ) to determine the statistical difference between the tested isolates and strains of *E. coli* and *E. coli* K-12 used as positive and negative controls, respectively. In the case of *P. multocida* and *M. haemolytica* it was determined that the 40 isolates produced biofilm, of which four of *P. multocida* and three of *M. haemolytica* proved to be highly productive. For *H. somni* the 10 isolates were producers and two of them were highly productive. The highly productive isolates were subjected to scanning electron microscopy. In addition, the 50 isolates were tested by the Bauer *et al.* and MIC with gentamicin, tetracycline, ampicillin, penicillin and streptomycin. For of *P. multocida* isolates, the greatest producers of biofilm were resistant to gentamicin and tetracycline, those of *M. haemolytica*, were resistant to gentamicin and streptomycin and those of *H. somni*, to penicillin and streptomycin. The results were analyzed using the Kappa test, giving values of 0.61 to 1.0, which established that there was correlation between biofilm production and antimicrobial resistance.



## I.- INTRODUCCIÓN

Durante su evolución, las bacterias han modificado constantemente su metabolismo y características físicas, adaptándose prácticamente a todos los ambientes del planeta. La idea generalizada de que las bacterias tienen una forma de vida unicelular, no es tan correcta ya que el crecimiento planctónico puro es poco común, las bacterias frecuentemente se desarrollan en comunidades complejas.<sup>1</sup>

Uno de los paradigmas más grandes en la microbiología es la concepción de la existencia de las bacterias como organismos asociales, cuya única actividad era dividirse para generar una nueva bacteria, cada una, idéntica a la otra. Sin embargo, desde hace más de 60 años se ha sugerido que lejos de esta conducta aislada, puede existir una conducta bacteriana en grupo, la cual sigue la norma “la unión hace la fuerza”.<sup>2</sup> Observaciones directas de una amplia variedad de bacterias han permitido establecer que la mayoría de los microorganismos persisten unidos a las superficies dentro de un estructurado ecosistema denominado biopelícula y no como organismos aislados.<sup>3</sup>

Las biopelículas se definen como comunidades de microorganismos que crecen embebidos en una matriz de exopolisacáridos y adheridos a una superficie inerte o un tejido vivo, y que puede estar conformado por una sola especie, o por diferentes especies bacterianas e incluso diferentes géneros. La composición de la biopelícula es variable en función del sistema en estudio, en general, el componente mayoritario es agua, que puede representar hasta un 97% del contenido total. Además de agua y de las células bacterianas, la matriz es un complejo formado principalmente por polímero extracelular, en menor cantidad se encuentran otras macromoléculas como proteínas, DNA y productos diversos procedentes de la lisis de las bacterias.<sup>4,5</sup>

Existen numerosas evidencias que relacionan las biopelículas con distintos procesos infecciosos, tales como neumonías, dermatitis y mastitis principalmente.<sup>4</sup> Algunos mecanismos por los que se producen las enfermedades todavía no están completamente entendidos, pero se ha sugerido que las bacterias pueden producir endotoxinas una vez que ya son parte de la biopelícula, también se pueden liberar bacterias al torrente sanguíneo, se vuelven resistentes a la acción fagocitaria de las células del sistema inmune y por otro lado, constituyen un nicho para la aparición de bacterias resistentes a los tratamientos con antibióticos, e incluso se menciona que las bacterias formando biopelículas pueden ser hasta 1000 veces más resistentes a los quimioterapéuticos, que las que no forman esos agregados.<sup>6</sup> Este último aspecto puede ser especialmente relevante dado que las bacterias resistentes originadas en estos agregados podrían extenderse de animal a animal a través de los trabajadores o de los implementos pecuarios como comederos, bebederos, saladeros, etc. Lo anterior puede explicar la presentación de enfermedades agudas, que posteriormente pudieran persistir con un curso crónico y hacerse resistentes a los tratamientos con antimicrobianos.<sup>7</sup>

La biopelícula bacteriana empieza a formarse cuando alguna célula individual se une inicialmente a una superficie. La capacidad de la célula para realizar esta reacción inicial depende de factores ambientales como la temperatura y el pH, y de los factores genéticos que codifican las funciones motrices, la sensibilidad ambiental, las adhesinas y otras proteínas. Aunque la combinación de los factores influyen en el desarrollo de la biopelícula dependen en principio de la especie, algunas características son comunes a la mayoría de las bacterias estudiadas hasta ahora.<sup>8-10</sup> El proceso de formación también se ve influenciado por factores externos como el ambiente nutricional.<sup>11-13</sup>

Después de la unión inicial, la célula empieza a crecer y a esparcirse sobre la superficie en una monocapa, mientras forma microcolonias. Las células cambian su

comportamiento y dan lugar a la compleja arquitectura de la biopelícula madura. El cambio más evidente es la producción de la matriz que soportará todo el conjunto. Mientras la biopelícula va creciendo suceden otros acontecimientos o cambios como el extenderse a otras áreas no infectadas o liberar algunas células, que recuperan las cualidades planctónicas y actúan como las semillas de otras estructuras similares en nuevas superficies.<sup>14</sup>

Se han determinado cinco fases: la adsorción reversible de la bacteria a la superficie, una unión irreversible, una primera fase de maduración con crecimiento y división, la segunda fase de producción de exopolisacárido y el desarrollo final de la colonia con dispersión de células colonizadoras. La estructura se permeabiliza con una red de canales atravesados por agua, residuos bacterianos, enzimas, nutrientes, metabolitos, y oxígeno. Es en la periferia de la estructura donde se localizan la mayoría de las células viables, cuyo número se reduce con la edad; en una biopelícula joven se han detectado hasta un 80% de células viables y tan solo un 50% en una estructura antigua. Se puede desarrollar un ambiente anaeróbico bajo la capa aeróbica.<sup>15</sup>

Para adaptarse a la vida de biopelícula, las bacterias sufren cambios radicales en su fisiología con respecto a las células planctónicas.<sup>8,16</sup> Así como un patrón de expresión genético diferente, existe represión de genes del pili y flagelo, ya que aunque son necesarios para el inicio de la formación, probablemente no son necesarios para la maduración de la estructura, además hay inducción de genes que tienen que ver con resistencia a antibióticos.<sup>17</sup> El cambio del medio y condiciones donde se encuentran, activan diferentes genes que codifican nuevas proteínas estructurales y enzimas. Estos genes y proteínas son los que explican la fijación y la resistencia de las bacterias incluidas en las biopelículas ante los antibióticos o los desinfectantes. Los avances recientes a partir del año 2000 en proteómica y genómica han permitido avanzar en el

estudio de sistemas complejos, ya que se han podido identificar 800 proteínas que cambian de concentración a lo largo de las diferentes fases de desarrollo.<sup>18</sup>

A los pocos días de la primera colonización, otros microorganismos quedan atrapados en el exopolisacárido por captación física y atracción electrostática. Hongos y bacterias sin movilidad propia son capaces de aprovechar materiales residuales de los primeros habitantes y de producir sus propios residuos que serán aprovechados por otros microorganismos.<sup>19</sup> Desde la biopelícula más simple hasta la más compleja, la comunidad metabólica coopera, como el tejido vivo de un organismo multicelular. Las diferentes especies viven en un nicho mínimo, súper especializado y hecho a la medida. Si una especie genera residuos tóxicos, otra los devorará con avidez, así se consigue coordinar los recursos bioquímicos de todos los habitantes; se reúnen las diferentes enzimas de los que disponen numerosas especies de bacterias para abastecerse de aporte nutritivo que ninguna especie sola podría digerir. También servirán para responder o resistir al ataque de diversas sustancias químicas como por ejemplo los biocidas.<sup>20</sup>

La terapia con antibióticos usualmente elimina a las bacterias en estado planctónico, pero no puede acceder a la biopelícula. Por otra parte, también se han detectado en ella, enzimas hidrolíticas del tipo de las  $\beta$ -lactamasas que son sintetizadas en pocas cantidades pero que se mantienen atrapadas y concentradas en la matriz, lo que contribuye a su protección.<sup>21,22</sup> Existen evidencias que estas características de las bacterias traen como consecuencia la presencia de enfermedades crónicas.<sup>23</sup>

Si las bacterias realmente pueden tener una conducta como grupo, entonces se hace necesaria la existencia de un sistema de comunicación entre ellas, a través del cual puedan “decidir” qué les conviene y actuar en grupo para conseguirlo<sup>2</sup> por lo que en 1994 nace el término “quorum sensing” para describir un fenómeno dependiente de densidad celular. Este proceso está basado en la producción de moléculas que sirven

como señales cuya concentración depende de la densidad del organismo que la produce. Una vez que estas moléculas o autoinductores alcanzan el umbral de detección, inducen diferentes fenómenos en la célula.<sup>24</sup>

La disgregación de la biopelícula se ve influenciada por el ambiente externo. Algunos factores que afectan este proceso son los cambios en el medio, disminución de la disponibilidad de nutrientes<sup>25</sup>, propiedades electroquímicas dentro de la estructura<sup>26</sup> y limitación del sustrato<sup>27</sup> o bien afectada por metabolismo, como la proteína reguladora de unión a RNA, CsrA (carbón storage regulator) que actúa como represor de la formación y activa la disgregación de la misma en diferentes condiciones de cultivo.<sup>28</sup>

El modelo propuesto por O'Toole *et al* en 2000<sup>8</sup> para describir todo el proceso de agregación y disgregación sugiere que las células en estado planctónico reciben señales ambientales que ocasionan la adhesión inicial al sustrato, después de ello, las bacterias comienzan a comunicarse unas con otras en el proceso denominado “quórum sensing” y estas señales guían a la formación de microcolonias que formarán la biopelícula madura, una estructura tridimensional embebida en una matriz de exopolisacárido. Finalmente nuevas señales indican a la bacteria su disgregación, para regresar al estadio planctónico, completando así el ciclo.<sup>2</sup>

Diversos estudios estiman que hasta en un 65% de las enfermedades bacterianas humanas interviene la formación de biopelícula y algunos otros factores predisponentes.<sup>29</sup> Algunos de estos microorganismo que tienen capacidad de formar biopelícula y producir enfermedades son: *Streptococcus* spp., *Staphylococcus* spp., en endocarditis valvular<sup>30,31</sup>; *Streptococcus* spp., *Haemophilus influenzae*, *Moraxella* spp., *Pseudomonas* spp., en otitis media<sup>32,33</sup>; *Escherichia coli*, *Klebsiella* spp., *Proteus* spp., *Serratia* spp., *Bacteroides* spp., *Corynebacterium* spp., en prostatitis bacteriana<sup>34,35</sup>; *Staphylococcus* spp., *Pseudomonas* spp., en fibrosis quística<sup>36</sup>; *Fusobacterium* spp.,

*Eubacterium* spp., *Lactobacillus* spp., *Haemophilus influenzae* en periodontitis.<sup>37,38</sup>

Recientemente en 2009, se aisló *Neisseria meningitidis* serogrupo B de nasofaringe y se le ha encontrado relación con septicemia y muerte por meningitis en humanos<sup>39</sup>; asimismo, se ha reportado que no solamente bacterias tienen la capacidad para agruparse en biopelículas, si no también levaduras como *Candida* spp., en pacientes clínicamente inmunocomprometidos.<sup>40</sup>

Además, estos estudios demuestran que la mayoría de las bacterias que forman estos agregados bacterianos se encuentran viables. Se sabe que el 80% de las células que conforman una biopelícula son capaces de migrar a otros sitios y formar nuevas agrupaciones.<sup>15,41</sup>

En Medicina Veterinaria se ha reportado la relación de la presencia de biopelículas con diversas enfermedades en diferentes especies animales como son: *Acinetobacter baumannii* en infecciones en catéteres aplicados en la yugular<sup>42</sup>, *Actinobacillus pleuropneumoniae* y *Staphylococcus epidermidis* en infecciones post operatorias<sup>43-45</sup>, *Klebsiella* spp., en infecciones musculo esquelética en equinos<sup>46</sup>; *Pseudomonas aeruginosa* en otitis<sup>47</sup>, *Staphylococcus intermedius* en pioderma en caninos<sup>48</sup>; *Staphylococcus aureus* y *Staphylococcus epidermidis* en mastitis en bovinos<sup>49-52</sup>, *Haemophilus parasuis* en neumonías en cerdos<sup>53</sup> y *Mycoplasma mycoides* subespecie *mycoides* SC en pleuroneumonías de bovinos.<sup>54</sup>

Las biopelículas en el campo industrial están implicadas en diversos ambientes constituyendo un enemigo cuando están involucradas en el “biofouling”, que es la contaminación producida por actividad microbiana sobre diferentes superficies, que genera corrosión de equipos, cascos de barcos, tuberías y de campos petroleros.<sup>55,56</sup> En los oleoductos y en general, en todas las tuberías, la formación de biopelículas como

comunidades viscosas ocasiona el taponamiento de filtros y orificios de estas estructuras produciendo alteraciones al fluido normal.<sup>57</sup>

El Instituto Nacional de Salud de E.U. publico recientemente que mas del 60% de todas las infecciones microbianas son causadas por biopelículas, de igual manera se le atribuye el 60% de las infecciones nosocomiales; incrementando la estancia hospitalaria, los costos de atención y la mortalidad.<sup>58</sup>

De igual forma el papel de la biopelícula en la contaminación de los implantes médico-humano ha sido bien establecido en válvulas cardiacas, catéteres de línea central, intravenosos y urinarios que pueden conducir a bacteremia o sepsis, e infecciones de lentes de contacto.<sup>59</sup>

## II.- JUSTIFICACIÓN

En Medicina Veterinaria existen pocos estudios al respecto, sin embargo la información disponible y los estudios realizados por Olson *et al* en 2002<sup>60</sup>, determinó la capacidad de producción de biopelícula de 22 cepas bacterianas dentro de las cuales se pueden destacar: *Corynebacterium pseudotuberculosis*, *Corynebacterium renale*, *Mannheimia haemolytica*, *Pasteurella multocida*, *Arcanobacterium* spp., *Haemophilus somnus* (*Histophilus somni*), *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus hyicus*, *Streptococcus agalactiae*, *Streptococcus dysgalactiae*, *Streptococcus suis*, *Escherichia coli* y *Salmonella* spp. Por otra parte Sandal *et al* en 2007<sup>61</sup>, realizó un estudio en el que compara y caracteriza el desarrollo de biopelícula de aislamientos patógenos y comensales de *H. somni*. Recientemente Sandal *et al* en 2009<sup>62</sup>, infectaron experimentalmente bovinos con *H. somni*, en donde se observó la formación de biopelícula en tejido pulmonar.

Actualmente no se tiene conocimiento de investigaciones realizadas en México sobre el tema en bacterias de interés veterinario. Un ejemplo de lo anterior son las bacterias de la



familia *Pasteurellaceae* como *P. multocida*, *M. haemolytica* e *H. somni* que participan en el llamado Complejo Respiratorio Infeccioso (CRI) de los bovinos y ovinos y que constituye una de las causas más importantes que ocasionan pérdidas económicas por concepto de mortalidad, morbilidad; además del establecimiento de tratamientos médicos y uso de biológicos como prevención que en ocasiones dan resultados variables; todo lo anterior afecta de forma importante la productividad en este sector en la industria ganadera.<sup>63</sup> La capacidad que tienen las bacterias antes mencionadas de producir biopelícula y su relación con la resistencia bacteriana a quimioterapéuticos es un aspecto importante por conocer, por lo que se considera oportuno realizar investigaciones de este tipo.

### **III.- HIPOTESIS DE TRABAJO**

Las bacterias de la familia *Pasteurellaceae*: *P. multocida*, *M. haemolytica* e *H. somni* tienen la capacidad de producción de biopelícula además de existir una concordancia entre su formación y resistencia a antimicrobianos.

### **IV.- OBJETIVO GENERAL**

Determinar la capacidad de producción de biopelícula en aislamientos de *P. multocida*, *M. haemolytica* e *H. somni* y establecer una concordancia con la resistencia antimicrobiana.

#### **4.1.- OBJETIVOS PARTICULARES**

- 1.- Determinar la capacidad de producción de biopelícula utilizando los métodos de: Siembra en tubo de Christensen, siembra en agar rojo Congo y el ensayo de producción de biopelícula en microplaca de 96 pozos.
- 2.- Establecer la susceptibilidad a quimioterapéuticos utilizando la técnica de Bauer *et al* y la Concentración Mínima Inhibitoria (CMI).
- 3.- Realizar observaciones de microscopía electrónica de barrido para comprobar la formación de biopelícula.
- 4.- Establecer si existe concordancia entre la capacidad de formación de biopelícula y la resistencia a antimicrobianos.

## V.- MATERIALES Y MÉTODOS

### 5.1.- Aislamientos bacterianos

Se utilizaron 20 aislamientos de *P. multocida*, 20 de *M. haemolytica* obtenidos en trabajo previo en el CENID Microbiología INIFAP a partir de exudado nasal de bovino, además de 10 de *H. somni* obtenidos del tracto reproductor de bovino y ovino. Se utilizaron cepas de *E. coli* como control positivo y *E. coli* K-12 como control negativo, ambas cepas de origen humano en todas las pruebas realizadas.

Cada uno de los 50 aislamientos fueron cultivados por igual; en agar sangre<sup>a</sup>, adicionado con 5% de sangre de ovino, incubado a 37 °C durante 36 h, con un ambiente enriquecido con 5% de CO<sub>2</sub>; posteriormente se inocularon en caldo infusión cerebro-corazón<sup>b</sup> adicionado con trizma base al 0.1% y tiamina monofosfatada<sup>c</sup> al 0.01% (BHI-TT), se colocaron en un agitador orbital (200 rpm) a 37 °C, para obtener un cultivo bacteriológico, que en la fase *log* tenga una concentración de  $5 \times 10^9$  UFC/ml.<sup>60,61,64</sup>

---

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

## **5.2.- Determinación de la capacidad de producción de biopelícula**

### **5.2.1.- Método en tubo de Christensen (safranina)**

Se colocaron 2 ml de caldo infusión cerebro-corazón, suplementados con glucosa<sup>d</sup> al 0.25% en un tubo de ensayo, el cual fue inoculado con 0.1 ml de la suspensión bacteriana con una concentración de  $5 \times 10^9$  UFC/ml, correspondiente a cada uno de los aislamientos; se incubó a 37 °C durante 24 h, en seguida se eliminó el contenido del tubo y se colocaron 2 ml de safranina<sup>e</sup> al 1%; el tubo se agitó cuidadosamente durante 3 min a temperatura ambiente para asegurar una tinción uniforme del material adherido a las paredes; posteriormente se eliminó el excedente del colorante y se lavó el tubo con agua destilada dos veces; finalmente, los tubos se colocaron boca abajo para que se secaran. La prueba se consideró positiva cuando se observó la formación de una película teñida en la superficie interna del tubo que se cuantificó de la siguiente forma: 0, ½+, 1+, 2+, 3+. Los que presentaron formación de ½+ y 1+ fueron clasificados como bajos, 2+ como medianos y los que desarrollaron 3+ fueron considerados como altos formadores.<sup>65</sup>

### **5.2.2.- Siembra de colonia en agar de rojo Congo**

Para elaborar el medio agar rojo Congo se colocaron 37 g/l de caldo infusión cerebro-corazón, 50 g de sucrosa, 10 g de agar bacteriológico<sup>f</sup> y 0.8 g de rojo Congo<sup>g</sup>. La mezcla se esterilizó en autoclave a 121°C, 15 lbr, 15 min; se dejaron polimerizar por 24 h, al mismo tiempo se sembraron los aislamientos en estudio en agar sangre (5% de sangre de ovino), e incubaron a 37 °C durante 36 h, con un ambiente enriquecido con 5% de

---

b Becton Dickinson de México

c Laboratorios Merker.

d Laboratorios Merker.

e Laboratorios Merker.

f Becton Dickinson de México.

g Laboratorios Disco.

CO<sub>2</sub>; los cultivos a partir de agar sangre, se inocularon con el método de estría cruzada y se incubaron a 37 °C durante 24 h.

Los aislamientos que produjeron colonias negras opacas, con una consistencia seca y firme al medio, se consideran como productoras de biopelícula y aquellos aislamientos que produjeron colonias de color rojo-rosa brillantes de consistencia laxa, se consideran negativas a la producción de biopelícula.<sup>66</sup>

### **5.2.3.- Ensayo de producción de biopelícula en microplaca de 96 pozos**

Del inóculo inicial ( $5 \times 10^9$  UFC/ml) se realizó una dilución 1:100 en el medio BHI-TT de los cuales se tomaron 100 µl y se transfirieron por triplicado a una microplaca<sup>h</sup> de polivinil de 96 pozos de fondo en “U”. Se incubaron a 37 °C durante 48 h, una vez transcurrido este tiempo se removieron las células planctónicas mediante decantación y se realizaron tres lavados sumergiendo la microplaca en agua destilada estéril; posteriormente se adicionaron 125 µl de cristal violeta al 0.1%, durante 10 min a temperatura ambiente, después se removió el excedente de colorante mediante dos lavados, al sumergir la microplaca en agua destilada estéril. A la microplaca se le agregaron 200 µl de etanol al 95% durante 15 min a temperatura ambiente.

Finalmente se transfirieron 125 µl de etanol y biopelícula teñida a otra microplaca estéril de fondo plano en donde se efectuó la lectura en espectrofotómetro a una densidad óptica de 630 nm de absorbancia, con la finalidad de evidenciar la formación de biopelícula.<sup>67</sup>

---

h Laboratorios Nunc.

i Becton Dickinson de México.

j Laboratorios Sigma.

### 5.3.- Susceptibilidad a quimioterapéuticos mediante la técnica de Bauer *et al*

De cada uno de los aislamientos bacterianos se realizó una suspensión de 0.5 Mc Farland se inoculó por estría cerrada en agar Müller Hinton<sup>i</sup>, donde se colocaron los sensidiscos:<sup>j</sup> gentamicina (10 µg), tetraciclina (30 µg), ampicilina (10 µg), penicilina (10 UI) y estreptomycinina (300 µg); con una distancia de 40 mm entre ellos. Se incubaron a 37 °C durante 24 h y para medir los halos de inhibición se utilizó un vernier.<sup>68-70</sup> Los valores de interpretación de los halos de inhibición se analizaron según los criterios propuestos por el National Committee for Clinical Laboratory Standards (NCCLS).<sup>69</sup>

### 5.4.- Determinación de Concentración Mínima Inhibitoria

Los 50 aislamientos en estudio fueron preparados para realizarles Concentración Mínima Inhibitoria en un sistema automatizado utilizando los mismos quimioterapéuticos: gentamicina, tetraciclina, ampicilina, penicilina y estreptomycinina.

Cada uno de los quimioterapéuticos utilizados fue preparado a una solución stock, calculando los gramos de la sal pura, disolvente y diluyente respectivo. (Cuadro 1).

**Cuadro 1.** Disolventes y diluyentes para cada quimioterapéutico utilizado.

<b>QUIMIOTERAPÉUTICO.</b>	<b>DISOLVENTE.</b>	<b>DILUYENTE.</b>
Gentamicina	Agua	Agua
Tetraciclina	Agua	Agua
Ampicilina	Amortiguador de fosfato pH 8.0, 0.1 mol.	Amortiguador de fosfato pH 6.0, 0.1 mol.
Penicilina	Agua	Agua
Estreptomycinina	Agua	Agua

Ya que se tiene disuelto el quimioterapéutico, en un volumen de 8 ml, se esteriliza mediante un filtro de 0.22 µm y se realizan diluciones para obtener las diferentes concentraciones: 256 µg/ml; 128 µg/ml; 64 µg/ml; 1 µg/ml; 32 µg/ml; 16 µg/ml; 8 µg/ml; 4 µg/ml; 2 µg/ml; 1 µg/ml; 0.5 µg/ml; 0.25 µg/ml y 0.125 µg/ml. Posteriormente, de cada tubo con diferente concentración se toman 3 ml y se colocan en

otro tubo con 24 ml de agar Müeller Hinton, además de adicionársele 3 ml de sangre, homogenizar esta mezcla y después vaciarla en placas *omni tray* de 68 x 128 mm,<sup>k</sup> que se dejan 24 h polimerizar.

El cultivo bacteriano se prepara en medio agar Müeller Hinton con 5% de sangre, durante 24 h de incubación a 37 °C, a partir de esta placa de agar se realiza una suspensión que se estandariza a 0.5 Mc Farland, para después hacer una dilución 1:10 en solución salina estéril y de esta última suspensión tomar 200 µl y colocarlos en una placa de 96 pozos.

Esta placa con el cultivo bacteriano, es colocada en el sistema automatizado, el cual inocular en cada placa *omni tray* con diferentes concentraciones de quimioterapéutico el inóculo bacteriológico y se incuban durante 18 h a 37 °C.

La lectura se realiza, al establecer la concentración del quimioterapéutico en la placa *omni tray* en donde ya no hay crecimiento bacteriano.

En todas las pruebas realizadas se incluyeron controles ATCC de *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853, *Escherichia coli* ATCC 25922, *Staphylococcus aureus* ATCC 29213 y *Enterococcus faecalis* ATCC 29212, para evitar interpretaciones erróneas en los resultados.<sup>69</sup>

#### **5.5.- Determinación de la biopelícula mediante microscopia electrónica de barrido**

De cada género bacteriano (*P. multocida*, *M. haemolytica* e *H. somni*) se escogió el aislamiento con mayor capacidad de producir biopelícula, de acuerdo a los procedimientos anteriormente descritos, y se procesó para microscopia electrónica de barrido.

---

<sup>k</sup> Laboratorios Nunc.

Del inóculo inicial ( $5 \times 10^9$  UFC/ml) se realizó una dilución 1:100 en el medio BHI, se colocó 1 ml de la suspensión bacteriana en una caja de Petri para cultivo celular de 35 x 10 mm de poliestileno<sup>l</sup> con un cubreobjetos estéril en su interior y se incubaron a 37 °C a tres diferentes tiempos, 48, 120 y 168 h. Una vez transcurrido el tiempo correspondiente de incubación las muestras (la biopelícula adherida al cubreobjetos) fueron fijadas con glutaraldehído al 2.5% en amortiguador de cacodilato de sodio<sup>m</sup> 0.1 M, pH 7.2 durante 60 min a 4 °C.

Posteriormente, se realizaron tres lavados con una duración de 10 min cada uno con amortiguador de cacodilato de sodio 0.2 M, pH 7.2. Las muestras se post fijaron en tetraóxido de osmio<sup>n</sup> al 1% durante 45 min, se hicieron 3 nuevos lavados de 10 min cada uno con amortiguador de cacodilato de sodio 0.1 M, pH 7.2, se deshidrataron con alcohol etílico de forma ascendente; alcohol al 30%, 10 min a temperatura ambiente, hasta llegar a una concentración de alcohol al 100% durante 15 min a temperatura ambiente. Después las muestras se desecaron a punto crítico en un desecador Samdry-780 utilizando CO<sub>2</sub>; una vez desecadas se colocaron en un porta especímenes, evaporados con carbón e ionizados con oro durante 6 min, utilizando un ionizador JEOL. Se colocaron en un evaporador de alto vacío para cubrir con oro durante 6 min y finalmente se observaron las muestras en un microscopio electrónico de barrido Zeiss DSM-950.<sup>71-73</sup>

---

<sup>l</sup> Laboratorios Corning.  
<sup>m</sup> IACSA.  
<sup>n</sup> IACSA.



### **5.6.- Análisis de concordancia entre la producción de biopelícula y la resistencia antimicrobiana.**

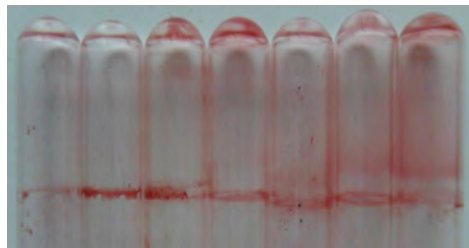
Para poder establecer una concordancia estadística entre la producción de biopelícula y la resistencia antimicrobiana en los aislamientos de los tres géneros bacterianos en estudio, se utilizó el programa *Statal for Windows perpetual 7.0*, con el que se realizaron varias pruebas de Kappa.

## VI.- RESULTADOS

### 6.1.- Determinación de la capacidad de producción de biopelícula

#### 6.1.1.- Método en tubo de Christensen (safranina)

De acuerdo a la metodología descrita para esta técnica, se determinó que de los 20 aislamientos de *P. multocida*, el 30% (6/20) fueron altos formadores de biopelícula, el 40% (8/20) medianos, el 20% (4/20) bajos y un 10% (2/20) negativos. Para *M. haemolytica*, 20% (4/20) fueron altos formadores, 50% (10/20) medianos, 15% (3/20) bajos y 15% (3/30) negativos. Para *H. somni*, un 30% (3/10) fueron altos formadores, 20% (2/10) medianos, 40% (4/10) bajos, y 10% (1/10) negativos a la prueba. (Fig. 1).



**Fig. 1.** Determinación de la biopelícula por el método de Christensen. Se observa diferentes cantidades de biopelícula adherida a las paredes de los tubos correspondientes a los aislamientos de *P. multocida*, *M. haemolytica* e *H. somni*.

#### 6.1.2.- Siembra de colonias en agar de rojo Congo

De acuerdo a la técnica de siembra en el agar rojo Congo, para *P. multocida* se identificó 80% (16/20) positivas a la formación de biopelícula y un 20% (4/20)

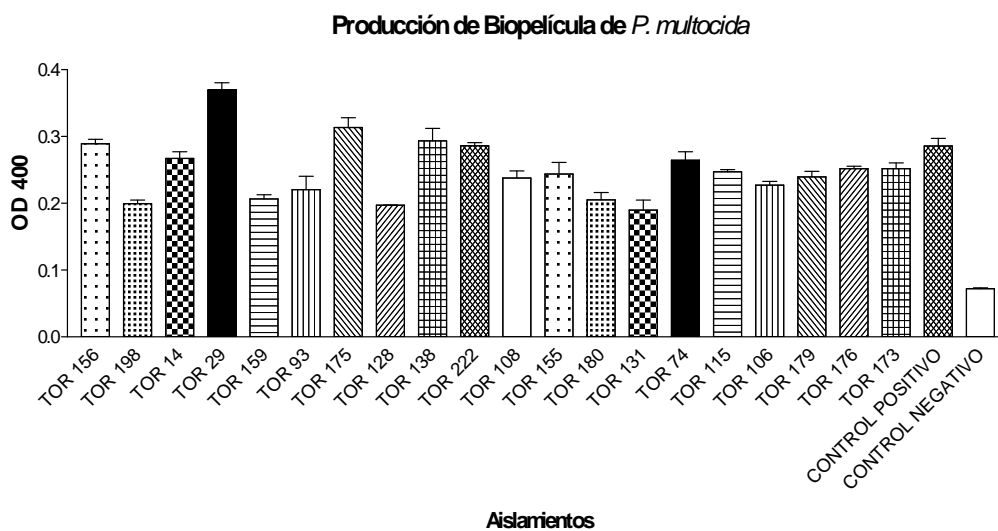
negativas; para *M. haemolytica*, se identificó un 65% (13/20) positivas y 35% (7/20) negativas. (Fig. 2); para *H. somni*, no existió crecimiento en ninguno de los aislamientos, debido a que el medio de cultivo no resultó adecuado para el desarrollo.



**Fig. 2.** Siembra en agar de rojo Congo. Coloración rojo-rosa brillante y consistencia laxa, de aislamientos negativos de *E. coli* K-12 (izquierda) y coloración negruzca opaca y consistencia seca y firme, de aislamientos positivos de *P. multocida* y *M. haemolytica* a la producción de biopelícula (derecha).

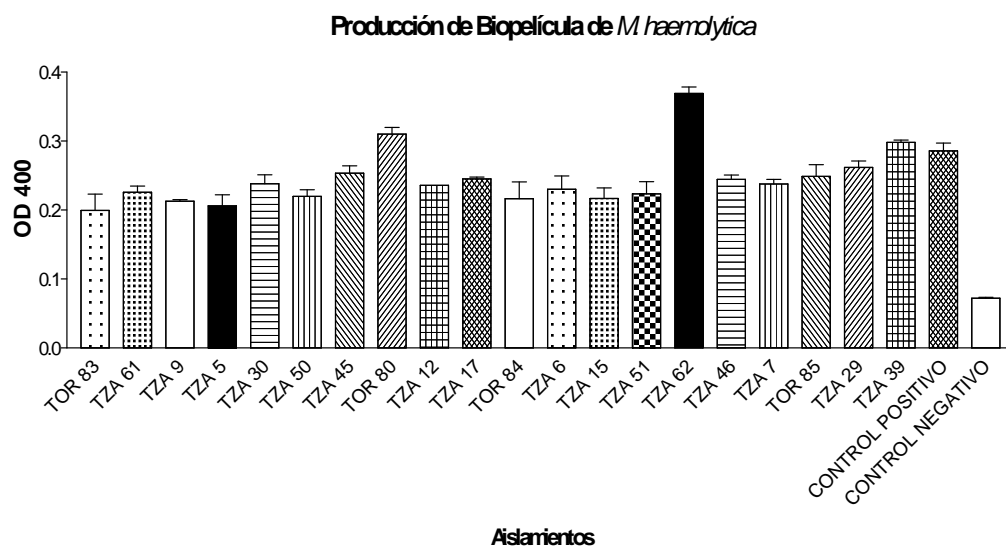
### 6.1.3.- Ensayo de producción de biopelícula en microplaca de 96 pozos

Con esta metodología se determinó que el 100% de los aislamientos de *P. multocida* fueron capaces de producir biopelícula, y que el 20% (4/20) son considerados como altos formadores. (Grafica 1 y Fig. 3).



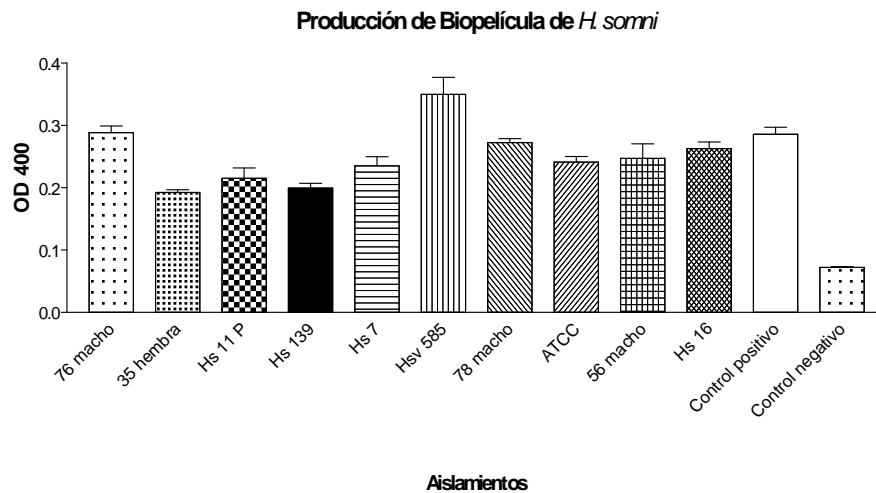
**Grafica 1.** Ensayo en microplaca de 96 pozos. Diferencias en la densidad óptica de los aislamientos de *P. multocida*, que indican diferentes capacidades de producción de biopelícula.

Para *M. haemolytica*, se observó que el 100% de los aislamientos fueron positivos para dicha característica, y que un 15% (3/20) fueron considerados como altos formadores de biopelícula. (Grafica 2 y Fig. 3).

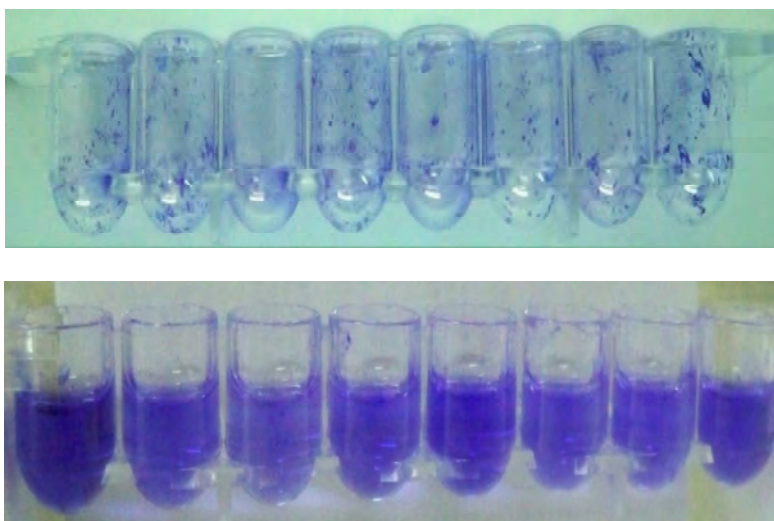


**Grafica 2.** Ensayo en microplaca de 96 pozos. Diferencias en la densidad óptica de los aislamientos de *M. haemolytica* que indican diferentes capacidades de producción de biopelícula.

Con respecto a los aislamientos de *H. somni* éstos resultaron ser positivos a la producción de biopelícula en un 100% y un 20% (2/10) fueron considerados como altos formadores. (Grafica 3 y Fig. 4).



**Grafica 3.** Ensayo en microplaca de 96 pozos. Diferencias en la densidad óptica de los aislamientos de *H. somni* que indican diferentes capacidades de producción de biopelícula.



**Fig. 3.** Ensayo en microplaca de 96 pozos. *P. multocida* y *M. haemolytica*. Se observa la biopelícula adherida a las paredes de los pozos, y las diferentes intensidades que ésta representa.



**Fig. 4.** Ensayo en microplaca de 96 pozos. *H. somni*. Se observa la biopelícula adherida a las paredes de los pozos, y las diferentes intensidades que ésta representa.

### **6.2.- Susceptibilidad a quimioterapéuticos mediante la técnica de Bauer *et al***

Los resultados de los antibiogramas de *P. multocida* determinaron la sensibilidad a gentamicina, tetraciclina, ampicilina y penicilina en un 100%, sin embargo, para la estreptomina se registró un 30% (6/20) de resistencia, un 15% (3/20) resistencia intermedia y 55% (11/20) susceptibles. En *M. haemolytica* se registró un 10% (2/20) de resistencia a tetraciclinas y de resistencia intermedia a penicilina, en el caso de estreptomina se registró un 35% (7/20) de resistencia, 20% (4/20) intermedia y 45% (9/20) susceptibles. Con *H. somni* se encontró 10% (1/10) de resistencia, 10% (1/10) intermedia y 80% (8/10) susceptibles para estreptomina, siendo 100% susceptibles a los demás quimioterapéuticos.

### **6.3.- Determinación de Concentración Mínima Inhibitoria.**

Los resultados de las Concentraciones Mínimas Inhibitorias de *P. multocida*, mostraron que el 80% (16/20) de los aislamientos son resistentes a la gentamicina; el 85% (17/20), a la tetraciclina; el 100% (20/20), susceptible a la ampicilina y penicilina; y el 50% (10/20) resistente a estreptomina. Los resultados fueron interpretados de acuerdo a las diluciones de los quimioterapéuticos y a los aislamientos bacterianos utilizados. (Cuadro 2). Los valores de interpretación para los tres géneros bacterianos utilizados en el presente estudio se analizaron según los criterios propuestos por el National Committee for Clinical Laboratory Standards (NCCLS).<sup>69</sup>

**Cuadro 2.** Resultados de las CMI de los aislamientos de *P. multocida*.

<b>AISLAMIENTO</b>	<b>Gentamicina µg/ml</b>	<b>Tetraciclina µg/ml</b>	<b>Ampicilina µg/ml</b>	<b>Penicilina µg/ml</b>	<b>Estreptomicina µg/ml</b>
TOR 156	8	32	0.125	0.125	128
TOR 198	2	0.25	0.125	0.125	32
TOR 14	8	8	0.125	0.125	64
TOR 29	8	64	0.125	0.125	256
TOR 159	2	8	0.125	0.125	256
TOR 93	8	16	0.125	0.125	128
TOR 175	8	16	0.125	0.125	128
TOR 128	2	0.25	0.125	0.125	64
TOR 138	8	16	0.25	0.125	128
TOR 222	8	8	0.125	0.125	64
TOR 108	8	8	0.125	0.125	64
TOR 155	8	64	0.25	0.125	64
TOR 180	8	8	0.125	0.125	256
TOR 131	2	0.25	0.125	0.125	64
TOR 74	8	32	0.125	0.125	64
TOR 115	8	8	0.125	0.125	64
TOR 106	8	8	0.125	0.125	64
TOR 179	8	32	0.25	0.125	256
TOR 176	8	8	0.25	0.125	256
TOR 173	8	8	0.125	0.125	128

Para *M. haemolytica*, los resultados de las Concentraciones Mínimas Inhibitorias, mostraron que el 15% (3/20) es resistente a gentamicina; el 5% (1/20) a tetraciclina; el 100% (20/20) susceptible a ampicilina y penicilina; el 10% (2/20) mostró resistencia a estreptomicina. (Cuadro 3).

**Cuadro 3.** Resultados de las CMI de los aislamientos de *M. haemolytica*..

<b>AISLAMIENTO</b>	<b>Gentamicina µg/ml</b>	<b>Tetraciclina µg/ml</b>	<b>Ampicilina µg/ml</b>	<b>Penicilina µg/ml</b>	<b>Estreptomycinina µg/ml</b>
TOR 83	2	0.5	0.125	0.125	16
TZY 61	2	0.25	0.125	0.125	16
TZY 9	2	0.5	1	0.125	16
TZY 5	2	0.5	0.125	0.125	16
TZY 30	2	0.5	0.125	0.125	16
TZY 50	2	0.5	0.125	0.125	16
TZY 45	2	0.5	0.125	0.125	16
TOR 80	8	0.5	0.25	0.125	128
TZY 12	2	0.25	0.125	0.125	16
TZY 17	2	0.25	0.125	0.125	16
TOR 84	2	0.25	0.125	0.125	16
TZY 6	2	0.25	0.125	0.125	16
TZY 15	2	0.25	0.125	0.125	16
TZY 51	2	0.25	0.125	0.125	16
TZY 62	8	4	0.125	0.125	256
TZY 46	2	0.25	0.125	0.125	16
TZY 7	2	0.5	0.125	0.125	16
TOR 85	2	0.25	0.125	0.125	16
TZY 29	2	0.5	0.125	0.125	16
TZY 39	8	0.5	0.125	0.125	16

En el caso de *H. somni*, los resultados de las Concentraciones Mínimas Inhibitorias, mostraron que el 40% (4/10) fue resistente a gentamicina; el 50% (5/10) a tetraciclina; el 100% (10/10) susceptible a la ampicilina; el 30% (3/10) resistente a penicilina y solo un 10% (1/10) resistente a la estreptomycinina. (Cuadro 4).

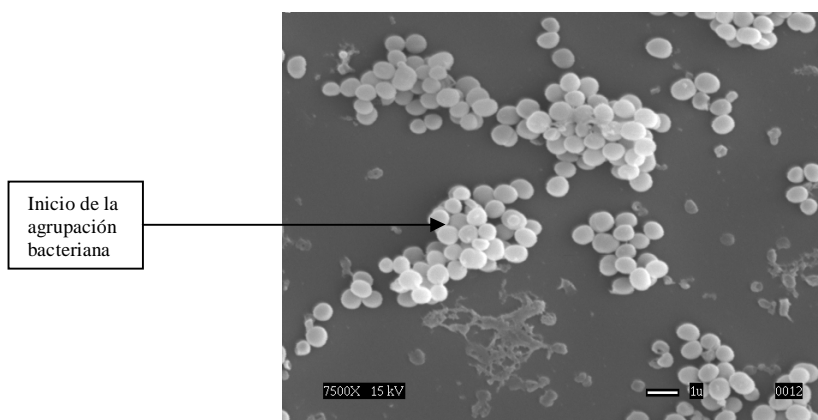
**Cuadro 4.** Resultados de las CMI de los aislamientos de *H. somni*.

<b>AISLAMIENTO</b>	<b>Gentamicina µg/ml</b>	<b>Tetraciclina µg/ml</b>	<b>Ampicilina µg/ml</b>	<b>Penicilina µg/ml</b>	<b>Estreptomycinina µg/ml</b>
76 MACHO	64	16	2	16	256
35 HEMBRA	2	8	1	0.125	32
Hs 11 P	2	16	1	16	32
Hs 139	8	0.25	1	0.125	32
Hs 7	8	16	0.125	0.125	32
Hsv 585	8	32	0.125	16	32
78 MACHO	2	32	0.125	0.125	32
ATCC	2	8	0.125	0.125	32
56 MACHO	2	8	0.125	0.125	16
Hs 16	2	8	0.125	0.125	32

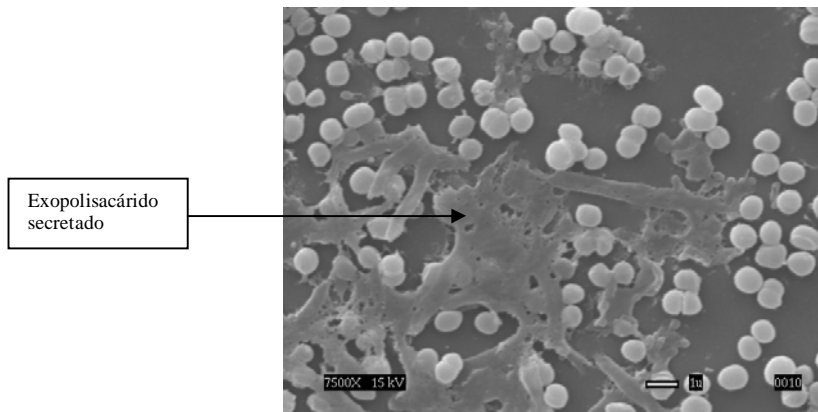


#### 6.4.- Determinación de la biopelícula mediante microscopía electrónica de barrido.

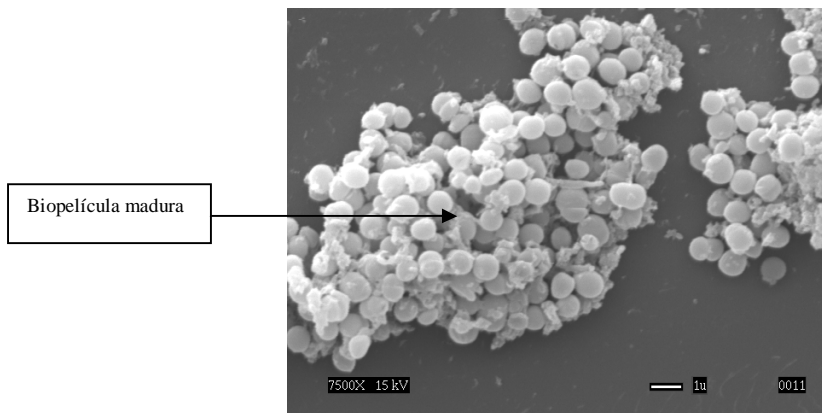
De cada género bacteriano que se utilizó en el presente estudio se seleccionó el aislamiento que resultó ser el mayor productor de biopelícula con los tres métodos utilizados para evidenciar dicha característica, se procesó para microscopía electrónica de barrido y se observaron los tres componentes que estructuran la biopelícula, es decir, la masa de células, los espacios intercelulares o canales, que permiten el flujo de nutrientes para dicho agregado bacteriano y la matriz extracelular que lo rodea compuesta por una mezcla de exopolisacáridos, proteínas, ácidos nucleicos y otras sustancias secretadas por las mismas bacterias formadoras. La biopelícula puede tener diferentes formas dependiendo de las condiciones ambientales bajo las cuales fue formada; en el caso del presente estudio, se logró la formación en un cubre objetos, lo que permitió evidenciar mediante las fotografías que se muestran, la agrupación y la estructura tridimensional que adquiere conforme pasa el tiempo de incubación, de tal manera que a mayor tiempo, mayor polímero extracelular secretado, mejor y mayor agrupación bacteriana, mejor y progresiva formación de canales, logrando una microcolonia madura. (Fig.5-13).



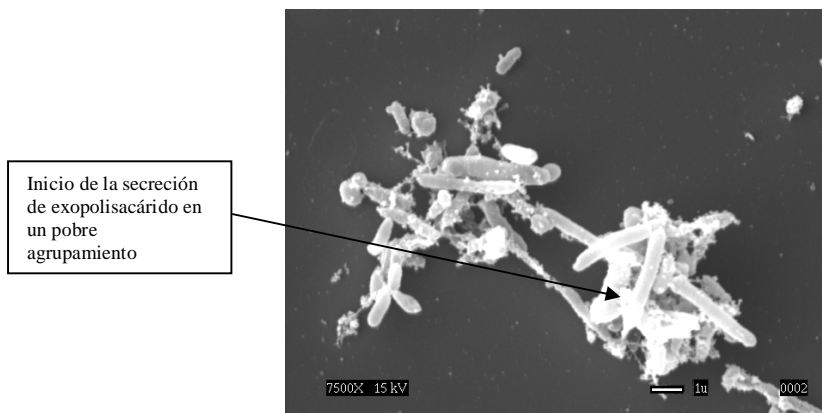
**Fig. 5.** Microscopía electrónica de barrido de *P. multocida* a las 48 h de incubación, en donde se observa el comienzo de la agrupación bacteriana.



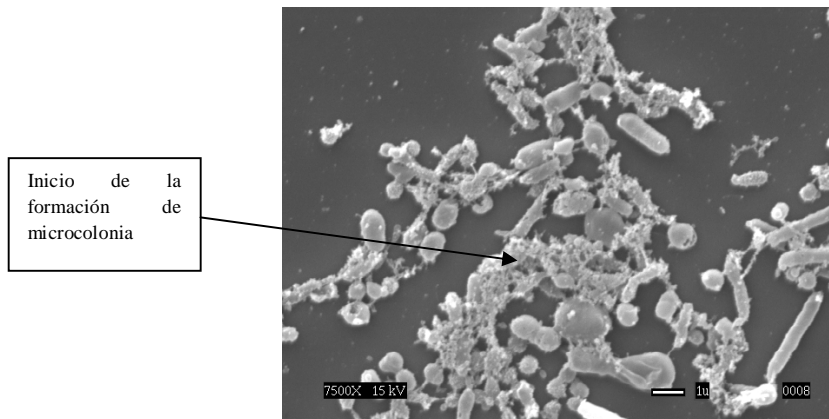
**Fig. 6.** Microscopia electrónica de barrido de *P. multocida* a las 120 h de incubación, en donde se observa la secreción del exopolisacárido que facilita la cohesión entre bacterias.



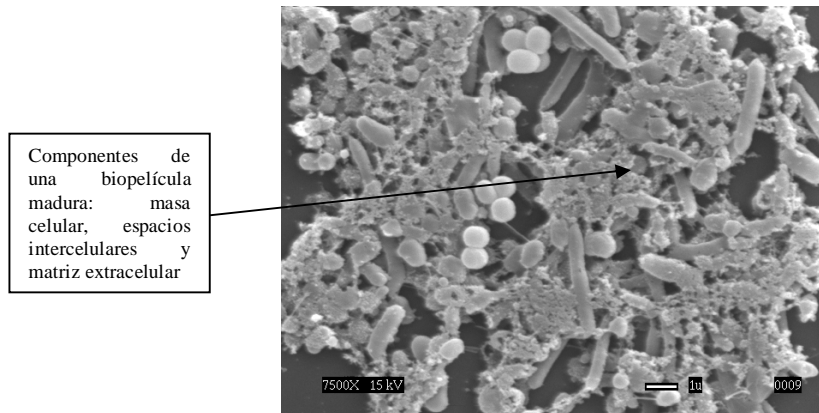
**Fig. 7.** Microscopia electrónica de barrido de *P. multocida* a las 168 h de incubación, en donde se observa la formación de una biopelícula madura.



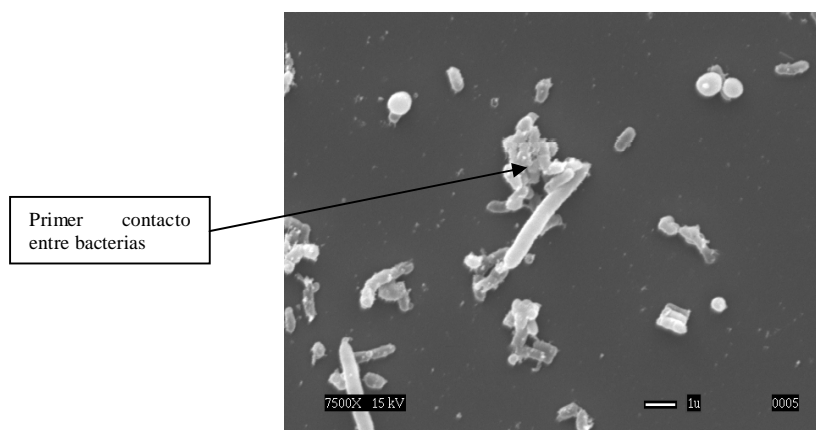
**Fig. 8.** Microscopia electrónica de barrido de *M. haemolytica* a las 48 h de incubación, en donde se observa un pobre agrupamiento y poca secreción del exopolisacárido.



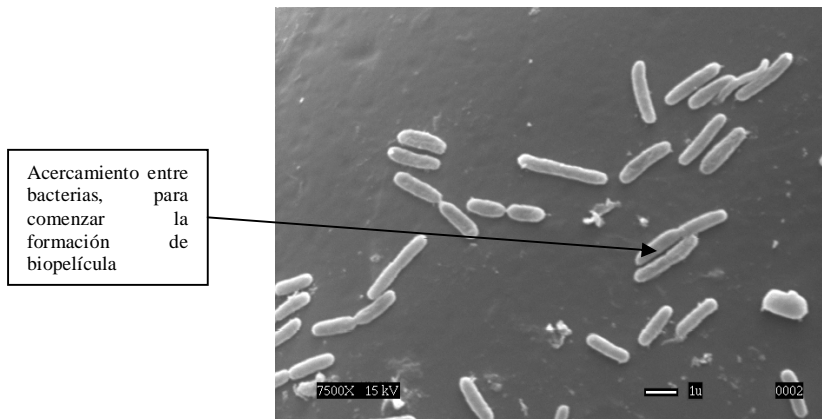
**Fig. 9.** Microscopia electrónica de barrido de *M. haemolytica* a las 120 h de incubación, en donde se observa el comienzo de formación de una microcolonia.



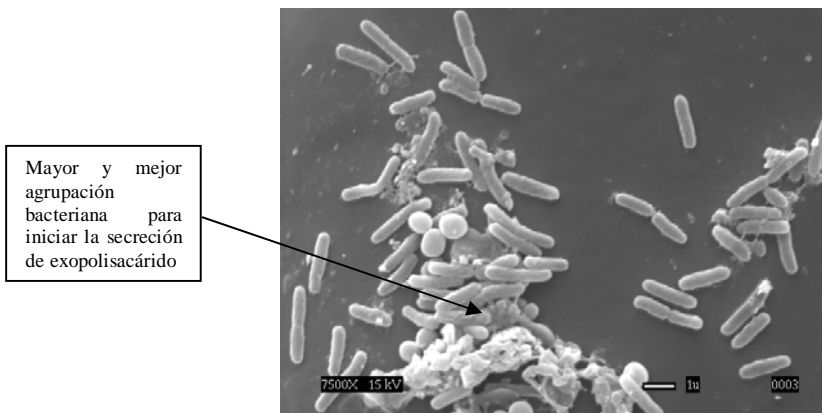
**Fig. 10.** Microscopia electrónica de barrido de *M. haemolytica* a las 168 h de incubación, en donde se observan los tres componentes mayoritarios de una biopelícula madura.



**Fig. 11.** Microscopia electrónica de barrido de *H. somni* a las 48 h de incubación, en donde se observa un primer contacto entre bacterias.



**Fig. 12.** Microscopia electrónica de barrido de *H. somni* a las 120 h de incubación, en donde se observa el acercamiento e inicio de la agrupación entre bacterias, para formar microcolonias.



**Fig. 13.** Microscopia electrónica de barrido de *H. somni* a las 168 h de incubación, en donde se observa la agrupación y el inicio en la secreción de exopolisacárido, que les conferirá mayor protección.

### **6.5.- Análisis de concordancia entre la producción de biopelícula y la resistencia antimicrobiana.**

Los resultados obtenidos de producción de biopelícula y de resistencia antimicrobiana fueron analizados de tal manera que se estableció una concordancia estadística, para ello se clasificaron los aislamientos en altos, medianos y bajos productores de biopelícula y en resistentes y susceptibles a los diferentes quimioterapéuticos. (Cuadro 5-7).

**Cuadro 5.** Clasificación de los aislamientos de *P. multocida* respecto a producción de biopelícula y resistencia antimicrobiana.

AISLAMIENTO	ALTO	MED.	BAJO	Gentamicina	Tetraciclina	Ampicilina	Penicilina	Estreptomicina
TOR 156	*			R	R	S	S	R
TOR 198			*	S	S	S	S	S
TOR 14		*		R	R	S	S	S
TOR 29	*			R	R	S	S	R
TOR 159		*		S	R	S	S	R
TOR 93		*		R	R	S	S	R
TOR 175	*			R	R	S	S	R
TOR 128			*	S	S	S	S	S
TOR 138	*			R	R	S	S	R
TOR 222		*		R	R	S	S	S
TOR 108		*		R	R	S	S	S
TOR 155		*		R	R	S	S	S
TOR 180		*		R	R	S	S	R
TOR 131			*	S	S	S	S	S
TOR 74		*		R	R	S	S	S
TOR 115		*		R	R	S	S	S
TOR 106		*		R	R	S	S	S
TOR 179		*		R	R	S	S	R
TOR 176		*		R	R	S	S	R
TOR 173		*		R	R	S	S	R

R: Resistente S: Susceptible

**Cuadro 6.** Clasificación de los aislamientos de *M. haemolytica* respecto a producción de biopelícula y resistencia antimicrobiana.

AISLAMIENTO	ALTO	MED.	BAJO	Gentamicina	Tetraciclina	Ampicilina	Penicilina	Estreptomina
TOR 83			*	S	S	S	S	S
TZY 61		*		S	S	S	S	S
TZY 9			*	S	S	S	S	S
TZY 5			*	S	S	S	S	S
TZY 30		*		S	S	S	S	S
TZY 50		*		S	S	S	S	S
TZY 45		*		S	S	S	S	S
TOR 80	*			R	S	S	S	R
TZY 12		*		S	S	S	S	S
TZY 17		*		S	S	S	S	S
TOR 84			*	S	S	S	S	S
TZY 6		*		S	S	S	S	S
TZY 15			*	S	S	S	S	S
TZY 51			*	S	S	S	S	S
TZY 62	*			R	R	S	S	R
TZY 46		*		S	S	S	S	S
TZY 7		*		S	S	S	S	S
TOR 85		*		S	S	S	S	S
TOR 29		*		S	S	S	S	S
TOR 39	*			R	S	S	S	S

R: Resistente S: Susceptible

**Cuadro 7.** Clasificación de los aislamientos de *H. somni* respecto a producción de biopelícula y resistencia antimicrobiana.

AISLAMIENTO	ALTO	MED.	BAJO	Gentamicina	Tetraciclina	Ampicilina	Penicilina	Estreptomina
76 macho	*			R	R	S	R	R
35 hembra			*	S	S	S	S	S
Hs 11P		*		S	R	S	R	S
Hs 139			*	S	S	S	S	S
Hs 7		*		R	R	S	S	S
Hsv 585	*			R	R	S	R	S
78 macho		*		S	R	S	S	S
ATCC		*		R	S	S	S	S
56 macho		*		S	S	S	S	S
Hs 16		*		S	S	S	S	S

R: Resistente S: Susceptible

Se realizaron análisis Kappa para la concordancia estadística, entre biopelícula y resistencia. (Cuadro 8-10).

**Cuadro 8.** Análisis Kappa de los aislamientos de *P. multocida*.

QUIMIOTERAPEUTICO	KAPPA	CONCORDANCIA
Gentamicina	0.8276	Optima
Tetraciclina	1.0000	Optima
Ampicilina	0.0000	Pésima
Penicilina	0.0000	Pésima
Estreptomina	0.3000	Mala

**Cuadro 9.** Análisis Kappa de los aislamientos de *M. heamolytica*.

QUIMIOTERAPEUTICO	KAPPA	CONCORDANCIA
Gentamicina	1.0000	Optima
Tetraciclina	0.4595	Regular
Ampicilina	0.0000	Pésima
Penicilina	0.0000	Pésima
Estreptomina	0.7727	Buena

Escala de concordancia Kappa.

Optima 1.0000-0.8100  
 Buena 0.8000-0.6100  
 Regula 0.6000-0.4100  
 Mala 0.4000-0.2100  
 Pésima 0.2000-0.0000

**Cuadro 10.** Análisis Kappa de los aislamientos de *H. somni*.

<b>QUIMIOTERAPEUTICO</b>	<b>KAPPA</b>	<b>CONCORDANCIA</b>
Gentamicina	0.5455	Regular
Tetraciclina	0.4000	Mala
Ampicilina	0.0000	Pésima
Penicilina	0.7368	Buena
Estreptomina	0.6154	Buena

Escala de concordancia Kappa.

Optima	1.0000-0.8100
Buena	0.8000-0.6100
Regula	0.6000-0.4100
Mala	0.4000-0.2100
Pésima	0.2000-0.0000

Según los resultados de las pruebas Kappa, los aislamientos de *P. multocida* que resultaron ser mayores productores de biopelícula concuerdan ser aquellos aislamientos resistentes a gentamicina y tetraciclina; para *M. haemolytica*, resistentes a gentamicina y estreptomina y para *H. somni*, resistentes a penicilina y estreptomina. Estos resultados nos permiten conocer que la biopelícula está involucrada en la resistencia antimicrobiana de los diferentes microorganismos.



## VII.- DISCUSIÓN.

Estudios sobre la producción de biopelícula bacteriana y la utilidad de estos agregados se han realizado principalmente en medicina humana desde hace 40 años aproximadamente, con diferentes metodologías y en diversos microorganismos.<sup>74</sup> Otro aspecto importante son los estudios realizados en la industria alimentaria, ya que la presencia de estos agregados en los alimentos conlleva a numerosas pérdidas económicas.<sup>75</sup> En la industria lechera, uno de los problemas más recurrentes es la formación de biopelículas en el sistema de conducción, filtrado y almacenaje de la leche.<sup>76</sup>

En la conducción de agua potable se ha demostrado que queda reducida la velocidad y capacidad de circulación, corrosión de las tuberías o de otras superficies metálicas como los cascos de los barcos, teniendo pérdidas económicas por el uso de pinturas que eviten la adhesión y colonización, sin una efectividad clara.<sup>77</sup>

Dada la importancia en salud animal que puedan tener las bacterias formadoras de biopelícula y su relación con su virulencia, se han empezado a realizar estudios sobre este tema en bacterias de interés veterinario. A nivel mundial son pocas las investigaciones que se han realizado y en nuestro país no existen antecedentes al respecto por lo que es difícil tener suficientes datos de estudios efectuados bajo las mismas condiciones, metodologías y microorganismos similares que permitan hacer un comparativo con la información obtenida en el presente estudio.

Por ejemplo, empleando el método cualitativo de Christensen, se realizó una investigación previa con cepas de *Staphylococcus* coagulasa negativos como *S. epidermidis* de origen humano, que evidenciaron su capacidad de producción y secreción de exopolisacárido, por lo que los autores concluyeron que les confiere resistencia al sistema inmune del hospedador y a los antimicrobianos.<sup>65</sup> Los resultados

obtenidos en el estudio de *Staphylococcus epidermidis* de origen humano causante de blefaroconjuntivitis con 12 horas de incubación mostraron que el 53% (50/93) fueron formadores de biopelícula, de los cuales un 48% (24/50) se consideraron como altos formadores y un 52% (26/50) bajos formadores. Del resto de las cepas, el 47% (43/93) fueron consideradas como negativas.<sup>78</sup> Esta metodología fue una de las empleadas. En el presente estudio, con los aislamientos de *P. multocida*, *M. haemolytica* e *H. somni* se encontró que los tres géneros bacterianos presentaron formación de biopelícula, en diferentes grados, determinados por la intensidad de la película formada y teñida de color rojizo en las paredes del tubo.

Por ejemplo en el caso de *P. multocida*, el 30% (6/20), en *M. haemolytica*, 20% (4/20) e *H. somni*, un 30% (3/10) fueron considerados como altos formadores de biopelícula respectivamente. De acuerdo a la intensidad de la coloración observada en la pared interior de los tubos, los microorganismos fueron clasificados en altos, medianos y bajos formadores de biopelícula. Los resultados obtenidos fueron similares a los que se obtuvieron con *Staphylococcus epidermidis*, con la variante del tiempo de incubación, por tratarse de un microorganismo de rápido crecimiento y no exigente.

Otra metodología cualitativa utilizada fue la siembra en agar rojo Congo, empleada en 1989 para la detección de la producción de “slime” en *Staphylococcus* spp., coagulasa negativos.<sup>66</sup> Esta segunda metodología utilizada en la presente investigación, permitió corroborar la información obtenida inicialmente con los aislamientos de *P. multocida* y *M. haemolytica* que fueron capaces de producir colonias oscuras con consistencia cristalina reseca, un indicativo de la producción del exopolisacárido en un 80% (16/20) y 65% (13/20) respectivamente. El resto de los aislamientos que desarrollaron colonias con características diferentes se consideraron negativas. Freeman<sup>66</sup> *et. al.*, encontró una

positividad del 50% en cepas de *Staphylococcus* spp., estudiadas e incubadas por 24 horas, porcentaje por debajo de lo encontrado en el presente trabajo.

Un dato importante a destacar fue la de no obtener crecimiento de ninguno de los aislamientos de *H. somni*, por lo que se puede establecer que este medio de cultivo no es adecuado para esta bacteria, probablemente por la presencia del rojo de fenol que pudo actuar como inhibidor. Aun cuando se trata de géneros bacterianos diferentes en la velocidad y exigencia de crecimiento, los resultados obtenidos apoyan la hipótesis de la capacidad de producción de biopelícula en *P. multocida* y *M. haemolytica*. Esta es una técnica que solo permite conocer si los aislamientos son o no positivos, pero no es factible conocer el grado de formación.

Una tercera determinación se realizó empleando una metodología cuantitativa, que consistió en realizar un ensayo en microplacas de 96 pozos.<sup>67</sup>

Olson<sup>60</sup> *et al.*, informó de la producción de biopelícula en bacterias de la familia *Pasteurellaceae*, así como 18 aislamientos de diferentes géneros y especies, utilizando una metodología similar en donde determina la concentración de células produciendo biopelícula, así como las células planctónicas, sin embargo utilizó el conteo en placa a diferencia de la metodología utilizada en el presente trabajo, donde se toma la densidad óptica para determinar la concentración. En el estudio referido<sup>60</sup> se detalla que las cuatro cepas estudiadas fueron productoras de biopelícula, aunque se observó a *Pasteurella multocida* de origen aviar como la mayor productora de biopelícula alcanzando una concentración de células de  $1.5 \times 10^5$  UFC/pozo e *Histophilus somni* como la menor productora con  $1 \times 10^4$  UFC/pozo. Los resultados anteriores concuerdan con lo encontrado en el presente estudio en el que los aislamientos de *P. multocida* fueron los mejores productores de biopelícula, ya que 4 aislamientos fueron altos formadores en las tres metodologías empleadas, *M. haemolytica* fue considerado como un formador

intermedio ya que tres aislamientos fueron altos formadores y los aislamientos de *Histophilus somni* los menos productivos, debido a que solo fueron dos los aislamientos clasificados de la misma forma.

Asimismo, Sandal *et. al.*, en el 2007<sup>61</sup>, realizó un estudio en donde comparó la capacidad de producción de biopelícula de aislamientos de *H. somni* comensales y patógenos, utilizando la técnica de microplaca, encontrando que las cepas patógenas aisladas de casos clínicos fueron las que produjeron mayor cantidad de biopelícula, lo que sugiere que estos microorganismos de la familia *Pasterelleceae*, formadores de agregados bacterianos, al secretar el exopolisacárido les permite crear comunidades multiresistentes al ambiente adverso y son capaces de producir enfermedades ayudados por una serie de características que les permite adherirse, multiplicarse, agruparse y comunicarse.

En 2009, Sandal<sup>62</sup> *et al.*, realizó un estudio para evidenciar la capacidad de *H. somni* de formar biopelícula en condiciones *in vivo* al inocular becerros con una cepa patógena y utilizó diferentes metodologías como histopatología, microscopía electrónica de transmisión, microscopía inmunoelectrónica, hibridación *in situ* fluorescente. Este trabajo demostró que *H. somni* es capaz de formar biopelícula en los tejidos como el pulmonar y cardiaco de sus huéspedes naturales, lo que evidenció que la formación de biopelícula está fuertemente asociado a la presentación de neumonía y miocarditis en becerros.

Otros estudios realizados con bacterias de interés veterinario son por ejemplo los realizados por Mc Auliffe *et al.*, en 2006<sup>64</sup>, donde utilizaron la técnica de microplaca de 96 pozos, en diferentes especies del género *Mycoplasma* spp., obteniendo resultados que permiten afirmar que aun cuando se trata de un microorganismo con características peculiares con respecto a su estructura y metabolismo es capaz de producir biopelícula y

que existe una variación en el tiempo y cantidad de polímero extracelular producido en las diferentes especies.

Estos estudios, aun cuando fueron realizados con microorganismos diferentes a los utilizados en el presente estudio, generaron información que permite determinar que la biopelícula es un factor de virulencia que les confiere resistencia a diferentes mecanismos de defensa del hospedador, a los diferentes antimicrobianos y al ambiente mismo.

Existe una concordancia entre las tres diferentes metodologías empleadas en el presente estudio para evidenciar la capacidad de formación de biopelícula por parte de los microorganismos utilizados. La técnica de Christensen permitió hacer una primera clasificación de los aislamientos según la cantidad de polímero extracelular que se adhería a las paredes de los tubos, aunque es una técnica cualitativa evidenció las diferencias que existen entre los géneros bacterianos en estudio. La técnica de siembra en rojo Congo, es una técnica cualitativa, y que solamente nos permite conocer si el aislamiento es positivo o no a la producción, aun así, reforzó los resultados que se habían obtenido en la técnica de Christensen. Al haber empleado una tercera técnica, pero ésta de tipo cuantitativo, como lo fue el ensayo en microplaca de 96 pozos, permitió conocer con mayor detalle y objetividad, las diferencias entre los aislamientos bacterianos de los géneros con los que se trabajó, ya que se obtuvieron resultados analizables estadísticamente y precisos que facilitaron la interpretación. De esta manera podemos asegurar que la mejor metodología para estudiar la capacidad de producción de exopolisacárido es el ensayo en microplaca de 96 pozos.

Los resultados de la prueba de Bauer *et al* que se empleo en el presente estudio, permiten conocer que existen variantes en el grado de resistencia antimicrobiana en cada uno de los tres géneros bacterianos utilizados.

Cabe mencionar que los quimioterapéuticos probados en el presente estudio son los que comúnmente se utilizan, para tratar los problemas neumónicos en rumiantes.<sup>63</sup>

En un estudio previo sobre la resistencia antimicrobiana con la prueba de Bauer *et al*, Pijoan *et al.*, en 2000<sup>79</sup>, estudiaron 34 cepas de *P. multocida*, 31 de *P. haemolytica* y 11 de *H. somnus*, encontraron que las cepas de *P. multocida* fueron resistentes en un 3% a gentamicina, 18.2% a tetraciclina, 28.5% a ampicilina, 42.8% a penicilina y 66.7% a estreptomina. En *P. haemolytica* los resultados fueron 12.9% a gentamicina, 19.4% a tetraciclina, 78.5% a ampicilina, 85.7% a penicilina y 83.9% a estreptomina. Siendo para *H. somnus* 27.3% a gentamicina, 27.3% a tetraciclina, 81.8% a ampicilina, 81.8% a penicilina y 100% a estreptomina.

La similitud existente entre ambos estudios es el mayor porcentaje de resistencia antimicrobiana de *P. multocida*, *P. haemolytica* y *H. somnus* a la acción de la estreptomina, quimioterapéutico al que resultaron resistentes en otro estudio, las cepas utilizadas por Fales *et al.*, en 1982<sup>80</sup> y Chang *et al.*, en 1976<sup>81</sup>, lo que permite sugerir la alta incidencia de cepas de la familia *Pasteurellaceae* resistentes en diferentes explotaciones en México y en otros países.

En los MICs, se obtuvieron resultados que indican, las diferencias entre los aislamientos bacterianos utilizados, respecto a las concentraciones de los diferentes quimioterapéuticos para inhibir su crecimiento; y que, coinciden ser aquellos aislamientos que resultaron altos formadores de biopelícula, con los aislamientos que resultaron ser resistentes a algunos quimioterapéuticos empleados en el presente estudio, lo que permite establecer una relación directa entre la formación de biopelícula y la resistencia antimicrobiana.

Estudios previos sobre la resistencia antimicrobiana en donde se utilizó la prueba de CMI fue el realizado por Watts *et al.*, en 1994<sup>82</sup>, donde realizó un estudio

cronológico de 4 años de la susceptibilidad antimicrobiana de aislamientos de bovinos con enfermedades respiratorias en Norteamérica; utilizó 318 cepas de *P. multocida*, 461 de *P. haemolytica* y 109 de *H. somnus*. Los resultados que obtuvieron fueron que *P. multocida* es 88.1% susceptible a ampicilina; 71.1% a tetraciclina y 27.4% a estreptomicina. Para *P. haemolytica* 60.5% susceptibles a ampicilina; 57.0% a tetraciclinas y 46.2% a estreptomicina. Finalmente en *H. somnus*, el 90.1% es susceptible a ampicilina; el 98.2% a tetraciclina y 35.8% a estreptomicina. Estos resultados de Watts, en comparación con los obtenidos en el presente estudio coinciden en que todos los aislamientos de los tres géneros bacterianos son susceptibles a ampicilina, y que hay una similitud entre dichos estudios en el antimicrobiano estreptomicina, pero difieren totalmente en la tetraciclina. De esta manera podemos sugerir que no importa la región geográfica, sino más bien las condiciones medio ambientales que permiten la proliferación de los microorganismos sumado al mal uso de algunos antimicrobianos, de tal manera que se facilita la presencia de padecimientos que afectan la productividad.

La existencia de microorganismos cada vez más resistentes a la acción de ciertos quimioterapéuticos, se debe en parte al uso indiscriminado de ellos, tanto en su elección como en el cumplimiento escaso o incorrecto de su administración. La necesidad de conocer el micro ambiente que rodea a los agentes patógenos y la farmacocinética de los antimicrobianos nos permitirá tener una mayor aproximación a la realidad, de tal manera que se podrían evitar errores al considerar a una bacteria como resistente a un quimioterapéutico o un tratamiento como no efectivo, cuando en realidad es posible que la bacteria se vea a salvo de la acción antimicrobiana por la actividad protectora de la biopelícula, nicho biológico del que forma parte.

Entender el comportamiento de las biopelículas permitirá un mejor manejo de las patologías en las que participa, así como la implementación de medidas que conduzcan a su prevención y a su tratamiento.



## VIII.- CONCLUSIONES.

- Se demostró que los aislamientos de *P. multocina*, *M. haemolytica* e *Histophilus somni* fueron capaces de producir biopelícula; siendo el primer reporte en nuestro país de tres microorganismos de la familia *Pasteurellaceae* que producen biopelícula.
- Las pruebas de Bauer *et al* y CMI permitieron conocer las diferencias que existen, respecto a la resistencia antimicrobiana entre los aislamientos bacterianos empleados en el estudio.
- Se demuestra que los aislamientos bacterianos considerados como altos formadores de biopelícula tienen mayor grado de resistencia a los diferentes antimicrobianos, por lo que se establece una concordancia entre la producción de biopelícula y la resistencia antimicrobiana.

**IX.- LITERATURA CITADA.**

1. March PD. Microbiologic aspects of dental plaque and dental caries. *Dent Clin N Am* 1999;(43):599-614.
2. Colón-González M; Membrillo-Hernández J. Comunicación entre bacterias. [www.microbiologia.org.mx/microbiosenlinea/CAPITULO\\_04/Capitulo04](http://www.microbiologia.org.mx/microbiosenlinea/CAPITULO_04/Capitulo04). Consultado el 15 febrero 2008.
3. Costerton J, Cheng G, Gersey, Nickel M, Marrie T. Bacterial biofilms in nature and disease. *Annu Rev Microbiol.* 1987;(41):435-464.
4. Watnick P, Kolter R. Biofilm, City of Microbes. *Journal of Bacteriology.* 2000; (182):2675–2679.
5. Betancourth M, Botero J, Rivera S. Biopelículas: Una comunidad microscópica en desarrollo. *Colombia Médica.* 2004;(35):34-39.
6. Gilbert P, Das J, Foley I. Biofilms susceptibility to antimicrobials. *Science.* 2007; (11):160-167.
7. Maestre M, Vera M. Biofilm: Modelo de comunicación bacteriana y resistencia a los antimicrobianos. *Prous Science.* 2004;(17):26-28.
8. Costerton J. Overview of microbial biofilms. *Indus. Microbiol.* 1995; 15:137-140.
9. O'Toole G. Kaplan H, Kolter R. Biofilm formation as microbial development. *Annu Rev Microbiol.* 2000;(54):49-79.
10. Kraigsley A, Ronney PD, Finkel Se. Hydrodynamic influences donde biofilm formation and growth, <http://carambola.usc.edu/research/biophysics/Biofilms4Web.html>
11. Pratt L, Kolter R. Genetic analysis of *Escherichia coli* biofilm formation: roles of flagella, motility, chemotaxis and type I pili. *Mol Microbiol.* 1998;(30):285-293.

12. Corona-Izquierdo F, Membrillo-Hernández J. Biofilm formation in *Escherichia coli* is affected by 3-(N-morpholino) propane sulfonate (MOPS). *Res Microbiol.* 2002; (153):181-185.
13. Corona-Izquierdo F, Membrillo-Hernández J. A mutation in *rpoS* enhances biofilm formation in *Escherichia coli* during exponential phase of growth. *FEMS Microbiol.* 2002;(211):105-110.
14. Danese P, Pratt L, Kolter R. Exopolysaccharide production is required for development of *Escherichia coli* K-12 biofilm architecture. *Bacteriol.* 2000;(182):3593-3596.
15. Wimpenny J. Heterogeneity in biofilms. *FEMS Microbiol Rev*, 2000.(24):661-671.
16. O'Toole GA, Pratt LA, Watnick PI, Newman DK, Weaver VB, Kolter R. Genetic approaches to study of biofilms. *Methods Enzymol.*1999;(310):91-109.
17. Whiteley M. Gene expresión in *Pseudomona aeruginosa* biofilms. *Nature reviews microbiology.* 2001;(413):860-864.
18. Stewart SP, Franklin JM. Physiological heterogeneity in biofilms. *Nature reviews microbiology.* 2008;(6):199.
19. Mandell G, Bennett J, Dolin R. *Staphylococcus*, in Principles and practice of infectious diseases. Panamericana. 2000;(20):96.
20. Brown MR, Allison DG, Gilbert P. Resitance of bacterial films to antibiotics: related effect? *J Antimicrob Chemother.* 1988;(22):777-780.
21. Winder A, Frei R, Rajcic Z, Zimmerli W. Correlation between in vivo and in vitro efficacy of antimicrobial agents agains foreing body infections. *J Infect Dis.* 1990; (162):96-102.

22. Merle E. Olson, Howard Ceri, Douglas W. Morck, Andre G. Buret, Ronald R. Read. Biofilm bacteria: formation and comparative susceptibility to antibiotics. *The Canadian Journal of Veterinary Research*. 2002;(66):86-92.
23. Costerton JW, Veeh R. The application of biofilm science to study and control of chronic bacterial infections. *J Clin Invest*. 2003;(112):1466-1477.
24. Fuqua WC, Winans SC, Greenberg EP. Quorum sensing in bacteria: the LuxR-LuxI family of cell density-responsive transcriptional activators. *J Bacteriol*. 1994;(176):269-275.
25. Stoodley PJ, Jørgensen F, Williams P, Lappin-Scott HM. The role of hydrodynamics and AHL signaling molecules as determinants of the structure of *Pseudomonas aeruginosa* biofilms.
26. Characklis WG, McFeters GS, Marshall KC. Physiological ecology in biofilm systems. *Biofilms wiley*. 1990;(12):341-394.
27. Peyton BM, Characklis WG. A statistical analysis of the effect of substrate utilization and shear-stress on the kinetics of biofilm detachment. *Biotechnol Bioeng*. 1993;(41):728-735.
28. Jackson DW, Suzuki K, Oakford L, Simecka JW, Hart ME, Romeo T. Biofilm formation and dispersal under the influence of the global regulator CsrA of *Escherichia coli*. *J Bacteriol*. 2002;(184):290-301.
29. Potera C. Forging a link between biofilms and disease. *Science*. 1999;(284):1837-1839.
30. Livornese LL, Korzeniowski OM. Pathogenesis of infective endocarditis. *Infective Endocarditis*. 1992;(2):19-35.
31. Tunkel AR, Mandell GL. Infecting microorganisms. *Infective Endocarditis*. 1992;(2):85-89.

32. Giebink GS, Juhn SK, Weber ML, Le CT. The bacteriology and cytology of chronic otitis media with effusion. *Pediatric Infect.* 1982;(1):98-103.
33. Stenfors LE, Raisanen S. Quantification of bacterial in middle ear effusions. *Acta Otolarygol.* 1998;(106):435-440.
34. Domingue GJ, Hellstrom WJG. Prostatitis. *Clin Microbiol Rev.* 1998;(11):604-613.
35. Nickel JC, Costerton JW, Mc Lean RJC. Bacterial biofilms: Influence on the pathogenesis, diagnosis and treatment of urinary tract infections. *J Antimicrob Chemother.* 1994;(33):31-41.
36. Nickel JC, Costerton JW. Bacterial localization in antibiotic refractory chronic bacterial prostatitis. *Prostate.* 1993;(23):107-114.
37. Govan JR, Deretic V. Microbial pathogenesis in cystic fibrosis. *Microbiol Rev.* 1996;(60):539-574.
38. Lamont RJ, Jenkinson HF. Life below gum line: Pathogenic mechanisms. *Microbiol Mol Biol Rev.* 1998;(62):1244-1263.
39. Neir R, Shao J, Apicella M. Biofilm formation on human airway epithelia by encapsulated *Neisseria meningitidis* serogroup B. *Veterinary Microbiology.* 2009;(11):281-287.
40. Hasan F, Xess I, Wang, X, Jain N, Fries B. Biofilm formation in clinical *Candida* isolates and its association with virulence. *Veterinary Microbiology.* 2009;(11):753-761.
41. Singh R, Stine OC, Smith DL. Microbial diversity of biofilms in dental unit water systems. *Appl Environ Microbiol.* 2003;(69):3412-3420.
42. Vaneechoutte M, Devriese LA, Dijkshoorn L, Lamote B, Deprez P. *Acinetobacter baumannii* infected vascular catheter collected from horses in an equine clinic. *J Clin Microbiol.* 2000;(38):4280-4281.

43. Kaplan J, Mulks M. Biofilm formation is prevalent among field isolates of *Actinobacillus pleuropneumoniae*. *Veterinary Microbiology*. 2005;(108):89-94.
44. Smith MA, Ross MW. Postoperative infection with *Actinobacillus* spp in horses: 10 cases (1995-2000). *J Am Vet Med Assoc*. 2002;(221):1306-1310.
45. Trostle S, Peavey CL, King DS. Treatment of methicillin resistant *Staphylococcus epidermidis* infection following repair of an ulnar fracture and humeroradial joint luxation in a horse. *J Am Vet Med Assoc*. 2001;(218):554-559.
46. Moore RM, Schneider RK, Kowalski J. Antimicrobial susceptibility of bacterial isolates from 233 horses with musculoskeletal infection during 1979-1989. *J Equine Vet*. 1992;(24):450-456.
47. Hariharan H, McPhee L, Heaney S, Bryenton J. Antimicrobial drug susceptibility of clinical isolates *Pseudomonas aeruginosa*. *Can Vet*. 1995;(36):166-168.
48. Lloyd DH, Lamport A, Noble WC, Howell SA. Fluoroquinolone resistance in *Staphylococcus intermedius*. *Vet Dermatol*. 1999;(10):249-251.
49. San Martin B, Cruze J, Morales MA, Aguero H, Leon B, Espinoza S. Bacterial resistance of mastitis pathogens isolated from dairy cows in the Vth región, Metropolitan región and Xth región Chile. *Arch Med Vet*. 2003;(34):221-234.
50. Vasudevan P, Kumar M, Nair M, Annamalai T, Venkitanarayanan K. Phenotypic and genotypic characterization of bovine mastitis isolates of *Staphylococcus aureus* for biofilm formation. *Veterinary Microbiology*. 2003;(92):179-185.
51. Fox L, Zadoks R, Gaskins C. Biofilm production by *Staphylococcus aureus* associated with intramammary infection. *Veterinary Microbiology*. 2005;(107):295-299.
52. Olivera M, Bexiga R, Nunes S, Carneiro C, Cavaco L, Bernardo F, Vilela C. Biofilm-forming ability profiling of *Staphylococcus aureus* and *Staphylococcus epidermidis* mastitis isolates. *Veterinary Microbiology*. 2006;(118):133-140.

53. Jin H, Zhou R, Kang M, Luo R, Cai X, Chen H. Biofilm formation by field isolates and reference strain of *Haemophilus parasuis*. *Veterinary Microbiology*. 2006;(118):117-123.
54. McAuliffe L, Ayling R, Ellis R, Nicholas R. Biofilm-grown *Mycoplasma mycoides* subsp. *mycoides* SC exhibit both phenotypic and genotypic variation compared with planktonic cells. *Veterinary Microbiology*. 2008;(129):315-324.
55. Characklis B. What is industrial significance of biofilm. 2003. <http://www.erc.montana.edu>
56. Stewart TL. Biofilms and corrosión in applications of marine biotechnology.2003.<http://www.nsgo.seagrant.org>
57. Sturman P. Petroleum industry.2003. <http://www.erc.montana.edu>
58. Anwar H, Starp L, Costerton J. Establishment of aging biofilms: possible mechanism of bacterial resistance to antimicrobial therapy. *Antimicrob Agents Chemother*. 1992;(36):1347-1351.
59. Kim L. Riddle of biofilm recistencia. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. 2001;(1):999-1007.
60. Olson E, Ceri H, Morck W, Buret G, Read R. Biofilm bacteria: formation and comparative susceptibility to antibiotics. *Vet Res*. 2002;(66):86-92.
61. Sandal I, Wenzhou H, Swords W, Inzana J. Characterization and comparison of biofilm development by pathogenic and comensal isolates of *Histophilus somni*. *Bacteriol*. 2007;(189):8179-8185.
62. Sandal I, Shao J, Annadata S, Apicella M, Boye M, Jensen T, Inzana J. *Histophilus somni* biofilm formation in cardiopulmonary tissue of the bovine host following respiratory challenge. *Microbes and Infection*. 2009;(11):254-263.

63. Trigo F. El complejo respiratorio infeccioso en bovinos y ovinos. *Ciencia Veterinaria*. 1987;(4):30-32.
64. Mc Auliffe L, Ellis R, Miles K, Agling R, Nicholas R. Biofilm formation by micoplasma species and its role in enviroment persistence and survival. *Microbiology*. 2006;(152):913-922.
65. Christensen GD, Simpson WA, Bisno AL, Beachey EH. Adherence of slime-producing strains of *Staphylococcus epidermidis* to smooth surfaces. *Infect Immun*. 1982;(37):318-326.
66. Freeman J, Falkiner F, Keane C. New method for detecting slime production coagulase negative staphylococci. *J Clin Phatol*. 1989;(42):872-874.
67. Merritt J, Kadouri D, O'Toole G. *Current protocols in Microbiology*. 2005; 1B.1.1-1B.1.17.
68. Bauer AW, Kirby MM, Sheccis JC, Turk M. Antibiotic susceptibilitu resising by standardized single disk method. *Am J Clin Pathol*. 1960;(45):493-496.
69. National Committee for Clinical Laboratory Standadrs. Approved standard M2-A8. Performance standard for antimicrobial disk susceptibility tests, NCCLS, Wayne, Pa. 2003.
70. Díaz R, Gamazo C, Lopez-Goñi. Determinación de la concentración mínima inhibitoria y de la concentración mínima bactericida. *Manual Práctico de Microbiología*. 1999; 141-147.
71. Zepeda A. Combinning and Peldri II methods for scanning electron microscopy. *LAB-acta*.2004;(16):85-90.
72. González del Pliego M, Aguirre E, Sánchez MC, Larrieta ME, Meza M, Zepeda A, Hernández J. Ultrastructural changes in pancreatic beta cells trated with NGF dbc AMP. *Cells tiss Res*. 2001;(305):365-378.



73. Villalpando I, Villafán H, Folores A, Zepeda A, Granados H, Chávez A. Ultrastructure and motility of the caudal epididymis spermatozoa from the volcano mouse. *Journ of experimental zoology*. 2000;(287):316-326.
74. Rivera Tapia JA, Roman Mendez C. Biopelículas y salud pública. *Asociación Medica del American British Hospital*. 2005;(50):172-176.
75. Carpentier B, Cerf O. Biofilms and their consequences with particular reference to hygiene in the food industry. *J Appl Bacteriol*. 1993;(75):499-511.
76. Glover H. Ultrafiltration and reverse osmosis for the dairy industry. *National institute for research in dairy*. 1985.
77. Cooksey KE, Wiggelworth B. The design of antifouling surfaces: Background and some approaches. *Biofilm science and technology*. 1992.
78. Moreno-Gonzales ME, Ruiz-Galindo E. *Staphylococcus epidermidis*, formador de biofilm en blefaroconjuntivitis. *Revista Médica del Hospital General*. 2007;(70):24-29.
79. Pijoan PA, Aguilar RF. Resistencia y sensibilidad a antimicrobianos en cepas de *Pasteurella haemolytica*, *Pasteurella multocida* y *Haemophilus somnus*, aisladas en becerras lecheras en establos de Tijuana. *Revista Veterinaria Mexico*. 2000;(2):153-156.
80. Fales WH, Selby LA, Webber JJ, Hoffman LJ, Kintner LD, Nelson SL, Miller RB, Smith DK. Antimicrobial resistance among *Pasteurella* spp recovered from Missouri and Iowa cattle with bovine respiratory disease complex. *J Am Vet Med Assoc*. 1982;(5):477-479.
81. Chang WH, Carter GR. Multiple drug resistance in *Pasteurella multocida* and *Pasteurella haemolytica* from cattle and swine. *J Am Vet Med Assoc*. 1976;(7):710-712.

**82.** Watts J, Yancen R. A 4 year survey of antimicrobial susceptibility trends for isolates from cattle with bovine respiratory disease in north america. Journal of clinical microbiology. 1994;(32):725-731.