



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA
DE MÉXICO**

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES CUAUTITLAN

**DETERMINACIÓN DE RESISTENCIA A ANTIMICROBIANOS EN CEPAS DE
Mannheimia haemolytica AISLADAS DE MUESTRAS DE EXUDADO NASAL
DE BOVINOS CLÍNICAMENTE ENFERMOS DE NEUMONÍA**

TESIS

**PARA OBTENER EL TÍTULO DE:
MÉDICA VETERINARIA ZOOTECNISTA**

P R E S E N T A:

MARÍA LUISA SAMANIEGO BARRÓN

ASESOR

MVZ. MSP. CARLOS JULIO JARAMILLO ARANGO



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

DEDICATORIA:

A la Universidad Nacional Autónoma de México por otorgarme una formación profesional.

A mis padres por su apoyo en mi vida, por darme su amor y comprensión.

AGRADECIMIENTOS

A mis hermanos: Griselda, Omar, Erick y Karen, por escucharme, brindarme su apoyo y darme un valioso ejemplo a seguir.

Al Ing. Luis Novoa Romo por entenderme, ayudarme y brindarme su amor en momentos difíciles

A mis asesores:

Dr. Carlos Julio Jaramillo Arango

Dr. Francisco Aguilar Romero

Dr. Jesús Vázquez Navarrete

Por brindarme su tiempo, sus consejos y su apoyo

A los doctores del laboratorio del CENID-Microbiología del INIFAP
Al MVZ Rigoberto Hernández Castro
del laboratorio de tuberculosis en CU

INDICE

Resumen.....	1
I. Introducción.....	
2	
Antimicrobianos β lactámicos.....	7
Tetraciclinas.....	9
Aminoglucósidos.....	9
Macrólidos.....	10
Sulfamidas y diaminopirimidinas.....	11
II. Objetivos.....	
17	
III. Material y Métodos.....	
18	
1. Técnica de Kirby-Bauer.....	19
2. Concentración Mínima Inhibitoria.....	20
3. Extracción de ADN cromosómico.....	21
4. Reacción en cadena de la polimerasa.....	22
5. Análisis estadístico.....	23
IV. Resultados.....	24
V. Discusión.....	30
VI. Conclusiones.....	33
VII. Literatura citada.....	35

ABREVIATURAS

Am	Ampicilina
BHI	Infusión cerebro-corazón
CAIT	Complejo Agropecuario Industrial de Tizayuca
CLL	Complejo Lechero de la Laguna
CRB	Complejo respiratorio bovino
E	Eritromicina
Gm	Gentamicina
I	Sensible de forma intermedia
Lkt	Leucotoxina
LPS	Lipopolisacárido
Mh	Mannheimia haemolytica
MIC	Concentración Mínima Inhibitoria
NCCLS	Nacional Committe for Clinical Laboratory Standards
OMP	Lipoproteínas de la membrana externa
ONPF	O-nitrofenil a-fucosidasa
P	Penicilina
PABA	Ácido p-aminobenzoico
R	Resistente
RTF	Factor de transferencia de resistencia
S	Sensible
SSF	Solución salina fisiológica
St	Estreptomicina
SXT	Trimetoprim y sulfametoxazol
TE	Tetraciclinas

UFC
XNL

Unidades formadoras de colonias
Ceftiofur

RESUMEN

Se emplearon un total de 100 cepas de *Mannheimia haemolytica* provenientes de muestras de exudado nasal de bovinos clínicamente enfermos de neumonía, obtenidas de dos complejos lecheros en México. Se les realizó la prueba de difusión en placa para determinar la resistencia a varios antimicrobianos como ampicilina, gentamicina, ceftiofur, penicilina, estreptomicina, trimetoprim con sulfametoxazol, tetraciclina y eritromicina. Las frecuencias más altas en la resistencia a antimicrobianos se presentaron en la estreptomicina (80%) y en la gentamicina (30%), todas las cepas fueron susceptibles a la ampicilina, a la penicilina y a la tetraciclina. Se determinó la concentración mínima inhibitoria (MIC) en las cepas que presentaron resistencia a 3 ó más antibióticos en la prueba de Kirby-Bauer, los rangos resultantes de las MIC fueron amplios en los casos de la gentamicina (1-32 µg/ml) y la estreptomicina (2-256 µg/ml). Se realizó la técnica de PCR para buscar la presencia del gen *strA* que codifica a la enzima *aminoglycoside-3-phosphotransferase* que proporciona resistencia contra la estreptomicina. Del total de cepas estudiadas (n=100) el 76% presentaron el gen *strA*, del cual el 63% provenía del CAIT y el 13% restante del CLL. De las 78 cepas del CAIT y las 22 del CLL, el 81% y el 59% respectivamente, presentaron el gen *strA*.

I. INTRODUCCION

La industria bovina juega un papel importante dentro de la producción pecuaria en México, según la Secretaría de Agricultura, Ganadería, Desarrollo Rural, Pesca y Alimentación, en el periodo que comprende del año 2000 al 2005, la producción de carne en canal de bovino ocupó el 2° lugar con un 31% del total de carne producida, superada solamente por carne de ave con un 44%, mientras que la producción de leche de bovino representa un 98% del total de leche cruda que se produce a nivel nacional.¹

El rendimiento de la industria bovina se ve afectado por diversos factores de los cuales destacan las enfermedades infecciosas, principalmente de tipo respiratorio que representan en Estados Unidos hasta el 75% de los casos clínicos con una mortalidad del 45 al 55%^{2,3} y pérdidas económicas estimadas en 640 millones de dólares anualmente.⁴

En un estudio realizado en Estados Unidos con 12 razas de bovinos durante un periodo de 15 años, se reportó una incidencia anual del complejo respiratorio bovino (CRB) del 5 al 44% y se encontró que los bovinos con neumonías tuvieron una menor GDP que los animales sanos, condiferencias hasta de 8 kilogramos entre ellos después de un periodo de engorda de 200 días y con costos que alcanzaban los 2,108 dólares por 1000 animales. Adicionalmente los por tratamiento se calcularon en 1,813 dólares y las pérdidas por mortalidad fueron de 9,794 dólares, finalmente la pérdida económica total estimada para 1000 animales fue de 13,895 dólares, sin incluir los costos de alimentación y mano de obra de los trabajadores antes de la muerte de los animales.⁵

Fels-Klerx *et al*, describieron un programa de computación para estimar las pérdidas económicas asociadas con el complejo respiratorio bovino en vaquillas de reemplazo, las pérdidas consideradas incluidas son los tratamientos, los costos asociados con el incrementos de la mortalidad, el incremento de animales destinados a rastro prematuramente, el retraso en el crecimiento, la disminución de la fertilidad y la baja producción de leche en la primera lactación.⁶

En México existe escasa investigación acerca del impacto económico que generan las neumonías en general. Un estudio realizado en becerras lecheras de dos establos de Tijuana, Baja California, evaluando dos sistemas diferentes de alojamientos de sus crías, determinó la incidencia y costo de las neumonías que afectaron a las mismas durante un año. Las pérdidas ocasionadas por esta enfermedad se calcularon con base en los costos directos: pérdidas por mortalidad, descarte, costo de tratamientos y mano de obra adicional, así como los costos indirectos: vacunaciones y tratamientos preventivos. El establo 1 mantuvo a sus crías en corraletas de metal dentro de un edificio, mientras que el establo 2 las mantuvo al exterior en casetas de madera. La incidencia de la enfermedad en el establo 1 fue de 39.9% y en el establo 2 de 19.7%, y los costos directos e indirectos producidos por neumonías por becerro nacida variaron respectivamente, entre \$501.41 y \$301.07, y entre \$83.25 y \$235.12.⁷

El complejo respiratorio bovino es causado por una interacción de virus, bacterias y factores estresantes tales como transporte, destete, aglomeraciones, cambios bruscos de temperatura, confinamiento de animales de diferentes edades, entre otros, los cuales se asocian con una elevación de la concentración de cortisol en el plasma, lo que provoca un decremento de la función leucocitaria. Dentro de los agentes infecciosos involucrados se encuentran los virus del herpes tipo 1, el respiratorio sincitial bovino, de parainfluenza 3 y de la diarrea viral bovina; las bacterias *Haemophilus somnus*, *Mycoplasma bovis*, *Arcanobacterium pyogenes*, *Pasteurella multocida* y *Mannheimia haemolytica*^{3, 8, 9, 10, 11} siendo *Mannheimia* y *Pasteurella* las bacterias aisladas con más frecuencia tanto en bovinos clínicamente

enfermos de neumonía como en bovinos sanos ¹², por lo tanto se debe resaltar que son parte de la microbiota normal y se les considera patógenos oportunistas.^{8, 13}

Mannheimia haemolytica (*Mh*) ha sido reclasificada continuamente, primero fue nombrada como *Bacterium bipolare multocidum* por Theodore Kitt en 1885, posteriormente fue renombrada como *Pasteurella haemolytica* en 1932 y clasificada en dos biotipos A y T, basados en su habilidad para fermentar arabinosa y trehalosa respectivamente. Existían 13 serotipos A y 4 serotipos T identificados, después los serotipos T fueron reclasificados como *Pasteurella trehalosi* en 1990. Finalmente en 1999, estudios basados en hibridaciones DNA-DNA y secuencias 16S RNA permitieron renombrar los serotipos A (A1, A2, A5, A6, A7, A8, A9, A12, A13, A14, A16 y A17) como *Mannheimia haemolytica*, donde el serotipo A11 se renombró como *M. glucosida*.^{14, 15, 16} Actualmente *M. haemolytica* pertenece a la siguiente clasificación taxonómica: Reino Bacteria; phylum Proteobacteria; clase Gammaproteobacteria; orden Pasteurellales; familia *Pasteurellaceae*; género *Mannheimia*.¹⁷

Mh es gramnegativa, cocobacilar, no móvil, débilmente hemolítica y forma colonias de coloración blanca a gris claro con un diámetro de 1 a 3 milímetros en agar sangre. Tiene la capacidad de fermentar D-sorbitol, D-xylosa, maltosa, dextrina y las cepas son positivas a la hidrólisis de o-nitrofenil a-fucosidasa (ONPF), la reacción a oxidasa comúnmente es positiva pero puede variar y es negativa a la reacción de ureasa ¹⁴.

Mh posee factores de virulencia tales como: adhesinas, lipopolisacárido (LPS), cápsula, proteínas y lipoproteínas de la membrana externa (OMP), leucotoxina (Lkt), glicoproteasa, neuraminidasa y proteasas de inmunoglobulinas.^{3, 18, 19}

Las adhesinas permiten a la bacteria atacar al epitelio respiratorio, el LPS representa 10- 25% del peso de *Mh*, es responsable de la inducción de IL-1 *beta* y

IL-8 vía TNF-*alfa*, que dirige a los neutrófilos causando así la inflamación y daño en las células del endotelio pulmonar bovino.^{3, 18}

La cápsula del serotipo A1 de *Mh* está compuesta por residuos de manopiranosos, mientras que la cápsula del serotipo A2 está compuesta de ácido siálico o colomínico.^{3, 18}

El ácido siálico de la cápsula es no-inmunogénico ya que es un componente normal de las membranas del hospedero. En el serotipo A1, la cápsula proporciona resistencia a la fagocitosis.^{3, 18}

Las OMPs se cree que están involucradas en la sensibilidad sérica y son importantes antígenos protectores. Los anticuerpos contra algunos de estos antígenos son capaces de inducir la fagocitosis y la activación del complemento.^{3, 18}

Mh secreta una leucotoxina de 102 kD, que es una citotoxina calcio-dependiente, perteneciente a la familia de toxinas *RTX*. La *LktA* es específica de especie, teniendo actividad leucotóxica sólo contra células linfoides de rumiantes.^{3, 18}

Todos los serotipos de *Mh* producen una zinc-metaloproteasa que tiene actividad contra O-sialoglicoproteínas. La proteasa actúa en la superficie de las células del hospedero incrementando su adhesión y su actividad *in vitro*, puede ser potencializada por la incubación con leucotoxina.^{3, 18}

Se ha sugerido que la neuraminidasa producida por *Mh* juega un papel importante en la colonización de la mucosa, particularmente de la parte alta del tracto respiratorio. Las proteasas son endopeptidasas que separan la inmunoglobulina en sus fragmentos Fab y Fc, de tal forma favorecen la colonización por eliminación local de anticuerpos que bloquean la adherencia.^{3, 18}

De los serotipos conocidos, en la mayoría de los casos predominan los serotipos A1 y A2 ^{12, 20, 21}. El serotipo A1 provoca pasteurelisis en bovinos o “fiebre de embarque” cuando se asocian los factores predisponentes antes mencionados. La transmisión de la enfermedad es horizontal mediante aerosoles, los signos clínicos son disnea, depresión, tos, descarga nasal mucopurulenta, fiebre de 42 °C, aumento de la frecuencia cardiaca, pérdida de peso y lagrimeo. La mortalidad ocurre frecuentemente dentro de las 48 horas después de observarse dichos signos.^{8, 9, 10, 19}

Debido a que la causa de la pasteurelisis es multifactorial, la prevención debe abarcar dichos aspectos como reducir cambios que provoquen estrés en los animales, dar un lapso de tiempo entre cada uno de ellos, asegurarse de que el ganado tenga acceso al alimento y agua antes, durante y después del transporte o eventos estresantes ⁹. También es indispensable que los neonatos tengan acceso al calostro de la madre, pero se debe considerar la duración de la inmunidad pasiva para poder establecer un calendario de vacunación óptimo ²². Se ha comprobado que la vacunación antes y después del destete disminuye la morbilidad y los costos médicos además de presentar una mejor ganancia diaria de peso ^{23, 24}. En algunos países se han realizado estudios para evaluar las diferentes vacunas contra la pasteurelisis, tales como bacterinas que contienen varios antígenos pero proporcionan una inmunidad corta; vacunas con extractos como la leucotoxina y el lipopolisacárido libres de células; vacunas polivalentes que proporcionan inmunidad contra antígenos virales y bacterianos y vacunas vivas modificadas que producen una respuesta inmune más intensa ^{9, 25, 26}.

El tratamiento es difícil ya que debe ir enfocado a combatir las diferentes causas de la enfermedad, sin embargo la terapia de antimicrobianos es el método utilizado con más frecuencia. La selección de un quimioterapéutico en general, debería determinarse por el costo, la duración de su acción y que sea de fácil administración, además de la susceptibilidad y resistencia de *Mh* dada en cada localidad. En diversos países los antimicrobianos más usados para el tratamiento contra neumonías son oxitetraciclina, trimetoprim con sulfametoxazol, penicilina con

estreptomycin, tilmicosin, ceftiofur, ampicilina, eritromicina y enrofloxacin ^{13, 27, 28, 29}. También se incluyen el uso de antiinflamatorios no esteroideos, (los corticosteroides están contraindicados por el efecto inmunosupresor que poseen), broncodilatadores y mucolíticos ¹⁰.

Sin embargo, la ineficiencia en la inmunoprofilaxis, ocasiona que los antimicrobianos sean utilizados por un periodo muy largo para profilaxis, tratamiento y como promotores del crecimiento. Además de que en la mayoría de los casos de neumonía se comienza con un tratamiento antes de tomar y enviar muestras a un laboratorio de diagnóstico en donde se pueda guiar al médico veterinario acerca de cuál es el antimicrobiano más eficaz, lo que trae como consecuencia un incremento en la resistencia a antimicrobianos en cepas de Mh ¹⁸.

La resistencia a antimicrobianos es la pérdida de sensibilidad de un microorganismo a un fármaco al que originalmente era susceptible, se logra por diferentes mecanismos, como es la producción de enzimas que destruyen al quimioterapéutico, el cambio de la permeabilidad hacia el antimicrobiano, alteraciones en la estructura de los receptores blanco, desarrollo de un metabolismo alterado que sobrepasa la reacción inhibida por el fármaco y producción de una enzima alterada que pueda seguir ejecutando su función metabólica pero que se ve menos afectada por el antibiótico ^{30, 31, 32, 33}.

Para entender cómo han desarrollado resistencia las bacterias hacia los antimicrobianos, es necesario conocer el mecanismo de acción de éstos, con un enfoque principal a aquellos que se utilizaron en el presente trabajo.

Antimicrobianos β Lactámicos

Este grupo comprende a las penicilinas y cefalosporinas, la estructura general de las penicilinas esta compuesto por un anillo de tiazolidina de 5 átomos de carbono unido al grupo activo β lactámico; las cefalosporinas se desarrollan a partir de un anillo de dihidrotiazina de 6 átomos de carbono. Estos antimicrobianos actúan sobre unas enzimas de la pared bacteriana que se conocen como proteínas ligadas a la

penicilina ó PLP, existen diferentes clases de PLP en cada especie bacteriana, estas proteínas pueden ser transpeptidasas, endopeptidasas y carboxipeptidasas. La pared celular de las bacterias esta compuesta por cadenas de glucanos, que son fibras lineales con unidades alternas de N-acetilglucosamina y ácido N-acetilmurámico unidas lateralmente y entre las que se cruzan fibras peptídicas cortas. La reacción de la transpeptidación es la responsable del entrecruzamiento de las fibras peptídicas para dar lugar a una estructura entrecruzada que confiere a la pared bacteriana la estabilidad necesaria. La inhibición por parte de la penicilina de la acción de las transpeptidasas catalizadoras de esta reacción da lugar a una pared celular débil, que no puede soportar la presión del medio interior y se rompe durante el proceso de división celular.^{34, 35}

Los mecanismos de resistencia a los β -lactámicos son la impermeabilidad de la membrana externa de la bacteria al antibiótico, la modificación de las PLP que puede disminuir la afinidad del antibiótico por estas proteínas y la producción de β -lactamasa que tiene la capacidad de hidrolizar la unión cíclica amídica de la estructura de los antibióticos β -lactámicos.^{30, 33, 34, 36}

Tetraciclinas

Las tetraciclinas están formadas por 4 anillos unidos en línea (designados como A, B, C y D), actúan como agentes bacteriostáticos inhibiendo la síntesis de proteínas de las bacterias, dicha inhibición se lleva a cabo evitando la asociación entre el aminoacil-ARNt y el ribosoma, uniéndose las tetraciclinas específicamente a la subunidad de 30s ribosomal, impidiendo la adición de aminoácidos a la cadena peptídico en formación, lo que inhibe la elongación de la cadena.^{35, 37}

La resistencia a las tetraciclinas está relacionada con la alteración del sistema de transporte activo de la tetraciclina hacia el citoplasma y el bombeo de ésta hacia el exterior, además con la protección del ribosoma a través de una proteína citoplasmática que impide la actuación del antibiótico sobre la subunidad 30s.^{30, 33, 36,}

37

Aminoglucósidos

Deben su nombre a la estructura que presentan: un núcleo de hexosa al que se unen mediante enlaces glucosídicos dos o más aminoazúcares. En la estreptomicina la hexosa es una estreptidina y 2-desoxi-estreptamina en la gentamicina. Su mecanismo de acción está basado en la inhibición de la síntesis de proteínas dada por la unión a la subunidad 30s ribosomal, lo que trae como consecuencia la lectura errónea del mensaje genético, al interferir en el apareamiento correcto de las bases del codón del ARNm con las del anticodón del ARNt, esto hace que se bloquee el comienzo de la síntesis, al impedir que se coloque el primer aminoácido, o bien que se interrumpa la traducción de forma prematura originándose una proteína trunca no funcional, o bien que se coloque aminoácidos distintos a los especificados por la secuencia de bases del ARNm, formándose proteínas anormales. El efecto letal sobre las bacterias parece estar relacionado con la formación de canales anormales en las membranas celulares causados por la síntesis de proteínas de membrana anormales. La resistencia está dada por la síntesis de enzimas que modifican al antimicrobiano, existen tres clases de enzimas que son las fosfotransferasas, acetiltransferasas y adeniltransferasas que fosforilan, acetilan o adenilan, respectivamente, a los grupos hidroxilo ó amino libres e impiden la unión del antibiótico al ribosoma.^{30, 33, 35, 36, 37}

Macrólidos

Los macrólidos son un grupo de antibióticos producidos por diversas especies de *Streptomyces*, la eritromicina contiene un anillo de lactona macrocíclica formado por 14 átomos de carbono, al que se unen cetonas, una hexosa (cladinosa) y una aminohexosa (desosamina). Su mecanismo de acción es bloquear la síntesis de proteínas mediante la inhibición de la translocación por unión reversible a la subunidad 50s ribosomal, inhibiendo específicamente la peptidiltransferasa, y puede ser bactericida ó bacteriostático, dependiendo de la concentración y de la sensibilidad específica de cada microorganismo. La resistencia suele consistir en una

mutación cromosómica que impide la unión del antibiótico al ribosoma, ó en la mutación de la diana del antibiótico en la peptidiltransferasa. ^{30, 33, 35, 36, 37}

Sulfamidas y diaminopirimidinas

La sulfamida se obtiene a partir de la hidrólisis alcalina o ácida de la N-acetilsulfanilamina, producto de la acción del amoniac sobre el cloruro de acetilsulfanilo. Todas las sulfas comparten en su estructura el grupo p-aminobenceno sulfonamida. La combinación de las sulfas con las diaminopirimidinas inhibe de forma secuencial la síntesis del ácido tetrahidrofólico bacteriano, precursor de las purinas y los ácidos nucleicos, y por lo tanto, altera la síntesis de proteínas y los mecanismos de replicación microbiana. Tanto las sulfas como las pirimidinas actúan como antimetabolitos inhibiendo el metabolismo intermediario de las bacterias e impidiendo su replicación. Debido a la similitud de las sulfas con el ácido p-aminobenzoico (PABA), las sulfas engañan literalmente a la enzima dihidropteroato sintetasa, que incorpora la sulfamida en vez del PABA. Esta acción de bloqueo de la síntesis de precursores del ácido fólico es competitiva y, por tanto, se puede invertir aumentando la concentración del PABA en el medio interno bacteriano. La trimetoprima se une a la enzima dihidrofolato reductasa y por ello bloquea la reacción en la que el ácido fólico se transforma en ácido tetrahidrofólico. La resistencia generalmente se asocia a cambios en la afinidad del grupo p-aminobenceno sulfonamida por la enzima sobre la que actúa como falso sustrato, la dihidropteroato sintetasa. Un aumento en la concentración del PABA en el medio bacteriano o la presencia de purinas y timidina en lesiones purulentas también disminuye la capacidad antibacteriana de las sulfas. La resistencia a la trimetoprima se produce como consecuencia de las variaciones de la enzima dihidrofolato reductasa que conducen a una menor afinidad de ésta por el fármaco. ^{30, 33, 35, 36, 38}

Desde el punto de vista molecular, la información para que se genere la resistencia a los antimicrobianos se encuentra en genes en el DNA bacteriano, los cuales pueden transmitirse mediante 3 diferentes mecanismos que son:

- a) Transformación: en este mecanismo de transferencia lateral de genes, el DNA que se va a transferir a la bacteria no está incorporado a cromosomas ni a otras estructuras, una proteína llamada factor de competencia es liberada dentro del medio y aparentemente facilita la entrada del DNA, una vez que ha entrado, endonucleasas propias de la bacteria cortan la doble cadena del DNA y algunos fragmentos se recombinan con el DNA de la bacteria, la cual por lo tanto ha sido transformada genéticamente y expresará los genes que ha recibido y los transmitirá a su descendencia. En dicho mecanismo se transfiere menos del 1% del DNA de una bacteria a otra e involucra sólo DNA cromosomal^{32, 39, 40}.

- b) Transducción: En este proceso el DNA es transportado por un bacteriófago. Los fagos están compuestos por ácidos nucleicos en el centro y cubiertos por una envoltura proteica, tienen la capacidad de infectar las células bacterianas y reproducirse dentro de ellas. La transducción puede ser especializada, cuando los fagos insertan sus ácidos nucleicos dentro del cromosoma bacteriano y trae consigo algunos genes de la bacteria al salir de ella y los transfiere a otra bacteria; o generalizada, cuando el fago causa fragmentación del cromosoma bacteriano y algunos de los fragmentos son introducidos accidentalmente en los fagos durante su formación. En la transducción la cantidad de DNA transmitido varía de pocos a una gran cantidad de fragmentos de cromosoma.^{32, 39, 40}

- c) Conjugación: Para que se pueda llevar a cabo la transferencia de genes en este mecanismo, se requiere que haya contacto mediante una fimbria entre la célula donadora y la célula receptora y de esa forma se transfiere el material genético contenido en un plásmido.^{32, 39, 40}

Los plásmidos son moléculas circulares de doble cadena de DNA extracromosomal y se clasifican de acuerdo a su función en las bacterias en plásmidos F o factores de fertilidad, plásmidos virulentos, plásmidos de resistencia, entre otros. Los plásmidos de la resistencia a medicamentos se denominan plásmidos R o factores R, generalmente contienen dos componentes un factor de transferencia de resistencia (RTF) y uno o más genes de resistencia (R). Los genes R pueden moverse de un plásmido a otro de otra bacteria o insertarse en el cromosoma al momento de la conjugación, esa habilidad de moverse de un lugar a otro se denomina transposición y una secuencia genética móvil es llamada elemento transposable o transposon.

Dentro de la familia *Pasteurellaceae* se han reportado la presencia de plásmidos con genes de resistencia antimicrobiana (Figura 1), en el caso de *Mh* el plásmido llamado pYFC1, que contiene genes de resistencia a sulfonamidas y estreptomicina, en *M. varigena* el plásmido *pMVSCS1* que además contiene el gen de resistencia a cloranfenicol, *Pasteurella multocida* con plásmidos como *pIGI* y *pVM111* y el plásmido *pMHT1* presente en los géneros bacterianos antes mencionados^{41, 42, 43, 44,}
⁴⁵.

Para determinar los perfiles de resistencia y sensibilidad a antimicrobianos en las cepas que se desea estudiar, existen diferentes métodos como la Técnica de Bauer-Kirby, que consiste en la difusión de los antimicrobianos en agar, estableciendo un gradiente de concentración. El diámetro de la zona de inhibición refleja la solubilidad del antibiótico y la sensibilidad del microorganismo a éste. Las

zonas estandarizadas de cada sensidisco determinan si la bacteria es sensible, de forma intermedia o resistente. Los resultados indican si un antibiótico en particular tiene el potencial para controlar efectivamente una infección causada por la bacteria patógena ^{11, 13, 27, 28, 29, 46, 47, 48, 49}

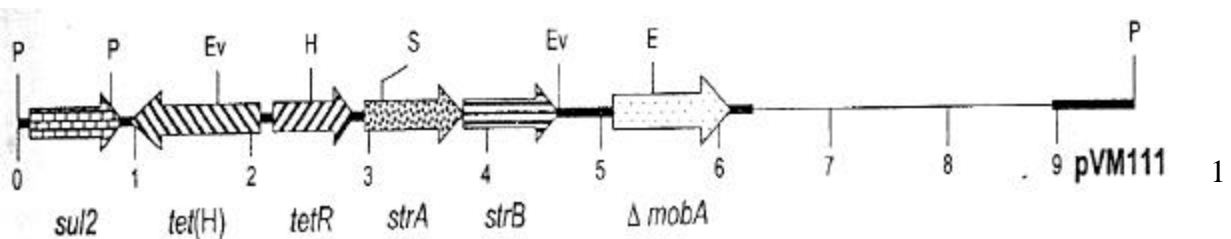
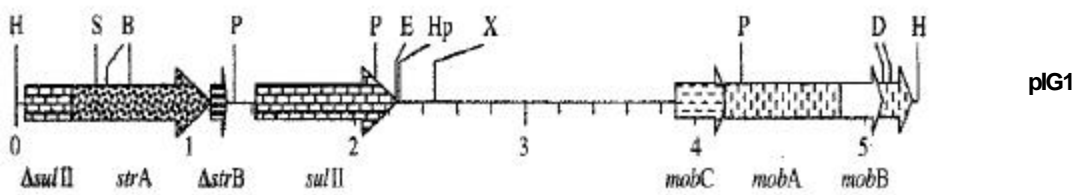
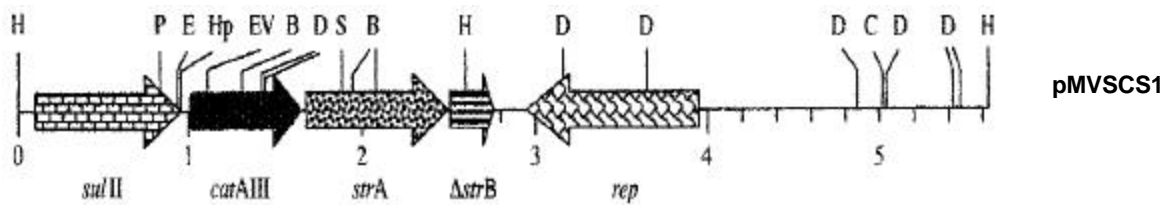
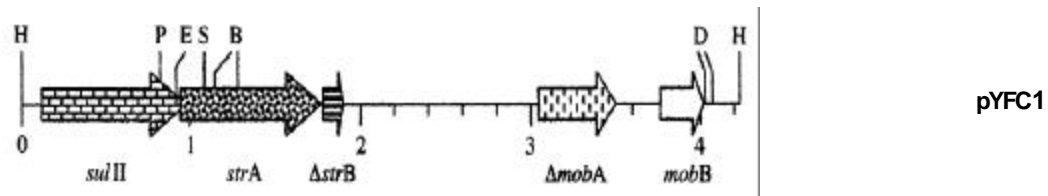
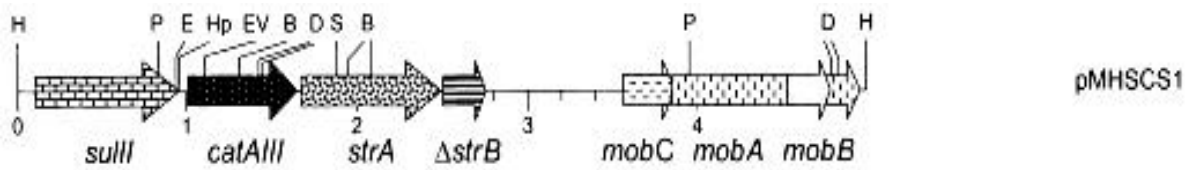


Fig. 1 Análisis comparativo de la organización estructural de los plásmidos *pYFC1* de *M. haemolytica*; *pMVSCS1* de *M. varigena*; *pIG1* y *pVM111* de *P. multocida*. Se presenta una distancia en escala de kilobases en la parte inferior de cada mapa. Las estructuras para lectura de los genes en la replicación de los plásmidos (*repA*), en movilización del plásmido (*mobA*, *mobB*, *mobC*), en la resistencia a sulfonamidas (*sulII*), la resistencia a estreptomicina (*strA*, *strB*), la resistencia a cloranfenicol (*catAIII*), la resistencia a tetraciclinas (*tet(H)*), y su gen represor *tetR*), se muestran en relación de la dirección de transcripción. *Kehrenberg et al. 2001*

Otra técnica es la llamada Concentración Mínima Inhibitoria (CMI), que mide la concentración más baja de un antimicrobiano capaz de inhibir una cantidad definida de microorganismos viables en una suspensión bacteriana durante un periodo específico de exposición. Una serie de diluciones de un antibiótico son inoculadas con las bacterias e incubadas y mediante esta técnica de CMI es posible conocer la concentración en la que el quimioterapéutico es capaz de inactivar a la bacteria ^{11, 13, 28, 46, 47, 49, 50}.

Actualmente gracias a la técnica de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR, por sus siglas en inglés) es posible detectar los genes que proporcionan la resistencia a los antimicrobianos, dicha técnica consiste en la [síntesis](#) "in vitro" de secuencias específicas de DNA, en este caso los genes de la resistencia, basándose en la replicación del DNA realizada por la DNA polimerasa. Estas enzimas realizan la [síntesis](#) de una cadena complementaria de DNA usando un molde de cadena sencilla, pero a partir de una región de doble cadena. Para crear esta región de doble cadena se usan los denominados iniciadores (primers), los cuales son una pareja de oligonucleótidos sintetizados de manera que sean complementarios a cada uno de los extremos 3' del fragmento de DNA que se desea amplificar.

En México las publicaciones referentes a resistencia a antimicrobianos de *Mh* son pocas y esporádicas, Pijoan reportó una alta resistencia a penicilina y estreptomicina (mayor a 80%) determinada mediante el método de difusión en disco, en cepas de *Mh* aisladas de casos de neumonía en becerras lecheras en establos de Tijuana ¹³; en diversas partes del mundo como Norte América, Asia y Australia se ha reportado resistencia a estreptomicina, sulfas, penicilina G, ampicilina, gentamicina, tilmicosina, enrofloxacina, tetraciclina y oxitetraciclina ^{11, 27, 28, 29, 51}. Kehrenberg *et al*, han informado la presencia de genes *sulll*, *strA*, *catAIII* y *tet(L)*, localizados tanto en plásmidos como en el cromosoma, que proporcionan resistencia a *Mh* contra sulfas, estreptomicina, cloranfenicol y tetraciclinas ^{41, 42, 43, 44, 45, 52, 53, 54}.

El propósito del presente estudio fue de contribuir para mejorar los tratamientos que contemplen el uso de los quimioterapéuticos mas eficaces contra *Mh* de tal forma que se aumente la eficiencia en las prácticas rutinarias que atienden los casos de enfermedades respiratorias, lo que finalmente redundará en la disminución de costos y pérdidas por este concepto.

II. OBJETIVOS

GENERAL:

- ✦ Determinar la resistencia a antimicrobianos en cepas de *Mannheimia haemolytica* provenientes de muestras de exudado nasal de bovinos clínicamente enfermos de neumonía en dos complejos lecheros de México.

ESPECÍFICOS:

- ✦ Determinar perfiles de resistencia antimicrobiana mediante la técnica de Kirby-Bauer.
- ✦ Determinar la Concentración Mínima Inhibitoria en las cepas que presenten resistencia antimicrobiana múltiple.
- ✦ Determinar la presencia del gen de resistencia antimicrobiana, en aquellas cepas de *Mh* que presentaron la mayor frecuencia de resistencia a un quimioterapéutico en la técnica de Kirby-Bauer.

III. MATERIAL Y MÉTODOS

OBTENCIÓN DE LAS CEPAS

Se emplearon un total de 100 cepas de *M. haemolytica* aisladas de muestras de exudado nasal de bovinos clínicamente enfermos de neumonía, obtenidas en establos del Complejo Agropecuario Industrial de Tizayuca (CAIT), Tizayuca, Hidalgo (n= 78); y del Complejo Lechero de La Laguna (CLL) Torreón, Coahuila y Gómez Palacio, Durango (n= 22).

Las cepas que se describen en la tabla 1 fueron obtenidas en un estudio previo que se realizó en la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia de la UNAM y el CENID-Microbiología (Centro Nacional de Investigación Disciplinaria en Microbiología Animal) del INIFAP (proyecto CONACYT G-38590-B).

Tabla 1
TOTAL DE CEPAS DE *Mannheimia haemolytica* ESTUDIADAS SEGÚN
SU SEROTIPO Y PROCEDENCIA

Procedencia	Serotipo			TOTAL
	A1	A6	NT	
CAIT	25	2	51	78

CLL	6	0	16	22
TOTAL	31	2	67	100

CAIT: Complejo Agropecuario Industrial de Tizayuca; **CLL** Complejo Lechero de La Laguna; **NT:** No tipificable.

MANEJO Y PROCESAMIENTO DE LAS CEPAS

Se llevó a cabo en los laboratorios de bacteriología del CENID-Microbiología; las cepas destinadas para este estudio fueron resembradas cada 10 días en placas de agar sangre¹ de ovino para mantenerlas viables para las diferentes pruebas a las que fueron sometidas.

1. TECNICA DE KIRBY-BAUER

Se prepararon cultivos de 18 horas de incubación² de las cepas en agar sangre de ovino, se obtuvieron las colonias y se resuspendieron en solución salina fisiológica (SSF) estéril hasta ajustar con el espectrofotómetro³ a 75% de transmitancia a 610 nm de longitud de onda, que corresponde a una concentración de 10^8 UFC/ml aproximadamente de acuerdo al método descrito por Kirby-Bauer^{46, 47, 48, 49}. Con una pipeta se tomaron 2 ml del inóculo y se vertieron en 1 placa de agar sangre de ovino, distribuyendo uniformemente sobre la superficie, se eliminó el excedente y se dejó secar. Posteriormente se colocaron los sensidiscos⁴ con las características que se muestran en la tabla 2, sobre la superficie de la placa a una distancia aproximada de 15 mm del borde de la placa y entre ellos. Las placas se incubaron en posición invertida a 37 °C durante 18-24 horas.

Tabla 2
ANTIBIÓTICOS UTILIZADOS EN LA TÉCNICA DE KIRBY-BAUER

¹ Becton, Dickinson and Company Sparks. (BD, BBL®)
² FELISA Estufa, modelo FE-143AD, serie 9809128, 120V, 375W, temp 70°C, cps 60Hz.
³ Bacharach. Cole man, modelo 35.
⁴ Becton, Dickinson and Company Sparks (BD, BBL®)

ANTIBIÓTICO	SENSIDISCO	CONCENTRACIÓN
Ampicilina	Am	10 µg
Gentamicina	Gm	10 µg
Eritromicina	E	15 µg
Penicilina	P	10 UI
Estreptomina	St	15 µg
Trimetoprim y Sulfametoxazol	SXT	1.25 µg 23.75 µg
Tetraciclinas	TE	30 µg
Ceftiofur	XNL	30 µg

La medición de los halos de inhibición se realizó con un vernier y la interpretación se realizó con los valores de la tabla 3, de acuerdo al National Committee for Clinical Laboratory Standards (NCCLS) ⁵⁵ en las siguientes categorías:

- a) Resistente (R): implica que las cepas no son inhibidas por la concentración del antimicrobiano que usualmente se alcanza en el sistema con una dosis normal.
- b) Sensible (S): implica que una infección dada por un agente infeccioso puede tratarse apropiadamente con la dosis recomendada del antimicrobiano.

Tabla 3
INTERPRETACIÓN DE ESTÁNDARES PARA LAS PRUEBAS
DE SUSCEPTIBILIDAD PARA DIFUSIÓN EN PLACA Y DILUCIÓN*.

ANTIBIOTICO	Zona de inhibición (diámetro mm)			MIC (µg/ml)		
	S	I	R	S	I	R
AM	≥17	14 a 16	≤13	≤8	16	≥32
XLN	≥21	18 a 20	≤17	≤2	4	≥8
E	≥23	14 a 22	≤13	≤0,5	1 a 2	>8
GM	≥15	13 a 14	≤12	≤4	8	≥16
P	≥15	-	≤14	≤8	-	≥16
S	≥15	12 a 14	≤11	≤64	-	≥128**
SXT	≥16	11 a 15	≤10	≤256	-	≥512
TE	≥19	15 a 18	≤14	≤4	8	≥16

Am (ampicilina); XLN (ceftiofur), E (eritromicina); GM (gentamicina), P (penicilina); St (estreptomina); SXT (sulfametoxazol con trimetoprim); TE (tetraciclina); S (sensible); I (sensibilidad intermedia); R (resistente); MIC (Concentración mínima inhibitoria) * Datos de acuerdo al NCCLS y al Manual of Clinical Microbiology **De acuerdo C. Kehrenberg, S. Schwarz/ FEMS Microbiology letters 205(2001) 283-290

2. CONCENTRACIÓN MINIMA INHIBITORIA

Se prepararon cultivos de 18 horas de incubación en placas de agar sangre de ovino, solamente de las cepas que presentaron resistencia a tres ó más antimicrobianos (multirresistencia) en la técnica de Kirby-Bauer. Las colonias se suspendieron en SSF estéril hasta ajustar su turbidez mediante espectrofotómetro (aproximadamente 10^8 UFC/ml). Se realizó una dilución al 1:100 del inóculo, 0.2 ml del inóculo en 19.8 ml de caldo Infusión cerebro-corazón⁵ (BHI por sus siglas en inglés) teniendo un inóculo final aproximado de 10^6 UFC/ml.

Se prepararon 15 tubos con 1 ml de caldo BHI y otro con 1.8 ml, se preparó una solución madre de antibiótico⁶ a una concentración de 5120 $\mu\text{g/ml}$. Se añadieron 0.2 ml de la solución madre de antibiótico al tubo que contenía 1.8 ml de caldo (concentración de este tubo 512 $\mu\text{g/ml}$). A partir de éste, se prepararon diluciones dobles seriadas tomando 1 ml del primer tubo y transfiriéndolo al segundo, la concentración de antibiótico de este tubo fue de 256 $\mu\text{g/ml}$. Después de mezclar el contenido del segundo tubo, se transfirió 1 ml al tercer tubo y así sucesivamente hasta el tubo 14, del cual se toma 1 ml y se desecha. De esta forma se obtuvieron soluciones dobles del antibiótico desde 512 $\mu\text{g/ml}$ hasta 0.0625 $\mu\text{g/ml}$. Posteriormente, a cada tubo con antibiótico se añadió 1 ml del inóculo preparado, que contenía aproximadamente 10^6 UFC/ml. Por lo tanto el inóculo final fue de 5×10^5 UFC/ml. Las concentraciones finales de antibiótico fueron de 256 $\mu\text{g/ml}$ hasta 0.03125 $\mu\text{g/ml}$. Se incubaron los tubos a 37 °C en agitación⁷ durante 18 horas y posteriormente se efectuó la lectura. Se consideró la CMI como la correspondiente al tubo con menor concentración de antibiótico donde no hubo desarrollo bacteriano, demostrado por la ausencia de turbidez^{46, 47, 49, 50}. La interpretación se realizó de

⁵ Lab Merck

⁶ Laboratorio SIGMA-ALDRICH

⁷ Forma Scientific © Orbital Shaker, model 4535 120V 60Hz

acuerdo al National Commite for Clinical Laboratory Standards (NCCLS) en sensible y resistente, con los estándares que se observan en la tabla 3.

3. EXTRACCIÓN DE ADN CROMOSÓMICO CON TIOCIANATO DE GUANIDINA

La extracción de DNA se realizó a partir de un cultivo puro, el cual se colocó en un tubo eppendorf, se agregó 550 µl de solución de lisis (tiocianato de guanidina⁸ 5M, EDTA⁹ 0.1M, Sarcosil¹⁰ 0.5%), se mezcló durante un periodo de 5 a 10 min. en vortex¹¹. Posteriormente se adicionaron 250 µl de acetato de amonio¹² 7.5 M y se colocó en hielo por 10 minutos, se adicionaron 500 µl de cloroformo-alcohol isoamílico¹³ 25:1 v/v, con el fin de romper la pared celular de las bacterias, se mezcló en el vortex hasta obtener una solución blanquecina lechosa. Se centrifugó¹⁴ (a 6000 gravedades) y se tomó el sobrenadante, se realizó otro lavado con cloroformo-alcohol isoamílico, se mezcló, se centrifugó y se tomó el sobrenadante, el cual se precipitó con 0.7 de volumen de isopropanol¹⁵. Se centrifugó (a 6000g) nuevamente y se desechó el sobrenadante. Se le adicionaron 200 µl etanol¹⁶ al 100%, se mezcló en vortex, se centrifugó a 13 000 rpm (6000g) durante 15 min y se decantó, se dejó secar durante 30 min aproximadamente y se resuspendió el DNA en 50-100 µl de TE (TRIS¹⁷, EDTA) y se almacenó a 4 °C

4. REACCIÓN EN CADENA DE LA POLIMERASA (PCR)

Debido a que la estreptomycinina fue el antimicrobiano para el cual se presentó un mayor número de cepas de *Mh*, se realizó PCR^{54, 56} para determinar la presencia de

⁸ Laboratorio SIGMA-ALDRICH, \geq 97%
⁹ Laboratorio SIGMA-ALDRICH
¹⁰ Laboratorio SIGMA-ALDRICH. N Lauroulsarcosine sodium ultra \geq 94%
¹¹ Vortex Labinco modelo L46 Cat. No. 46010
¹² ANASOL^{MR} reactivo analítico, lab TECSIQUIM; SA de CV
¹³ Reactivo Baker®
¹⁴ Centrifuga EPPENDORF modelo 5410
¹⁵ Laboratorio Merck
¹⁶ Reactivo Baker®
¹⁷ Laboratorio BIO-RAD

los genes *strA*. Para cada muestra se mezclaron 10 µl de PCR Master Mix¹⁸, 6.8 µl de H₂O¹⁹, 0.6 µl de los primers *str1*²⁰ (5'- TGA CTGGTTGCCTGTCAGAGG-3') y *str2*²¹ (5'-CCAGTTGTCTTCGGCGTTAGC-3') y 2 µl de DNA, las muestras se colocaron en un termociclador²², el procedimiento comenzó con una desnaturalización a 94 °C durante 2 min, seguido de 35 ciclos, cada uno de 94 °C por 1 min, alineamiento de los primers a 56 °C durante 1 min y 1 min a 72 °C, seguidos por la extensión final de los primers a 72 °C durante 7 min⁵⁴. El producto de la reacción se visualizó en gel de agarosa²³ al 1% con bromuro de etidio²⁴ mediante electroforesis²⁵ en una cámara de luz UV²⁶ y se utilizó el marcador de peso molecular 2-Log DNA Ladder (0.1-10.0 kb)²⁷ que se muestra en la figura 2.

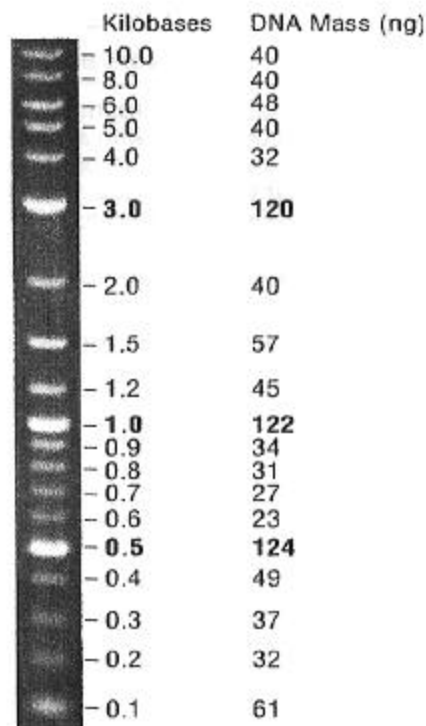


Fig 2. Marcador de peso molecular 2-Log DNA Ladder visualizado en gel de agarosa al 1%. Foto tomada del catálogo de BioLabs, 2006.

- 18 PCR Master Mix, laboratorio QUIAGEN
 19 PCR Master Mix, laboratorio QUIAGEN
 20 Invitrogene, ACCESOLAB order number 1194272, primer number 112789E11
 21 Invitrogene, ACCESOLAB order number 1194272, primer number 112789E12
 22 Bio-Rad model no iCycler® Thermal cycler.
 23 Lab AMRESCO; Invitrogene
 24 Invitrogene.
 25 Horizon® 58, Horizontal gel, Electrophoresis Apparatus, Life Technologies Gibco BRL.
 26 UVP BiImaging systems, EPI CHEM II Darkroom
 27 BioLabs

5. ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Los datos obtenidos se analizaron mediante estadística descriptiva empleando además la prueba de Chi cuadrada o Fisher, según características de los datos, para evaluar las diferencias entre las frecuencias de las cepas sensibles o resistentes a los diferentes antimicrobianos. El análisis estadístico se realizó con el programa EPI info versión 3.3.2 para Windows (Centers for Diseases Control and Prevention (CDC), Atlanta, USA, 2004).

IV. RESULTADOS

1. TECNICA DE KIRBY-BAUER

En el método de difusión en placa sólo hubo cepas resistentes para los antimicrobianos XNL, E, GM, St y SXT con frecuencias variables. La St fue el que presentó una mayor frecuencia de cepas resistentes seguida de la GM tanto en el CAIT como en el CLL (Tabla 4). Al evaluar la diferencia entre las frecuencias de cepas resistentes para los diferentes antimicrobianos en cada uno de los complejos lecheros estas fueron significativas ($p \leq 0.05$).



Tabla 4

FRECUENCIA DE CEPAS DE *Mannheimia haemolytica* RESISTENTES A DIFERENTES ANTIMICROBIANOS SEGÚN SU PROCEDENCIA

Procedencia	No. cepas estudiadas	ANTIMICROBIANOS				
		XNL	E	GM	St	SXT
		No. (%)	No. (%)	No. (%)	No. (%)	No. (%)
CAIT	78	1 (1.3)	3 (3.8)	23 (29.5)	61 (78.2)	1 (1.3)
CLL	22	1 (4.5)	3 (13.6)	13 (59.1)	19 (86.4)	0 (0)
TOTAL	100	2 (2)	6 (6)	36 (36)	80 (80)	1 (1)

CAIT (Complejo Agropecuario Industrial de Tizayuca); CLL (Cuenca Lechera de la Laguna); XNL (ceftiofur); E (eritromicina); GM (gentamicina); St (estreptomicina), SXT (trimetoprim con sulfametoxazol).

En la tabla 5 se muestra la frecuencia de las cepas de *Mh* que presentaron resistencia a antimicrobianos de acuerdo a su serotipo, destaca una alta frecuencia de cepas de *Mh* resistentes a St entre las cepas NT (94%) y las A1 (51.6%). Al evaluar estadísticamente las frecuencias de cepas resistentes para los diferentes antimicrobianos en cada uno de los serotipos, las diferencias fueron significativas en los casos del serotipo A1 y NT ($p \leq 0.05$).

Tabla 5

FRECUENCIA EN CEPAS DE *Mannheimia haemolytica* RESISTENTES A DIFERENTES QUIMIOTERAPÉUTICOS SEGÚN SU SEROTIPO

Serotipo	No. Cepas estudiadas	ANTIMICROBIANOS				
		XNL	E	GM	St	SXT
		No. (%)	No. (%)	No. (%)	No. (%)	No. (%)

A1	31	0 (0)	1 (3.2)	3 (9.7)	16 (51.6)	1 (3.2)
A6	2	0 (0)	0 (0)	0 (0)	1 (50)	0 (0)
NT	67	2 (3)	5 (7.5)	33 (49.2)	63 (94)	0 (0)
TOTAL	100	2 (2)	6 (6)	36 (36)	80 (80)	1 (1)

Serotipos A1, A6 y NT (No tipificables); XNL (ceftiofur); E (eritromicina); GM (gentamicina); St (estreptomicina), SXT (trimetoprim con sulfametoxazol).

2. CONCENTRACIÓN MÍNIMA INHIBITORIA

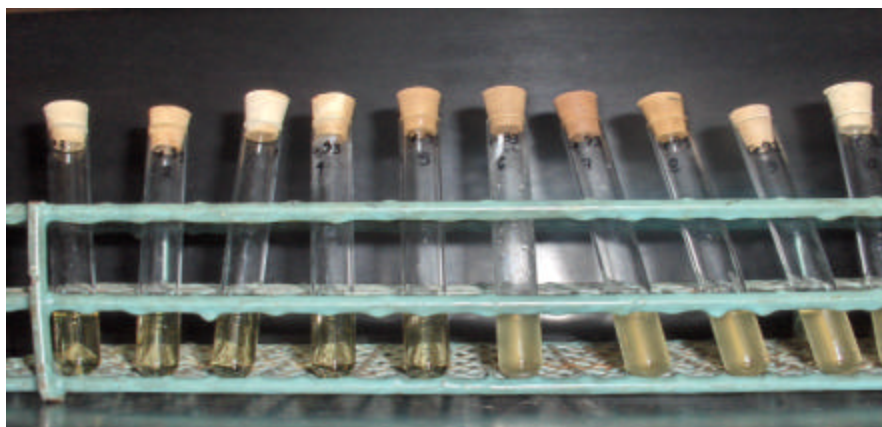
Entre las 8 cepas que presentaron multirresistencia en la técnica de Kirby-Bauer, al determinar la concentración mínima inhibitoria 2 cepas resultaron resistentes a GM, 2 a St y 2 a E, mientras que ninguna a XNL y SXT, la cepa 1 fue resistente a GM, St y E simultáneamente y la cepa 98 a St y E (tabla 6).

Tabla 6

CONCENTRACIÓN MÍNIMA INHIBITORIA EN CEPAS DE *Mannheimia haemolytica* CON RESISTENCIA MÚLTIPLE EN KIRBY-BAUER

CMI	GM		S		E		SUL		XNL	
	(µg/ml)	R/S	(µg/ml)	R/S	(µg/ml)	R/S	(µg/ml)	R/S	(µg/ml)	R/S
1	32	R	256	R	8	R				
5	4	S	64	S			4	S		
36	1	S	64	S	2	I				
52	8	I	32	S					0,6	S
90	4	S	2	S	1	I				
93	16	R	64	S	2	I				
96	4	S	16	S					0,03	S
98	2	S	128	R	8	R				

CMI (Concentración mínima inhibitoria); GM (Gentamicina); St (Estreptomicina); SUL (sulfas); µg (microgramos); ml (mililitros); R (resistente); S (sensible)



3. EXTRACCIÓN DE ADN CROMOSÓMICO CON TIOCIANATO DE GUANIDINA

Mediante esta técnica la extracción de ADN fue eficaz y sencilla, cabe destacar que algunas cepas bacterianas presentan un fragmento de alto peso molecular por abajo del DNA cromosomal, lo que se presume sea un plásmido.

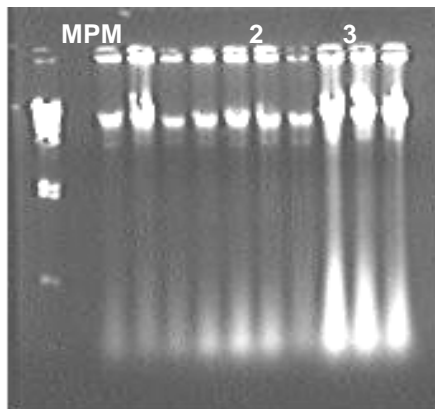


Fig. 5 Foto de un gel de agarosa al 1% en TAE 1X, teñido con bromuro de etidio, visto con luz ultravioleta. Carril 1: MPM ?; Carril 2 al 8: ADN de cepas de *Mannheimia haemolytica*

4. REACCIÓN EN CADENA DE LA POLIMERASA (PCR)

Debido a la alta frecuencia (80%) de cepas de *Mh* resistentes a estreptomicina en la técnica de Kirby-Bauer, se buscó la presencia del gen *strA*. De las 100 cepas estudiadas, en el 76% se logró amplificar un fragmento (646 pb aproximadamente)

con las mismas características (Fig. 6 y 7) a las reportadas por *Kehrenberg et al.* ⁵⁴ En la tabla 7 se muestra que el 60% de las cepas procedentes del CAIT que fueron resistentes a St con la técnica de Kirby-Bauer, presentaron el gen *StrA*, sin embargo el 75% de las cepas sensibles en la misma técnica también presentaron el gen. Entre las frecuencias de cepas R con presencia del gen *strA*, si existe diferencia significativa entre complejos ($p \leq 0.05$).



Fig 6. Amplificaciones específicas reportadas para los genes *sull* (carril 1), *catAIII* (carril 2) y *strA* (carril 3) *Kehrenberg 2001*

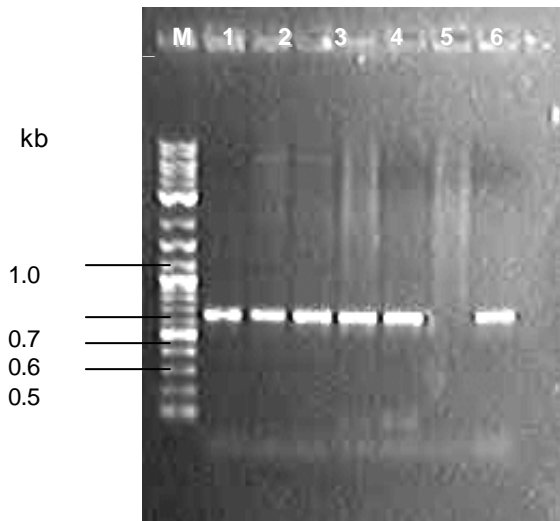


Fig 7. Amplificación del gene *strA*; carril 1, DNA Ladder 2-Log; carriles 2 al 5 cepas de *Mh*; carril 6, *Salmonella*

Tabla 7

FRECUENCIA DE CEPAS DE *Mannheimia haemolytica* DE ACUERDO A PRESENCIA O AUSENCIA DEL GEN *strA* SEGÚN RESISTENCIA O SENSIBILIDAD EN LA TÉCNICA DE KIRBY-BAUER Y SU PROCEDENCIA

Técnica Kirby-Bauer con estreptomicina	No. Cepas estudiadas	PROCEDENCIA			
		CAIT		CLL	
		Gen <i>strA</i>		Gen <i>strA</i>	
		(+)	(-)	(+)	(-)
		No. (%)	No. (%)	No. (%)	No. (%)
R	48	48 (60)	13 (16.25)	10 (12.5)	9 (11.25)
S	20	15 (75)	2 (10)	3 (15)	0 (0)
TOTAL	100	63 (63)	15 (15)	13 (13)	9 (9)

CAIT (Complejo Agropecuario Industrial de Tizayuca); CLL (Cuenca Lechera de la Laguna Torreón, Coahuila y Gómez Palacio); R (resistente); S (sensible)

Entre las cepas R el mayor porcentaje con presencia del gen fueron NT (58.7%), mientras que el serotipo A1 fue el que presentó el mayor porcentaje de cepas con el gen (65%), pero entre las cepas S (Tabla 8). Cabe mencionar que en las cepas R y S hubo diferencia significativa entre las frecuencias con presencia del gen *strA* para los diferentes serotipos ($p \leq 0.05$).

Tabla 8

FRECUENCIA DE CEPAS DE *Mannheimia haemolytica* DE ACUERDO A PRESENCIA O AUSENCIA DEL GEN *strA* SEGÚN RESISTENCIA Ó SENSIBILIDAD EN LA TÉCNICA DE KIRBY-BAUER Y SU SEROTIPO

Técnica Kirby-Bauer con estreptomicina	No. Cepas estudiadas	Serotipos					
		A1		A6		NT	
		Gen <i>strA</i>		Gen <i>strA</i>		Gen <i>strA</i>	
		(+)	(-)	(+)	(-)	(+)	(-)
		No. (%)	No. (%)	No. (%)	No. (%)	No. (%)	No. (%)
		10 (12.5)	6 (7.5)	1 (1.25)	0 (0)	47 (58.75)	16 (20)
	20	13 (65)	2 (10)	1 (5)	0 (0)	4 (20)	0
TOTAL	100	23 (23)	8 (8)	2 (2)	0 (0)	51 (51)	16 (16)

CAIT (Complejo Agropecuario Industrial de Tizayuca); CLL (Cuenca Lechera de la Laguna Torreón, Coahuila y Gómez Palacio); R (resistente); S (sensible); serotipos A1, A6 y NT (no tipificable)

Se presentó una mayor frecuencia de cepas de *Mh* con el gen *strA* en el CAIT (80.8%) y en los dos complejos el mayor porcentaje de cepas con gen fueron NT (CAIT= 55.1%; CLL= 36.4%) seguidas del serotipo A1 (CAIT= 23.1%; CLL= 22.7%) (Tabla 9). Al evaluar la diferencia entre las frecuencias de cepas con presencia del gen *strA* para los diferentes serotipos en cada uno de los complejos, éstas resultaron significativas ($p \leq 0.05$).

Tabla 9

FRECUENCIA DE CEPAS DE *Mannheimia haemolytica* CON PRESENCIA DEL GEN *strA* SEGÚN SU SEROTIPO Y PROCEDENCIA

Procedencia	No. Cepas	Serotipo			Total
		A1	A6	NT	

		No. (%)	No. (%)	No. (%)	No. (%)
CAIT	78	18 (23,1)	2 (2,6)	43 (55,1)	63 (80,8)
CLL	22	5 (22,7)	0 (0)	8 (36,4)	13 (59,1)
Total	100	23 (23)	2 (2)	51 (51)	76 (76)

CAIT (Complejo Agropecuario e Industrial de Tizayuca); CLL (Cuenca Lechera de al Laguna Torreón Coahuila y Gómez Palacios y serotipos A1, A6, y NT (no tipificables)

PREVIAMENTE se han realizado algunos estudios en diversas partes del mundo como Asia, Norte América, Australia y México sobre la resistencia antimicrobiana en cepas de *Mh*, utilizando las técnicas de difusión en placa y dilución. En México Pijoan *et al.*,¹³ informaron una alta frecuencia (mayor al 80%) en la resistencia a estreptomicina, así mismo Fales y Chang^{27, 28} reportaron frecuencias del 70 al 90% en la resistencia al mismo antibiótico, lo cual coincide con lo que se presenta en este trabajo. Por otro lado también mencionan resistencia a penicilina, ampicilina y tetraciclina, lo cual contrasta con los resultados obtenidos en donde *Mh* es sensible a dichos quimioterapéuticos.

Diversos estudios han mencionado que el serotipo A1 de *Mh* es el más frecuente en los aislamientos en los casos del complejo respiratorio bovino o fiebre de embarque^{12, 20, 21, 57, 58}, sin embargo cabe destacar que las cepas que presentaron mayor frecuencia (94%) en la resistencia a estreptomicina fueron NT.

Las CMI de las cepas que presentaron resistencia múltiple en la prueba de difusión en placa dieron como resultados rangos muy amplios, como GM (1-32 µg/ml), St (2-256 µg/ml), E (1-8 µg/ml), lo que no coincide con un estudio de dilución realizado previamente por Esaki *et al.*, quienes informaron las MIC en rangos de 0.25-2 µg/ml para GM¹¹.

El gen *strA* que proporciona resistencia a la estreptomicina mediante la producción de la enzima *aminoglycoside-3-phosphotransferase*, se ha localizado en varios géneros bacterianos^{58, 59, 60, 61, 62, 63, 64}. En el presente trabajo el 76% de las

cepas presentaron el gen, de las cuales 18 cepas de *Mh* (23.7%) fueron sensibles a la estreptomicina en la prueba de difusión en placa, es probable que dicho fenómeno esté relacionado con la expresión del gen. Reggie *et al.*,⁵⁸ en un estudio realizado informaron que *Mh* requiere de factores de crecimiento *in vivo*, como el proceso de infección, para llevar a cabo la expresión de sus genes.

El 22% de las cepas de *Mh* que resultaron resistentes a la estreptomicina en la prueba de difusión en placa, no presentaron, bajo las condiciones en que se probaron, el gen *strA*, lo que sugiere que *Mh* podría tener otros mecanismos para desarrollar resistencia a la estreptomicina. *Mh* porta un plásmido (Fig. 8) denominado pYFC1, el cual contiene un grupo de genes que le proporcionan resistencia a antibióticos, sin embargo el gen *strB* que también otorga resistencia a la estreptomicina no es funcional, es posible que dichas cepas no posean este plásmido, pero si contengan en su ADN cromosómico el gen *strB* completo que codifica a la enzima *aminoglycoside-6-phosphotransferase*, el gen *strB* no se identificó en el presente trabajo porque los primers utilizados fueron diseñados para localizar sólo al gen *strA*.^{54, 59, 60, 61, 64}

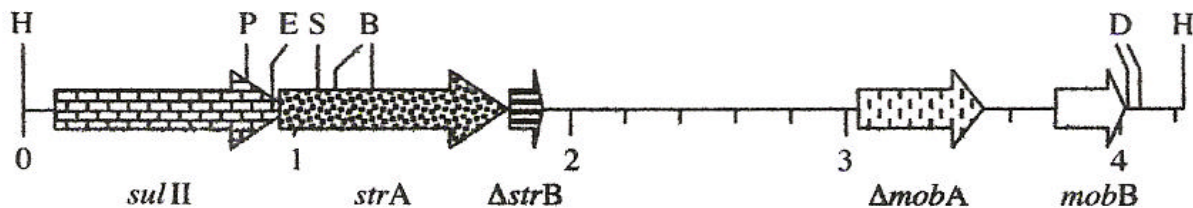


Fig 8 Organización estructural del plásmido pYFC1 de *M. haemolytica*. Se presenta una distancia en escala de kilobases en la parte inferior de cada mapa. Las estructuras para lectura de los genes en movilización del plásmido (*mobA*, *mobB*), en la resistencia a sulfonamidas (*sulII*), la resistencia a estreptomicina (*strA*, *strB*). Kehrenberg *et al*, 2001

Gioia *et al.*,⁵⁷ mencionan que *Mh* posee genes denominados AcrAB y AcrR que le proporcionan a la bacteria un mecanismo de bombeo del interior al exterior de los quimioterapéuticos, además de una posible familia de transportadores de multiresistencia a antibióticos (MarC). Peric *et al.*,⁶⁵ también reportan en

Haemophilus influenzae los efectos del mecanismo de bombeo que le otorgan resistencia contra los macrólidos.

Finalmente, es posible que las cepas de *Mh* que son resistentes a la estreptomicina y no poseen los genes *strA*, *strB*, ni los genes *AcrAB* y *AcrR*, pudieran adquirir esta resistencia mediante mutaciones en el gen que codifica a una proteína ribosomal S12 (*rpsL*) como en el caso de *Brucella melitensis* que al secuenciar un fragmento nucleotídico se reveló una mutación en el gen *rpsL* de la cepa vacunal Rev1 comparada con la cepa de referencia 16M. Dicha mutación permite un cambio del aminoácido Pro a Leu en el codón de la posición 91 (codón 91: CCG a CTG) ⁶⁶.

En las cepas con resistencia múltiple (≥ 3 quimioterapéuticos) el 75% presentó el gen *strA*; cabe mencionar que no existen investigaciones referentes que indiquen que la presencia del gen *strA* esté relacionada con la multirresistencia en las cepas de *Mh*, solamente Kehrenberg *et al.*,⁵⁴ informaron de la resistencia a sulfonamidas, estreptomicina y cloramfenicol en cepas de los géneros *Pasteurella* y *Mannheimia*, así como la presencia de plásmidos que contienen genes de resistencia a dichos antibióticos.

VI. CONCLUSIONES

Mannheimia haemolytica es un agente infeccioso muy importante en el complejo respiratorio bovino ya que se le aísla con mucha frecuencia, sin embargo en México la investigación acerca de dicho patógeno y su resistencia y susceptibilidad a los quimioterapéuticos es escasa, por lo tanto y de acuerdo a los resultados obtenidos en el presente trabajo se puede concluir que:

- ◆ Los antimicrobianos más recomendados en el tratamiento contra la pasteurelisis o “fiebre de embarque” para el CAIT y el CLL son la ampicilina, la penicilina y la tetraciclina, ya que todas las cepas resultaron susceptibles en la prueba de difusión en placa.
- ◆ La eritromicina, el trimetoprim con sulfametoxazol y el ceftiofur también pueden utilizarse aunque con menor frecuencia que los anteriores por presentar *Mh* resistencia en menor proporción.
- ◆ No se recomienda el uso de aminoglucósidos como la estreptomina y la gentamicina por presentar una alta frecuencia (80 y 36%) de resistencia antimicrobiana de *Mh*.
- ◆ *Mh* tiene varios mecanismos que le proporcionan resistencia contra la estreptomina, sin embargo en el presente estudio sólo se pudo comprobar la presencia del gen *strA*.

- ◆ Fue posible cumplir el último objetivo específico gracias a los estudios realizados en otros países, donde se ha determinado la presencia del gen *strA* que codifica para la enzima *aminoglycoside-3-phosphotransferase* que inactiva a la estreptomicina, quimioterapéutico que presentó la frecuencia más alta de resistencia en la prueba de difusión en placa.
- ◆ México requiere de mayor investigación en enfermedades que causan pérdidas económicas importantes en el ganado, tales como las infecciones respiratorias, y de esa forma aplicar la información generada en el establecimiento de programas de prevención efectivos y en el diseño de esquemas de tratamientos adecuados, lo que finalmente repercutirá en una industria ganadera productiva.

VII. LITERATURA CITADA

1. SAGARPA. Producción Pecuaria en México 2000-2005., Servicio de Información Estadística, Agroalimentaria y Pesquera (SIAP), Secretaría de Agricultura, Ganadería, Desarrollo Rural, Pesca y Alimentación. 2006. México. Disponible en:
URL: <http://www.sagarpa.gob.mx/Dgg/prod0001.htm>.
2. Speer, N., C. Young, and D. Roeber, The importance of preventing bovine respiratory disease a beef industry review. *Bovine Pract*, 2001. **35**: p. 189-196.
3. Zecchinon, L., T. Fett, and D. Desmecht, How *Mannheimia haemolytica* defeats host defence through a kiss of death mechanism. *Vet Res*, 2005. **36**(2): p. 133-56.
4. Bowland, S. and P. Shewen, Bovine Respiratory disease: comercial vacines currently available in Canada. *Can Vet*, 2000. **41**(1): p. 33-48.
5. Snowden, G D., Van Velck, L D., Cundiff, L V y G L Bennett., Bovine respiratory disease in feedlot cattle: Environmental, genetic, and economic factors. *J. Anim. Sci.*, 2006. **84**: p. 1999-2008
6. Van der Fels-Klerx, H J., Sorensen, J T., Jalvingh, A W y R B Hurne. An economic model to calculate farm-specific losses due to bovine respiratory disease in dairy heifers. *Prev. Vet. Med.*, 2001. **51**: p. 75-94.
7. Pijoan, A.P. y D.J.A. Chavez, Costos Provocados por Neumonias en becerras lecheras para remplazo, mantenidas bajo dos sistemas de alojamiento. *Vet Mex*, 2003. **34**(4): p. 333-342.
8. Trigo, F.J., Patogénesis y aspectos inmunológicos de la Pasteurelisis pulmonar bovina. *Vet Mex*, 1991. **22**(2): p. 131-134.
9. Weekley, L.B., H.P. Veit, and P. Eyre, Bovine Pneumonic Pasteurellosis Part II. Clinical Presentation And Treatment. *The Compendium*, 1998. **20**(2): p. 56-62.
10. Cusack, P.M., N. McMeniman, and I.J. Lean, The medicine and epidemiology of bovine respiratory disease in feedlots. *Aust Vet J*, 2003. **81**(8): p. 480-7.
11. 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 Med Sci*, 2005. **67**(1): p. 75-7.
12. Pijoan AP., R.F. Aguilar, y F. Morales Álvarez, Caracterización de los procesos neumónicos en becerros lecheros de la región de Tijuana, Baja California, México. *Vet Mex*, 1999. **30**(2): p. 149-155.
13. Pijoan, AP. y R.F. Aguilar, Resistencia y Sensibilidad a antimicrobianos en cepas de *Pasteurella haemolytica*, *P. multocida* y *Haemophilus somnus*,

- aisladas en becerras lecheras en establos de Tijuana. *Vet Mex*, 2000. **2**(31): p. 153-156.
14. Angen, O., Mutters, R., Caugant, D. A., Olsen, J. E., Bisgaard, M., Taxonomic relationships of the [*Pasteurella*] *haemolytica* complex as evaluated by DNA-DNA hybridizations and 16S rRNA sequencing with proposal of *Mannheimia haemolytica* gen. nov., comb. nov., *Mannheimia granulomatis* comb. nov., *Mannheimia glucosida* sp. nov., *Mannheimia ruminalis* sp. nov. and *Mannheimia varigena* sp. nov. *Int J Syst Bacteriol*, 1999. **49 Pt 1**: p. 67-86.
 15. Quirie, M., W. Donachie, and N.J. Gilmour, Serotypes of *Pasteurella haemolytica* from cattle. *Vet Rec*, 1986. **119**(4): p. 93-4.
 16. Bingham, D.P., R. Moore, and A.B. Richards, Comparison of DNA:DNA homology and enzymatic activity between *Pasteurella haemolytica* and related species. *Am J Vet Res*, 1990. **51**(8): p. 1161-6.
 17. NCBI, *Taxonomy*. 2006, Disponible en:
URL:<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Taxonomy/Browser/wwwtax.cgi?mode=Info&id=45201&lvl=3&lin=f&keep=1&srchmode=1&unlock>.
 18. Highlander, SK., Molecular genetic analysis of virulence in *Mannheimia (pasteurella) haemolytica*. *Front Biosci*, 2001. **6**: p. D1128-50.
 19. Weekley, LB., HP. Veit, and P. Eyre, Bovine Pneumonic Pasteurellosis Part I. Pathophysiology. *The Compendium*, 1998. **17**(7): p. 33-46.
 20. Jaramillo ML., Aguilar FR, y F.J. Trigo, Serotificación de *Pasteurella haemolytica* y determinación de los tipos capsulares de *Pasteurella multocida*, aisladas de pulmones neumónicos de becerros en México. *Vet Mex*, 1987. **18**: p. 185-188.
 21. Blanco VFJ., Trigo, FJ., Jaramillo, ML., Aguilar, RF., Serotypes of *Pasteurella multocida* and *Pasteurella haemolytica* isolated from pneumonic lesions in cattle and sheep from Mexico. *Rev Latinoam Microbiol*, 1995. **37**(2): p. 121-6.
 22. Prado, M.E., Prado, T M., Payton, M., Confer, A Wet al., Maternally and naturally acquired antibodies to *Mannheimia haemolytica* and *Pasteurella multocida*. *Vet Immunol Immunopath*, 2006. **111**: p. 301-307.
 23. Speer, N., C. Young, and D. Roeber, The importance of preventig bovine respiratory disease: a beef industry review. *Bovine Pract*, 2001. **35**(2): p. 189-196.
 24. Fulton, R.W., Briggs RE., Payton ME., Confer AW., Saliki JT., Ridpath JF., Burge LJ.,Duff GC., Maternally derived humoral immunity to bovine viral diarrhea virus (BVDV) 1^a, BVDV2, bovine herpesvirus-1, parainfluenza-3, virus bovine respiratory syncytial virus, *Mannheimia haemolytica* and *Pasteurella multocida* in beef calves, antibody decline by half-life studies and effect on response to vaccination. *Vaccine*, 2004. **22**: p. 643-649.
 25. Hodgins, D.C. and P.E. Shewen, Vaccination of neonatal colostrum-deprived calves againts *Pasteurella haemolytica* A1. *Can J Vet Res*, 2000. **64**: p. 3-8.
 26. Cardella, M.A., M.A. Adviento, and R.M. Nerving, Vaccination studies against experimental bovine *Pasteurella pneumonia*. *Can J Vet Res*, 1987. **51**: p. 204-211.
 27. Fales WH., Selby LA., Webber JJ., Hoffman LJ., Kintner LD., Nelson SL., Miller RB., Thorne JG., McGinity JT., Smith DK., Antimicrobial resistance

- among *Pasteurella spp* recovered from Missouri and Iowa cattle with bovine respiratory disease complex. J Am Vet Med Assoc, 1982. **181**(5): p. 477-9.
28. Chang, WH. and GR. Carter, Multiple drug resistance in *Pasteurella multocida* and *Pasteurella haemolytica* from cattle and swine. J Am Vet Med Assoc, 1976. **169**(7): p. 710-2.
 29. Watts J.L., Selby LA., Webber JJ., Hoffman LJ., Kintner LD., Nelson SL., Miller RB., Thorne JG., McGinity JT., Smith DK., A 4-year survey of antimicrobial susceptibility trends for isolates from cattle with bovine respiratory disease in North America. J Clin Microbiol, 1994. **32**(3): p. 725-31.
 30. Jawetz, Melnick, and Adelbergs, Medical Microbiology. 23 ed. 2004: Mc Graw-Hill. 164-172.
 31. Ballows A., Hauster WJ., Herrmann KL., Isenberg HB., Shadomy, HJ., Mechanisms of resistance to antimicrobial agents, in Manual of Clinical Microbiology. 1991, American Society of Microbiology: Washington, DC. p. 1099-1103.
 32. Murray., Patrick R., Ellen J., Pfaller MA., Tenover FG., Yolken RH., Mechanisms of Resistance to Antimicrobial Agents, in Manual of Clinical Microbiology. 1999, ASM PRESS. p. 1505-1519.
 33. Talaro, K. and A. Talaro, Principles of Antimicrobial Therapy, in Foundations in Microbiology. 1993, Wm C Brown Publishers. p. 296-311.
 34. Botana, LM., MF. Landoni, y TM. Jimenez, Antimicrobianos que actúan en la pared bacteriana, in Farmacología y Terapéutica Veterinaria. 2002, McGraw-Hill Interamericana: Madrid, España. p. 455-467.
 35. Gilman, AG. y JG. Hardman, Las Bases Farmacológicas de la Terapéutica. 10ª ed. Vol. 2. 2001, Madrid, España: McGraw Hill. 1161-1164.
 36. Demian, AL. and JE. Davies, *Antibiotic Resistance Mechanisms of Bacterial Pathogens, in Industrial Microbiology and Bacteriology*. 1999, ASM PRESS: Washington DC. p. 759-775.
 37. Botana LM., TM. Jimenez, y MF. Landoni, Antimicrobianos que inhiben la síntesis de proteínas, en Farmacología y Terapéutica Veterinaria, M.L. Lemos, Editor. 2002, McGraw-Hill: Madrid, España. p. 468-482.
 38. Botana LM., MF Landoni, y TM Jimenez, Sulfamidas y diamonopirimidinas, en Farmacología y Terapéutica Veterinaria. 2002, McGraw-Hill Interamericana: Madrid, España. p. 447-450.
 39. Ronald M., Atlas, and Mosby, Principles of Microbiology. 1ª ed. 1995. 87-98, 364-366.
 40. Black, J.G., Microbiology Principles and Explorations. 5th ed. 2002, U.S.A: Jonh Willey and Sons. 194-207.
 41. Kehrenberg, C., C. Werckenthin, and S. Schwarz, *Tn5706, a Transposon-Like Element from Pasteurella multocida Mediating Tetracycline Resistance*. Antimicrob Agents Chemother, 1998. **42**(8): p. 2116-2118.
 42. Kehrenberg, C., Salmon, SA., 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 Antimicrob Chemother, 2001. **48**(5): p. 631-40.

43. Kehrenberg, C. and S. Schwarz, Nucleotide sequence and organization of plasmid pMVSCS1 from *Mannheimia varigena*: identification of a multiresistance gene cluster. J Antimicrob Chemother, 2002. **49**(2): p. 383-6.
44. Kehrenberg, C., N.T.T. Tham, and S. Schwarz, New Plasmid-Borne Antibiotic Resistance Gene Cluster in *Pasteurella multocida*. Antimicrobial Agents and Chemotherapy, 2003. **47**(9): p. 2978-2980.
45. Kehrenberg, C., Catry, B., Haesebrouck F., de Kruif A., Schwarz, S., Novel spectinomycin/streptomycin resistance gene, aadA14, from *Pasteurella multocida*. Antimicrob Agents Chemother, 2005. **49**(7): p. 3046-9.
46. Murray, Patrick R., Ellen J., Pfaller MA., Tenover FG., Tenover RH., Antibacterial Susceptibility Tests: Dilution and Disk Diffusion Methods, en Manual of Clinical Microbiology. 1999, ASM PRESS. p. 1526-1542.
47. Ballows, A., Hauster WJ., Herrmann KL., Isenberg HB., Shadomy, HJ., Antimicrobial Susceptibility Testing: General Considerations, en Manual of Clinical Microbiology. 1991, American Society of Microbiology: Washington DC. p. 1059-1064.
48. Diaz, R., C. Gamazo, y I. López-Goñi, Determinación de la sensibilidad de una bacteria a agentes antimicrobianos: antibiograma, en Manual Práctico de Microbiología. 1999, Massón: Barcelona. p. 136-140.
49. Lennette, E.H., Dilution Susceptibility Test: Agar and Macro-broth dilution procedures, en Manual of Clinical Microbiology. 1980, American Society for Microbiology: Washington. p. 453-473.
50. Diaz, R., C. Gamazo, y I. López-Goñi, Determinación de la concentración mínima inhibitoria y de la concentración mínima bactericida, en Manual Práctico de Microbiología. 1999, Massón: Barcelona, España. p. 141-147.
51. Catry, B., Haesebrouck F., de Vlieghe S., Feyen B., Vanrobaeys M., Opsomer G., Schwarz S., de Kruif A., Variability in acquired resistance of *Pasteurella* and *Mannheimia* isolates from nasopharynx of calves, with particular reference to different herd types. Microbial Drug Resistance, 2005. **11**(4): p. 387-394.
52. Kehrenberg, C., Catry, B., Haesebrouck F., de Kruif A., Schwarz, S., tet(L)-mediated tetracycline resistance in bovine *Mannheimia* and *Pasteurella* isolates. J Antimicrob Chemother, 2005. **56**(2): p. 403-6.
53. Kehrenberg, C., Schulze-Tanzil, G.Martel JL., Chaslus-Dancla E., Schwarz, S., Antimicrobial resistance in *Pasteurella* and *Mannheimia*: epidemiology and genetic basis. Vet Res, 2001. **32**(3-4): p. 323-39.
54. Kehrenberg, C. and S. Schwarz, Occurrence and linkage of genes coding for resistance to sulfonamides, streptomycin and chloramphenicol in bacteria of the genera *Pasteurella* and *Mannheimia*. FEMS Microbiol Lett, 2001. **205**(2): p. 283-90.
55. Standards, N.C.f.C.L., Approved standard M2-A8 Performance standards for antimicrobial disk susceptibility test. 8 ed. 2003, Wayne P.A. USA: NCCLS.
56. Erlich, H.A., PCR Technology: principles and applications for DNA amplifications. 1989, N.Y., E.U.A.: Stockton Press.
57. Gioia, J., Xiang Qin., Jiang H., Clinkenbreard K., Reggie Lo., Yamei Liu., Foxet GE., The genome sequence of *Mannheimia haemolytica* A1: insights into virulence, natural competence, and Pasteurellaceae phylogeny. J.Bacteriol, 2006. **188**(20): p. 7257-7266.

58. Reggie, Y.C., S. Sathiamoorthy, and P.E. Shewen, Analysis of in vivo expressed genes in *Mannheimia haemolytica* A1. FEMS Microbiol Lett, 2006. **265**: p. 18-25.
59. Sundin, G.W. and C.L. Bender, Expression of the strA-strB streptomycin resistance genes in *Pseudomonas syringae* and *Xanthomonas campestris* and characterization of IS6100 in *X. campestris*. Appl Environ Microbiol, 1995. **61**(8): p. 2891-2897.
60. Sundin, G.W., Distinct Recent Lineages of the strA-strB streptomycin-resistance genes in clinical and environmental bacteria. Current Microbiology, 2002. **45**: p. 63-69.
61. Sundin, G.W., Examination of base pair variants of the strA-strB streptomycin resistance genes from bacterial pathogens of humans, animals and plants. J Antimicrob Chemother, 2000. **46**: p. 848-849.
62. Sunde, M. and M. Norstrom, The genetic background for streptomycin resistance in *Escherichia coli* influences the distribution of MICs. JAC, 2005. **56**: p. 87-90.
63. Stuy, J.H. and R.B. Walter, Cloning, characterization, and DNA base sequence of the high-level streptomycin resistance gene strA1 of *Haemophilus influenzae* Rd. J.Bacteriol, 1992. **174**(17): p. 5604-5608.
64. Han, H.S., et al., Occurrence of the strA-strB streptomycin resistance genes in *Pseudomonas* species isolated from kiwifruit plants. J. Microbiol., 2004. **42**(4): p. 365-368.
65. Peric, M., Bozdogan B., Jacobs MR., Appelbaumet PA., Effects of an efflux mechanism and ribosomal mutations on macrolide susceptibility of *Haemophilus influenzae* clinical isolates. Antimicrob Agents Chemother, 2003. **42**(3): p. 1017-1022.
66. Cloeckert, A., M. Grayon, and O. Grepinet, Identification of *Brucella melitensis* vaccine strain Rev. 1 by PCR-RFLP based on a mutation in the rpsL gene. Vaccine, 2002. **20**: p. 2546-2550.