

Resistencia a antimicrobianos en cepas de *Mannheimia haemolytica* aisladas de exudado nasal de bovinos productores de leche

Antimicrobial resistance in *Mannheimia haemolytica* strains isolated from dairy cattle nasal exudate

María Luisa Samaniego B.* José Luis Contreras J.* Carlos J. Jaramillo-Arango**
Francisco Aguilar-Romero*** Jesús Vázquez Navarrete*** Rigoberto Hernández-Castro†
Francisco Suárez-Güemes F.‡ Francisco Trigo Tavera•

Abstract

Two hundred and one strains of *M. haemolytica* isolated from nasal exudate of dairy cattle were used, 123 strains from clinically healthy (CH) bovines and 78 from clinically ill (CI) bovines affected by pneumonia, obtained from a dairy complex in the Tizayuca region of the state of Hidalgo, Mexico. Strains were previously identified by conventional culture and biochemical tests, and serotyped by indirect haemagglutination. Disk diffusion test was performed to determine antimicrobial resistance to antibiotics, such as: ampicillin, gentamicin, ceftiofur, penicillin, streptomycin, trimethoprim-sulfamethoxazole, tetracycline and erythromycin. Frequencies of higher antimicrobial resistance were: streptomycin (81.6%) and gentamicin (24.4%), all strains were susceptible to ampicillin and penicillin. Because of the high resistant strain frequency (81.6%) of *M. haemolytica* to streptomycin, obtained by Kirby-Bauer test, presence of the *strA* gene, which encodes the enzyme aminoglycoside-3-phosphotransferase that provides resistance to streptomycin, PCR was performed by testing the presence of the *strA* gene. Of the 201 strains tested, 42.7% showed the gene *strA*, 17.4% of which was serotype A1, 1.4% serotype A6 and 23.8% non-typable strains. Of the 78 CI strains and 123 CH strains, 80% and 18.7%, had the gene *strA*, respectively.

Key words: *MANNHEIMIA HAEMOLYTICA*, RESISTANCE, ANTIMICROBIAL, ANTIBIOGRAM, NASAL EXUDATE, CATTLE.

Resumen

Se emplearon 201 cepas de *Mannheimia haemolytica* provenientes de muestras de exudado nasal de bovinos productores de leche, 123 de bovinos clínicamente sanos (CS) y 78 de bovinos enfermos de neumonía (CE), obtenidas de un complejo lechero en la región de Tizayuca, Hidalgo, México, las cuales fueron identificadas previamente mediante pruebas convencionales de cultivo y bioquímicas, y serotipificadas mediante la prueba de hemaglutinación indirecta. Se les realizó la prueba de difusión en placa para determinar la resistencia a diversos antimicrobianos como ampicilina, gentamicina, ceftiofur, penicilina, estreptomina, trimetoprim con sulfametoxazol, tetraciclina y eritromicina. Las frecuencias más altas en la resistencia a antimicrobianos se presentaron a la estreptomina (81.6%) y gentamicina (24.4%), todas las cepas fueron susceptibles a la ampicilina y penicilina. Debido a la alta frecuencia (81.6%) de cepas de *M. haemolytica* resistentes a St con la técnica de Kirby-Bauer, se buscó la presencia del gen *strA*. Se realizó la técnica de PCR para comprobar la presencia del gen *strA* que codifica para la enzima *aminoglycoside-3-phosphotransferase* que proporciona resistencia contra la estreptomina. Del total de cepas estudiadas (n = 201), 42.7% presentaron el gen *strA*, del cual 17.4% pertenecía al serotipo A1, 1.4% al A6 y 23.8% a cepas no tipificables. De las 78 cepas de CE y las 123 de CS, 80.0% y 18.7% respectivamente, presentaron el gen *strA*.

Palabras clave: *MANNHEIMIA HAEMOLYTICA*, RESISTENCIA, ANTIMICROBIANOS, ANTIBIOGRAMA, EXUDADO NASAL, BOVINOS.

Recibido el 24 de marzo de 2011 y aceptado el 30 de septiembre de 2011.

*Departamento de Medicina Preventiva y Salud Pública, Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia, Universidad Nacional Autónoma de México, 04510, México, DF.

**Centro de Enseñanza, Investigación y Extensión en Producción Animal en Altiplano, Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia, Universidad Nacional Autónoma de México, km 8.5, Carretera Tequisquiapan-Ezequiel Montes, Tequisquiapan, Querétaro, México.

***Instituto Nacional de Investigaciones Agrícolas y Pecuarias, CENID-Microbiología, km 15.5, Carretera México-Toluca, 05110, Cuajimalpa, DF. †Dirección de Investigación, Hospital General "Dr. Manuel Gea González", Secretaría de Salud, Av. Calzada de Tlalpan 4800, col. Sector XVI, 14080, México, DF.

‡Departamento de Microbiología e Inmunología, Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia, Universidad Nacional Autónoma de México, 04510, México, DF.

•Departamento de Patología, Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia, Universidad Nacional Autónoma de México, 04510, México, DF. Responsable de correspondencia: Carlos Julio Jaramillo Arango, correo electrónico: jaramillo50@yahoo.com.mx

Introduction

Mannheimia haemolytica is an opportunist pathogen from the upper respiratory tract; it is often isolated from clinically sick bovines with pneumonia as well as from healthy cattle, and forms part of the bovine respiratory complex interacting with other bacteria, viruses and stress factors. The following viruses can be found within the infectious agents: herpes virus type 1, bovine respiratory syncytial virus, parainfluenza-3 virus and bovine viral diarrhoea virus; and the bacteria: *Histophilus somni*, *Mycoplasma bovis*, *Arcanobacterium pyogenes* and *Pasteurella multocida*.^{1,2} *M. haemolytica* is a Gram negative rod, non-motile and slightly hemolytic, has virulence factors such as: adhesins, lipopolysaccharides (LPS), capsule, proteins and outer membrane lipoproteins (OMP), leukotoxin (Lkt), glycoprotease, neuraminidase and several proteases.³⁻⁶

Up to date there are 12 *M. haemolytica* serotypes (A1, A2, A5, A6, A7, A8, A9, A12, A13, A14, A16 and A17), from which A1 and A6 predominate in bovines and cause shipping fever when they are associated with other bacteria, viruses and stress factors aforementioned.⁷⁻⁹ Treatment for the respiratory complex is difficult, since it must be focused on combating different causes of disease; however, antimicrobial therapy is the method that is most frequently used. Also, in the majority of pneumonic cases, an initial treatment is administered before taking and sending samples to the diagnostic laboratory wherefrom the veterinarian is able to know which antibiotic is the most efficacious; administering the wrong treatment will not warranty health recovery, which increases antimicrobial resistance in *M. haemolytica* strains and other microorganisms.^{10,11}

The objective of the present study was to determine the resistance to different chemotherapeutic agents by the agar diffusion method, and once the one with greater resistance was identified, the presence of the responsible gene of such resistance was assessed by PCR technique.

Material and methods

Strains

Two hundred and one *M. haemolytica* strains were used, which were previously identified by conventional culture and biochemical tests, as well as by the micro-method for identification by the API 20E system,* and the serotypes by indirect haemoagglutination. Out of these strains, 55 corresponded to serotype 1; nine to serotype 6; and 137 were not typeable by this sys-

Introducción

Mannheimia haemolytica es un patógeno oportunista del aparato respiratorio alto, se aísla con frecuencia tanto en bovinos clínicamente enfermos de neumonía como en bovinos sanos, y forma parte del complejo respiratorio bovino al interactuar con otras bacterias, virus y factores estresantes. 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; y, las bacterias *Histophilus somni*, *Mycoplasma bovis*, *Arcanobacterium pyogenes* y *Pasteurella multocida*.^{1,2} *M. haemolytica* es un cocobacilo gramnegativo, no móvil, y débilmente hemolítico, posee factores de virulencia tales como: adhesinas, lipopolisacárido (LPS), cápsula, proteínas y lipoproteínas de la membrana externa (OMP), leucotoxina (Lkt), glicoproteasa, neuraminidasa y diversas proteasas.³⁻⁶

Actualmente existen 12 serotipos de *M. haemolytica* (A1, A2, A5, A6, A7, A8, A9, A12, A13, A14, A16 y A17), de los cuales, en bovinos predominan los serotipos A1 y A6, que producen “fiebre de embarque” cuando se asocian con otras bacterias, virus y factores estresantes antes mencionados.⁷⁻⁹ El tratamiento en el complejo respiratorio es difícil, ya que debe ir enfocado a combatir las diferentes causas de la enfermedad; sin embargo, la terapia de antimicrobianos es el método que se utiliza con más frecuencia. Además, en la mayoría de los casos de neumonía se comienza con un tratamiento antes de tomar y enviar muestras a un laboratorio de diagnóstico donde se pueda guiar al médico veterinario acerca de cuál es el antimicrobiano más eficaz, al administrar un tratamiento erróneo no se garantiza la eliminación del patógeno deseado, lo que trae como consecuencia un incremento en la resistencia a antimicrobianos en cepas de *M. haemolytica* y otros microorganismos.^{10,11}

El objetivo del presente trabajo fue determinar la resistencia a diferentes quimioterapéuticos mediante el método de difusión en agar, y una vez identificado el quimioterapéutico con mayor resistencia, determinar la presencia del gen responsable de dicha resistencia mediante la técnica del PCR.

Material y métodos

Cepas

Se emplearon 201 cepas de *M. haemolytica*, las cuales se identificaron previamente mediante pruebas convencionales de cultivo y bioquímicas, así como por el micro-método de identificación API 20E,* y los serotipos

*Biomerieux, Durham, NC, Estados Unidos de América.

tem. The strains were isolated from samples of clinically healthy bovine nasal exudate (n = 78) and from bovines sick with pneumonia (n = 123), in cow sheds of the Complejo Agropecuario Industrial de Tizayuca (CAIT), Tizayuca, Hidalgo.⁹

Assessment of susceptibility to chemotherapeutic agents

The strains were seeded in sheep blood agar and incubated at 37°C for 24 h. Then, one colony was inoculated with 10 ml of brain-heart infusion broth. According to the method described by Kirby-Bauer,^{12,13} growth was supervised each hour by optical density determination, OD₆₀₀ (approximately 10⁸ CFU/ml). Sensidiscs with 10 µg of ampicillin (Am), 10 µg of gentamicin (Gm), 15 µg of erythromycin (E), 10 IU of penicillin (P), 15 µg of streptomycin (St), 1.25 µg and 23.75 µg sulfamethoxazole/trimethoprim (SXT), 30 µg of tetracycline (TE), 30 µg of ceftofur (XNL) were used,* they were placed on the plate's surface and incubated in an inverted position at 37°C for 18-24 h. The interpretation of inhibition halos was reported as resistant (R) or sensitive (S), according to the National Committee for Clinical Laboratory Standards (NCCLS).¹⁴

Chromosomal DNA isolation

M. haemolytica culture was carried out using 10 ml of brain-heart infusion broth and centrifuged at 8 000 g, the bacterial tablet was placed in a 1.5 ml tube. Then, 550 µl lysis solution (5M guanidine of thiocyanate, 0.1 M EDTA, 0.5% Sarkosyl) was added, it was mixed for 10 min and 250 µl of 7.5 M ammonium acetate was added, it was kept in ice for 10 min, 500 µl of chloroform-isoamyl alcohol (25:1; v:v) was added, it was mixed and centrifuged at 6 000 g. The supernatant was precipitated with 0.7 volumes of isopropanol, centrifuged at 6 000 g and the supernatant was discarded. Two hundred µl of ethanol at 100% were added, mixed and centrifuged at 6 000 g for 15 min and decanted; it was left to dry and the DNA tablet was resuspended in 100 µl of sterile water and stored at 4°C until used. For determining DNA quality, an agarose gel at 1% was visualized. For its concentration measurement, a UV light spectrophotometer with absorbance at 260 was used.

Polymerase chain reaction (PCR)

Because streptomycin was the antibiotic to which a great percentage of *M. haemolytica* strains showed resistance (81.6%), PCR was carried out to assess the presence of *strA* gene. Each sample was mixed with: 10

mediante hemaglutinación indirecta. De estas cepas, 55 pertenecían al serotipo 1, 9 al serotipo 6 y 137 no fueron tipificables mediante esta prueba. Las cepas se aislaron de muestras de exudado nasal de bovinos clínicamente sanos (n = 78) y enfermos de neumonía (n = 123), en establos del Complejo Agropecuario Industrial de Tizayuca (CAIT), Tizayuca, Hidalgo.⁹

Determinación de la susceptibilidad a quimioterapéuticos

Las cepas se sembraron en agar sangre de ovino y se incubaron a 37°C por 24 h. Posteriormente, una colonia fue inoculada en 10 ml de caldo infusión cerebro-corazón. De acuerdo con el método descrito por Kirby-Bauer,^{12,13} el crecimiento se supervisó cada hora mediante determinación de densidad óptica OD₆₀₀ (aproximadamente 10⁸ UFC/ml). Se utilizaron sensidiscos de ampicilina (Am) 10 µg, gentamicina (Gm) 10 µg, eritromicina (E) 15 µg, penicilina (P) 10 UI, estreptomicina (St) 15 µg, trimetoprim con sulfametoxazol (SXT) 1.25 µg y 23.75 µg, tetraciclina (TE) 30 µg, ceftofur (XNL) 30 µg,* se colocaron sobre la superficie de la placa y se incubaron en posición invertida a 37°C durante 18-24 h. La interpretación de los halos de inhibición se realizó con los valores de acuerdo al National Committee for Clinical Laboratory Standards (NCCLS) en resistente (R) y sensible (S).¹⁴

Extracción de ADN cromosomal

El cultivo de *M. haemolytica* se realizó en 10 ml de caldo infusión cerebro corazón y se centrifugó a 8000 g, la pastilla bacteriana se colocó en un tubo de 1.5 ml. Posteriormente, se agregaron 550 µl de solución de lisis (tiocianato de guanidina 5 M, EDTA 0.1 M, Sarkosil 0.5%), se mezcló durante 10 min y se adicionaron 250 µl de acetato de amonio 7.5 M, se colocó en hielo por 10 min, se agregaron 500 µl de cloroformo-alcohol isoamílico 25:1 v/v, se mezcló y se centrifugó a 6000 g. El sobrenadante se precipitó con 0.7 de volumen de isopropanol, se centrifugó a 6000 g y se desechó el sobrenadante. Se le adicionaron 200 µl etanol al 100%, se mezcló y se centrifugó a 6000 g durante 15 min y se decantó; se dejó secar, y la pastilla de ADN se resuspendió en 100 µl de agua estéril y se almacenó a 4°C hasta su uso. Para determinar la calidad del ADN, se visualizó en un gel de agarosa al 1%. Para medir su concentración se utilizó un espectrofotómetro de luz UV a una absorbancia de 260.

*Becton, Dickinson, Minnessota, Estados Unidos de América.

µl of PCR Master Mix,* 6.8 µl of H₂O, 0.6 µl of primers *str1* (5'-TGACTGGTTGCCTGTCAGAGG-3') and *str2* (5'-CCAGTTGTCTTCGGCGTTAGC-3') and 2 µl of DNA, which represent 100 ng; conditions for PCR were the following: denaturalization at 94°C for 2 min, followed by 35 cycles, at 94°C for 1 min each, alignment at 56°C for 1 min and for 1 min at 72°C, followed by final extension at 72°C for 7 min. The amplified product, of 646 bp, was visualized on a 1% agarose gel, stained with ethidium bromide.

Statistical analysis

Data obtained was analyzed by descriptive statistic, also using Pearson's chi-squared or Fisher's exact test, according to data characteristics, to evaluate differences between frequencies of sensitive or resistant strains to different antimicrobials. The statistical analysis was carried out by means of the EPI-Info version 3.3.2 program for Windows.**

Results

The strains resistant to chemotherapeutic agents such as: XNL, E, GM, St, SX and TE with variable frequencies were observed; St showed higher frequency (81.6%) followed by GM (24.4%) either in CI or in CH (Table 1).

All strains were sensitive to P and Am. The differences between resistance and sensitive frequencies, between CI and CH, were not significant ($P \geq 0.05$).

Table 2 shows frequency of *M. haemolytica* strains that presented resistance to chemotherapeutic agents according to their serotype. Between NT strains (86.9%) and A1 (74.5%) there is an outstanding difference of *M. haemolytica* strains resistant to St. The differences between resistance and sensitive frequencies (A1, A6 and NT) were significant ($P = 0.001$).

Because of high frequency (81.6%) of St-resistant *M. haemolytica* strains shown by Kirby-Bauer susceptibility testing method, the presence of *strA* gene was looked for. In 42.8% of the 201 study strains, a fragment of approximately 646 bp was able to be amplified (Figure 1).

Table 3 shows that among R strains, the greatest percentage carrying the gene was NT (26.8%), followed by serotype A1 (14%). The majority of sensitive strains that showed the gene (32.4%) were A1. In general, the gene was more frequently observed among NT strains (23.8%), followed by serotype A1 (17.14%). Evaluating the frequencies of A1, A6 and NT strains with presence or absence of the gene, differences were significant ($P \leq 0.05$). However, R strains from sero-

Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR)

Debido a que la estreptomocina fue el antimicrobiano para el cual presentó resistencia un mayor porcentaje (81.6%) de cepas de *M. haemolytica*, se realizó la PCR para determinar la presencia del gen *strA*. Para cada muestra se mezclaron 10 µl de PCR Master Mix,* 6.8 µl de H₂O, 0.6 µl de los iniciadores *str1* (5'-TGA-CTGGTTGCCTGTCAGAGG-3') y *str2* (5'-CCAGTTGTCTTCGGCGTTAGC-3') y 2 µl de ADN, que representan 100 ng; las condiciones de la PCR fueron las siguientes: una desnaturalización a 94°C durante 2 min, seguido de 35 ciclos, de 94°C por 1 min cada uno, alineamiento de 56°C durante 1 min y 1 min a 72°C, seguidos por la extensión final de 72°C durante 7 min. El producto de amplificación, de 646 pb, se visualizó en gel de agarosa al 1% teñido con bromuro de etidio.

Análisis estadístico

Los datos obtenidos se analizaron mediante estadística descriptiva empleando, además, la prueba de Ji 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.**

Resultados

Con la técnica de Kirby-Bauer se observaron cepas con resistencia a quimioterapéuticos como XNL, E, GM, St, SX y TE con frecuencias variables; la St presentó una mayor frecuencia (81.6%) seguida de la GM (24.4%) tanto en los CE como en los CS (Cuadro 1).

Todas las cepas fueron sensibles a la P y la Am. Las diferencias entre las frecuencias de resistentes y sensibles, entre los CE y CS, no fueron significativas ($P \geq 0.05$).

En el Cuadro 2 se muestra la frecuencia de las cepas de *M. haemolytica* que presentaron resistencia a quimioterapéuticos de acuerdo con su serotipo. Destaca una alta frecuencia de cepas de *M. haemolytica* resistentes a St, entre las cepas NT (86.9%) y las A1 (74.5%). Las diferencias entre las frecuencias de resistentes y sensibles (A1, A6 y NT), fueron significativas ($P = 0.001$).

Debido a la alta frecuencia (81.6%) de cepas de *M. haemolytica* resistentes a St con la técnica de Kirby-Bauer, se buscó la presencia del gen *strA*. En un 42.8%

*QIAGEN, Ventura, CA, Estados Unidos de América.

**Centers for Diseases, Control and Prevention (CDC), Atlanta, Estados Unidos de América, 2004.

CUADRO 1

Frecuencia de cepas de *M. Haemolytica* resistentes a diferentes quimioterapéuticos de acuerdo con la condición de salud de los bovinos, en Tizayuca, Hidalgo, México

Frequency of *M. haemolytica* strains resistant to different chemotherapeutic agents according to bovine health condition, in Tizayuca, Hidalgo, Mexico

Health condition	Strains	Antimicrobians					
		XNL	E	GM	St	SXT	TE
		No. (%)	No. (%)	No. (%)	No. (%)	No. (%)	No. (%)
CE	78	1 (1.3)	3 (3.8)	23 (29.5)	61 (78.2)	1 (1.3)	0 (0)
CS	123	0 (0)	13 (10.6)	26 (21.1)	103 (83.7)	0 (0)	1 (0.8)
Total	201	1 (0.5)	16 (8)	49 (24.4)	164 (81.6)	1 (0.5)	1 (0.5)

CI: Clinically ill; CH: Clinically healthy; XNL (ceftofur); E (erythromycin); GM (gentamicin); St (streptomycin); SXT (sulfamethoxazole/trimethoprim); TE (tetracycline).

CUADRO 2

Frecuencia de cepas de *M. Haemolytica* resistentes a diferentes quimioterapéuticos de acuerdo con su serotipo, en Tizayuca, Hidalgo, México

Frequency of *M. Haemolytica* strains resistant to different chemotherapeutic agents according to their serotype, in Tizayuca, Hidalgo, Mexico

Serotype	Strains	Antimicrobians					
		XNL	E	GM	St	SXT	TE
		No. (%)	No. (%)	No. (%)	No. (%)	No. (%)	No. (%)
A1	55	0 (0)	11 (20)	8 (14.5)	41 (74.5)	1 (1.8)	1 (1.8)
A6	9	0 (0)	0 (0)	0 (0)	4 (44.4)	0 (0)	0 (0)
NT	137	1 (0.7)	5 (3.6)	41 (29.9)	119 (86.9)	0 (0)	0 (0)
Total	201	1 (0.5)	16 (8)	49 (24.4)	164 (81.6)	1 (0.5)	1 (0.5)

Serotypes A1, A6 and NT (Non-typeable); XNL (ceftofur); E (erythromycin); GM (gentamicin); St (streptomycin); SXT (sulfamethoxazole/trimethoprim); TE (tetracycline).

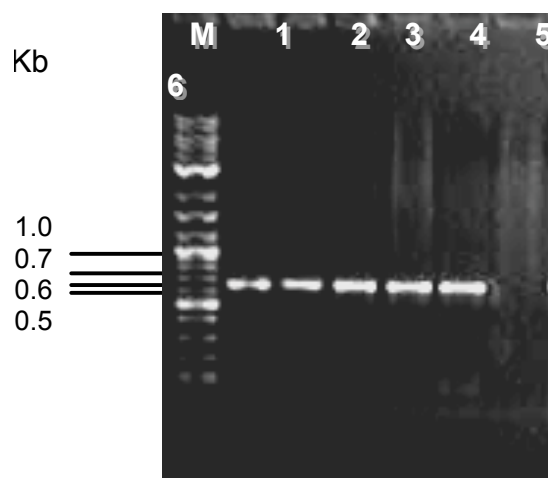


FIGURA 1. Amplificación del gen *strA*; carril M, DNA Ladder 2-Log; carriles 2 a 5 cepas de *Mh*; carril 6, *Salmonella*.

FIGURE 1. *strA* gene amplification; lane M, DNA Ladder 2-Log; lanes 2 to 5 *Mh* strains; lane 6, *Salmonella*.

de las 201 cepas estudiadas, se logró amplificar un fragmento de 646 pb aproximadamente (Figura 1).

El Cuadro 3 muestra que entre las cepas R, el mayor porcentaje con presencia del gen fue NT (26.8%), seguido del serotipo A1 (14%). La mayoría de las cepas sensibles que mostraron el gen (32.4%) eran A1. En general, el gen se presentó más entre las cepas NT (23.8%), seguidas del serotipo A1 (17.4%). Al evaluar las frecuencias de cepas A1, A6 y NT con presencia o ausencia del gen, las diferencias fueron significativas ($P \leq 0.05$). Sin embargo, en las cepas R, de serotipos A1, A6 y NT, con presencia o ausencia del gen, no resultaron significativas.

Entre las cepas R sólo 29.3% procedían de animales CE y 12.8% de los CS presentaron el gen. Entre las cepas susceptibles, 40.6% de las que mostraron el gen eran de CE y apenas 5.4% eran de CS. En general, el gen se presentó con mayor frecuencia entre las cepas de animales CE (31.3%) que entre las de CS (11.4%). Llama la atención que en los animales CE el gen se presentó con mayor frecuencia (40.6%) en las cepas

CUADRO 3

Frecuencia de cepas de *M. Haemolytica* de acuerdo con la presencia o ausencia del gen *strA*, resistencia o sensibilidad con la técnica de Kirby-Bauer, su serotipo y la condición de salud de los bovinos en Tizayuca, Hidalgo, México

Frequency of *M. haemolytica* strains according to *strA* gene presence or absence, resistance or sensitivity by the Kirby-Bauer testing method, serotype and bovine health condition in Tizayuca, Hidalgo, Mexico

Kirby-Bauer method using streptomycin	Number of strains studied	Serotypes						Health condition			
		A1		A6		NT		CI		CH	
		<i>strA</i> gene		<i>strA</i> gene		<i>strA</i> gene		<i>strA</i> gene		<i>strA</i> gene	
		(+)	(-)	(+)	(-)	(+)	(-)	(+)	(-)	(+)	(-)
No. (%)		No. (%)		No. (%)		No. (%)		No. (%)		No. (%)	
R	164	23 (14)	18 (11)	2 (1.2)	2 (1.2)	44 (26.8)	75 (45.8)	48 (29.3)	13 (7.9)	21 (12.8)	82 (50)
S	37	12 (32.4)	2 (5.4)	1 (2.7)	4 (10.8)	4 (10.8)	14 (37.9)	15 (40.6)	2 (5.4)	2 (5.4)	18 (48.6)
TOTAL	201	35 (17.4)	21 (10.3)	3 (1.4)	6 (2.9)	48 (23.8)	89 (44.2)	63 (31.3)	15 (7.5)	23 (11.4)	100 (49.8)

CI (Samples from clinically sick animals with pneumonia); CH (Samples from healthy animals); R (resistant); S (sensitive); serotypes A1, A6 and NT (non-typeable).

types A1, A6 and NT, with presence or absence of the gene, were not significant.

Among R strains, only 29.3% came from CI animals and 12.8% CH showed the gene. Among susceptible strains, 40.6% that showed the gene came from CI and as little as 5.4% came from CH. In general, the gene was more frequently present among strains of CI animals (31.3%) than among CH (11.4%). It is worth mentioning that in CI animals the gene was most frequently found (40.6%) in sensitive strains. The differences between frequencies of gene presence or absence, CI and CH strains, and R and S, were significant ($P \leq 0.05$).

Table 4 shows higher frequency of *M. haemolytica* strains carrying the *strA* gene in those coming from CI animals (80.8%), and from these, 55.1% corresponded to NT; the highest frequency was shown in serotype A1 (13.82%) of strains coming from CH animals. The differences between gene presence and absence in strains from CH and CI animals were significant ($P \leq 0.05$). In A1, A6 and NT strains, with gene presence or absence, the frequency differences resulted significant only when they came from CH animals ($P \leq 0.05$); they were not significant between frequencies from CI ($P \geq 0.05$).

Discussion

Studies on antimicrobial resistance in *M. haemolytica* strains have been done in some countries, using plate diffusion and dilution methods. In Mexico, Salas *et al.*¹⁵ found that 100% of this pathogen isolates, obtained from pneumonic lungs of calves, were resistant to P and Am. This finding contrasts with the results of the

sensibles. Al evaluar las diferencias entre las frecuencias de la presencia o ausencia del gen, entre las cepas de CE y CS, y entre R y S, resultaron significativas ($P \leq 0.05$).

En el Cuadro 4 se observa una mayor frecuencia de cepas de *M. haemolytica* con el gen *strA* en aquellas provenientes de animales CE (80.8%), y de éstas, 55.1% correspondían a NT; de las cepas provenientes de animales CS, la mayor frecuencia se presentó en el serotipo A1 (13.82%). Las diferencias entre la presencia o ausencia del gen en las cepas de animales CS y CE, fueron significativas ($P \leq 0.05$). En las cepas A1, A6 y NT, con presencia o ausencia del gen, resultaron significativas las diferencias de frecuencias sólo cuando provenían de animales CS ($P \leq 0.05$); no fueron significativas entre las frecuencias de los CE ($P \geq 0.05$).

Discusión

En algunos países se han realizado estudios sobre la resistencia antimicrobiana en cepas de *M. haemolytica*, utilizando técnicas de difusión en placa y dilución. En México, Salas *et al.*¹⁵ encontraron que el 100% de los aislamientos de este patógeno, obtenidos de pulmones neumónicos de becerros, fueron resistentes a la P y la Am, lo cual contrasta con los resultados de este estudio, en el cual, el 100% de los aislamientos fueron sensibles a dichos quimioterapéuticos; posiblemente la renovación del pie de cría que se dio en los últimos años en el CAIT, aunado a la reducción de la P, y particularmente de la Am, en la terapia de la manheimiosis,* generaran una disminución tan dramática en los porcentajes de resistencia que nosotros obser-

*Comunicación personal: MVZ. Rafael Soto Castor, 2011.

CUADRO 4

Frecuencia de cepas de *M. Haemolytica* con presencia del gen *strA* de acuerdo con su serotipo y la condición de salud de los bovinos en Tizayuca, Hidalgo, México

Frequency of *M. haemolytica* strains with *strA* gene presence or absence according to their serotype and bovine health condition in Tizayuca, Hidalgo, Mexico

Health condition	No. of strains	Serotype			Total
		A1	A6	NT	
		No. (%)	No. (%)	No. (%)	
CE	78	18 (23.1)	2 (2.6)	43 (55.1)	63 (80.8)
CS	123	17 (13.82)	1 (0.8)	5 (4.06)	23 (18.7)
Total	201	35 (17.41)	3 (1.49)	48 (23.88)	86 (42.8)

CI (Samples from clinically ill animals with pneumonia); CH (Samples from healthy animals) and serotypes A1, A6, and NT (non-typeable).

present study, where 100% of the isolates were sensitive to such chemotherapeutic agents; probably, the breeding stock renovation that took place at CAIT during the last years, along with P reduction, and mainly to Am, administered for manheimiosis therapy,* will generate a dramatic reduction in rates observed here. Likewise, Pijoan and Aguilar Romero¹⁰ reported a high frequency (greater than 80%) of resistance to St, which coincides with the findings of this work.

Several studies have demonstrated that *M. haemolytica* serotype A1 is more frequently isolated from pasteurellosis cases; however, it is worth mentioning that the strains that showed the highest frequency (86.9%) of resistance to St were NT.^{16,17}

Plasmids play an important role in the genetic structure of *M. haemolytica* antimicrobial resistance; now then, if the existence of plasmids is not a characteristic phenomenon of all *Mannheimia* species, in *M. haemolytica* it has been demonstrated the existence of resistance plasmids to chemotherapeutic agents.³ Resistance genes to some antimicrobials have been found, such as: kanamycin, tetracyclines, β -lactams or aminoglycosides in plasmids that vary from 4.2 to 16.7 kb. Among the genes most frequently found in *M. haemolytica* are: the one resistant to sulfonamides (*suII*) and the one resistant to streptomycin (*strA*); the latter has been found in plasmids and in chromosome.^{3,18}

In the present study, 42.8% of the strains showed the *strA* gene, of which 17 (19.8%) *M. haemolytica* strains were shown by Kirby-Bauer susceptibility testing to be sensitive to streptomycin; it is possible that such phenomenon could be associated with gene expression, that is, that two factors are required so the strains can express *strA* gene, as reported by Lo *et al.*,¹⁹ who affirm that *in vivo* growth factors are necessary, as the infection process, for expression of their genes.

The 57.9% of *M. haemolytica* strains that resulted resistant to St by plate diffusion testing, did not show

vamos. De manera similar, Pijoan y Aguilar Romero,¹⁰ informaron una frecuencia alta (mayor al 80%) en resistencia a St, lo cual coincide con lo encontrado en este estudio.

Varios estudios han demostrado que el serotipo A1 de *M. haemolytica* es el más frecuente en los aislamientos en los casos de pasteurellosis; sin embargo, cabe destacar que las cepas que presentaron la mayor frecuencia (86.9%) en la resistencia a St fueron NT.^{16,17}

En la estructura genética de resistencia antimicrobiana de *M. haemolytica* los plásmidos desempeñan un papel primordial; si bien la existencia de plásmidos no es un fenómeno característico de todas las especies de *Mannheimia*, en *M. haemolytica* se ha demostrado la existencia de plásmidos de resistencia a quimioterapéuticos.³ Se han encontrado genes resistentes a algunos antimicrobianos como kanamicina, tetraciclinas, β -lactámicos o aminoglicósidos en plásmidos que varían de 4.2 a 16.7 kb. Entre los genes más frecuentes en Mh se encuentran el de resistencia a sulfonamidas (*suII*) y el de resistencia a estreptomycin (*strA*); este último se ha encontrado tanto en plásmidos como en el cromosoma.^{3,18}

En el presente trabajo, 42.8% de las cepas presentaron el gen *strA*, de las cuales, 17 (19.8%) cepas de *M. haemolytica* fueron sensibles a la estreptomycin en la prueba de Kirby-Bauer; es posible que dicho fenómeno pudiera relacionarse con la expresión del gen, es decir, que se requieren otros factores para que las cepas puedan expresar el gen *strA*, como lo mencionan Lo *et al.*,¹⁹ quienes afirman que se requiere de factores de crecimiento *in vivo*, como el proceso de infección, para llevar a cabo la expresión de sus genes.

El 57.9% de las cepas de *M. haemolytica* que resultaron resistentes a la St en la prueba de difusión en placa no presentaron el gen *strA* bajo las condiciones en las que se probaron, lo que sugiere que *M. haemolytica* podría tener otros mecanismos para desarrollar resis-

the *strA* gene under testing conditions, which suggests that *M. haemolytica* could have other mechanisms for developing resistance to St; in fact, not all plasmids found in *M. haemolytica* are associated with antimicrobial resistance; paradoxically, resistance was found in absence of plasmids and some of them were correlated with leukotoxin or other virulence factors.³ It has also been reported that *M. haemolytica* has a plasmid called pYFC1, which contains a group of genes conferring resistance to different antibiotics; however, *strB* gene, which also confers resistance to St, is not functional; it is possible that such strains do not contain the plasmid, but that they do contain functional *strB* gene in their chromosomal DNA, which encodes the aminoglycoside-6-phosphotransferase enzyme.²⁰

Gioia *et al.*²¹ report that *M. haemolytica* carries genes called *AcrAB* and *AcrR*, which encode efflux pumps, which confer mechanisms to pump the chemotherapeutic agents from the inside to the outside, also possible multidrug-resistance transporters (MarC), which would favour the resistance of this pathogen to chemotherapeutic agents, besides the *strA* gene.

It was very important to observe that 80.8% of strains from CI showed the gene and only 18.7% of strains from CH showed it, of which 13.8% corresponded to serotype A1, suggesting that the presence of *strA* gene is associated with the disease of the animals, and once they get sick it does not depend on the serotype. This is probable due to the transference of plasmid DNA conjugative, where the donor bacterium, by cellular contact, transfers the resistance genes to one not carrying them, in animals already ill.^{22,23} Additionally, it must be considered that such gene is found either on plasmids or chromosome of *M. haemolytica*,^{3,18} which, joined to selection pressure caused by resistance originated by inadequate use of chemotherapeutic agents, a multiple resistance can be derived, this transmissible resistance mediated by plasmids can propitiate intraspecies, interspecies or intergenus horizontal resistance.

Likewise, it must be taken into consideration that *M. haemolytica* is a normal habitant of the bovine upper respiratory tract^{1,2} and the improper use of chemotherapeutic agents in prophylaxis, metaphylaxis or as growth promoters, have caused that in the case of such bacterium, resistance has been developed in a large number of antibiotics. Now, within a biological system, not all calves respond to an antimicrobial treatment administered at the right time and for an adequate period of time; however, within this biological system there will always be extreme cases and within a calf population there may be a percentage that do not respond to treatment, because of a poor immune system function.^{24,25}

According to the results obtained in this study, it can be concluded that despite the majority of the

tencia a la St; de hecho, no todos los plásmidos que se han encontrado en *M. haemolytica* están asociados con resistencia a antimicrobianos; paradójicamente se encontró resistencia en ausencia de plásmidos y algunos de ellos fueron correlacionados con la leucotoxina u otros factores de virulencia.³ También se ha informado que *M. haemolytica* posee un plásmido denominado pYFC1, el cual contiene un grupo de genes que le proporcionan resistencia a diferentes antibióticos; sin embargo, el gen *strB*, que de igual manera le otorga resistencia contra la St, no es funcional; es posible que dichas cepas no posean el plásmido, pero que sí posean el gen *strB* funcional en su ADN cromosómico, que codifica a la enzima aminoglycoside-6-phosphotransferase.²⁰

Gioia *et al.*,²¹ mencionan que *M. haemolytica* posee genes denominados *AcrAB* y *AcrR*, que codifican para bombas de eflujo, las cuales le confieren un mecanismo de bombeo del interior al exterior de los quimioterapéuticos, además de una posible familia de transportadores de multirresistencia a antibióticos (MarC), lo cual favorecería la resistencia de este patógeno a los quimioterapéuticos, además del gen *strA*.

Fue relevante observar que 80.8% de las cepas de los CE presentaron el gen y en las cepas de los CS sólo 18.7% lo presentaron, de los cuales 13.8% correspondía al serotipo A1, lo cual sugiere que la presencia del gen *strA* está asociada con la enfermedad de los animales, y una vez enfermos no depende del serotipo. Probablemente ello suceda por la transferencia de ADN plasmídico mediante conjugación, donde la bacteria donante, por contacto celular, transfiere los genes de resistencia a aquélla que no los posee, una vez que los animales se encuentran enfermos.^{22,23} Adicionalmente, hay que tener en cuenta que dicho gen se encuentra tanto en plásmidos como en el cromosoma de *M. hemolítica*,^{3,18} lo cual, aunado a la presión de selección causada por la resistencia originada por el uso inadecuado de quimioterapéuticos, puede derivar en una resistencia múltiple, esta resistencia transmissible mediada por plásmidos puede propiciar la resistencia horizontal intraespecies, interespecies o intergénero.

Asimismo, hay que considerar que *M. haemolytica* es un habitante normal del aparato respiratorio alto del bovino^{1,2} y que el empleo indebido de los quimioterapéuticos en prácticas de profilaxis, metafilaxis o como promotores del crecimiento, han propiciado que en el caso de dicha bacteria se haya desarrollado resistencia a un gran número de antimicrobianos. Ahora bien, dentro de un sistema biológico, no todas las becerras responden de manera similar a la misma terapia, lo típico es que la mayoría de las becerras respondan bien ante un tratamiento antimicrobiano que se administre de manera oportuna y por un periodo adecuado; sin embargo, dentro de ese sistema biológico siempre ha-

strains isolated at CAIT were resistant to St, the presence of *strA* gene was only confirmed in some of them; likewise, all were sensitive to P and Am. Because of the aforementioned, it is necessary to carry out studies to identify the mechanism by which the strains that did not show *strA* gene were resistant to St.

Acknowledgements

This study was financially supported by CONACyT (Project G38590-B). Special thanks to cattlemen and the Coordinación de Servicios Médicos Veterinarios de la Cuenca Lechera de Tizayuca, Hidalgo, as well as to CENID-Microbiología of the INIFAP and the Departamento de Microbiología e Inmunología of the Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia of the UNAM, for their support and considerations granted to conduct this work.

Referencias

1. CUSACK PM, MCMENIMAN N, LEAN IJ. The medicine and epidemiology of bovine respiratory disease in feedlots. *Aust Vet J* 2003; 81: 480-7.
2. WEEKLEY LB, VEIT HP, EYRE P. Bovine pneumonic pasteurellosis part I. Pathophysiology. *Compendium* 1998; 17: 33-46.
3. HIGHLANDER SK. Molecular genetic analysis of virulence in *Mannheimia (Pasteurella) haemolytica*. *Front Biosci* 2001; 6: 1128-1150.
4. LO RY. Genetic analysis of virulence factors of *Mannheimia (Pasteurella) haemolytica* A1. *Vet Microbiol* 2001; 83: 23-35.
5. JEYASEELAN S, SREVATSAN S, MAHESWARAN SK. Role of *Mannheimia haemolytica* leukotoxin in the pathogenesis of bovine pneumonic pasteurellosis. *Anim Health Res Rev* 2002; 3: 69-82.
6. ZECCHINON L, FETT T, DESMECHT D. How *Mannheimia haemolytica* defeat host defense through a kiss of death mechanism. *Vet Res* 2005; 36: 133-156.
7. AL-GHAMDI GM, AMES TR, BAKER JC, WALKER R, CHASE CC, FRANK GH *et al*. Serotyping of *Mannheimia (Pasteurella) haemolytica* isolates from the upper Midwest United States. *J Vet Diagn Invest* 2000; 12: 576-578.
8. DAVIS RL, WHITTAM TS, SELANDER RK. Sequence diversity and molecular evolution of the leukotoxin (*lktA*) gene in bovine and ovine strains of *Mannheimia (Pasteurella) haemolytica*. *J Bacteriol* 2001; 183: 1394-1404.
9. JARAMILLO-ARANGO CJ, HERNANDEZ-CASTRO R, SUAREZ-GÜEMES F, MARTINEZ-MAYA JJ, AGUILAR-ROMERO F, JARAMILLO-MEZA L *et al*. Characterization of *Mannheimia spp* strains isolated from bovine nasal exudate and factors associated to isolates, in dairy farms in the Central Valley of Mexico. *Res Vet Sci* 2008; 84: 7-13.
10. PIJOAN AP, AGUILAR-ROMERO F. Resistencia y sensibilidad a antimicrobianos en cepas de *Pasteurella*

brán casos extremos y dentro de una población de becerras puede haber un porcentaje que no responden bien al tratamiento debido a un pobre funcionamiento de su sistema inmune.^{24,25}

De acuerdo con los resultados obtenidos en el presente trabajo se puede concluir que no obstante que la mayoría de las cepas aisladas en el CAIT fueron resistentes a la St, sólo en una parte de ellas se confirmó la presencia del gen *strA*; de igual manera, todas fueron sensibles a la P y la Am. Por lo anterior, es necesario realizar estudios para identificar el mecanismo por el cual las cepas que no presentaron el gen *strA* fueron resistentes a la St.

Agradecimientos

Este estudio fue financiado por el CONACyT (Proyecto G38590-B). Se agradece a los ganaderos y a la Coordinación de Servicios Médicos Veterinarios de la Cuenca Lechera de Tizayuca, Hidalgo, así como al CENID-Microbiología del INIFAP y al Departamento de Microbiología e Inmunología de la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia de la UNAM, por el apoyo y las facilidades otorgadas para la realización de este trabajo.

haemolytica, *P. multocida* y *Haemophilus somnus*, aisladas de becerras lecheras en establos de Tijuana. *Vet Méx* 2000; 2: 153-156.

11. WATTS JL, SELBY LA, WEBBER JJ, HOFFMAN LJ, KINTNER LD, NELSON SL *et al*. A 4-year survey of antimicrobial susceptibility trends for isolates from cattle with bovine respiratory disease in North America. *J Clin Microbiol* 1994; 32: 725-731.
12. BAUER AW, KIRBY WM, SHERRIS JC, TURCK M. Antibiotic susceptibility testing by a standardized single disc method. *Am J Clin Pathol* 1966; 45: 493-496.
13. BAUER AW, ROBERTS CE, KIRBY WM. Single disc *versus* multiple disc and plate dilution techniques for antibiotic sensitivity testing. *Antibiot Annu* 1959-1960 7: 574-580.
14. NATIONAL COMMITTEE FOR CLINICAL LABORATORY STANDARDS. Performance standards for antimicrobial disk susceptibility tests. Approved standard M2-A6. Wayne, Pa: National Committee for Clinical Laboratory Standards, 1997.
15. SALAS TÉLLEZ E, AGUILAR ROMERO F, TRIGO TAVERA FJ, JARAMILLO MEZA L. Sensibilidad de aislamientos de *Pasteurella haemolytica* y *Pasteurella multocida* aisladas de bovinos y ovinos a varios agentes antimicrobianos. *Téc Pec Méx* 1987; 25: 243-249.
16. PIJOAN AP, AGUILAR RF, MORALES AF. Caracterización de los procesos neumónicos en becerros lecheros de la región de Tijuana, Baja California, México. *Vet Méx* 1999; 30: 149-155.
17. BLANCOVFJ, 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: 121-126.
18. KEHRENBERG C, SCHULZE-TANZIL G, MARTEL J-L, CHASLUS-DANCLA E, SCHWARZ S. Antimicrobial resistance in *Pasteurella* and *Mannheimia*: epidemiology and genetic basis. *Vet Res* 2001; 32: 323-339.
 19. LO RY, SATHIAMOORTHY S, SHEWEN PE. Analysis *in vivo* expressed genes in *Mannheimia haemolytica* A1. *FEMS Microbiol Lett* 2006; 265: 18-25.
 20. KEHRENBERG C, SCHWARZ S. Occurrence and linkage of genes coding for resistance to sulfonamides, streptomycin and cloramphenicol in bacteria of genera *Pasteurella* and *Mannheimia*. *FEMS Microbiol Lett* 2001; 205: 283-290.
 21. GIOIA J, XIANG Q, JIANG H, CLINKENBREARD K, LO R, YAMEI L. The genome sequence of *Mannheimia haemolytica* A1: insights into virulence, natural competence, and Pasteurellaceae phylogeny. *J Bacteriol* 2006; 188: 7257-7266.
 22. POTTS NR, HABIBI S, CHANG Y, LUJAN SA, MR REDINBO. The mechanism and control of DNA transfer by the conjugative relaxase of resistance plasmid pCU1. *Nucleic Acids Res* 2010; 1-15.
 23. FONDI M, R FANI. The horizontal flow of the plasmid resistome: clues from inter-generic similarity networks. *Environ Microbiol* 2010; 12: 3228-3242.
 24. SWEIGER SH, NICHOLS MD. Control methods for bovine respiratory disease in stocker cattle. *Vet Clin North Am Food Anim Pract* 2010; 26: 261-271.
 25. GRIFFIN D, CHENGAPPA MM, KSZAK J, McVEY DS. Bacterial pathogens of the bovine respiratory disease complex. *Vet Clin North Am Food Anim Pract* 2010; 26: 381-394.