

**SENSIBILIDAD DE ALIMENTOS DE *Pasteurella haemolytica* Y *Pasteurella multocida* AISLADAS DE BOVINOS Y OVINOS A VARIOS AGENTES ANTIMICROBIANOS**

ENRIQUE SALAS TELLEZ <sup>1</sup>

FRANCISCO AGUILAR ROMERO <sup>1</sup>

FRANCISCO J. TRIGO TAVERA <sup>2</sup>

LAURA JARAMILLO MEZA <sup>1</sup>

Las enfermedades respiratorias en los rumiantes pueden ser ocasionadas por diversos gérmenes patógenos, entre los que destacan ***Pasteurella haemolytica*** y ***Pasteurella multocida*** por su importancia en las condiciones neumónicas de bovinos y ovinos (Wrey and Morrison, 1983). Estos microorganismos han sido aislados con frecuencia del aparato respiratorio de animales neumónicos y en ocasiones de tejidos no neumónicos (Allan y col., 1985).

El control de la pasteurelisis depende en gran parte del uso de agentes antimicrobianos (Fales y col., 1982; Zimmerman and Hirsh, 1980), debido a lo ineficaz que ha resultado la vacunación (Pancieria y col., 1984). Sin embargo, se ha informado del aislamiento de cepas de ***Pasteurella*** que son resistentes a uno o más antibióticos (Chang and Carter, 1976). Asimismo, en la actualidad se ha demostrado que la resistencia múltiple de ***P. haemolytica*** y ***P. multocida*** está mediada por plásmidos (Berman and Hirsh, 1978; Zimmerman and Hirsh, 1980).

1 Proyecto Enfermedades Bacterianas de los Rumiantes. Centro Nacional de Investigaciones en Medicina Veterinaria, Sector Pecuario, INIFAP-SARH, Km. 15.5 Carr. México-Toluca, México, D.F., C.P. 05110.

2 Departamento de Patología, FMVZ-UNAM. Ciudad Universitaria.

Con base en estas observaciones el propósito del presente estudio fue determinar los patrones de susceptibilidad antimicrobiana y concentración mínima inhibitoria de diversos aislamientos de ***P. haemolytica*** y ***P. multocida***.

Se trabajó con un total de 57 aislamientos de ***P. haemolytica***, de los cuales 38 procedían de exudados nasales de ovinos, 19 de pulmones neumónicos de becerros; y 13 aislamientos de ***P. multocida*** de pulmones neumónicos de becerros.

Para determinar la susceptibilidad de estos aislamientos a varios agentes antimicrobianos se realizaron antibiogramas (ABG), después se determinó la Concentración Mínima Inhibitoria (CMI) por la técnica de microdilución en caldo.

Antibiogramas (ABG). Se utilizaron multidiscos comerciales\* que contaban con los siguientes antibióticos: ácido nalidíxico, ampicilina, cefalosporina, cloramfenicol, eritromicina, furadantina, gentamicina, cefotaxima, colimicina, penicilina, sulfametoxazol-trimetoprim y tetraciclina.

Preparación del inóculo: Se tomaron cuatro o cinco colonias de cada uno de los aislamientos a probar, para ser ino-

\* Productos BIOCLIN, S.A.

culados en tubos que contenían 5 ml de caldo de soya tripticaseína\*\*, estos fueron incubados durante 4 h a 37°C en baño María hasta alcanzar una turbidez comparativa con el estándar 0.5 de McFarland. Con un hisopo estéril impregnado de la suspensión bacteriana, se estrió en tres direcciones la caja de Petri de 150 mm de diámetro con agar Mueller-Hinton\*\* con un espesor de 4 mm. Las placas se dejaron secar 5 min a temperatura ambiente para después colocar los multidiscos e incubarse 18 h a 37°C. Las zonas de inhibición fueron medidas e interpretadas de acuerdo a los patrones de Barry y Thornsberry (1980).

Concentración Mínima Inhibitoria (CMI). Se determinó la CMI de las cepas de *P. haemolytica* y *P. multocida* para los siguientes agentes antimicrobianos: ácido nalidíxico, carbenicilina, cloramfenicol, dicloxacilina, eritromicina y gentamicina; se emplearon los solventes y diluyentes recomendados (United States Pharmacopeia XX, 1980; Anhalt and Washington II, 1980).

La preparación del inóculo fue idéntica a la realizada en los antibiogramas; sin embargo, una vez alcanzada la turbidez deseada se efectuó una dilución 1:20 con caldo de soya tripticaseína con lo que quedó una concentración bacteriana de  $2 \times 10^5$  UFC. Se emplearon microplacas de 96 pozos con fondo en "U", en ellas se colocó una solución del antibiótico a probar con cada uno de los aislamientos de *P. haemolytica* y *P. multocida*. Se utilizó una concentración de 123 µg/ml, de esta solución se colocaron 100 µl en los primeros pozos horizontales, en los pozos restantes se colocaron 50 µl del diluyente apropiado; después se efectuaron diluciones dobles del antibiótico hasta una concentración de 0.064 µg/ml. Por último se colocaron en cada pzo 50 µl del inóculo, de esta manera se trabajó con concentraciones antimicrobianas de 64

\*\* BIOXON DE MEXICO, S.A.

a 0.032 µg/ml y con una concentración bacteriana de  $1 \times 10^5$  UFC. Las microplacas se incubaron por 18 h a 37°C en medio húmedo para leerse e interpretarse según las recomendaciones de Gavan y Barry (1980).

Antibiogramas (ABG). Los resultados de resistencia, mediana sensibilidad y sensibilidad se muestran en el Cuadro 1. Los aislamientos de *P. haemolytica* obtenidos de bovinos mostraron resistencia a cefalosporina (42.1%), tetraciclina (47.3%), eritromicina (31.5%); y menor del 27% para cefotaxima, ácido nalidíxico, furadantina, gentamicina, colimicina y sulfametoxazol-trimetoprim. En las cepas de *P. haemolytica* de ovino la resistencia fue de 31.5% a cefalosporina, 39.4% a eritromicina, y menores a 16% los antimicrobianos restantes. *P. multocida* mostró resistencia del 61.5% a colimicina, 23.0% a eritromicina, 15.3% a cloramfenicol y tetraciclina, y 7.6% a cefatoxima, cefalosporina y furadantina; existió una completa susceptibilidad al ácido nalidíxico, gentamicina y sulfametoxazol-trimetoprim.

En su totalidad los aislamientos de *P. haemolytica* y *P. multocida* mostraron un 100% de resistencia a la penicilina y ampicilina.

Concentración Mínima Inhibitoria (CMI). Las concentraciones requeridas para inhibir el desarrollo del 50, 75 y 90% del número total de aislamientos probados se muestran en el Cuadro 2 así como la actividad comparativa hacia los seis agentes antimicrobianos. El 90% de los aislamientos de *P. haemolytica* de ovino fueron inhibidas con las concentraciones siguientes: gentamicina (4 µg/ml), carbenicilina y dicloxacilina (16 µg/ml), eritromicina (32 µg/ml) y ácido nalidíxico y cloramfenicol (64 µg/ml). Para *P. haemolytica* de bovinos el 90% de las cepas fueron inhibidas con gentamicina (18 µg/ml), carbenicilina (32 µg/ml) y ácido nalidí-

C U A D R O 1

PORCENTAJES DE SENSIBILIDAD; MEDIANA SENSIBILIDAD Y RESISTENCIA A DIVERSOS AGENTES ANTIMICROBIANOS EN AISLAMIENTOS DE Pasteurella haemolytica y Pasteurella multocida MEDIANTE LA PRUEBA DE ANTIBIOGRAMA

|                        | Cepas        | n  | AGENTES ANTIMICROBIANOS, % |      |     |      |      |      |       |      |      |     |      |      |
|------------------------|--------------|----|----------------------------|------|-----|------|------|------|-------|------|------|-----|------|------|
|                        |              |    | CT                         | NX   | AP  | CP   | CF   | ET   | FD    | GT   | CM   | PN  | ST   | TC   |
| RESISTENTES            | Ph de bovino | 19 | 26.3                       | 21.0 | 100 | 42.1 | 0    | 31.5 | 10.5  | 10.5 | 26.3 | 100 | 21.0 | 47.3 |
|                        | Ph de ovino  | 38 | 15.7                       | 7.89 | 100 | 15.7 | 2.63 | 39.4 | 10.52 | 2.63 | 5.26 | 100 | 13.1 | 13.1 |
|                        | Pm de bovino | 13 | 7.6                        | 0    | 100 | 7.6  | 15.3 | 23.0 | 7.6   | 0    | 61.5 | 100 | 0    | 15.3 |
| MEDIANAMENTE SENSIBLES | Ph de bovino | 19 | 10.5                       | 15.7 | 0   | 26.3 | 5.2  | 52.6 | 5.2   | 0    | 0    | 0   | 5.26 | 21.0 |
|                        | Ph de ovino  | 38 | 10.5                       | 13.1 | 0   | 7.89 | 0    | 39.4 | 2.6   | 5.2  | 18.4 | 0   | 7.8  | 18.4 |
|                        | Pm de bovino | 13 | 46.1                       | 23.0 | 0   | 30.7 | 0    | 69.2 | 0     | 7.6  | 7.6  | 0   | 30.7 | 15.3 |
| SENSIBLES              | Ph de bovino | 19 | 63.1                       | 63.1 | 0   | 31.5 | 94.7 | 15.7 | 84.2  | 89.4 | 73.6 | 0   | 73.6 | 31.5 |
|                        | Ph de ovino  | 38 | 73.6                       | 78.9 | 0   | 76.3 | 97.3 | 21.0 | 86.8  | 92.1 | 76.3 | 0   | 78.9 | 68.4 |
|                        | Pm de bovino | 13 | 46.1                       | 76.9 | 0   | 61.5 | 84.6 | 7.6  | 92.3  | 92.3 | 30.7 | 0   | 69.2 | 69.2 |

CT: cefotaxima (30 mg), NX: ácido nalidíxico (30 mcg), AP: ampicilina (10 mcg), CP: cefalosporina (30 mcg), CF: cloranfenicol (30 mcg), ET: eritromicina (15 mcg), FD: furandantina (300 mcg), GT: gentamicina (10 mcg), CM: colimicina (10 mcg), PN: penicilina (10 U), ST: sulfametoxazol-trimetoprim (25 mcg), TC: tetraciclina (30 mcg).

Ph: Pasteurella haemolytica

Pm: Pasteurella multocida

C U A D R O 2

| ACTIVIDAD COMPARATIVA DE AGENTES. ANTIMICROBIANOS SOBRE<br><u>Pasteurella haemolytica</u> Y <u>Pasteurella multocida</u> |                                |                   |                   |                   |        |
|--|--------------------------------|-------------------|-------------------|-------------------|--------|
| ANTIMICROBIANO   | ACTIVIDAD ( $\mu\text{g/ml}$ ) |                   |                   |                   | ORIGEN |
|  | RANGO CMI                      | CMI <sub>50</sub> | CMI <sub>75</sub> | CMI <sub>90</sub> |        |
| Ac. Nalidíxico   | 0.0312 - 64                    | 8                 | 32                | 64                | Pho    |
|  | 0.0312 - 64                    | 4                 | 16                | 64                | Phb    |
|  | 0.0312 - 64                    | 8                 | 32                | 64                | Pmb    |
| Carbenicilina  | 0.0312 - 64                    | 1                 | 4                 | 16                | Pho    |
|  | 0.0312 - 64                    | 4                 | 16                | 32                | Phb    |
|  | 0.0312 - 64                    | 4                 | 16                | 32                | Pmb    |
| Clorafenicol   | 0.0312 - 64                    | 1                 | 32                | 64                | Pho    |
|  | 0.0312 - 64                    | 8                 | 64                | 64                | Phb    |
|  | 0.0312 - 64                    | 32                | 64                | 64                | Pmb    |
| Dicloxacilina  | 0.0312 - 16                    | 4                 | 8                 | 16                | Pho    |
|  | 0.0312 - 64                    | 4                 | 16                | 64                | Phb    |
|  | 1 - 64                         | 8                 | 64                | 64                | Pmb    |
| Eritromicina   | 0.0312 - 64                    | 1                 | 8                 | 32                | Pho    |
|  | 0.0312 - 64                    | 1                 | 16                | 64                | Phb    |
|  | 0.0312 - 64                    | 8                 | 32                | 64                | Pmb    |
| Gentamicina  | 0.0625 - 32                    | 2                 | 2                 | 4                 | Pho    |
|  | 0.0312 - 8                     | 1                 | 4                 | 8                 | Phb    |
|  | 0.0312 - 8                     | 2                 | 4                 | 4                 | Pmb    |

CMI: Concentración Mínima Inhibitoria.

Pho: Pasteurella haemolytica de ovino.

Phb: Pasteurella haemolytica de bovino.

Pmb: Pasteurella multocida de bovino.

xico, cloramfenicol y dicloxalina y eritromicina (64  $\mu\text{g/ml}$ ). Por último, el 90% de los aislamientos de **P. multocida** fueron inhibidas a la concentración de: gentamicina (14  $\mu\text{g/ml}$ ), carbenicilina (32  $\mu\text{g/ml}$ ) y ácido nalidíxico, cloramfenicol, dicloxacilina y eritromicina a 64  $\mu\text{g/ml}$ .

Al tomar como base los patrones de Barry y Thornsberry (1980), se determinó el porcentaje de cepas resistentes (Cuadro 3), existió un menor grado de resistencia hacia la gentamicina, en donde en la mayoría de los casos no se

sobrepasó el 50% de resistencia; sólo fue mayor en los casos de **P. haemolytica** (53%) hacia la dicloxacilina y **P. multocida** (67, 72 y 84%) hacia la eritromicina, dicloxacilina y cloramfenicol en forma respectiva.

Este estudio demostró que el 100% de cepas de **P. haemolytica** y **P. multocida** son resistentes a penicilina y ampicilina mediante la prueba de ABG. Diversos autores han encontrado porcentajes variables de resistencia de estos microorganismos a tales antibióticos (Chang y Carter, 1976; Chakrabar-

C U A D R O 3

| COMPARACION DE LA RESISTENCIA A AGENTES ANTIMICROBIANOS ENTRE LAS CEPAS DE <u>Pasteurella haemolytica</u> y <u>Pasteurella multocida</u> . |  |      |      |
|--|--|------|------|
| AGENTES ANTIMICROBIANOS  | PORCENTAJE DE RESISTENCIA<br>( BASADO EN CMI ) |      |      |
|  | Pho  | Phb  | Pmb  |
| Acido Nalidifxico  | 38.5   | 21.0 | 38.5 |
| Carbenicilina  | 9.0  | 22.0 | 26.0 |
| Cloranfenicol  | 26.0   | 38.0 | 84.0 |
| Dicloxacilina  | 48.0   | 53.0 | 72.0 |
| Eritromicina   | 28.0   | 41.0 | 67.0 |
| Gentamicina  | 3.0  | 12.0 | 8.0  |

CMI: Concentración Mínima Inhibitoria.

Pho: Pasteurella haemolytica de ovino.

Phb: Pasteurella haemolytica de bovino.

Pmb: Pasteurella multocida de bovino.

ti y col., 1978; Martin and Meek, 1981; Utah y col., 1981; Davidson and Bavish, 1982; Fales y col., 1983; Allan y col., 1985) los cuales se han incrementado con el transcurso del tiempo y con su uso. Sin embargo, en México no se tienen datos acerca de anteriores estados de resistencia para estas bacterias. Zimmerman y Hirsh (1980) informan que **P. haemolytica** contiene plásmidos no conjugables que codifican para la resistencia a la penicilina, ampicilina, tetraciclina y estreptomycin; también mencionan la reciente aparición de cepas de **P. haemolytica** y **P. multocida** aisladas de casos clínicos en el Norte de California que demostraron idénticos patrones de resistencia a los antibióticos ya mencionados. La resistencia a la penicilina por parte de estas bacterias, así como a otros antimicrobianos que poseen el anillo  $\beta$ -láctamico, está dada por la capacidad de los plásmidos para codificar la

producción de la enzima  $\beta$ -lactamasa, aún cuando la sensibilidad depende de la afinidad de la enzima por el sustrato (antibiótico).

Los aislamientos aquí estudiados mostraron un patrón de resistencia variable frente a la dicloxacilina y carbenicilina, fueron más susceptibles a esta última debido quizá a que la carbenicilina es una penicilina de amplio espectro susceptible a la penicilinasas, lo que no ocurre con la dicloxacilina. Estos hechos asociados con la resistencia hacia la penicilina, hacen pensar en la posible existencia de la enzima  $\beta$ -lactamasa por parte de estos microorganismos.

La resistencia de **P. haemolytica** hacia la tetraciclina ha sido demostrada por diferentes autores (Martin and Meek, 1981; Davidson and Bavish, 1982; Fales y col., 1982; Martin y col., 1983), así como la existencia de un

plásmido que codifica para esta resistencia (Rimerman and Hirsh, 1980). Los datos presentados aquí indican que hay un mayor número de aislamientos de *P. haemolytica* de bovinos que son resistentes a la tetraciclina en comparación con los aislamientos de origen ovino. El porcentaje de resistencia encontrado en este estudio para los aislamientos de *P. haemolytica* de ovinos y de *P. multocida* son similares y concuerdan con los descritos por otros autores (Martin and Meek, 1981; Davidson and Babish, 1982; Martin y col., 1983).

Para la eritromicina, el 67% de los aislamientos de *P. multocida* mostraron resistencia, lo que contrasta con el 26% de Davidson y Babish (1982), sin embargo el porcentaje de resistencia de *P. haemolytica* fue similar al notificado por estos autores. Por otra parte, se ha informado que existe un bajo porcentaje de aislamientos de *Pasteurella sp.* resistente a la gentamicina (Davidson and Babish, 1982; Fales y col., 1982) en el presente trabajo se obtuvieron porcentajes similares.

En el caso de cloramfenicol se observa discrepancia entre los datos obtenidos del ABG y CMI, debido quizá al carácter cuantitativo de esta última prueba.

Debido a la existencia de evidencias sobre la creciente resistencia de estos microorganismos a diversos agentes quimioterapéuticos, se presenta entonces el problema de la selección de un antibiótico, este procedimiento es complejo pues se requiere de un buen criterio clínico y de un conocimiento detallado de factores farmacológicos y microbiológicos. Las pruebas de sensibilidad *in vitro* tienden a orientarnos sobre el patrón de sensibilidad que muestra determinada bacteria; cuando están indicados los agentes antimicrobianos, el objetivo es elegir una droga que sea selectiva para el microorganis-

mo infeccioso y que tenga el menor potencial posible para causar toxicidad o reacciones alérgicas en el animal tratado, además de considerar la accesibilidad y costo del producto elegido.

En conclusión los aislamientos estudiados de *P. haemolytica* y *P. multocida* obtenidos de bovinos y ovinos presentaron una resistencia total hacia la penicilina y ampicilina, y una resistencia variable a los antimicrobianos restantes; queda por demostrar si la resistencia de estos microorganismos esta dada por la existencia de la enzima  $\beta$ -lactamasa y en caso de ser así, si ésta es de tipo constitutivo o inducido.

#### LITERATURA CITADA

ALLAN, E.M., WISEMAN, A., GIBBS, H.A. and SELMAN, I.E., 1985. *Pasteurella* species isolated from the bovine respiratory tract and their antimicrobial sensitivity patterns, *Vet. Rec.* 117:629.

ANHALT, J.P. and WASHINGTON II, J.A., 1980. Preparation and Storage of Antimicrobial Solutions, in Lennette, E.H., Balows, A., Hausler, W.J., et al., (Ed) Manual of Clinical Microbiology, Ed. 3th. Washington, D.C., p.495.

BARRY, A. and THORNSBERRY, C., 1980. Susceptibility testing: Diffusion test procedures. In: Lennette, E.H., Balows, A., Hausler, W. J., et al., (Ed) Manual of Clinical Microbiology, Ed. 3th. Washington, DC, p. 463.

BERMAN, S.M. and HIRSH, D.C., 1978. Partial Characterization of R-Plasmids from *Pasteurella multocida* Isolated from Turkeys, *Antimicrob. Agents Chemother.* 14 (3):348.

CHAKRABARTI, A., DASH, P.K., KAP, B.C. and MISRA, S.K., 1978. Microbial Flora of the upper Respiratory tract in bovines and their *In vitro* sensitivity test with certain antiseptics and antibiotics. *Indian Vet. J.* 55:435.

CHANG, W.H. and CARTER, G.R., 1976. Multiple drug resistance in *Pasteurella multocida* and *Pasteurella haemolytica* from cattle and swine. *J. A.V.M.A.* 169:710.

DAVIDSON, J.N. and BABISH, J.G., 1982. Clinical use of odds ratios in selecting antimicro-

crobial therapy for bovine *Pasteurella pneumon*ia. *Am. J. Vet. Res.*, 43 (5):922.

FALES, W.H., SELBY, L.A., WEBBER, J.J., HOFFMAN, L.J., KINTNER, L.D., NELSON, S.L., MILLER, R.B., THORNE, J.G., MCGINITY, J.T. and SMITH, D.K., 1982. Antimicrobial resistance among *Pasteurella spp.* recovered from Missouri and Iowa cattle with bovine respiratory disease complex. *J.A.V.M.A.* 181 (5):477.

GAVAN, T.L. and BARRY, A.L., 1980. Microdilution test procedures, in Lennette, I.H., Balows, A., Hausler, W.J. et al., (Ed): Manual of clinical Microbiology Ed. 3. Washington, D.C. p. 459.

MARTIN, S.W. and MEEK, A.H., 1981. The interpretation of Antimicrobial Susceptibility Patterns. *Can. J. Comp. Med.* 45:199.

MARTIN, S.W., MEEK, A.H. and CURTIS, R.A. 1983. Antimicrobial Use in Feedlot calves: Its Association with Culture rates and Antimicrobial Susceptibility. *Can. J. Comp. Med.* 47:6.

PANCIERA, R.J., CORSTVET, R.E., CONFER, A.W. and GRESHAM, C.N., 1984. Bovine pneumonic pasteurellosis: Effect of vaccination with live *Pasteurella* species. *Am. J. Vet. Res.* 45 (12):2538.

UNITED STATES PHARMACOPEIA, USP XX. 1980.

UTAH, H.C., LUTHER, D.G., NEWMAN, S.S. and ROY, A.F., 1981. Comparison of Antibio-grams determined by Disk Diffusion and Microdilution Methods for Selected Gram-Negative Bacilli. *Am. J. Vet. Res.* 42 (3): 546.

WRAY, C. and MORRISON, J.R.A., 1983. Antibiotic Resistant. *Pasteurella haemolytica*. *Vet. Rec.* 112:143.

ZIMMERMAN, M.L. and HIRSH, D.C., 1980. Demonstration of an R. Plasmid in a strain of *Pasteurella haemolytica* Isolated from cattle. *Am. J. Vet. Res.* 41 (2):166.