

# Resistencia y sensibilidad a antimicrobianos en cepas de *Pasteurella haemolytica*, *P. multocida* y *Haemophilus somnus*, aisladas en becerras lecheras en estableos de Tijuana

Pau Pijoan Aguadé \*  
Francisco Aguilar Romero \*\*

## Abstract

The frequency of resistance or sensitivity *in vitro* to different antibiotics was studied in 34 strains of *Pasteurella multocida*, 31 of *P. haemolytica* and 11 of *Haemophilus somnus*, obtained from pneumonic lungs of dairy calves from Tijuana and Rosarito in the state of Baja California in Mexico from January 1996 to March 1997. Sensitivity or resistance of the isolates was determined by using the standard disk diffusion susceptibility test. Each strain was tested with 17 antimicrobial agents. A very high prevalence (> 90%) of resistance was found in *Pasteurella* spp when tested against kanamycin and lincomycin. In addition to the resistance showed to these antibiotics, *P. haemolytica* also presented a high prevalence (> 80%) of resistance to penicillin and streptomycin, and *H. somnus* to penicillin, streptomycin and ampicillin. Furthermore, over 20% of isolates were resistant to recently released antibiotics such as tilmicosin and florfenicol. In contrast, all strains studied were sensitive to cefotaxime, and over 87% of all strains analyzed were sensitive to mezlocilina or cefalexime. These results show the need for local veterinarians and producers to be more responsible in the use of antibiotics in the treatment of pneumonia in calves, and the growing danger of the dissemination of strains of *Pasteurella* spp or *H. somnus* resistant to most antimicrobials which could complicate in the future the treatment of pneumonia in these animals.

**Key words:** ANTIBIOTICS, RESISTANCE, SENSITIVITY, DAIRY CALVES, BAJA CALIFORNIA.

## Resumen

Se estudió la frecuencia de resistencia y sensibilidad antimicrobiana *in vitro* en 34 cepas de *P. multocida*, 31 de *P. haemolytica* y 11 de *H. somnus*, aislados de pulmones neumónicos de becerras de las cuencas lecheras de Tijuana y Rosarito, Baja California, a partir del mes de enero de 1996 hasta marzo de 1997. La sensibilidad y resistencia se determinó usando la prueba de Bauer-Kirby, mediante sensidiscos comerciales. Cada cepa bacteriana se probó contra 17 antibióticos. Se encontró una muy alta prevalencia (> 90%) de resistencia en *Pasteurella* spp al probarse contra kanamicina o lincomicina; además de lo anterior, *P. haemolytica* mostró una alta resistencia (> 80%) a penicilina y estreptomicina y *H. somnus* a penicilina, estreptomicina y ampicilina. Asimismo, más del 20% de los aislamientos de las 3 especies estudiadas presentaron resistencia a antibióticos de reciente introducción, tales como tilmicocina y florfenicol. Por el contrario, todas las cepas analizadas fueron sensibles a cefotaxima y más del 87% de los aislamientos fueron sensibles a mezlocilina y cefalexima. Estos resultados muestran la necesidad de que los veterinarios y productores lecheros de la región de Tijuana, sean más responsables en la utilización de antibióticos en el tratamiento de neumonías en becerras, debido al peligro creciente de la diseminación de cepas de *Pasteurella*.

Recibido el 13 de octubre de 1999 y aceptado el 3 de febrero del 2000.

\* Campo Experimental Costa de Ensenada, Instituto Nacional de Investigaciones Forestales, Agrícolas y Pecuarias, Secretaría de Agricultura, Ganadería y Desarrollo Rural (SAGAR), Miramar 1193, Centro, 22800, Ensenada, Baja California, México.

\*\* Proyecto Complejo Neumónico en Rumiantes, Centro Nacional de Investigaciones Disciplinarias en Microbiología, Instituto Nacional de Investigaciones Forestales, Agrícolas y Pecuarias, Secretaría de Agricultura, Ganadería y Desarrollo Rural (SAGAR), km 15.5, Carretera México-Toluca, Cuajimalpa, 05110, México, D.F.

spp o *H. somnus* resistentes a la mayoría de los antimicrobianos, lo cual puede complicar en el futuro el tratamiento de estos animales.

**Palabras clave: ANTIBIÓTICOS, SENSIBILIDAD, RESISTENCIA, NEUMONÍA, BECERRAS LECERAS, BAJA CALIFORNIA.**

En la mayor parte de los establos de la región de Tijuana se ha indicado que las neumonías son la principal causa de mortalidad de las beceras.<sup>1</sup> Aunque el complejo respiratorio bovino (CRB) puede iniciarse por una variedad de agentes patógenos, debido a la importancia que revisten *Pasteurella haemolytica*, *P. multocida* y *Haemophilus somnus* como los microorganismos que producen las principales lesiones pulmonares,<sup>2</sup> la terapia antibiótica debe concentrarse en combatir estos tres agentes.<sup>3,4</sup> Sin embargo, un gran problema que enfrenta el veterinario ante este problema, es decidir qué tipo de antibiótico usar y en qué dosis será efectivo, ya que desde hace más de 20 años se informó del aislamiento de cepas de *Pasteurella* spp que mostraban resistencia a uno o más antibióticos,<sup>5</sup> llegando en la actualidad al grado que la resistencia mostrada por estos agentes a distintos antimicrobianos ha alcanzado niveles preocupantes.<sup>6</sup> En México existe muy poca información confiable sobre los niveles de resistencia antimicrobiana en *Pasteurella* spp o *H. somnus* la información disponible tiene más de 10 años de haber sido publicada.<sup>7</sup> Con base en lo anterior el propósito del presente estudio fue determinar los patrones de susceptibilidad y resistencia antimicrobiana, de diversas cepas de *P. haemolytica*, *P. multocida* y *H. somnus*, aisladas *post mortem* de pulmones neumónicos de beceras lecheras originarias de establos de la región de Tijuana y Rosarito, Baja California, México,<sup>8</sup> a partir de enero de 1996 hasta marzo de 1997.

La sensibilidad a diferentes antimicrobianos fue determinada en 34 cepas de *P. multocida*, 31 de *P. haemolytica* y 11 de *H. somnus*, mediante el método de difusión en disco descrito por Bauer *et al.*,<sup>9</sup> siguiendo las recomendaciones del Federal Register de Estados Unidos de América,<sup>10</sup> utilizando sensidiscos comerciales, que contenían los siguientes antimicrobianos: amoxicilina (AML), 25 µg; ampicilina (AMP), 10 µg; cefalexina (CFL), 30 µg; cefotaxima (CTX), 30 µg; cloxacilina (CXC), 5 µg; eritromicina (ET), 15 µg; estreptomicina (STR), 10 µ; florfenicol (FL), 15 µg; gentamicina (GT), 10 µg; kanamicina (K), 30 µg; lincomicina (LINC), 10 µg; mezlocilina (MEZ), 75 µg; oxitetraciclina (OT), 30 µg; penicilina (PEN), 10 UI; sulfametoxasol-trimetroprim (S-T), 25 µg; tetraciclina (TC), 30 µg; tilmicicina (TIL) 15 µg.

El inóculo se estandarizó agregando la cepa bacteriana a probar, la cual había sido previamente cultivada en agar sangre en un tubo con solución salina fisiológica hasta alcanzar una turbidez comparativa con el estándar 0.5 de McFarland (esta turbidez corresponde aproxima-

damente a 5  $\times$  107 a 5  $\times$  109 unidades formadoras de colonias por mililitro). Con un hisopo estéril impregnado de la suspensión bacteriana se distribuyó la solución en toda la superficie de una caja de Petri con agar Mueller-Hinton; después de dejarla secar durante 5 minutos a temperatura ambiente, se colocaron los sensidiscos y se incubó a 37°C durante 24 h. De acuerdo con el tamaño de la zona de inhibición, se determinó la resistencia, sensibilidad media y sensibilidad alta que cada cepa presentó contra cada uno de los antibióticos anteriores, siguiendo las recomendaciones de Barry y Thonsberry.<sup>11</sup>

Los resultados obtenidos para *P. haemolytica* se presentan en el Cuadro 1. De acuerdo a este último cuadro se concluye que más del 75% de las cepas aisladas en la

**Cuadro 1**  
PORCENTAJES DE RESISTENCIA, SENSIBILIDAD MEDIA Y ALTA  
DE *Pasteurella haemolytica* A DIVERSOS ANTIBIÓTICOS

Antibiótico	Resistentes	Sensibilidad media	Sensibilidad alta
CTX	0	0	100
CFL	6.5	25.8	67.7
MEZ	12.9	22.6	67.7
GT	12.9	58.1	22.6
ET	16.12	51.6	29.0
TC	19.4	77.4	3.2
TIL	21.4	78.5	0
S-T	25.8	9.7	64.5
FLOR	26.3	52.6	21.1
AML	35.5	12.9	51.6
CXC	38.7	41.9	19.4
OT	41.9	58.1	0
AMP	78.5	21.4	0
STR	83.9	16.1	0
PEN	85.7	14.2	0
K	100	0	0
LINC	100	0	0

Claves: AML= Amoxicilina. AMP= Ampicilina. CFL= Cefalexina. CTX= Cefotaxima. CXC= Cloxacilina. ET= Eritromicina. FLOR= Florfenicol. GT= Gentamicina. K= Kanamicina. LINC= Lincomicina. MEZ= Mezlocilina. OT= Oxitetraciclina. PEN= Penicilina. S-T=Sulfametoxasol-trimetroprim. STR= Estreptomicina. TC= Tetraciclina. TIL= Tilmicicina.

**Cuadro 2**

PORCENTAJES DE RESISTENCIA, SENSIBILIDAD MEDIA Y SENSIBILIDAD ALTA DE *Pasteurella multocida* A DIVERSOS ANTIBIÓTICOS

Antibiótico	Resistentes	Sensibilidad media	Sensibilidad alta
CFL	0	18.2	81.8
ET	0	45.5	51.5
CTX	3	0	97
GT	3	33.3	63.6
MEZ	9.1	6.1	84.8
S-T	12.1	15.2	72.7
AML	15.2	12.1	72.7
CXC	18.2	39.4	42.4
TC	18.2	72.7	9.1
FLOR	23.5	58.8	17.7
AMP	28.5	57.2	14
PEN	42.8	57.2	0
TIL	42.8	57.2	0
OT	63.6	18.2	18.2
STR	66.7	30.3	3
K	93.9	0	6.1
LINC	97	3	0

Claves: AML= Amoxicilina. AMP= Ampicilina. CFL= Cefalexina. CTX= Cefotaxima. CXC= Cloxacilina. ET= Eritromicina. FLOR=Florfenicol. GT= Gentamicina. K= Kanamicina. LINC= Lincomicina. MEZ= Mezlocilina. OT= Oxitetraciclina. PEN= Penicilina. S-T=Sulfametoxasol-trimetropirim. STR= Estreptomicina. TC= Tetraciclina. TIL= Tilmicocina.

región de Tijuana son resistentes a estos antibióticos: ampicilina (78.5%), estreptomicina (83.9%), penicilina (85.7%), kanamicina (100%) y lincomicina (100%); por otro lado, se presentaron niveles muy bajos de resistencia a antibióticos tales como: cefotaxima (0%), cefalexina (6.5%), mezlocilina (12.9%) y gentamicina (12.9%).

En el Cuadro 2 se muestran los resultados obtenidos para *P. multocida*. A semejanza de lo anterior se encontró un gran índice de resistencia a lincomicina (97%) y kanamicina (93.9%), aunque se presentó además un elevado porcentaje de resistencia a estreptomicina (66.7) y a oxitetraciclina (63.9). Por el contrario, la totalidad de las cepas analizadas fueron sensibles a la cefalexina o a la eritromicina y sólo 3% mostraron resistencia a la cefotaxima o la cloxacilina.

Los índices de resistencia y sensibilidad demostrados por *H. somnus* a los diversos antibióticos estudiados se indican en el Cuadro 3. De nueva cuenta, se encontró que la totalidad de las cepas analizadas presentaron resistencia a estreptomicina, kanamicina y lincomicina, mientras

que 81.8% de los aislamientos de esta bacteria fueron resistentes a ampicilina o penicilina. Por el contrario, ninguna cepa estudiada mostró resistencia a cefotaxima, mezlocilina, cefalexina o amoxicilina.

Previamente diversos autores han informado del aislamiento de diversas cepas de *Pasteurellaspp*, así como de *H. somnus*, que han mostrado resistencia a uno o más antibióticos. De esta forma se ha indicado una alta proporción (superior al 80%) de cepas de *Pasteurella* spp resistentes a estreptomicina,<sup>3,12</sup> lincomicina<sup>3,12,13</sup> penicilina,<sup>3,13</sup> ampicilina,<sup>3,6</sup> tetraciclina.<sup>3,6</sup> Por el contrario, se ha informado de una alta incidencia (superior al 80%) de cepas de *Pasteurellaspp* sensibles al cloranfenicol,<sup>3,12,13</sup> así como al sulfametoxasol-trimetropirim.<sup>12,13</sup> De igual forma, existen en la literatura internacional multitud de referencias sobre la eficacia de diversos antibióticos en el tratamiento de las neumonías en bovinos, ejemplos de ellos son la eficacia demostrada por la oxitetraciclina, trimetroprim-sulfadoxina, sulfactan-ampicilina, penicilina o tilmicocina.<sup>4,14</sup> Con base en estudios realizados en

**Cuadro 3**  
PORCENTAJES DE RESISTENCIA, SENSIBILIDAD MEDIA Y SENSIBILIDAD ALTA DE *Haemophilus somnus* A DIVERSOS ANTIBIÓTICOS

Antibiótico	Resistentes	Sensibilidad media	Sensibilidad alta
CTX	0	27.3	72.7
MEZ	0	27.3	72.7
CFL	0	72.7	27.3
AML	0	45.5	54.5
ET	9.1	54.5	36.4
GT	27.3	45.5	27.3
TC	27.3	63.6	9.1
FLOR	27.3	63.6	9.1
TIL	36.3	45.4	18.1
S-T	54.5	18.2	27.3
CXC	63.6	18.2	18.2
OT	63.6	36.4	0
AMP	81.8	18.1	0
PEN	81.8	18.1	0
STR	100	0	0
K	100	0	0
LINC	100	0	0

Claves: AML= Amoxicilina. AMP= Ampicilina. CFL= Cefalexina. CTX= Cefotaxima. CXC= Cloxacilina. ET= Eritromicina. FLOR=Florfenicol. GT= Gentamicina. K= Kanamicina. LINC= Lincomicina MEZ= Mezlocilina. OT= Oxitetraciclina. PEN= Penicilina. S-T=Sulfametoxasol-trimetropirim. STR= Estreptomicina. TC= Tetraciclina. TIL= Tilmicocina.

México, Salas *et al.*<sup>7</sup> mostraron una alta proporción de cepas de *Pasteurella* spp aisladas de bovinos sacrificados en rastro, sensibles a la ampicilina, cloranfenicol, oxitetraciclina y trimetroprim-sulfametoaxasol, mientras que la totalidad de los aislamientos de ese estudio mostraron resistencia a la penicilina y a la ampicilina.

Es interesante destacar la alta incidencia encontrada en este estudio de cepas de *Pasteurella* spp, así como de *H. somnus* resistentes a la tilmicicina, lo cual contrasta con lo descrito previamente por otros autores que han indicado su alta eficacia contra estos agentes, ya sea *in vitro*<sup>15</sup> como *in vivo*,<sup>16</sup> indicando la posibilidad de lograr un tratamiento efectivo de la neumonía en bovinos con tan sólo una inyección de este antibiótico del grupo de los macrólidos.<sup>17</sup> Contrario a lo anterior, es de interés precisar que aquellos antibióticos poco utilizados en veterinaria (como es la mezlocilina) o de reciente introducción en la región (como las cefalosporinas) sí muestran una alta efectividad *in vitro* contra los agentes estudiados.

Recientemente Singer *et al.*<sup>6</sup> demostraron la importancia de determinar regionalmente los patrones de resistencia de *Pasteurella* spp a diversos antibióticos, ya que observaron variaciones muy significativas en la efectividad de la ampicilina y tetraciclina en bovinos de distintas regiones de California, Estados Unidos de América. De esta forma se ha advertido<sup>18</sup> la necesidad de verificar periódicamente la aparición de bacterias resistentes, lo cual se recomienda se realice regionalmente. Los resultados presentados en este estudio muestran claramente el serio problema que existe en la población de bovinos lecheros de Tijuana, respecto de la alta incidencia de cepas de *Pasteurella* spp y *H. somnus* resistentes a multitud de antibióticos, aun a varios de reciente aparición en el mercado. Es importante que los técnicos y productores de esta región que administran estos fármacos, los utilicen de una manera responsable, ya que de lo contrario, es factible que proliferen cepas bacterianas productoras de neumonía altamente resistentes a la totalidad de antibióticos actualmente disponibles, por lo que el tratamiento de las neumonías en estos animales será mucho más complicado lo que es en la actualidad.

## Agradecimientos

Se agradece al Sistema de Investigación del Mar de Cortés (Fosimac-Conacyt), así como a la Fundación Produce para la Investigación Agropecuaria y Forestal de Baja California, A.C., el apoyo financiero brindando para la ejecución de este trabajo. Se desea hacer patente, además, un reconocimiento a la Asociación Ganadera Local de Productores de Leche de Tijuana, Baja California, así como a los establos que participaron en el estudio, por las facilidades otorgadas a los autores.

## Referencias

1. Pijoan AP. Factores de manejo asociados con la mortalidad de becerras en establos de Tijuana, Baja California, México. *Vet Méx* 1997;28:269-275.
2. Ames TR. *Dairy calf pneumonia*. *Vet Clin North Am Food Anim Pract* 1997;13:379-391.
3. Fales WH, Selby LA, Webber JJ, Hoffman LJ, Kintner LD, Nelson SL, *et al*. Antimicrobial resistance among *Pasteurella* spp recovered from Missouri and Iowa cattle with bovine respiratory disease complex. *J Am Vet Med Assoc* 1982;181:477-479.
4. Radostitis OM, Leslie KE, Fetrow J. *Herd health*. 2nd ed. Philadelphia: W.B. Saunders Co., 1994.
5. Chang WH, Carter GR. Multiple drugs resistance in *Pasteurella multocida* and *Pasteurella haemolytica* from cattle and swine. *J Am Vet Med Assoc* 1976;169:710-712.
6. Singer RS, Case JT, Carpenter TE, Walker RL, Hirsh DC. Assessment of spatial and temporal clustering of ampicillin and tetracycline resistant strains of *Pasteurella multocida* and *P. haemolytica* isolated from cattle in California. *J Am Vet Med Assoc* 1998;212:1001-1005.
7. Salas TE, Aguilar RF, Trigo TF, Jaramillo ML. Sensibilidad de aislamientos de *Pasteurella haemolytica* y *Pasteurella haemolytica* aisladas de bovinos y ovinos a varios agentes antimicrobianos. *Téc Pecu Méx* 1987;25:243-249.
8. 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;30:149-156.
9. Bauer AW, Kirby MM, Sherris JC, Turk M. Antibiotic susceptibility testing by a standardized single disk method. *Am J Clin Pathol* 1960;45:493-496.
10. Federal Register. Rules and regulations: antibiotic susceptibility disks. *Fed Regist* 1972;37:20525-20529.
11. Barry A, Thonsberry C. Susceptibility testing: diffusion test procedures. In: Lennette EH, Balows A, Hausler WJ, editors. *Manual of clinical microbiology*. 3rd ed. Washington (DC): American Society of Microbiologists, 1980:463-474.
12. Allan EM, Wiseman A, Gibbs HA, Selman IE. *Pasteurella* species isolated from the bovine respiratory tract and their microbial sensitivity patterns. *Vet Rec* 1985;117:629-631.
13. Shoo MK. Comparing different isolates of *Pasteurella haemolytica* from beef calves using their *in vitro* antimicrobial sensitivity patterns. *Vet Microbiol* 1989;20:73-78.
14. Janzen ED, Stockdale PHG, Acres SD, Babiuk LA. Therapeutic and prophylactic effects of some antibiotics on experimental pneumonic pasteurellosis. *Can Vet J* 1984;25:78-81.
15. Ose EE. *In vitro* antibacterial properties of EL-870, a new semi-synthetic macrolide antibiotic. *J Antibi* 1987;40:190-194.
16. Musser J, Mechor GD, Grohn YT, Dubovi EJ, Shin S. Comparison of tilmicosin with long-acting oxytetracycline for treatment of respiratory tract disease in calves. *J Am Vet Med Assoc* 1996;208:102-106.
17. Ose EE, Tonkinson LV. Single-dose treatment of neonatal calf pneumonia with the new macrolide antibiotic tilmicosin. *Vet Rec* 1988;123:367-369.
18. O'Brien TF. The global epidemic nature of antimicrobial resistance and the need to monitor and manage it locally. *Clin Infect Dis* 1997;24(Suppl 1):2-8.