



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL ESTADO DE MÉXICO

MAESTRÍA Y DOCTORADO EN CIENCIAS

AGROPECUARIAS Y RECURSOS NATURALES

Evaluación del efecto bactericida *in vitro* de las nanopartículas de plata en cepas de *Moraxella* spp. multirresistentes aisladas en ovinos en el Estado de México.

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL GRADO DE

**MAESTRO EN CIENCIAS AGROPECUARIAS Y RECURSOS
NATURALES.**

P R E S E N T A :

MVZ. Giovany Ortiz Arana

El Cerrillo Piedras Blancas, Toluca, Estado de México, abril de 2019.



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL ESTADO DE MÉXICO

MAESTRÍA Y DOCTORADO EN CIENCIAS

AGROPECUARIAS Y RECURSOS NATURALES

Evaluación del efecto bactericida *in vitro* de las nanopartículas de plata en cepas de *Moraxella* spp. multirresistentes aisladas en ovinos en el Estado de México.

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL GRADO DE

**MAESTRO EN CIENCIAS AGROPECUARIAS Y RECURSOS
NATURALES.**

P R E S E N T A :

MVZ. Giovany Ortiz Arana.

COMITÉ DE TUTORES

DR. MARTÍN TALAVERA ROJAS

DR. JORGE PABLO ACOSTA DIBARRAT

DR. EDGARDO SORIANO VARGAS

El Cerrillo Piedras Blancas, Toluca, Estado de México, abril de 2019.

Dedicatorias.

A mis padres.

Que gracias a consejos y palabras de aliento me han ayudado a crecer como persona y a luchar por lo que quiero, gracias por enseñarme valores que me han llevado a alcanzar mis metas. De antemano les agradezco su amor, cariño y cuidado. Este logro también es de ustedes. Los quiero mucho.

A mis hermanos.

Gracias por su apoyo, cariño, por los ratos de diversión en todo momento y por estar en los momentos más importantes de mi vida.

A mis asesores.

Agradezco su tiempo dedicado, paciencia y enseñanzas para la elaboración de este documento.

A mis amigos.

Gracias por su amistad y lealtad en todo momento, agradezco los momentos de risa que los conmemoré en mis recuerdos.

A ti:

Alicia gracias por tu cariño, apoyo, comprensión y confianza que has dado en todo este trayecto.

Resumen

Evaluación del efecto bactericida *in vitro* de las nanopartículas de plata en cepas de *Moraxella* spp. multirresistentes aisladas en ovinos en el Estado de México.

La queratoconjuntivitis contagiosa ovina (QCO) es una enfermedad que produce ceguera temporal o permanente en ovinos y caprinos, está asociada a un conjunto de diversos géneros bacterianos y virales y el tratamiento se basa en el uso de compuestos antimicrobianos, ya se reportado la aparición de cepas de *Moraxella* spp. con resistencia antimicrobiana asociados a la QCO, por esta razón se está en la búsqueda de nuevas alternativas al uso de antibióticos y actualmente se está empleando nuevas herramientas basadas en nanotecnología contra bacterias multirresistentes, en particular, las nanopartículas de plata (AgNPs) que han atraído mucha atención en el campo científico, debido a que tienen un alto potencial para resolver el problema de la aparición de bacterias multirresistentes y sobrepasar los mecanismos de resistencia. En este estudio se evaluó el efecto bactericida *in vitro* de las nanopartículas de plata contra aislamientos de *Moraxella* spp. multirresistentes. Para este estudio se partió de un muestreo probabilístico, utilizando la fórmula de poblaciones finitas, obteniéndose un total 209 muestras de casos clínicos con queratoconjuntivitis contagiosa ovina en unidades producción ovina del Estado de México, se realizó el aislamiento e identificación de *Moraxella* spp. mediante técnicas bacteriológicas y la amplificación mediante PCR de los genes *16s rRNA* y *rtxA* y posteriormente se determinó su perfil de sensibilidad antimicrobiana a diversos antimicrobianos mediante el método de difusión en disco y se amplificaron siete genes de resistencia antimicrobiana. Finalmente se evaluó la eficacia del efecto bactericida de las nanopartículas de plata contra los aislamientos de *Moraxella* spp. multirresistentes. Se obtuvieron 60 aislamientos de *Moraxella* spp., en el 90% (54/60) solo se amplificó el gen *16S rRNA* y el 95.0% (57/60) el gen *rtxA*, identificando (58/60) de los aislados como *M. ovis* y (2/60) como *M. bovoculi*. El 8.33% (5/60) resultaron aislamientos multirresistentes, 23.33% (14/60) aislamientos resistentes y 68.33% (41/60) aislamientos sensibles a todos los antibióticos. Se logró la amplificación de los genes *sul1*, *sul2*, *tetB*, *qnrA*, *qnrB*, *Blat_{TEM}*, no se logró amplificar el gen *floR* en los aislados. Con respecto a la actividad bactericida de las AgNPs sobre los aislamientos de *Moraxella ovis* multirresistentes, resistentes y sensibles (MDR, R y S) y *Moraxella bovoculi* resistentes (R) se observó inhibición del crecimiento a partir de la concentración de 10.78 µg/L (100mM), mientras que la inhibición del crecimiento de las cepas controles de *E. coli* y *S. aureus* se obtuvo a partir de concentraciones de 5.39 µg (50mM) y 8.09 µg/L (75mM) respectivamente. Los casos de queratoconjuntivitis contagiosa ovina en México están relacionados con la presencia de *Moraxella ovis* y *M bovoculi*. El uso de las nanopartículas de plata son una alternativa para el tratamiento de la queratoconjuntivitis ovina provocada por bacterias del género *Moraxella*.

Palabras Claves: Nanopartículas plata, *Moraxella* spp., resistencia bacteriana, PCR, genes de resistencia antimicrobiana.

Abstract.

Evaluation of the bactericidal effect *in vitro* of the silver nanoparticles in multiresistant *Moraxella* spp. strains isolated in sheep in the State of Mexico.

Contagious ovine keratoconjunctivitis (QCO) is a disease that produces temporary or permanent blindness in sheep and goats, is associated with a set of different bacterial and viral genera and the treatment is based on the use of antimicrobial compounds, the appearance of *Moraxella* spp strains with antimicrobial resistance associated with the QCO was reported. With resistance to these drugs, for this reason we are searching for new alternatives to the use of antibiotics and currently we are using new tools based on nanotechnology against multiresistant bacteria, in particular, the silver nanoparticles (AgNPs) that have attracted a lot of attention in the scientific field, because they have a high potential to solve the problem of the appearance of multiresistant bacteria and surpass the mechanisms of resistance. In this study, the *in vitro* bactericidal effect of silver nanoparticles against isolates of *Moraxella* spp. multi-resistant. For this study we started with a probabilistic sampling, using the formula of finite populations, obtaining a total of 209 samples of clinical cases with contagious ovine keratoconjunctivitis in sheep production units of the State of Mexico, isolating and identifying *Moraxella* spp. by means of bacteriological techniques and PCR amplification of the *16s rRNA* and *rtxA* genes and subsequently their antimicrobial susceptibility profile was determined to several antimicrobials by the disk diffusion method and seven antimicrobial resistance genes were amplified. Finally, the effectiveness of the bactericidal effect of the silver nanoparticles against the isolates of *Moraxella* spp. multi-resistant. We obtained 60 isolates of *Moraxella* spp., in 90% (54/60) only the *16S rRNA* gene was amplified and 95.0% (57/60) the *rtxA* gene, identifying (58/60) of the isolates as *M. ovis* and (2/60) as *M. bovoculi*. 8.33% (5/60) resulted in multiresistant isolates, 23.33% (14/60) resistant isolates and 68.33% (41/60) sensitive isolates to all antibiotics. The amplification of the *sul1*, *sul2*, *tetB*, *qnrA*, *qnrB*, *Bla_{TEM}* genes was achieved; the *floR* gene could not be amplified in the isolates. With regard to the bactericidal activity of the AgNPs on the multiresistant, resistant and sensitive *Moraxella ovis* (MDR, R and S) and resistant *Moraxella bovoculi* (R) isolates, growth inhibition was observed from the concentration of 10.78 µg / L (100mM), while growth inhibition of the control strains of *E. coli* and *S. aureus* was obtained from concentrations of 5.39 µg (50mM) and 8.09µg / L (75mM) respectively. Cases of contagious ovine keratoconjunctivitis in México are related with the presence of *Moraxella ovis* and *Moraxella bovoculi*. The use of silver nanoparticles are an alternative for the treatment contagious ovine keratoconjunctivitis caused by bacterias of the genus *Moraxella*.

Keywords; silver nanoparticles, *Moraxella* spp., resistance bacteria, PCR, genes resistance antimicrobial.

Agradecimientos.

A la Universidad Autónoma del Estado de México por favorecer mi crecimiento como profesionista y persona.

A la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia, Centro de Investigación y Estudios Avanzados en Salud Animal (CIESA), por el conocimiento adquirido con su cuerpo Académico e Instalaciones.

Al CONACYT, por el apoyo como becario dentro de Programa de Maestría en Ciencias Agropecuarias y Recursos Naturales con número de registro REF 001553.

El presente trabajo conto con el financiamiento del proyecto:

“Nanotecnología como herramienta para el diagnóstico y tratamiento de enfermedades infecciosas” con clave 3998/2016RED financiado por la Secretaría de Educación Pública, registrado como “Biotecnología aplicada, enfermedades emergentes y zoonosis con la clave UAEM-CA-215 en la Universidad Autónoma del Estado de México”.

El presente trabajo forma parte del proyecto:

“Caracterización, fenotípica y genotípica y resistencia antimicrobiana de aislados de *Moraxella* spp. obtenidos de casos clínicos de queratoconjuntivitis ovina” con clave de registro 4629/2019SF, UAEM.

ÍNDICE.

Dedicatorias.	I
Resumen.....	II
Abstract.	III
Agradecimientos.	IV
1 INTRODUCCIÓN.	- 1 -
II-ANTECEDENTES - 3 -	
2.1. Queratoconjuntivitis contagiosa ovina..... - 3 -	
2.1.2 Otros agentes bacterianos reportados..... - 6 -	
2.1.3. Epidemiología y factores de riesgo de la queratoconjuntivitis contagiosa ovina. - 7 -	
2.1.4 Diagnóstico clínico, laboratorio y molecular de <i>Moraxella</i> spp. - 12 -	
2.1.5 Tratamiento y sensibilidad antimicrobiana de <i>Moraxella</i> spp..... - 16 -	
2.2. Resistencia bacteriana. - 17 -	
2.2.1 Antecedentes de resistencia bacteriana en el ámbito veterinario..... - 17 -	
2.2.2 Determinantes génicos en la resistencia bacteriana. - 20 -	
2.3.1 Antecedentes de la nanociencia y nanotecnología. - 25 -	
2.3.2 Antecedentes del uso de la plata y las nanopartículas de plata. - 26 -	
2.3.3 Propiedades bactericidas de las nanopartículas de plata. - 27 -	
2.3.4 Síntesis y mecanismo de acción de las nanopartículas de plata. - 29 -	
III. JUSTIFICACIÓN. - 33 -	
IV. HIPÓTESIS. - 34 -	
V. OBJETIVO..... - 35 -	
VI. MATERIALES Y MÉTODOS. - 36 -	
VII. RESULTADOS. - 49 -	
IX. CONCLUSIONES. - 105 -	
X. SUGERENCIAS. - 106 -	
XI. LITERATURA. - 107 -	
XII. ANEXOS..... - 126 -	

ÍNDICE DE FIGURAS.

Figura 1.- Fotomicrografías de transmisión electrónica de <i>Moraxella</i> spp. piliadas y no piliadas	- 9 -
Figura 2.- Operón RTX y estructura de la proteína rtxA.....	- 11 -
Figura 3.- Agentes bacterianos y perfil de resistencia de <i>Moraxella</i> spp. reportados en enfermedades de bovinos.....	- 19 -
Figura 4.- Tipos de nanopartículas.....	- 26 -
Figura 5. Mecanismo de acción de las AgNPs.....	- 29 -
Figura 6. Esquema representativo de pruebas de susceptibilidad antimicrobiana <i>in vitro</i>	- 41 -
Figura 7. Método de difusión en disco con las AgNPs.....	- 47 -
Figura 8. Método de suplementación de las AgNPs en agar.....	- 47 -
Figura 9. Método de conteo de colonia en placa utilizando las AgNPs en superficie del agar....	- 48 -
Figura 10. Municipios del Estado de México muestreados en busca de casos de clínicos de queratoconjuntivitis ovina.....	- 85 -
Figura 11. Aspecto de colonias de <i>Moraxella</i> spp.....	- 86 -
Figura 12. Prueba de Fenilalaninadesaminasa en aislados de <i>Moraxella</i> spp.....	- 87 -
Figura 13. Amplificación del gen <i>16S rRNA</i> , identificación molecular de <i>Moraxella ovis</i> y <i>Moraxella bovoculi</i>	- 88 -
Figura 14. Amplificación del gen <i>rtxA</i> , identificación molecular de <i>Moraxella ovis</i> y <i>Moraxella bovoculi</i>	- 88 -
Figura 15. Pruebas de sensibilidad antimicrobiana de <i>Moraxella</i> spp.....	- 89 -
Figura 16. Perfil de resistencia antimicrobiana por aislamiento de <i>Moraxella</i> spp.....	- 91 -

Figura 17. Amplificación de los genes *sul1* y *sul2* en aislados de *Moraxella*.....- 92 -

Figura 18. Amplificación de los genes *tetB* en aislados de *Moraxella*.....- 92 -

Figura 19. Amplificación de los genes *qnrA* y *qnrB* en aislados de *Moraxella*.....- 93 -

Figura 20. Amplificación de los genes *Bla_{TEM}* en aislados de *Moraxella*.....- 94 -

Figura 21. Amplificación de los genes *floR* en muestras controles.....- 94 -

Figura 22. Actividad antimicrobiana de las AgNPs-C en *Moraxella* spp., por el método de difusión en disco.....- 96 -

Figura 23. Actividad antimicrobiana de las AgNPs-C en *Moraxella* spp., por el método de conteo de colonias en superficie de agar.....- 97 -

Figura 24. Actividad antimicrobiana de las AgNPs-C en *Moraxella* spp., por el método de conteo suplementación de las AgNPs en el agar.....- 97 -

ÍNDICE DE CUADROS.

Cuadro 1. Pruebas bacteriológicas para la identificación de especies del género <i>Moraxella</i>	13 -
Cuadro 2. Genes de resistencia y mecanismo de acción asociados en bacterias.....	24 -
Cuadro 3. Distribución de las unidades producción ovina de casos de QCO en el Estado México.....	36 -
Cuadro 4. Identificación de especies de <i>Moraxella</i> con primers específicos.....	39 -
Cuadro 5 Lectura e interpretación de pruebas sensibilidad antimicrobiana con base en los halos de inhibición para la familia <i>Enterobacteriaceae</i>	41 -
Cuadro 6 Lectura e interpretación de pruebas sensibilidad antimicrobiana con base en los halos de inhibición para la familia <i>Moraxellaceae</i>	42 -
Cuadro 7. Secuencia, tamaño de los fragmentos de los genes de resistencia antimicrobiana utilizados en <i>Moraxella</i> spp.....	43 -
Cuadro 8. Presentación de lesiones de queratoconjuntivitis contagiosa ovina.....	85 -
Cuadro 9. Resultados de pruebas bacteriológicas de los aislados de <i>Moraxella</i> spp.....	86 -
Cuadro 10. Sensibilidad antimicrobiana de los aislados de <i>Moraxella</i> spp. por compuesto antimicrobiano.....	90 -
Cuadro 11. Perfil fenotípico y genotípico de resistencia antimicrobiana en aislamientos de <i>Moraxella</i>	95 -

ÍNDICE DE ANEXOS.

Anexo 1. Prevalencia de la QCO en aislamiento por municipio en el Estado de México.....	- 126 -
Anexo 2. Actividad antimicrobiana de las AgNPs-C en <i>Moraxella</i> spp. por el método difusión en disco.....	- 126 -
Anexo 3. Actividad antimicrobiana en <i>Moraxella</i> spp. utilizando las AgNPs-C en la superficie del agar.....	- 127 -
Anexo 4. Actividad antimicrobiana en <i>Moraxella</i> spp. suplementando las AgNPs-C en el agar.....	- 127 -
Anexo 5. Ceparío del proyecto de investigación.....	- 128 -

1 INTRODUCCIÓN.

Uno de los procesos infecciosos en los ovinos, es la queratoconjuntivitis contagiosa ovina por sus siglas (QCO) también es conocida como oftalmía contagiosa o infecciosa ovina, ceguera contagiosa ovina, lágrima, nube y pink eye (ojo rosado). A nivel de campo, los pastores definen al problema como nube o ceguera; es una enfermedad de distribución mundial que afecta a los ovinos y caprinos de todas las razas y de todas las edades; se caracteriza por una alta morbilidad y una rápida diseminación dentro de los rebaños causando un gran perjuicio económico, ya que todos los animales afectados sufren un gran deterioro de su condición física; reflejado en la ganancia de peso, así como la disminución de la calidad de la lana, carne o leche, lo que reflejan la severidad del problema; además de los costos de medicamentos y tratamientos (Moore y Whitley, 1984; Pijoan *et al.*, 1986).

Los organismos bacterianos de importancia clínica y que pueden aislarse del saco conjuntival en ovejas sanas y afectadas con QCO son; *Moraxella ovis*, *Mycoplasma conjunctivae* y *Chlamydia psittaci* (Akerstedt y Hofshagen, 2004; Fernández-Aguilar *et al.*, 2013). Aunque también se ha aislado *Moraxella bovis* (Karthik *et al.*, 2017) y *Moraxella bovoculi* de lesiones oculares en ovejas (Farias *et al.*, 2015), pero estas bacterias junto con *Moraxella ovis* se asocian a la queratoconjuntivitis infecciosa bovina (Libardoni *et al.*, 2012), además se han aislados otros agentes bacterianos, pero sin interés clínico (Akerstedt y Hofshagen, 2004), asimismo se ha asociado del agente viral de Cervid herpesvirus 2 (CvHV2) (Tryland *et al.*, 2017). Actualmente el tratamiento de la queratoconjuntivitis consiste en la aplicación de colirios que contienen compuestos antimicrobianos a base de sulfonamidas, tetraciclinas y cloranfenicol aunque se han descrito el uso de otros antimicrobianos, por ejemplo, penicilina, estreptomina, clortetraciclina, furazolidona, oxitetraciclina y la aplicación de estos tratamientos son de forma sistémica e intrapalpebral (König, 1983; Scott, 2007; Maboni *et al.*, 2015).

Sin embargo, la aparición de bacterias patógenas con resistencia a antibióticos es un problema grave a nivel mundial y el uso de antimicrobianos en la ganadería, en la acuicultura, en los animales domésticos y en los seres humanos, hace que se seleccionen bacterias resistentes a los antimicrobianos y estas residan en los ecosistemas agrícolas y clínicos (Cameron y McAllister, 2016). Además, las bacterias patógenas y no patógenas actúan como un depósito genético de determinantes de resistencia antimicrobianos y estos genes pueden transferirse a través de mecanismos horizontales (HGT) a otras poblaciones de bacterias (Soucy, Huang y Gogarten, 2015).

Los efectos generados por el uso inadecuado de antibióticos son: el fenómeno de multirresistencia microbiana, toxicidad aguda, carcinogenicidad, efectos reproductivos y reacciones alérgicas en individuos susceptibles, entre otros, esto ha creado preocupación en los organismos regulatorios y ha obligado a tener un control más riguroso en los fármacos empleados, en las dosis y el tiempo de aplicación y la búsqueda de nuevas alternativas (Barton, 2000; Gehring *et al.*, 2006).

Los agentes antimicrobianos no tradicionales han sido identificados como herramientas prometedoras contra las bacterias resistentes a los antibióticos tradicionales (Huh y Kwon, 2011) . Recientemente una de las prioridades en las investigaciones biomédicas es el desarrollo de agentes antimicrobianos basados en nanotecnología contra bacterias multirresistentes (Rai *et al.*, 2012).

Las nanopartículas se consideran ahora una alternativa viable y parecen tener un alto potencial para resolver el problema de la aparición de bacterias multirresistentes (Rai *et al.*, 2012), algunas nanomateriales tienen efectos contra los microorganismos patógenos. Los “nanoantibióticos” (Huh y Kwon, 2011) son nanomateriales que muestran una actividad antimicrobiana o que elevan la efectividad y seguridad de los antibióticos. Las nanopartículas metálicas son un buen ejemplo de nanoantibióticos.

En particular, las nanopartículas de plata (AgNPs) han atraído mucha atención en el campo científico (Jana y Pal, 2007; Szmecinski *et al.*, 2008). La plata siempre se ha utilizado contra diversas enfermedades en el pasado se ha usado como un antiséptico y antimicrobiano contra bacterias Gram positivos y Gram negativas (Lazar, 2011; Taraszkievicz *et al.*, 2013), debido a su baja citotoxicidad (Biel *et al.*, 2011), menor costo de producción y la posibilidad de sobrepasar los mecanismos de resistencia (Baker *et al.*, 2005; Allaker y Ren, 2008). Las AgNPs fueron considerados, en los últimos años, particularmente atractivo para la producción de una nueva clase de antimicrobianos (Dos Santos *et al.*, 2014; Lara *et al.*, 2011; Rai *et al.*, 2014) abriendo una forma completamente nueva para combatir una amplia gama de patógenos bacterianos.

Hasta hoy en día, el potencial de la actividad bactericida de las nanopartículas de plata ha sido ampliamente reportada en una diversidad de agentes bacterianos, de ahí la importancia de evaluar el efecto de las nanopartículas de plata en aislados de *Moraxella* spp. multirresistentes aisladas de casos clínicos en ovinos en el Estado de México, por lo cual este trabajo tiene como objetivo la búsqueda de una nueva herramienta para combatir dicha problemática de la resistencia antimicrobiana y poder aspirar a controlar y erradicar la enfermedad, contribuyendo en la economía del país.

II-ANTECEDENTES.

2.1. Queratoconjuntivitis contagiosa ovina.

Agentes causales.

Los únicos organismos que son de importancia clínica y que pueden aislarse del saco conjuntival de ovejas sanas y aquellos afectados por la queratoconjuntivitis ovina (QCO), son *Moraxella ovis*, *Mycoplasma conjunctivae* y *Chlamydia psittaci* que se ha asociado con una conjuntivitis folicular específica (Cello, 1967; Barile *et al.*, 1972; Andrews *et al.*, 1987; Elad *et al.*, 1988; Dagnall, 1994a; Fernández-Aguilar *et al.*, 2013), aunque también se ha aislado *Moraxella bovis* (Karthik *et al.*, 2017) y *Moraxella bovoculi* de lesiones oculares en ovejas, pero se ha asociado a la queratoconjuntivitis infecciosa bovina (Farias *et al.*, 2015) y además se ha aislado otros agentes bacterianos pero sin interés clínico (Åkerstedt y Hofshagen, 2004).

En comparación con la queratoconjuntivitis infecciosa bovina (QIB) que afecta al ganado bovino, se caracteriza por el desarrollo de conjuntivitis y úlceras corneales, los microorganismos implicados son *Moraxella bovis*, *Moraxella ovis* y *Moraxella bovoculi* (Henson y Grumbles 1960; Elad *et al.*, 1988; Angelos *et al.*, 2007; Shen *et al.*, 2011; O'Connor *et al.*, 2012; Sosa y Zunino, 2013).

Mycoplasma conjunctivae.

Taxonómicamente pertenece al Dominio *Bacteria*, Subdominio *Posibacteria*, Filo *Tenericutes*, Orden *Mycoplasmatales*, Familia *Mycoplasmataceae*, Género *Mycoplasma*, Especie *conjunctivae* (Holt *et al.*, 1994).

M. conjunctivae ha sido descrito como el agente etiológico primario de la queratoconjuntivitis contagiosa ovina (QCO), la presencia de esta bacteria generalmente causa ceguera temporal. Se ha aislado *M. conjunctivae* en ausencia de signos clínicos de QCO. Posiblemente, aquellas ovejas de las cuales se aisló *M. conjunctivae* estuvieron en contacto con ovejas afectadas con QCO, como los animales parecían clínicamente sanos, pueden haber sido muestreados justo antes del desarrollo de QCO (Jones *et al.*, 1976; Ter Laak *et al.*, 1988; Belloy *et al.*, 2003).

M. conjunctivae y *M. ovis* fueron aisladas tanto de la mucosa nasal de algunas ovejas como del saco conjuntival (Åkerstedt y Hofshagen, 2004). En las ovejas afectadas por QCO, *M. conjunctivae* fue el organismo aislado con mayor frecuencia (Dagnall, 1994, 1994a)

***Chlamydia psittaci*.**

Taxonómicamente pertenece al: Dominio *Bacteria*, Filo *Chlamydiae*, Orden *Chlamydiales*, Familia *Chlamydiaceae*, Género *Chlamydia* / *Chlamydophila*, Especie *Chlamydophila psittaci* (Holt *et al.*, 1994).

Chlamydia psittaci y *Mycoplasma conjunctivae* generalmente se consideran patógenos implicados en la queratoconjuntivitis infecciosa ovina. *C. psittaci* causa a veces brotes aislados de queratoconjuntivitis infecciosa ovina folicular (Jones *et al.*, 1976; Cooper 1974; Andrews *et al.*, 1987) y también es responsable de la poliartritis en corderos (Hopkins *et al.*, 1973).

Antecedentes de Familia *Moraxellaceae*.

El género *Moraxella*, fue propuesto por primera vez por Lwoff en 1939, en la familia *Neisseriaceae*. Más tarde Bøvre, (1984) argumenta que el género consistía en dos subgéneros, *Moraxella* (*Moraxella*) y *Moraxella* (*Branhamella*), aún dentro de la familia *Neisseriaceae*. En 1989, Rossau y colaboradores propusieron excluir de la familia *Neisseriaceae* a los géneros *Moraxella*, *Acinetobacter* y *Psychrobacter* y sugirió la creación de una nueva familia taxonómica para incluirlos (Rossau *et al.*, 1991). Por el contrario, Catlin (1991) sugirió que sólo los géneros *Moraxella* y *Branhamella* fueran colocados dentro de la nueva familia llamada *Branhamaceae*.

Pettersson *et al.* (1998) revisaron la situación taxonómica de estas especies mediante el análisis filogenético del gen *16S rRNA*, proporcionando datos para la clasificación en cuatro grupos de especies dentro de la familia, ahora llamado, *Moraxellaceae*. El primer subgrupo, el subgrupo llamado *Moraxella lacunata* limita el auténtico género *Moraxella*, incluyendo *Moraxella lacunata*, *Moraxella nonliquefaciens*, *Moraxella bovis*, *Moraxella catarrhalis*, *Moraxella ovis*, *Moraxella caviae*, *Moraxella cuniculi*, la cepa (*Alysiella*) ATCC 29468 y la cepa 1018-2 (se clasificará en *Moraxella* sp.).

Sin embargo, en el género *Moraxella*, subgénero *Branhamella* y nueve especies enumeradas en subgéneros se publicaron de forma válida. La opinión judicial 83 decidió que los nombres de los géneros *Moraxella* subgénero *Moraxella* y el género *Moraxella* subgénero *Branhamella* debería haber sido incluido en las listas aprobadas de nombres procarióticos con estandarización en la nomenclatura (LPSN). Sin embargo, Tindall (2008) cuestionó la decisión judicial 83. Después de una reunión judicial en Estambul en Turquía, los nombres de los *Moraxella* (subgénero *Moraxella*) y *Moraxella* (subgénero *Branhamella*) fueron excluidos de LPSN.

Moraxella ovis.

La incertidumbre sobre su correcta clasificación ha llevado a la inclusión de esta especie en el género *Neisseria* como *Neisseria ovis*, así como en el género *Moraxella* como *Moraxella* subgénero *Branhamella especie ovis* (Bøvre, 1984). El mismo microorganismo se ha denominado así *Neisseria ovis*, *Moraxella ovis* o *Branhamella ovis*.

Taxonómicamente pertenece al Dominio *Bacteria*, Filo *Proteobacteria*, Clase *Gammaproteobacteria*, Orden *Pseudomonadales*, Familia *Moraxellaceae*, Género *Moraxella*, Especie *ovis* (Holt *et al.*, 1994; Tindall, 2008).

Los únicos sitios de los que se ha aislado *Moraxella ovis* en ovejas son el saco conjuntival (Lindqvist, 1960; Spradbrow, 1968) y la secreción nasal (Dagnall, inédito) y del saco conjuntival del ganado bovino (Elad *et al.*, 1988). El papel de *Moraxella ovis* en las enfermedades infecciosas es en gran parte desconocido, pero bajo ciertas circunstancias, *M. ovis* puede contribuir a la gravedad de los signos clínicos de conjuntivitis en ovejas (Lindqvist, 1960; Wilsmore *et al.*, 1990).

Los estudios de (Spradbrow, 1968; Akerstedt y Hofshagen, 2004) encontraron relativamente pocos organismos en el saco conjuntival, sugirió que *M. ovis* podría ser una causa de QCO en conjunción con factores tales como la exposición a la luz ultravioleta, traumatismos y otros microorganismos.

Moraxella ovis se aisló de los ojos afectados y no afectados, pero significativamente más a menudo de los afectados por QCO. Los signos clínicos en los ojos afectados fueron generalmente leves y en su mayoría confinados a cambios inflamatorios en la conjuntiva las pruebas sugieren que *M. ovis* puede tener un papel en el desarrollo de QCO y QIB al contribuir a la gravedad de la enfermedad. Es importante que los mecanismos patogénicos de *M. ovis* se definan para clarificar el papel del organismo en QCO (Elad *et al.*, 1988; Dagnall, 1994a).

Moraxella bovis.

Taxonómicamente pertenece al Dominio *Bacteria*, Filo *Proteobacteria*, Clase *Gammaproteobacteria*, Orden *Pseudomonadales*, Familia *Moraxellaceae*, Género *Moraxella*, Especie *bovis* (Holt *et al.*, 1994).

Moraxella bovis ha sido considerada como el principal agente etiológico de la queratoconjuntivitis infecciosa bovina (QIB) durante mucho tiempo. Recientemente (Karthik *et al.*, 2017) describió a

Moraxella bovis en un ovino. Estos datos sugieren que la especie *Moraxella bovis* podría estar extendida entre ovinos bovinos, caprinos y equinos y puede estar entre otras especies animales (Menoueri *et al.*, 1988; Richard *et al.*, 1989; Sosa y Zunino, 2013).

***Moraxella bovoculi*.**

Taxonómicamente pertenece al Dominio *Bacteria*, Filo *Proteobacteria*, Clase *Gammaproteobacteria*, Orden *Pseudomonadales*, Familia *Moraxellaceae*, Género *Moraxella*, Especie *bovoculi* (Holt *et al.*, 1994; Angelos y Ball, 2007; Angelos *et al.*, 2007).

Sin embargo, otras especies pertenecientes al género *Moraxella* se han asociado en la queratoconjuntivitis infecciosa bovina QIB como es el caso de *Moraxella bovoculi* que se han aislado en Estados Unidos, Brasil y Uruguay (Angelos *et al.*, 2007; Shen *et al.*, 2011; Libardoni *et al.*, 2012; Sosa y Zunino, 2013; Loy y Brodersen, 2014). El primer reporte de *Moraxella bovoculi* fue reportado en el 2007 en los Estados Unidos (Angelos *et al.*, 2007), es un coco Gram negativo que fue aislado de corneas ulceradas de bovinos (Sosa, 2013), se ha identificado a *Moraxella bovoculi* en renos con problemas oculares en Suecia (Sanchez Romano, *et al.*, 2019) y su identificación representa una oportunidad para entender la epidemiología de la QIB como una enfermedad potencial con múltiples organismos causales y una nueva era en oportunidades para su control (Gould *et al.*, 2013).

2.1.2 Otros agentes bacterianos reportados.

***Staphylococcus aureus*.**

Taxonómicamente pertenece al Dominio *Bacteria*, Filo *Firmicutes*, Clase *Bacilli* Orden *Bacillales*, Familia *Staphylococcaceae*, Género *Staphylococcus*, Especie *aureus* (Holt *et al.*, 1994).

En un estudio realizado por Dagnall, (1994a) aisló con frecuencia *Staphylococcus* coagulasa-negativo, estos organismos nunca han sido implicados en QCO y fueron considerados bacterias colonizadoras oportunistas, aunque su significado clínico no fue investigado más.

Egwu, (1989) aisló *S. aureus* de aproximadamente el mismo número de ovejas con queratoconjuntivitis y de ovejas sanas, pero encontraron un posible papel en la conversión de la infección leve a grave, pero no se atribuyó ningún papel al patógeno en la enfermedad.

Listeria monocytogenes.

Taxonómicamente pertenece al Dominio *Bacteria* Filo *Firmicutes*, Clase *Bacilli* Orden *Bacillales*, Familia *Listeriaceae*, Género *Listeria*, Especie *monocytogenes* (Holt *et al.*, 1994).

El aislamiento de *L. monocytogenes* en 3 ovinos con QCO es un hallazgo interesante. En un estudio realizado por Åkerstedt y Hofshagen, (2004) aislaron *Listeria monocytogenes* de animales con queratoconjuntivitis en un único rebaño al norte de Noruega, sin embargo, es raro aislarlo este agente, dichos autores demostraron no había diferencias significativas entre los casos de queratoconjuntivitis y los controles, lo que sugiere que éstas no tienen importancia en la enfermedad (Kummeneje y Mikkelsen 1975, Walker y Morgan 1993; Åkerstedt y Hofshagen, 2004).

Escherichia coli.

Taxonómicamente pertenece al Dominio *Bacteria* Filo *Proteobacteria*, Clase *Gammaproteobacteria* Orden *Enterobacteriales* Familia *Enterobacteriaceae*, Género *Escherichia*, Especie *coli* (Holt *et al.*, 1994).

Åkerstedt y Hofshagen, (2004) muestrearon rebaños con QCO y rebaños sanos, dichos autores obtuvieron el (4%) de aislamientos de *E. coli* y el (2%) de *Corynebacterium* spp. Para estas bacterias, no hubo diferencias significativas entre los casos y los controles. En otro estudio encontraron cepas de *E. coli* en ovejas afectadas con QCO y en animales no afectados de QCO, pero como la tasa de prevalencia fue baja (7,5%) consideraron que este agente no era un agente causal primario de la enfermedad (Egwu, 1989).

2.1.3. Epidemiología y factores de riesgo de la queratoconjuntivitis contagiosa ovina.

La queratoconjuntivitis contagiosa ovina afecta a pequeños rumiantes en todo el mundo (Jones, 1991), se ha reportado también en rumiantes silvestres. Se ha aislado *Moraxella ovis* de casos de queratoconjuntivitis infecciosa en rebaño de ovejas en Escocia (Fairlie, 1966) y Gales (Smith, 1967), en Dinamarca (Pedersen, 1972), en Noruega (Kummeneje y Mikkelsen, 1975), en ovejas en Australia (Spradbrow, 1968), en rebaños en Polonia (Buczek *et al.*, 1979), también en Argentina, Turquía (Diker y Z. Alkan, 1985), Hungría (Hajtós *et al.*, 1986) e Israel (Elad *et al.*, 1988) y a partir de un feto bovino en Irlanda (Neill *et al.*, 1978). Se ha aislado y reportado *Moraxella bovis* y *Moraxella bovoculi* en Europa (Degiorgis *et al.*, 2000), en Norteamérica (Thorne, 1982; Loy y Brodersen, 2014)

todos en bovinos y en único estudio en Brasil se aisló a *Moraxella bovoculi* en la conjuntiva de una oveja (Farias *et al.*, 2015).

Factores ambientales.

Se considera que las moscas, el polvo y la luz solar son factores predisponentes y en conjunto con una variedad de microorganismos dan origen al cuadro clínico (Egwu, 1989). En Noruega, la mayoría de los casos de queratoconjuntivitis contagiosa ovina se observan en otoño e invierno, después de que los animales han sido sacados de las montañas y se alojan en el interior de los graneros y esto es debido tal vez a la forma en que la cría de ovejas se practica en este país. Los corderos que nacen de abril a mayo, son llevados con las ovejas a pastar en las montañas o bosques, donde permanecen dispersas por grandes áreas y reciben poca intervención humana. El predominio de los casos registrados durante el otoño puede estar relacionado con el aumento del nivel de contacto entre animales y / o el nivel más cercano de supervisión por parte de los agricultores que ocurre cuando las ovejas son estabuladas antes del invierno (Akerstedt y Hofshagen, 2004).

Factores de virulencia.

Una variedad de microorganismos del género *Moraxella* están relacionados en los casos clínicos de QIB (*Moraxella bovis*, *Moraxella ovis* y *Moraxella bovoculi*) y QCO (*Moraxella ovis*), que afecta tanto a animales jóvenes y adultos, sin embargo el rol de cada microorganismo no está completamente dilucidado en la patogénesis de cada enfermedad (Elad *et al.*, 1988; Shen *et al.*, 2011; Angelos y Ball, 2007; Angelos, *et al.*, 2007).

Cerny *et al.* (2006), examinaron la presencia de factores de virulencia presentes en aislados de *Moraxella bovis* y en aislamientos clínicos de *Moraxella ovis* con el objetivo de dilucidar la importancia de esta última en la etiología y desarrollo de la QIB. Estos autores evaluaron el efecto de cultivos de *M. ovis* sobre diferentes tipos de células de origen bovino y encontraron que los aislamientos exhibieron actividad hemolítica sobre eritrocitos y actividad citotóxica sobre células mononucleares sanguíneas y células epiteliales de la córnea, lo que sugiere que *Moraxella ovis* juega un papel importante en la patogénesis de la queratoconjuntivitis infecciosa bovina. Asimismo, produce una hemolisina que daña a los neutrófilos que son reclutados al área de la infección, además de que puede liberar colagenasas lo que conducen a la licuefacción y a la ulceración de la córnea.

Se ha descrito que *Moraxella* spp posee fimbrias (pili tipo IV) que desempeñan un rol crucial en la adhesión y colonización corneal. Se han identificado dos tipos de pili distintos. El pili Q es

responsable por la adhesión, mientras el pili I se encarga de la persistencia local y del mantenimiento una vez establecido (Sosa *et al.*, 2015). Como se observa en la Figura 1, las fimbrias de *Moraxella bovis* se encuentran distribuidas alrededor de la célula y las mismas miden de 1 a 4 µm de largo y aproximadamente 6 nm de diámetro (Sosa, 2013).

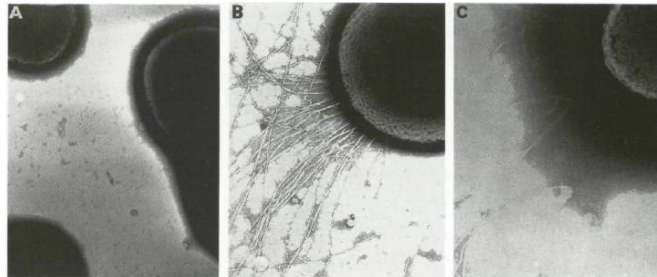


Figura 1.- Fotomicrografías de transmisión electrónica de *Moraxella* spp. piliadas y no piliadas. Fotografías usando un microscopio transmisión de electrones en cepas (A) *M. bovis* Epp63 no piliadas X12000, (B) *M. bovis* Epp63 piliadas X18000, (C) *Pseudomonas aeruginosa* recombinante con expresión pili Q de *M. bovis* Epp63 X 18000 (tomadas de Ruehl *et al.*, 1993).

La patogenicidad de *Moraxella bovis* requiere la expresión del pili para que se adhiera a la superficie ocular y de una citotóxina que dañe las células epiteliales de la córnea (Angelos, 2015). Debido a su estructura proteica, los pili son inmunógenos, por lo tanto, pueden estimular la expresión de anticuerpos específicos, estas características fueron aprovechada para su clasificación en 7 grupos denominados con letras desde el grupo A a la G (Zielinski y Piscitelli, 2009).

Se ha demostrado hemoaglutininas en cepas de *M. bovis* que son capaces de aglutinar eritrocitos de ovinos a temperatura ambiente y de cerdos a 4°C (Gil-Turnes, 1983). Se ha señalado que las hemoaglutininas podrían tener un papel importante en la adhesión, ya que se ha observado que cepas no fimbriadas se adhieren a varios tipos de células, a pesar de hacerlo menos eficientemente que las cepas fimbriales (Annuar y Wilcox, 1985).

Otro factor de virulencia identificado en *M. bovis* es de dos ORFs denominados *flpA* y *flpB* en un plásmido de 44 kb pMBO-1 (Kakuda *et al.*, 2006). Estos ORFs posiblemente codifiquen proteínas homologas con las hemoaglutininas filamentosas de *Bordetella pertussis* (*FHA*) que le permite a este patógeno adherirse a las superficies mucosas.

Estudios *in vitro* sugieren que *Moraxella bovis* posee un eficiente sistema de adquisición de hierro constituido por sideróforos y proteínas de membrana externa (PME) que reconocen lactoferrina y

transferrina bovina, dos proteínas capaces de quelar el hierro presente en mucosas y en el suero sanguíneo respectivamente (Sosa, 2013).

La β -hemolisina de *Moraxella bovis* (*MbxA*) pertenece a la familia RTX es una exoproteína bacteriana y se caracteriza por producir poros en la membrana citoplasmática de diversas células, provocando flujo de potasio y desequilibrio osmótico y lisis celular. Las hemolisinas de *Moraxella bovis* demostraron la homogeneidad genética en cepas de diversos orígenes geográficos (Sosa, 2013; Farias *et al.*, 2015). Esta exotoxina está codificada en un operón compuesto por 5 genes denominados 5´-*mbxC-mbxA-mbxB-mbxD-TolC*-3´. El gen *mbxA* codifica una proteína de aproximadamente 98.8 kDa (Angelos *et al.*, 2001). La toxina *mbxA* es activada por el producto del gen *mbxC* y transportada por las proteínas de membrana codificada por los genes *mbxB* y *mbxD* (Angelos *et al.*, 2001).

Moraxella bovoculi, es una especie recientemente descrita en el género *Moraxella*, que ha sido aislado y caracterizado en la QIB en ausencia de *M. bovis* (Angelos *et al.*, 2007a). Evidencias demuestran que *M. bovoculi* secreta una citotóxina similar de la clase RTX a la de *M. bovis* (Angelos *et al.*, 2007b), sin embargo, cuando se inocula de forma experimental a *M. bovoculi* en corneas escarificadas de terneras, no se observan cambios morfológicos, haciendo que la participación de *M. bovoculi* sea aún incierta.

Como se aprecia en la Figura 2, el operón RTX completo ha sido identificados en *M. bovoculi* y *M. ovis* (Angelos *et al.*, 2007b). En *M. bovoculi* el operón fue denominado *mbv* y comprende los genes *mbvBCADtolC*, mientras que en *M. ovis* el operón fue denominado *mov* y comprende *movBCADtolC*. El suero policlonal obtenido en conejos contra *mbxA* neutraliza solo parcialmente la actividad hemolítica de *M. bovoculi* y *M. ovis*. *MbvA* y *movA* tienen aproximadamente un 98% de identidad en la secuencia de aminoácidos deducida, mientras que en la secuencia aminoácida deducida de *M. bovis* *mbxA* tiene aproximadamente un 83% de la identidad de *mbvA* y *movA* (Angelos *et al.*, 2007b).

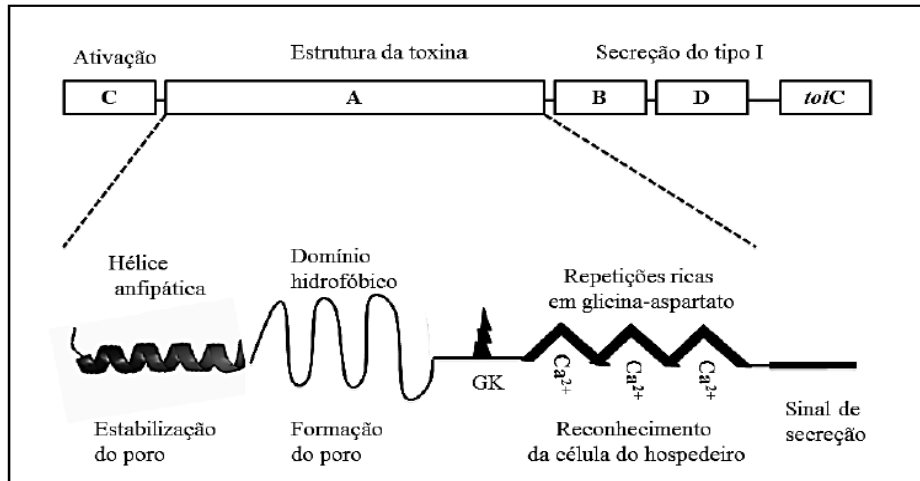


Figura 2.- Operón RTX y estructura de la proteína rtxA. Diagrama superior representación esquemática de un típico operón RTX: o producto 4 genes C (activador), A (Toxina estructural), B y D (proteínas de secreción tipo I. El operón RTX está representado por cajas abiertas en el orden que generalmente se codifican. Diagrama inferior: representación de las principales partes funcionales de la toxina. GK indica el lugar de acilación de la lisina-glicina, que es seguido por el lugar de las repeticiones ricas en glicina y ácido aspártico (Angelos *et al.*, 2003; Frey, 2011).

Enzimas hidrolíticas esterasas C4, esterasa-lipasa C8, lipasa C14, fosfoamidasa, hialuronidasa y fosfatasa y enzimas proteolíticas aminopeptidasas y gelatinasas han sido identificadas en el sobrenadante de cultivos de *Moraxella bovis* y *Moraxella bovoculi*, se ha sugerido que las mismas participarían en la producción de úlceras corneales junto a fibrinolisin y las enzimas con actividad hemolítica (Sosa, 2013).

La mayoría de la vida bacteriana en la naturaleza en vez de encontrarse en estado planctónico, se encuentra en comunidades biofilms (Costerton, 1995; Kolter y Greenberg, 2006). A pesar de que la capacidad de *M. bovis* de formar biofilms ha sido escasamente estudiada, una gran variedad de infecciones oculares se ha asociados a los biofilm (Elder *et al.*, 1995; Murugan *et al.*, 2010). Las capacidades de formación de biofilm de *M. bovis* puede aumentar la resistencia antimicrobiana. Prieto *et al.* (2013) encontraron que *M. bovis* forma fácilmente biopelículas, aumentando la resistencia a la ampicilina, el cloranfenicol, la gentamicina y la oxitetraciclina en comparación cuando esta bacteria crece de forma planctónica.

2.1.4 Diagnóstico clínico, laboratorio y molecular de *Moraxella* spp.

Diagnóstico clínico de la queratoconjuntivitis contagiosa ovina.

La queratoconjuntivitis contagiosa ovina es una enfermedad dolorosa que puede causar ceguera temporal o permanente. Los primeros signos son hiperemia de la conjuntiva y esclerótica (conjuntivitis), se observan descargas nasales, secreción lagrimal de color hialino a amarillento o seroso, fotofobia, blefaroespasma, hiperplasia linfocelular en la conjuntiva y en la membrana nictitante, queratitis (Ewgu, 1989; Dagnall, 1994a; Nietfeld, 2001). Si la enfermedad progresa se desarrollan folículos hiperplásicos en los linfonódulos, generalizándose la inflamación por toda la esclerótica llegando hasta la córnea, donde el exudado comienza a ser purulento, desarrollándose por último y en raras ocasiones úlceras (Dagnall, 1994b).

La enfermedad es más común en caprinos y ovinos adultos que en jóvenes (Nietfeld, 2001). Generalmente ambos ojos se ven afectados, aunque los signos clínicos pueden comenzar en un solo ojo. Más tarde, los vasos sanguíneos conjuntivales se dilatan y la córnea puede volverse ennegrecida o grisácea, especialmente en la periferia (Dagnall, 1994a,b).

Rara vez, se produce una infección adicional de la cámara anterior que conduce a panofalmitis y encogimiento del globo ocular. Por lo general, los animales comienzan a recuperarse después de una semana, pero algunos corderos permanecen enfermos durante 3 a 4 semanas con debilidad y fiebre, lo que resulta en pérdida de peso y reduce los pesos al mercado (Kjølleberg 1971).

Diagnóstico bacteriológico de *Moraxella* spp.

Lindqvist, (1960) describió a *M. ovis* como una bacteria Gram negativa, en forma de coco, reaccionando positivamente en las pruebas de catalasa, oxidasa y no produce ácido a partir de la fermentación de carbohidratos.

La condición óptima de temperatura para el crecimiento de *Moraxella ovis* es de 37°C en condiciones aerobias. El crecimiento bacteriano se observa luego de las 24 horas de incubación por la turbidez en el caldo o por la aparición de colonias en agar. Las colonias son circulares con una elevación convexa, un margen entero, una superficie suave y un halo de β -hemólisis a su alrededor (Angelos y Ball, 2007; Angelos *et al.*, 2007).

Moraxella bovis se ha descrito como un diplobacilo Gram negativo se ha aislado de saco conjuntival de ojo en bovinos. Se caracteriza por producción de un halo de β-hemolisis en placas agar sangre su temperatura optima de crecimiento es 37°C en condiciones aerobias, licuan la gelatina luego de 10 días de incubación 22°C, no fermentan carbohidratos, el tamaño de la colonia es de 1- 2 μm de longitud y 0.5 μm de ancho, son capsulados, no móviles y no esporulados (Sosa, 2013).

Moraxella bovoculi es un coco Gram negativo que fue asilado de corneas ulceradas de bovinos. A su vez, los análisis bioquímicos mostraron diferencias entre los aislamientos de *Moraxella bovoculi*, *Moraxella bovis* y *Moraxella ovis*. Se encontró que *Moraxella bovoculi* podía ser diferenciada bioquímicamente de *M. bovis* en base a la actividad fenilalaninadesaminasa positiva y la incapacidad de expresar gelatinasa. No obstante, luego de la primera identificación *Moraxella bovoculi* fenilalaninadesaminasa positivos, se identificaron cepas de *Moraxella bovoculi* que fueron fenilalaninadesaminasa negativa. En el Cuadro 1, se presenta un resumen de las características macroscópicas y microscópicas esperadas para las diferentes especies del género *Moraxella* involucradas en brotes de QIB y QCO (Fraser-Gilmour 1979; Angelos y Ball, 2007; Angelos *et al.*, 2007; Shen *et al.*, 2011).

Cuadro 1. Pruebas bacteriológicas para la identificación de especies del genero *Moraxella* de importancia para la queratoconjuntivitis.

Características	Agente	Morfología	Tinción Gram	Respiración	Movilidad	Actividad catalasa	Actividad oxidasa	Crecimiento Mac Conkey	Producción de ácido a partir de glucosa	Crecimiento sobre medio mínimo de contenido acetato mono	Hemolisis	Reducción de nitratos	Licuefacción de gelatina	Actividad ADNasa	Proteólisis sobre medio Loeffler	Indol	Actividad Fenilalaninadesaminasa	Hidrolisis del Tween 80	Actividad fosfatasa alcalina	Actividad estearasa C4 y C8	Actividad Fosfatasa Acida
<i>Moraxella bovis</i>	C, B	-	Aerobia	-	(+)	+	-	-	-	-	+	(-)	+	(+)	+	-	-	+	-	+	W
<i>Moraxella bovoculi</i>	C, DC	-	Aerobia	-	+	+	-	-	-	-	(+)	(+)	-	(-)	-	-	(+)	(+)	(-)	+	-
<i>Moraxella ovis</i>	C	-	Aerobia	-	+	+	-	-	-	-	(+)	(+/-)	-	(-)	(+/-)	-	-	-	+	+	-

Cuadro1. Pruebas bacteriológicas para la identificación de especies del género *Moraxella*. Abreviaciones: C coco, DC diplococos, B bacilos, - reacción negativa, + reacción positiva, w reacción débil, (+) la mayoría de las cepas positivas, (-) la mayoría de las cepas negativas (+/-) 50% de las cepas positivas (Fraser-Gilmour 1979; Angelos y Ball, 2007; Angelos *et al.*, 2007; Shen *et al.*, 2011).

Diagnóstico molecular de *Moraxella* spp.

Los inconvenientes que presentan los métodos tradicionales de identificación han estimulado el desarrollo de estrategias alternativas. Las aplicaciones de las herramientas moleculares ofrecen un gran potencial para la identificación de microorganismos. Diversos autores publicaron a finales de la década de los 80 las primeras aproximaciones hacia la evolución de los microorganismos utilizando técnicas moleculares (Olsen *et al.*, 1986; Pace *et al.*, 1986; Woese, 1987; Woese *et al.*, 1990). La propuesta más ampliamente utilizada para la identificación bacteriana se basa en el análisis del gen *16S rDNA*, este gen ha sido utilizado como un cronometro evolutivo. El gen *16S rDNA* codifica para la molécula de 16S RNA la cual es parte de la subunidad menor de los ribosomas junto con unas 20 proteínas. Una de las características por la que ha sido posible definir relaciones filogenéticas entre organismos tan distantes con este gen es que tiene tasas de cambio muy distintas a lo largo de su secuencia (Woese, 1987).

Estudio realizado por Shen *et al.* (2011) seleccionaron el gen *16S rRNA*, para el diseño de cebadores y sondas para el ensayo PCR multiplex en tiempo real para la identificación de agentes de *M. bovis*, *M. bovoculi* y *M. ovis*, ellos demostraron que las tres cepas de referencia se identificaron correctamente sin reacciones cruzadas observadas entre las tres especies de *Moraxella* y con respecto a otros aislados no pertenecen al género *Moraxella* lo que indica alta especificidad de los cebadores y sondas seleccionados.

El análisis filogenético basado en las citotoxinas de cepas de *Moraxella* spp proporciona una clara diferenciación entre las especies de interés veterinario. El análisis de secuencias del gen *rtxA* que codifica para la citotoxina A (*mbxA*, *mbvA* y *movA*), reveló una región altamente conservada dentro de estas especies bacterianas. Se observó que la región menos conservada se encontró en cepas de *M. bovis* en relación con *M. bovoculi* y *M. ovis*. Curiosamente, los genes *mbvA* y *movA* presentaron una alta similitud entre las cepas de *M. bovoculi* y *M. ovis* (Farias *et al.*, 2015).

Secuenciación de *Moraxella* spp.

Secuenciación del gen *16S rRNA*.

Se realizó un análisis filogenético basándose en las homologías de las secuencias del gen *16S rRNA*, los aislamientos de *M. bovis* y *M. bovoculi* mostraron diferencias entre sus secuencias agrupándose en diferentes ramas del dendrograma ambos claramente diferenciables de la cepa de referencia *M. ovis* (Sosa y Zunino, 2012).

Las secuencias del gen *16S rRNA* indicaron que 23 secuencias fueron similares a las secuencias publicadas de *M. bovis*, mientras que 25 mostraron homología con secuencias de *M. bovoculi*, nueve aislamientos que no pudieron hidrolizar gelatina mostraron homología con *M. bovoculi* y ningún aislado mostró homología con *M. ovis* (Sosa y Zunino, 2012).

Secuenciación del gen citotoxina A (*mbxA*, *mbvA* y *movA*)

El gen que codifica la citotoxina A de las cepas de *M. bovis*, *M. bovoculi* y *M. ovis* se secuenció parcialmente. El fragmento secuenciado cubría la región codificante del extremo -COOH de la familia de las citotoxinas RTX, realizando una alineación consistente de las secuencias por 843 nt (del gen *mbxA* de *M. bovis* Epp63; del gen *mbvA* de *M. bovoculi* 237^t; del gen *movA* de *M. ovis* ATCC 33,078), lo que reveló un alto grado de similitud entre secuencias de las mismas especies, encontrado en *M. bovoculi* y *M. ovis* regiones altamente conservadas. Y el grado de similitud entre las secuencias de las cepas de *M. bovis* fue 99.9% (100% de similitud entre todas las cepas de *M. bovis* Epp63), mientras que entre las secuencias *mbvA* (*M. bovoculi*) y entre secuencias *movA* (*M. ovis*), se observó una similitud de 98.8% y 99.3% respectivamente. El grado de similitud entre las secuencias de *mbxA* (*M. bovis*) en relación con *mbvA* (*M. bovoculi*) y *movA* (*M. ovis*) fue del 77.6% y la similitud entre las secuencias de *mbvA* y *movA* de 95.7% a 97.5% (Farias et al., 2015).

Todas las 15 cepas de *M. bovis* incluyendo cepa *M. bovis* Epp63 compartieron el alelo llamado 1bx, mientras que la cepa identificada como SFS9 tuvo otro alelo diseñado 2bx. En once cepas de *M. bovoculi* se identificaron siete alelos llamándolos 1bv y 7bv, mientras que 7 cepas de *M. ovis* dieron lugar a cinco alelos agrupados en alelos 2ov-6ov, se observaron un total de 15 alelos en tres especies de *Moraxella* (Farias et al., 2015).

2.1.5 Tratamiento y sensibilidad antimicrobiana de *Moraxella* spp.

El tratamiento de la queratoconjuntivitis contagiosa se basa en la terapia antimicrobiana, que debe ser adoptada considerando que es necesario combatir dos o más especies de *Moraxella* presentes en la misma lesión según Maboni *et al.* (2015), dichos autores mencionan que son escasos los datos disponibles en la literatura de la susceptibilidad antimicrobiana de *Moraxella* spp. Elad *et al.*, en 1988, mostraron que aislamientos de *M. ovis* presentaron sensibilidad antimicrobiana *in vitro* a diferentes antibióticos como son: gentamicina, tetraciclina, cloranfenicol, polimixina B y sulfonamidas y resistencia antimicrobiana *in vitro* a penicilina, ampicilina, estreptomina y neomicina.

En otro estudio más reciente que abordó la susceptibilidad antimicrobiana de aislados de *M. ovis* en rebaños afectados con queratoconjuntivitis, solo se reportó resistencia para la eritromicina (Catry *et al.*, 2007).

Maboni *et al.* (2015), determinaron la sensibilidad antimicrobiana a través del método de microdilución en cepas de *Moraxella bovis*, *Moraxella ovis* y *Moraxella bovoculi* y demostraron que las cepas utilizadas fueron sensibles a la ampicilina, ceftiofur, enrofloxacin, florfenicol y gentamicina.

La oxitetraciclina suele ser la primera opción para el tratamiento antimicrobiano de la queratoconjuntivitis (Alexander, 2010). Estos resultados pueden sugerir que el uso indiscriminado de oxitetraciclina a lo largo de los años puede estar relacionado con la selección de *Moraxella* spp. resistente a este fármaco (Maboni *et al.*, 2015).

Al igual que la oxitetraciclina, se ha informado que el florfenicol es una opción terapéutica eficaz para combatir la queratoconjuntivitis (Gokce *et al.*, 2002; Angelos *et al.*, 2011), especialmente en los casos en que *M. bovis* que son resistente a tetraciclina (Angelos *et al.*, 2010).

Es importante señalar que *M. ovis* aisladas de ovejas, debe ser controlada por antibióticos, especialmente para evitar la exacerbación de lesiones causadas principalmente por otros agentes bacterianos tales como *M. conjunctivae* y *C. Psittaci* (Dagnall, 1994a).

2.2. Resistencia bacteriana.

2.2.1 Antecedentes de resistencia bacteriana en el ámbito veterinario.

La introducción de los antibióticos en la medicina humana y animal ha sido uno de los logros más importantes del siglo XX (Aarestrup, 2005). En la industria veterinaria los antibióticos se administran a niveles subterapéuticos para la utilización de la engorda de los animales y para la prevención de enfermedades veterinarias (Doyle, 2012). El uso de fármacos en la producción animal ha sido una práctica no regularizada que carece de control y supervisión, como consecuencia favorece el uso inadecuado de medicamentos causando el desarrollo de cepas resistentes a los antibióticos, tanto de bacterias patógenas como no patógenas (Máttar *et al.*, 2009).

Desde hace ya no pocos años, una amenaza creciente deteriora la eficacia de estos fármacos y es la resistencia bacteriana a los antibióticos, que se define; como la capacidad de una bacteria para sobrevivir en concentraciones de antibiótico que inhiben y/o matan a otras de la misma especie (Alós, 2015). Las definiciones de resistencia se clasifican según el número y la clase de antibióticos afectados. La multiresistencia (Multiple Drug Resistance, MDR) se define; como la ausencia de sensibilidad a, por lo menos, un fármaco en tres o más de las categorías de antibióticos; la resistencia extrema (Extensively Drug-Resistant, XDR) se refiere a la ausencia de sensibilidad a, por lo menos, un agente en todas las categorías de antimicrobianos excepto en dos de ellas o menos y la resistencia a todos los antimicrobianos (Pandrug-resistant PDR) se define como resistencia a todas las categorías de antibióticos (Falagas y Karageorgopoulos, 2008; Magiorakos *et al.*, 2011).

En un estudio realizado por Cota-Rubio *et al.*, (2014), revisaron y analizaron una diversidad de artículos científicos publicados en diversos buscadores MEDLINE/ PubMed, SciELO and EBSCO desde el 2000 al 2012, con la finalidad de identificar la cepas bacterianas involucradas, número de aislados, la especie animal en la que fue aislada la bacteria, el país de origen de estudios y al tipo de grupo o familia de antibiótico que presentan resistencia antimicrobiana.

Cota-Rubio *et al.*, (2014) en su análisis identificó las bacterias que presentaron mayor resistencia antimicrobiana encontrando a *Salmonella spp.* (491 cepas) (Camacho *et al.*, 2010; Ibar *et al.*, 2009; Mejia *et al.*, 2008; Nayak *et al.*, 2004; Hao *et al.*, 2007), *Escherichia coli* (691 cepas) identificados en dos estudios (Mirzaagha *et al.*, 2011; Yang *et al.*, 2004), aunque también se vieron involucrados otras bacterias como *Campylobacter jejuni*, *Campylobacter coli* y *Enterococcus*. De las bacterias resistentes, se identificaron una diversidad especies destinadas al consumo humano, de los cuales seis estudios fueron realizados en aves (Fallon *et al.*, 2003; Yang *et al.*, 2004; Novais *et al.*, 2005; Hao *et al.*, 2007; Camacho *et al.*, 2010; Marinou *et al.*, 2012;), cinco en cerdos (Hao *et al.*, 2007; Mejia *et*

al., 2008; Ibar *et al.*, 2009;), dos en pavos (Nayak *et al.*, 2004; Novais *et al.*, 2005), en un estudio se trabajó con becerros (Mirzaagha *et al.*, 2011) y en el estudio de Hao *et al.* (2007), incluyeron bovinos, aves, cerdos y mariscos. En ese estudio se analizaron varios grupos de antibióticos, como; las betalactámicos, macrólidos, glucopéptidos, aminoglucósidos, quinolonas, tetraciclinas y sulfamidas de los cuales fueron resistentes.

Investigaciones más recientes realizadas por Maboni *et al.* (2015) caracterizaron el perfil de sensibilidad antimicrobiana de 32 aislados *Moraxella* spp. asociados a la QIB. Estos autores demostraron que aislados de *M. ovis* presentaron resistencia antimicrobiana *in vitro* a dos diferentes antibióticos, a la oxitetraciclina 9% (1/11) y a la penicilina 18% (2/11), para *M. bovoculi* se determinó que el 9% (1/11) de los aislados resultaron resistente a penicilina y un estudio anterior informó resultados similares de *M. bovoculi* 12.3% de resistencia a la penicilina (Angelos *et al.*, 2011).

En el mismo estudio Maboni *et al.* (2015), determinaron cepas de *M. bovis* con resistencia antimicrobiana de oxitetraciclinas 20% (2/10) de los aislados y sólo hay dos reportes de resistencia de *M. bovis* a este fármaco en la literatura (Senturk *et al.*, 2007; Shryock *et al.*, 1998). Se observa en la Figura 3, los valores porcentuales de la resistencia antimicrobiana de diversos fármacos en aislados de *Moraxella* spp. asociados a casos de queratoconjuntivitis en bovinos.

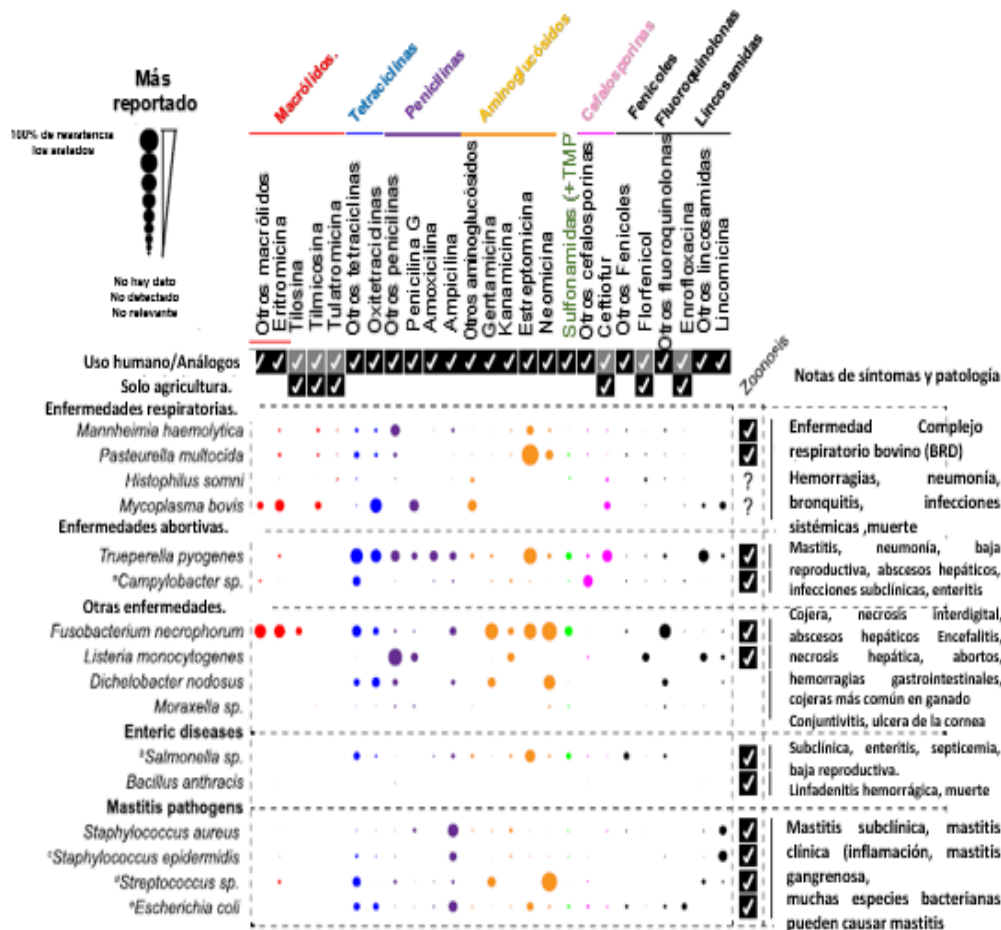


Figura 3.- Agentes bacterianos y perfil de resistencia de *Moraxella spp* reportados en enfermedades de bovinos. El diámetro del círculo indica el porcentaje de resistencia fenotípica a antimicrobianas por clase. El porcentaje de resistencia se determinó a través de la mediana de los valores porcentuales obtenidos de artículos de revistas que informan el porcentaje de resistencia entre los aislados recolectados de animales enfermos o pasivos (Cameron y McAllister, 2016).

La resistencia bacteriana se ha dividido en dos grupos: la natural o innata que es controlada cromosómicamente, se ha estudiado más en bacterias Gram negativas que en Gram positivas. La resistencia innata está influenciada por la estructura fisiológica de cada bacteria, por el estado metabólico como el crecimiento y los nutrientes; otra estrategia es la formación de consorcios llamados biofilm con producción de exopolisacáridos que reducen el paso de antibióticos y desinfectantes, además de un constante intercambio genético, el cual permite a las bacterias sobrevivir aún después de que el biofilm se desintegre (McDonnell y Russell, 1999).

La resistencia adquirida, que se da por la adquisición de genoma externo como plásmidos y trasposones o por mutaciones (McDonnell y Russell, 1999; Russell, 2002) Las bacterias desarrollan resistencia a través de la adquisición de material genético nuevo desde otros microorganismos

resistentes lo que es conocido como evolución horizontal, puede ocurrir entre cepas de la misma especie o entre diferentes especies o géneros bacterianos. Los mecanismos de intercambio genético, como se mencionó anteriormente incluyen conjugación, transducción y transformación (McManus, 1997).

2.2.2 Determinantes génicos en la resistencia bacteriana.

Se creía que los antibióticos eran un arma defensiva contra las bacterias (Fajardo y Martínez, 2008) y que los genes de resistencia servían para que las bacterias se defendieran de esa arma, pero hay demasiados genes de resistencia en la naturaleza y funcionalmente diversos (Sommer *et al.*, 2009), asimismo hay que considerar que dichos genes pueden evolucionar una vez son adquiridos por bacterias patógenas o comensales del hombre o de animales. La presión selectiva en las bacterias por el uso masivo de los antibióticos en los últimos 70 años ha contribuido a la diversificación genética de los genes de resistencia (Corvec *et al.*, 2013).

En cepas con multiresistencia a antibióticos se debe a una matriz tándem de genes de resistencia antimicrobiana (AMR) concentrados dentro de un elemento integrativo y conjugable (ICE), que es un elemento genético móvil (MGE). Estos elementos constituyen un grupo diverso de (MGEs) encontrados tanto en bacterias Gram positivas como Gram negativas, son notables para codificar la maquinaria de conjugación requerida para la movilización de ICE a otras bacterias, donde a menudo se integran en genes múltiples copias tales como ARN transferencia (ARNt) y ARN ribosomal (ARNr) (Klima *et al.*, 2014).

Se ha descrito ICE, designado ICEMh1 en la cepa 42548 de *M. haemolytica* que portaban genes de resistencia a los aminoglucósidos (*aphA-I*, *strA*, *strB*), el gen de resistencia a las tetraciclinas (*tetH*) y el gen de resistencia de sulfonamidas (*sul2*) (Eidam *et al.*, 2013, 2015). ICEMh1 comparte un alto grado de similitud con ICEPmu1 identificado con *Pastereulla multocida* (Eidam *et al.*, 2015).

Se han codificado once genes de resistencia dentro de dos grupos de genes ICEPmu1 y ICEMh1, confiriendo resistencia a tetraciclinas (genes *tetR* - *tetH*), estreptomicina (*strA* y *strB*), estreptomicina y/o espectinomina (*aadA25*), gentamicina (*aadB*), kanamicina y/o neomicina (*aphAI*) fenicoles (*floR*), sulfonamidas (*sul2*), macrólidos y/o lincosamidas (gen *erm42*) o tilmicosina y/o tulatromicina (genes *msrE* y *mphE*) (Klima *et al.*, 2014; Michael *et al.*, 2012).

En cepas de *E. coli* se demostró una resistencia hasta 64 veces superior de la concentración mínima inhibitoria (MIC) para el florfenicol, lo que sugiere una actividad funcional del gen (*floR*), además

estaban presentes genes de resistencia a beta-lactamasa oxacilinas (*blaOXA-2*), lo cual confería una mayor resistencia a la ampicilina. *E.coli* puede albergar el *ICEPmu1* (Michael *et al.*, 2012), dado que muchos de los genes de resistencia ICEPmu1 pueden no ser originarios de la Familia *Pasteurellaceae*, la adquisición de determinantes de resistencia múltiples de antibióticos (AMR) pueda ser probablemente dado por la Familia *Enterobacteriaceae* (Michael *et al.*, 2012).

Dickey *et al.* (2016) publicaron la secuencia del genoma de un aislado de AMR de *Moraxella bovoculi* y *Mb58069* y encontraron que era resistente al florfenicol, oxitetraciclina, sulfonamidas y mostró resistencia intermedia a los macrólidos. Lo cual ubicó diez determinantes de AMR que fueron ubicados en una isla genómica mayor de 27 kb.

Resistencia a las Betalactamasas.

Dentro de las más de 890 beta-lactamasas que actualmente se han caracterizado, las familias más comunes dentro de las enterobacterias son los genes: *Bla_{TEM}*, *Bla_{SHV}*, *Bla_{OXA-1}* y *Bla_{CARB}*. Las dos primeras pertenecientes al grupo 2b, es decir son penicilasas, inhibidas por el ácido clavulánico y que en algunos casos también tienen acción contra cefalosporinas de tercera generación. En el caso de *Bla_{OXA-1}*, pertenece al grupo 2d donde están las penicilasas que se caracterizan por la hidrólisis de cloxacilina (oxacilina); por su parte *Bla_{CARB}* pertenece al grupo 2c, el cual se caracteriza por tener penicilasas con acción hidrolítica contra carbenicilina (Bush y Jacoby, 2010; Dallenne *et al.*, 2010).

Resistencia a las quinolonas.

Los mecanismos vinculados a la resistencia a quinolonas están relacionados con la transferencia de genes mediante plásmidos, como es el caso de los genes *qnr* que codifican a la familia de las proteínas *qnr* (*qnrA*, *qnrB*, *qnrS*, *qnrC* y *qnrD*) que se unen al ADN girasa (*gyrA* y *gyrB*) y a la topoisomerasa IV (*parC* y *parE*) disminuyendo la acción de las quinolonas. El aumento de la resistencia a esta familia de antibióticos se puede relacionar con el aumento de la MIC (concentración mínima inhibitoria) hacia diferentes quinolonas, en *E. coli* se ha notado que se habla de una “susceptibilidad disminuida”. Dado que en los últimos años se han descrito numerosos genes *qnr*, se ha efectuado una propuesta de nomenclatura (Cattoir *et al.*, 2007; Jacoby *et al.*, 2008) y se ha dispuesto una página web en lo que se reúne aquellos genes que se han descrito hasta la fecha y los que surjan en un futuro (Lahey Clinic, 2011).

Resistencia a las tetraciclinas.

De hecho, la resistencia a las tetraciclinas ha emergido en muchas bacterias comensales y patógenos debido a la adquisición del gen *tet*. Actualmente se encuentran descritos por los menos 40 genes *tet* y 3 *otr*. El mecanismo de resistencia antimicrobiana más común hacia las tetraciclinas es mediante;

- Sistemas de proteínas eflujo activo. Estas proteínas funcionan como un sistema de contratransporte, donde las proteínas captan un protón desde el espacio extracelular mientras evacua un complejo formado por el fármaco y un catión, utilizando como fuente de energía la fuerza motriz entregada por el gradiente electroquímico a través de la membrana citoplasmática (Roberts, 2008). El flujo del fármaco reduce la concentración intracelular de estas, protegiendo así a los ribosomas del citoplasma. Se han descrito en bacterias Gram negativas 26 genes que son codificantes de proteínas flujo activo como son; *tetA*, *tetB*, *tetC*, *tetD*, *tetE*, *tetG*, *tetH*, *tetI*, *tetJ*, *tetZ*, *tetK*, *tetL*, *tetV*, *tetY*, *tetP*, *ortB2*, *tcr32*, *tet (30)I* y *tet (31)I*, todos ellos previamente informados en *E. coli*.

Sin embargo, existen otros mecanismos de resistencia a las tetraciclinas como;

- Proteínas de protección ribosomal (PPRs). Es el mecanismo de resistencia más frecuentemente utilizado. Corresponde a proteínas plasmáticas solubles que protegen a los ribosomas de la acción de las tetraciclinas y confieren resistencia (Chopra y Roberts, 2001). Se han descrito 11 genes involucrados como son; *tetM*, *tetO*, *tetS*, *tetW*, *tetQ*, *tetT*, *tetPB³*, *te²* por mencionar algunos.
- Inactivación enzimática a la tetraciclina. El único ejemplo de resistencia por alteración enzimática a la tetraciclina se codifica por el gen *tetX*. El producto de este gen *tetX* es una proteína citoplasmática de 44 *kDa* que modifica químicamente la tetraciclina en presencia de oxígeno y NADPH.
- Mecanismo aún no definido de resistencia. Confiere un bajo nivel de resistencia a tetraciclinas. Entre los genes responsables se encuentra el gen *tetU* y *ortC*. El *tetU* que codifica una proteína menor que las proteínas de eflujo activo y que las PPRs. El mecanismo de resistencia codificado por el gen *otr(C)* tampoco ha sido identificado, debido a que aún no ha sido secuenciado, pero se ha especulado que no codifica ni para proteínas de eflujo ni la PPRs, pero aún no está totalmente esclarecido si codifica para la inactivación enzimática o

de un mecanismo aun no descrito (Chopra y Roberts, 2001; Levy *et al.*, 1989; Martí *et al.*, 2006; Roberts, 2008).

Resistencia a los fenicoles.

Dentro de los mecanismos de resistencia antimicrobiana al cloranfenicol, el más frecuente es el de la inactivación enzimática por acetilación mediante los diferentes tipos cloranfenicol acetiltransferasas (CAT) descritos. Estas CAT se dividen en dos tipos: tipo A y tipo B por sus diferencias en sus secuencias de aminoácidos. Además la resistencia a cloranfenicol puede estar mediada por sistemas de exportadores específicos para cloranfenicol y florfenicol (sus derivados), relacionados con genes como *cmlA* y *floR* (Chiu *et al.*, 2006; Schwarz *et al.*, 2004).

Resistencia a las sulfonamidas

Los mecanismos de resistencia a sulfonamidas y a trimetropim mayormente descritos, son los relacionados con la adquisición de genes mutantes mediante elementos móviles. En el caso de las sulfonamidas se han descrito los genes *sul1*, *sul2* y *sul3* relacionados con integrones y que codifican formas mutantes de la enzima dihidropteroato sintetasa que no pueden ser inhibidas por el antimicrobiano. Lo mismo sucede en el caso del trimetropim, se han descritos múltiples genes *dfr* que generan resistencia antimicrobiana (Danhem *et al.*, 2010; Ho *et al.*, 2009; Infante *et al.*, 2005).

En un estudio realizado en Australia, donde se aislaron *E coli* comensales a partir de muestras de heces de adultos sanos se determinó la presencia de los genes *sul1*, *sul2* y *sul3* (Kern *et al.*, 2002); así como de *dfrA1*, *dfrA5*, *dfrA7*, *dfrA12* y *dfrA17*, estos genes de resistencia principalmente relacionados con integrones tipo 1 y 2 (Bailey *et al.*, 2010)

De manera general, las enterobacterias a nivel mundial presentan alta resistencia hacia diversos antibióticos y estas están asociados a diversos genes de resistencia antimicrobiana, como se muestra en el Cuadro 2 (Cattoir *et al.*, 2007; C. Chiu *et al.*, 2006; Dallenne *et al.*, 2010; Grape *et al.*, 2003; Martí *et al.*, 2006; Mosquito *et al.*, 2011).

Cuadro 2. Genes de resistencia y mecanismo de acción asociados en bacterias (tomado y modificado de Mosquito *et al.*, 2011).

Familia de antibióticos	Mecanismo de acción	Mecanismo de resistencia	Genes implicados
Betalactámicos	Interfiere en las últimas fases de la síntesis del peptidoglicano, componente necesario en la formación de la pared bacteriana	Betalactamasas: enzimas que se caracterizan por hidrolizar el enlace amida del núcleo Betalactámicos, inactivando de esta manera el antibiótico	Genes que codifican betalactamasas: <i>bla_{TEM}</i> , <i>bla_{SHV}</i> , <i>bla_{CARB}</i> , <i>bla_{OXA}</i> , <i>bla_{CTX-M}</i> y <i>bla_{GES}</i>
Quinolonas	Inhibe la acción de las topoisomerasas y del ADN girasa bacterianas	Mutaciones puntuales que generan el cambio de aminoácidos en la enzima blanco del antibiótico Sistemas de expulsión Presencia de genes plasmídicos de resistencia antibiótica	Mutaciones a nivel de <i>gyrA</i> (gen que codifica una subunidad de la ADN girasa) y <i>parC</i> (gen que codifica una subunidad de la topoisomerasa IV). AcrAB-like (sistema presente en diferentes enterobacterias) familia de genes <i>qnr</i> (<i>A</i> , <i>B</i> , <i>C</i> , <i>D</i> y <i>S</i>) que codifican proteínas Qnr que impiden estéricamente la unión del antibiótico al blanco. Gen que codifica la variante <i>cr</i> de la acetiltransferasa 6' (<i>AAC</i> (6')- <i>Ib-cr</i>), capaz de acetilar fluoroquinolonas
Tetraciclinas	Se unen al ribosoma bacteriano, inhibiendo la síntesis de proteínas	Presencia de bombas de eflujo específicas para tetraciclinas	Genes <i>tetA</i> y <i>tetB</i> que codifican sistemas de eflujo
Cloranfenicol	Inhibidor de la biosíntesis de las proteínas, previene la elongación de la cadena de péptidos al unirse al centro de la peptidiltransferasa del ribosoma 70S	Inactivación enzimática por acetilación Exportadores específicos de cloranfenicol	Gen <i>cat</i> que codifica a la enzima cloranfenicol acetiltransferasa Genes <i>floR</i> y <i>cmlA</i>
Sulfonamidas	Inhibe la síntesis de la enzima dihidropteroato sintasa (Sulfametaxazol) y de la enzima dihidrofolato reductasa (Trimetropim), las cuales son enzimas necesarias en la ruta del ácido fólico	Presencia de genes que codifican formas mutantes de la enzima blanco	Genes <i>sul1</i> , <i>sul2</i> y <i>sul3</i> (Sulfametaxazol) y genes <i>dfr</i> (Trimetropim)

En la actualidad hay poca información sobre la prevalencia de los determinantes de resistencia múltiple de antibióticos y de los elementos integrativos y conjugables (AMR-ICE) en los agentes, lo cual representa un riesgo crítico para la eficacia de la futura terapia antimicrobiana. La adquisición simultánea y rápida de múltiples genes de resistencia a través de un único evento fortuito, podría limitar severamente las opciones terapéuticas (Cameron y McAllister, 2016).

2.3.1 Antecedentes de la nanociencia y nanotecnología.

La nanociencia se ha encargado del estudio de los átomos para que la nanotecnología produzca, diseñe y utilice de estructuras, dispositivos y sistemas mediante el control de la forma y tamaño de materiales a escala nanométrica con aplicaciones en las diversas áreas de la ciencia, en ingeniería y en la tecnología (Hornyak *et al.*, 2009; Initiative, 2002; Frejo *et al.*, 2011).

En el caso de la nanomedicina, ésta es la aplicación de la nanotecnología para realizar diagnóstico médico, tratamiento y prevención de enfermedades, aprovechando las propiedades físicas, químicas y biológicas mejoradas de los materiales a nanoescala. En el caso de los nanofármacos, la mayoría de ellos se han investigado y aprobado en oncología y le siguen los antiinfecciosos (Frejo *et al.*, 2011).

Los nanomateriales son estructuras que se encuentran en un rango de tamaño de 1 a 100 nm, aunque algunos autores incluyen a aquellos que miden incluso 1000 nm (Buzea *et al.*, 2007; Edwards-Jones, 2009; Le *et al.*, 2010; Mohanraj y Chen., 2006; Morones *et al.*, 2005; Rai *et al.*, 2012; Sharma *et al.*, 2009; Zhang *et al.*, 2001). El tamaño de los nanomateriales es un parámetro de interés, debido a su impacto a nivel biológico y las propiedades de los nanomateriales dependen de los elementos que los constituyen y de su forma (Mohanraj y Chen, 2006).

Algunos nanomateriales tienen efectos contra los microorganismos patógenos. Los “nanoantibióticos” (Huh y Kwon, 2011) son nanomateriales que muestran una actividad antimicrobiana o que elevan la efectividad y seguridad de los antibióticos. Las nanopartículas metálicas son un buen ejemplo de nanoantibióticos. En la Figura 4, se aprecia los diferentes nanomateriales con propiedades antimicrobianas y se muestran sus aplicaciones potenciales, aunque es importante destacar que faltan muchos estudios todavía.

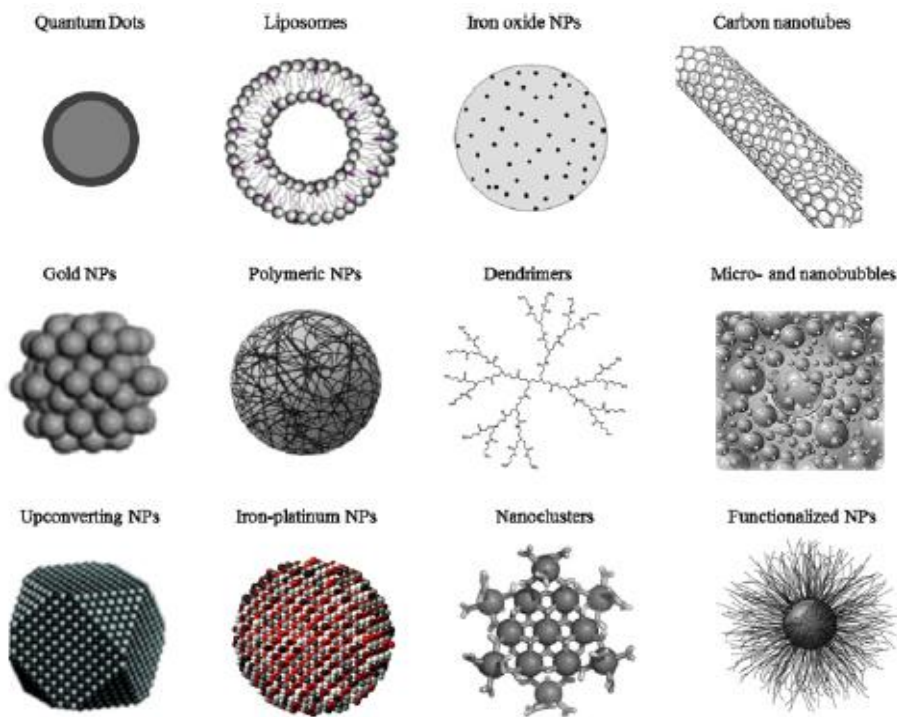


Figura 4.-Tipos de nanopartículas. Nanopartículas son comúnmente definidas como objetos con dimensiones de 1-100 nm. En esta ilustración es representado la morfología de las NPs más comúnmente usados y más prometedoras (Re *et al.*, 2012)

Entre los nanomateriales más estudiados por la bionanomedicina, se encuentran las nanopartículas metálicas, tales como las de plata (AgNPs) (Franci *et al.*, 2015), de oro (AuNPs) (Mateo *et al.*, 2013) dióxido de titanio (TiO₂NPs) y el zinc (ZnNPs) (Yao *et al.*, 2018). Las nanopartículas NPs metálicas presentan características importantes para las áreas microbiológicas y biomédicas (Sondi y Salopek-Sondi, 2004), aunque también muchas de ellas presentan riesgos potenciales para la salud y el ambiente.

2.3.2 Antecedentes del uso de la plata y las nanopartículas de plata.

Históricamente la plata ha sido utilizada ampliamente por algunas civilizaciones desde la antigüedad con diferentes propósitos, principalmente para la desinfección del agua (Jain y Pradeep, 2005). Muchas sociedades han usado la plata como joyería, adornos, bajillas finas, aleaciones dentales, fotografía, fabricación de monedas, explosivos, etc. y se consideró que la plata brindaba beneficios de salud a los usuarios (Chen y Schluesener, 2008). En el antiguo sistema médico indio Ayurveda, la plata se describió como agente terapéutico de muchas enfermedades. Existe un uso cada vez mayor de la plata como agente antibacteriano y antifúngico eficaz en productos para el cuidado de heridas y dispositivos médicos (Kim *et al.*, 2007; Lara *et al.*, 2010; Salata, 2004; Shahverdi *et al.*, 2007).

A partir del siglo XVII se describe la plata y sus derivados como un producto medicinal con múltiples propósitos y a fines del siglo XIX se introduce la solución de nitrato de plata para uso en gotas oculares en el recién nacido. En la década de 1920 la Food and Drug Administration (FDA) de los Estados Unidos aprueba soluciones de plata iónica (electrocoloidales) como agentes antibacterianos. Existen indicios de que las nanopartículas de plata (AgNPs) se encuentran presentes desde siempre en la naturaleza y que la producción deliberada de AgNPs se practica desde hace más de 100 años, siendo uno de los nanomateriales más comúnmente utilizados (Ge *et al.*, 2014).

El primer reporte de obtención de nanopartículas de plata data de 1889, cuando M.C. Lea informa sobre la síntesis de plata coloidal estabilizada con citrato, procedimiento mediante el cual el tamaño promedio fue de 7 a 9 nm. A partir de 1897 se comercializa un producto bajo el nombre de “Collargol”, conteniendo nanopartículas con un tamaño promedio de 10 nm y utilizándose para aplicaciones terapéuticas en la medicina. También se describe en 1902, la estabilización de la nanoplatina utilizando proteínas. En 1953 Moudry patenta un producto con nanopartículas de plata de 2 a 20 nm estabilizada en gelatina y estas fueron utilizadas desde hace tiempo por sus propiedades bactericidas en el tratamiento de heridas (Nowack *et al.*, 2011).

Después de la introducción de los antibióticos en 1940, se disminuyó el uso de la plata, sin embargo en los últimos años como consecuencia de la resistencia bacteriana, una mejora en la tecnología aplicada y al uso de polímero vuelve ser utilizada (Rigo *et al.*, 2013).

2.3.3 Propiedades bactericidas de las nanopartículas de plata.

Las nanopartículas de plata AgNPs son consideradas muy atractivas por diversos investigadores, porque llegan a ser no tóxicas en el humano y animales a bajas concentraciones y poseen un espectro de acción muy diverso con propiedades bactericidas (Baker *et al.*, 2005; Kim *et al.*, 2007; Rai *et al.*, 2012; Doddapaneni *et al.*, 2018), además de capacidades antivirales (Rai *et al.*, 2014), antiparasitarias, (Allahverdiyev *et al.*, 2011), antifúngicas (Doddapaneni *et al.*, 2018) y también posee propiedades deseables en la clínica, tales como su capacidad antiinflamatoria (Nadworny *et al.*, 2008), la promoción de la regeneración de tejidos con quemaduras (Klasen, 2000), antidiabética (Rajaram *et al.*, 2015) y anticancerígena (Doddapaneni *et al.*, 2018).

La actividad biocida de las AgNPs depende de varias características morfológicas y fisicoquímicas, por ejemplo, tamaño, forma y superficie, que influyen directamente en el éxito de estos compuestos como agentes antimicrobianos. Se ha demostrado una acción antibacteriana mejor de las AgNPs cuando las partículas son más pequeñas dentro del rango de tamaño del nanómetro, se ha visto que

parece mejorar la permeabilidad de los iones Ag⁺ en las células microbianas facilitando la muerte celular (Devi *et al.*, 2014).

Algunos científicos han estudiado la actividad bactericida de las nanopartículas de plata frente a cepas patógenas y cepas multirresistentes, se ha demostrado que las nanopartículas de plata son armas poderosas contra las bacterias MDR como; *Pseudomonas aeruginosa*, *Escherichia coli* resistente a la ampicilina, *Streptococcus pyogenes* resistente a la eritromicina (Saravanan y Nanda, 2010), *Streptococcus epidermitis* y *Streptococcus mutans* resistente a la meticilina (Espinosa-Cristóbal *et al.*, 2009), *Staphylococcus aureus* resistente a la meticilina (MRSA) (De Souza *et al.*, 2006; Panáček *et al.*, 2006; Ayala-Núñez *et al.*, 2009; Espinosa-Cristóbal *et al.*, 2009) y *Staphylococcus aureus* resistente a la vancomicina (VRSA) (Ayala-Núñez *et al.*, 2009), aunque también se han probado en cepas de *Acinetobacter*, *Salmonella typhus*, *S. typhi*, *S. typhimurium*, *Proteus subtilis*, *P. morganii*, *P. vulgaris*, *Klebsiella pneumoniae*, *Yersinia enterocolitica*, *Acinetobacter baumannii* y *Vibrio cólera*, *Bacillus subtili*, *Clostridium*, *Enterococcus faecalis*, *Listeria*, *S. epidermidis* y *Streptococcus pyogenes* (Morones *et al.*, 2005; Irwin *et al.*, 2010; Lara *et al.*, 2010; Inbaneson *et al.*, 2011; Geethalakshmi y Sarada, 2012; Mukha *et al.*, 2013; Niakan *et al.*, 2013; Vijayakumar *et al.*, 2013; Paredes *et al.*, 2014).

Uno de los inconvenientes que se han encontrado para el uso de las nanopartículas es la generación de resistencia después de una exposición por tiempo prolongado, debido a la presencia de reportes de resistencia bacteriana a los metales pesados como el mercurio y la plata (McDonnell y Russell, 1999), sin embargo, dado que las características de las nanopartículas son diferentes con respecto al material de origen, los mecanismos de resistencia observados en los metales pesados no se han presentado en las nanopartículas (Iniative, 2002; Sondi y Salopek-Sondi, 2004; Morones *et al.*, 2005; Hornyak *et al.*, 2009; Lara *et al.*, 2011). Un estudio realizado en bacterias de sedimento con multirresistencia, señala que las bacterias expuestas por un tiempo prolongado a las nanopartículas no generan resistencia y no se observó un efecto cruzado entre antibióticos y nanopartículas (Niakan *et al.*, 2013). Estudios recientes por (Panáček *et al.*, 2018) reporta que bacterias Gram negativas como *Escherichia coli* 013, *Pseudomonas aeruginosa* CCM 3955 y *E. coli* CCM 3954 pueden desarrollar resistencia a las nanopartículas de plata después de la exposición repetida. La resistencia se deriva de la producción de la proteína flagelina adhesiva flagelo, que desencadena la agregación de las nanopartículas.

2.3.4 Síntesis y mecanismo de acción de las nanopartículas de plata.

Síntesis de las nanopartículas de plata.

Hay numerosos reportes sobre la síntesis de la nanopartículas de plata (Sun y Xia, 2002; Panáček *et al.*, 2006; Nair y Laurencin, 2007). En general, existen dos estrategias para producir NPs metálicas. El primer método es el llamado “bottom-up” (abajo-hacia arriba) que usan métodos químicos en solución coloidal, son procesos de formación de partículas a partir de una solución, donde las nanoestructuras se obtienen mediante el ensamblaje de unidades básicas más pequeñas en estructuras más grandes.

El otro método es el de “top-down” (arriba-hacia abajo) que utiliza métodos de físicos, procesos de molienda, que comienza a partir de material cuyo tamaño se reduce durante el proceso hasta llegar a un tamaño nanométrico con un consumo considerable de energía. Las técnicas top-down incluyen, fotolitografía y litografía por haz de electrones (Sun y Xia, 2002; Eustis *et al.*, 2006).

Mecanismos de acción de las nanopartículas plata (AgNPs).

Aunque, las AgNPs han demostrado ser efectivos contra más de 650 microorganismos incluidas bacterias tanto Gram positivas como Gram negativas, hongos y virus, aun no se comprende por completo el mecanismo preciso de su modo de la acción antimicrobiana (Malarkodi *et al.*, 2013). Sin embargo, se han reconocido algunos mecanismos de acción antimicrobiana de las AgNPs Figura 5.

La acción antimicrobiana de AgNPs está vinculada con cuatro mecanismos bien definidos:

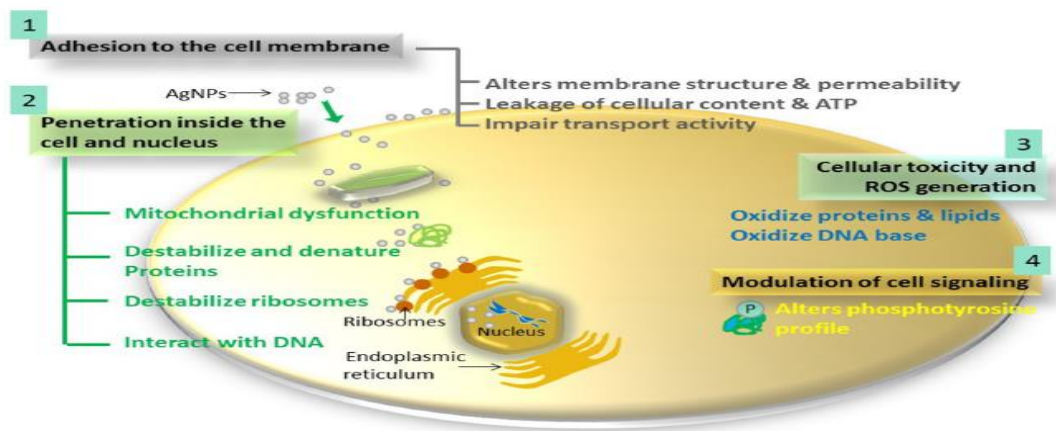


Figura 5. Mecanismo de acción de las AgNPs.

- Adhesión de las AgNPs a la superficie de la pared celular y la membrana.

La exposición de las AgNPs a microorganismos provoca la adhesión de nanopartículas a la pared celular y a la membrana. La carga superficial positiva de las AgNPs es crucial para la adhesión (Abbaszadegan *et al.*, 2015).

La carga positiva confiere atracción electrostática entre los AgNPs y la carga negativa de la membrana celular de los microorganismos, facilita la unión de las AgNPs a las membranas celulares. Los cambios morfológicos se hacen evidentes en dicha interacción y pueden caracterizarse por la contracción del citoplasma y de la membrana, lo que finalmente conduce a ruptura de la pared celular (Nalwade y Jadhav, 2013), de manera que aumenta la permeabilidad de la bacteria (Sondi y Salopek-Sondi, 2004). Se ha observado una atracción entre las mismas cargas cuando las NPs tienen carga negativa, pero es más débil la interacción (Chamakura *et al.*, 2011).

- Penetración de AgNPs dentro de la célula y daño de las estructuras intracelulares (mitocondrias, vacuolas, ribosomas) y biomoléculas (proteínas, lípidos y ADN).

En situaciones en donde las AgNPs penetran la célula microbiana, puede interactuar con estructuras celulares y biomoléculas lo cual tienen efectos dañinos sobre los microorganismos. En particular, la interacción de las AgNPs con los ribosomas conduce a su desnaturalización causando la inhibición de la traducción y la síntesis de proteínas (Morones *et al.*, 2005; Jung *et al.*, 2008; Rai *et al.*, 2012).

Se ha demostrado que los iones Ag (+) pueden interactuar con los grupos funcionales de las proteínas, lo que resulta en su desactivación (Klueh *et al.*, 2000; Rai *et al.*, 2012). Tanto las AgNPs y como los iones Ag (+) alteran la estructura tridimensional de las proteínas en la interacción e interfieren con los enlaces disulfuro y bloquean los sitios activos de unión que conducen a todos los defectos funcionales en el microorganismo (Lok *et al.*, 2006).

Bhattacharya y Mukherjee, (2008), demostraron la inhibición del metabolismo de la glucosa, esto se debe a la inactivación de la enzima fosfomanosa-isomerasa en la interacción con las AgNPs. La fosfomanosa isomerasa media la isomerización del fosfato de manosa-6 en fructosa-6-fosfato, este último es un intermediario importante en el ciclo glucolítico.

Se ha demostrado que la interacción entre las AgNPs con el ADN, puede causar daño en el proceso de la transcripción del ADN e interrupción en la división celular (Hsueh *et al.*, 2015; Kumar *et al.*, 2016). Las AgNPs causa daños en el ADN produciendo roturas en la cadena y mutaciones en genes esenciales de reparación de ADN (*mutY*, *mutS*, *mutM*, *mutT* y *nth*) (Radzig *et al.*, 2013). Se ha encontrado que los iones Ag (+) forman complejos con ácidos nucleicos, los iones Ag (+) se intercala entre los pares de bases de purina y pirimidina, interrumpe los enlaces hidrogeno (H⁺) entre las pares de bases de las cadenas de ADN antiparalelas, allí interrumpe la estructura de doble hélice (Klueh *et al.*, 2000) y la intercalación de las AgNPs en la hélice de ADN puede bloquear la transcripción de genes en microorganismos (Morones *et al.*, 2005).

Cuando las AgNPs interactúa con cepas de *S. aureus*, la división celular se inhibe en sus etapas iniciales (Jung *et al.*, 2008) sugiriendo que la interacción de los iones Ag (+) con el ADN puede tener un papel en la prevención de la división y reproducción celular (Monteiro *et al.*, 2012).

- Inducción de toxicidad celular y estrés oxidativo causado por la generación de especies reactivas de oxígeno (ROS) y radicales libres de las AgNPs.

El aumento del estrés oxidativo celular en los microbios es una indicación de los efectos tóxicos causados por los iones de metales pesados, como la Ag (+). La potente actividad antibacteriana, antifúngica y antiviral de las AgNPs se debe a su capacidad de producir ROS y especies de radicales libres como el peróxido de hidrógeno (H₂O₂), anión superóxido (O₂⁻), radical hidroxilo (OH), ácido hipocloroso (HClO) y único agente tóxico genético (Kim *et al.*, 2011).

La generación de ROS en células bacterianas causa muerte celular, aunque el mecanismo preciso de la actividad antibacteriana mediada por ROS de las AgNPs no es completamente clara (Pellieux *et al.*, 2000). Este efecto tóxico puede deberse a la unión de iones Ag (+) a la membrana celular de los microorganismos, que en consecuencia transmite la señalización y bloquea la función respiratoria mitocondrial de los microbios (Blecher y Friedman, 2012).

- Modulación de las vías de transducción de señales.

El ciclo de fosforilación y cascada de desfosforilación es un mecanismo de transmisión de señales en microorganismos esenciales para el crecimiento microbiano y la actividad celular (Kirstein y Turgay, 2005).

El examen del perfil de fosfotirosina de las proteínas bacterianas tanto de Gram positivas como Gram negativas ofrece una manera muy útil de estudiar el efecto de las AgNPs en las vías de transducción de señales bacterianas. Estas vías de señalización afectan el crecimiento bacteriano y otras actividades moleculares y celulares (Mijakovic *et al.*, 2003; Mijakovic, *et al.*, 2005; Mijakovic, *et al.*, 2006). Las proteínas fosforiladas resultantes tienen un papel esencial en la replicación del ADN, en la recombinación, en el metabolismo y el crecimiento de las bacterianas y por lo tanto, la inhibición de la fosforilación de las proteínas inhibiría su actividad enzimática, lo que provocaría la inhibición del crecimiento bacteriano de una manera similar (Iniesta *et al.*, 2006).

Además de estos cuatro mecanismos bien reconocidos, las AgNPs también modulan el sistema inmune de las células humanas al orquestar la respuesta inflamatoria, lo que ayuda aún más a inhibir los microorganismos (Tian *et al.*, 2007).

III. JUSTIFICACIÓN.

La queratoconjuntivitis contagiosa ovina (QCO) es una enfermedad que causa pérdidas económicas importantes en la producción ovina y caprina a nivel mundial, además de afectar la salud y el bienestar animal de los animales afectados. A nivel nacional existen escasos estudios de las enfermedades oculares en ovinos como es el caso de la QCO, caso contrario, lo que sucede en la queratoconjuntivitis infecciosa bovina (QIB) donde los estudios son más extensos. Las especies del género *Moraxella* están involucrados en los procesos de la QCO y QIB, sin embargo, aún no se conoce por completo el papel que juega cada uno de ellos.

El uso de compuesto antimicrobianos en la producción animal ha sido una práctica no regularizada que carece de control y supervisión, como consecuencia de esto se ha causado el desarrollo de cepas resistentes, para lo cual, existe evidencia de la aparición de cepas de *Moraxella* spp. resistentes a diversos fármacos. Con respecto a *Moraxella* spp. actualmente no hay reportes de estudio que demuestren la presencia de genes de resistencia antimicrobiana y de los elementos integrativos y conjugables (AMR-ICE) vinculados en estas bacterias, lo cual abriría una brecha a nuevas líneas de investigación con respecto al riesgo que representa para la eficacia de la futura terapia antimicrobiana, lo que conlleva, a un reto científico muy importante para descubrir, diseñar o fabricar nuevas alternativas terapéuticas que permitan combatirlos de una manera más eficiente.

Las nanopartículas de plata se consideran ahora una alternativa viable al uso de los antibióticos, parecen tener un alto potencial para resolver el problema de la aparición de bacterias multirresistentes. Las distintas nanopartículas poseen características variables, que pueden ser aprovechadas en las áreas biomédicas, algunas ventajas de las NPs son: baja citotoxicidad, menores costos de producción y la posibilidad de sobrepasar los mecanismos de resistencia, así como, un efecto antibacteriano mayor especialmente en bacterias Gram negativas.

Así que, las nanopartículas de plata podrían ser una opción al uso de los antibióticos, en la clínica veterinaria de campo y en la aparición de cepas *Moraxella* spp. resistentes asociados a problemas oculares en ovinos.

IV. HIPÓTESIS.

El uso de las nanopartículas de plata *in vitro* será eficaz para la inhibición del desarrollo *Moraxella* spp. multirresistentes, obtenidas de casos clínicos de queratoconjuntivitis en ovinos en el Estado de México.

V. OBJETIVO.

Objetivo general

Evaluar la eficacia del efecto bactericida de las nanopartículas de plata contra en cepas de *Moraxella* spp. multirresistentes.

Objetivos específicos

- Aislar y realizar la caracterización fenotípica de *Moraxella* spp. obtenidas de muestras de casos clínicos de queratoconjuntivitis en ovinos en el Estado México.
- Caracterizar genótipicamente a través de los genes *16S rRNA* y *rtxA* los aislados *Moraxella* spp. obtenidos previamente de casos clínicos de queratoconjuntivitis en ovinos.
- Determinar la sensibilidad antimicrobiana *in vitro* de aislados de *Moraxella* spp.
- Amplificar la presencia de los genes *sul1*, *sul2*, *tetB*, *qnrA*, *qnrB*, *floR* y *Bla_{TEM}* que pueden conferir resistencia antimicrobiana a los aislados *Moraxella* spp.
- Determinar el efecto bactericida *in vitro* de las nanopartículas de plata contra *Moraxella* spp. multirresistentes.

VI. MATERIALES Y MÉTODOS.

Diseño de la investigación.

El diseño de la investigación del proyecto se basó en el método científico, constructivista, positivista, experimental y descriptivo.

Límite de tiempo y espacio.

El proyecto de investigación comprendió del periodo de febrero de 2017 a enero de 2019. La recolección de las muestras de casos de queratoconjuntivitis contagiosa ovina se realizó en 15 unidades de producción ovina ubicada en 11 localidades de 6 municipios perteneciente al Estado de México (Lerma, Xonacatlán, Capulhuac, Toluca, Calimaya y Tenango) durante el periodo primavera-verano de febrero a junio del 2017. Las unidades de producción ovina están distribuidas en la Región VII Lerma y Región XII Toluca pertenecientes a la Macro región I Toluca, Estado de México ubicados a una latitud: 18° y longitud: -90.8903 Cuadro 3.

Cuadro 3. Distribución de las unidades producción ovina de casos de QCO en el Estado México.

Municipio	Localidad	N° de unidad de producción	Animales dentro del hato	Región VII Lerma	Región XII Toluca
Lerma	3	3	80	Lerma	
Xonacatlán	1	3	117	Xonacatlán	
Capulhuac	1	1	43	Capulhuac	
Toluca	3	4	189		Toluca
Tenango	2	3	282		Calimaya
Calimaya	1	1	150		Tenango
N	11	15	861	3	3

Se realizó un muestreo piloto, para obtener el valor indicador de $p = 0.23$ (107/454), con la finalidad de estimar el tamaño de muestra final del estudio (Arango, 2009), este valor servirá como indicador de la prevalencia, ya que no se dispone de información en la literatura sobre la prevalencia de la queratoconjuntivitis contagiosa ovina en el Estado de México y dentro del territorio nacional, en este caso de realizar un muestreo piloto presenta la ventaja que si el muestreo se realiza de manera adecuada estas mismas muestras podrán ser parte del tamaño del muestreo final.

Las pruebas de identificación bacteriológicas, moleculares y ensayos antimicrobianos de las nanopartículas de plata se realizaron en las áreas de Bacteriología y Biología Molecular del Centro de Investigación y Estudios Avanzados en Salud Animal, CIESA; Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia, Universidad Autónoma del Estado De México, Km, 15.5 Carretera Toluca-Atlacomulco, Toluca, Estado de México, C.P 50090, México.

Tamaño de la muestra

Para la estimación del tamaño de muestra se utilizó la fórmula para población finitas, utilizando la formula estadística de estimación de proporciones.

$$n = \frac{N * Z_{\alpha}^2 * p * q}{d^2 * (N - 1) + Z_{\alpha}^2 * p * q}$$

Donde:

N = Total de población ($N= 861$)

Z_{α}^2 = nivel de confianza = 95%

p = probabilidad de que ocurra el evento.

q = 1- p , probabilidad de que no ocurra el evento.

d = error estimado (al 5%).

n = tamaño de la muestra.

Para la estimación del indicador de p , se realizó un muestreo piloto, obtenido un valor de $p = 0.23$ (107/454) (Arango, 2009).

Toma de muestras e identificación de aislados

Se identificaron a los animales con afecciones oculares sugerentes con QCO dentro de los rebaños a través de una exploración clínica y pruebas oftalmológicas, se determinó el grado de lesión. Se

recolectaron las muestras por medio de un hisopo estéril realizando un pase de la descamación conjuntival sin tocar el borde palpebral, teniendo cuidado de no contaminar la muestra (Akerstedt y Hofshagen, 2004).

Posteriormente el hisopo se colocó en medio de transporte Stuart (MTS, Cat 1058A, Dibico en México S.A de C.V) se mantuvo la muestra en refrigeración a 4°C para su conservación y su transporte hasta ser procesadas dentro del laboratorio de bacteriología del Centro de Investigación y Estudios Avanzados en Salud Animal (CIESA) de la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia de la Universidad Autónoma del Estado de México.

Identificación bacteriológica de aislados *Moraxella* spp.

Las muestras se incubaron en placas de agar base sangre contiene el 5% de sangre desfibrinada ovina (ABS, BLL, Cat BD211037 Becton, Dickison en México) durante 24 a 48 hrs a 37°C en condiciones aerobios. Para la identificación bacteriológica se realizó las siguientes pruebas bioquímicas convencionales, movilidad bacteriana, producción de oxidasa y catalasa, producción de ácido o gas a partir de glucosa sacarosa y lactosa (TSI), la fenilalanina (AF, Cat 211785, Bioxon, Becton Dickison en México), para formar indol y ácido fenilpirúvico, respectivamente, producción de ureasa (CU, Cat BD227210, Difco, Becton Dickison en México), detección de aislamientos fermentadores de lactosa y producción de exoenzimas como gelatinasa (AG, Cat BD214340, Difco, Becton Dickison en México), desoxirribonucleasas (ADNase ,Cat BD227210,Bioxon, Becton Dickison en México), reducción de nitrato (CN, Cat BD226810,Bioxon, Becton Dickison en México). Además, se evaluó la actividad β -hemolítica por la aparición de un halo transparente en el medio de cultivo de agar sangre alrededor de las colonias aisladas (Angelos y Ball, 2007; Angelos *et al.*, 2007; Fraser-Gilmour 1979; Shen *et al.*, 2011).

Pruebas moleculares de aislados *Moraxella* spp.

Extracción de ADN.

La preparación rápida de ADN se realizó a partir de una colonia en un volumen total de 100 μ L de agua destilada estéril a 95°C durante 10 minutos seguido de una etapa de centrifugación a 9279 g (Eppendorf Centrifuga 5415D,USA) de la suspensión celular y posteriormente la recolección de la extracción del ADN (Dallenne *et al.*, 2010). Como control negativo se utilizó cepa de *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 en el PCR.

Primers.

La identificación genotípica de las especies del género *Moraxella* se realizó por medio de la amplificación de los fragmentos *16S rRNA* y la región 3' *rtxA* que codifica para la citotóxina A. En el Cuadro 4., se muestra la secuencia de los cebadores y el tamaño del amplicón.

Cuadro 4. Identificación de especies de <i>Moraxella</i> con primers específicos.					
Gen	Especie	Cebadores	Secuencia 5' - 3'	Tamaño del fragmento	Referencia
<i>rtxA</i>	<i>M. bovis</i>	<i>MbxAF</i>	5' GCA AAA CTG GCA ATG ACG A 3'	943 pb	(Farias <i>et al.</i> 2015)
		<i>MbxAR</i>	5' GTG CCA TTG ACC CAA CTA GC 3'		
	<i>M. bovoculi</i>	<i>MbvAF</i>	5' AAT GCT GGT GCT GGT AAC GA 3'	990 pb	Fariás <i>et al.</i> (2015)
		<i>MovAR</i>	5' TGG TTG CAG GGT ATT GGA GC 3'		
<i>16s rRNA</i>	<i>M. ovis</i>	<i>Ovi16S1F</i>	5' GAA CGA TGA GTA TCC AGC TTG CT 3'	1849 pb	Shen <i>et al.</i> (2011)
		<i>Ovis1849R</i>	5' CTC TTT ACT TTG GTT AAT TAT TTT GTT GGA 3'		
	<i>M. bovoculi</i>	<i>Bovo1915R</i>	5' TGT ATT GGG TAC AAT CAC CAT GG 3'	1859 pb	Shen <i>et al.</i> (2011)
		<i>Bviv16S1F</i>	5' GAA CGA TGA CTA TCT AGC TTG CTA GAT ATG 3'		
<i>M. bovis</i>	<i>Bovi1541R</i>	5' AGC TAT AGA CCC AAT TTA ACT TAC GCT ACT 3'	1541 pb	Shen <i>et al.</i> (2011)	

Identificación genética de aislamientos de *Moraxella*.

Gen *16S rRNA*.

Para la amplificación del gen *16s rRNA* se realizó un PCR multiplex utilizando un volumen de reacción total de 25 µL. Se usó 12.5 µL de Master Mix (Gotaq Green Master Mix, Cat M7122 Promega), 1 µL de cada cebador (*Ovi16S1 F/ Ovis1849 R*, *Bovo1915 R* y *Bviv16S1 F/ Bovi1541 R*), 5 µl de la extracción de ADN bacteriano y 3.5 µL de agua libre de nucleasas (Cat.P1195, Promega). Las reacciones de PCR se realizaron en un termociclador (MultiGene™ Mini, TC 020-24, Labnet International Inc, California, USA) y se usó el siguiente protocolo de temperaturas: una desnaturalización inicial a 95°C durante 5 min, seguido de 35 ciclos de 40 s a 95°C, 40 s a 55°C y 1 min a 72°C y finalmente la extensión a 72°C durante 7 min. La calidad de los productos de PCR se determinó en un gel de agarosa al 1.0%, posteriormente se tiñó con bromuro de etidio y se visualizó

mediante irradiación UV (Mini-Bis 16mm, DNr Bio-Imaging Systems Transluminador, Israel), el tamaño de amplicón para *Moraxella bovoculi* es de 1859 pb, para *Moraxella bovis* es de 1541 pb y para *Moraxella ovis* es de 1849 pb (Shen *et al.*, 2011).

Gen *rtxA* que codifica la citotóxina A (*mbxA*, *mbvA* y *movA*).

Para la amplificación del gen *rtxA* se llevó a cabo una mezcla de reacción total de 25 µL por medio de un PCR multiplex. Se usó 12.5 µL de Master Mix (Gotaq Green Master Mix, Cat M7122 Promega), 1 µL de cada cebador (*mbxA F/mbxA R*, *mbvA F/MovA R*), 5 µl extracción de ADN y 4.5 µL de agua libre de nucleasas (Cat.P1195 Promega). Las reacciones de PCR se realizaron en un termociclador (MultiGene™ Mini, TC 020-24, Labnet International Inc, California, USA) y se usó el siguiente protocolo de temperaturas; una desnaturalización inicial a 95°C durante 5 min seguido de 35 ciclos de 95°C durante 50 s, 65°C durante 50 s, 72°C durante 1 min y una extensión final 72°C por 4 min. La calidad de los productos de PCR se determinó en un gel de agarosa al 1%, posteriormente se realizó una tinción bromuro de estudio y se visualizó mediante irradiación ultravioleta (Mini-Bis 16mm, DNr Bio-Imaging Systems Transluminador, Israel), el tamaño de amplicón para *Moraxella bovoculi* es de 990 pb, *Moraxella bovis* es de 943 pb y *Moraxella ovis* es de 990 pb (Farias *et al.*, 2015).

Prueba de sensibilidad antimicrobiana en aislados de *Moraxella* spp.

A partir de un aislado puro de la bacteria, se seleccionaron entre 4 o 5 colonias y se transfirieron estas a un tubo que contiene 3 a 5 cm³ de Mueller-Hinton (MH, BBL™, Becton, Dickinson en México), se ajustó a una escala de 0.5 Mc Farland lo que equivale a una concentración de 1-2 x 10⁸ UFC/mL. Posteriormente se inoculó el aislado en la superficie del agar Mueller-Hinton suplementada al 5% con sangre ovina (AMH, BD Bioxon, Becton, Dickinson de México) y se colocaron los unidiscos con una concentración conocida de ampicilina (10 µg), carbencilina (100 µg), cefalotina (30 µg), cefotaxima (30 µg), ciprofloxacina (5 µg), cloranfenicol (30 µg), nitrofurantoina (300 µg) netilmicina (30 µg), gentamicina (10 µg), amikacina (30 µg), sulfametoxazol/trimetopim (25 µg), norfloxacina (10 µg), tetraciclina (30 µg), ácido nalidixico (30 µg), finalmente se incubaron las placas con los unidiscos, a una temperatura de 37°C por 24 horas (Bernal y Guzman, 1984).

Para la interpretación de los resultados del método difusión en disco se determinaron los perfiles sensibles (S), intermedio (I) y resistente (R) y estos fueron definidos a partir de los diámetros de los halos de inhibición total antimicrobiana, ya que los diámetros tienen una relación inversa con la

concentración mínima inhibitoria se aprecia en la Figura 6. Se utilizaron los criterios establecidos y estandarizados para patógenos Gram-negativos asociados a la enfermedad respiratoria bovina y en bacterias fastidiosas (CLSI; 2012, 2013, 2016), como se visualiza en los Cuadro 5 y 6, puesto que, para *Moraxella spp.*, aun no se tiene criterios de estandarización establecida. Y como cepa control se utilizó *Escherichia coli* ATCC 25922 que fue donada por el departamento bacteriología.

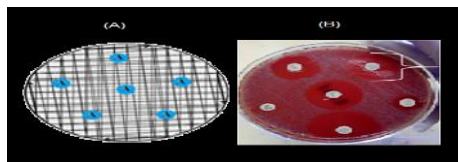


Figura 6. Esquema representativo de pruebas de susceptibilidad antimicrobiana *in vitro*. (A) las flechas señalan las direcciones en las que estrió el inóculo y los círculos azules muestran la distribución de los antibióticos. (B) Se muestra el crecimiento bacteriano en una placa después de ser incubada 18-24 h señalando el halo de inhibición. Imágenes originales.

Cuadro 5. Lectura e interpretación de pruebas sensibilidad antimicrobiana con base en los halos de inhibición para la familia la *Enterobacteriaceae*. Tomado y modificados (CLSI,2012).

Antibiótico	Abreviación	Concentración (μg)	Interpretación con respecto al diámetro (mm)		
			R	I	S
Criterios para la Familia <i>Enterobacteriaceae</i> (<i>Escherichia coli</i>)					
Ampicilina	AM	10 μg	≤ 13	15-16	≥ 17
Carbencilina	CB	100 μg	≤ 19	20-22	≥ 23
Cefalotina	CF	30 μg	≤ 14	15-17	≥ 18
Cefotaxima	CXT	30 μg	≤ 22	23-25	≥ 26
Ciprofloxacina	CIP	5 μg	≤ 15	15-20	≥ 21
Cloranfenicol	CL	30 μg	≤ 12	13-17	≥ 18
Nitrofurantoina	NF	300 μg	≤ 14	15-16	≥ 17
Netilmicina	NET	30 μg	≤ 12	13-14	≥ 15
Gentamicina	GE	10 μg	≤ 12	13-14	≥ 15
Amikacina	AK	30 μg	≤ 14	15-16	≥ 17

Sulfametoxazol/ Trimetropim	SXT	25 µg	≤10	11-15	≥16
Norfloxacin	NOR	10 µg	≤12	13-16	≥17
Tetraciclina	TE	30 µg	≤11	12-14	≥15
Ácido Nalidixico	NA	30 µg	≤13	14-18	≥19

Cuadro 6. Lectura e interpretación de pruebas sensibilidad antimicrobiana con base en los halos de inhibición para la familia *Moraxellaceae*. Tomado y modificados (CLSI,2013; CLSI 2016).

Antibiótico	Abreviación	Concentración (µg)	Interpretación con respecto al diámetro (mm)		
			R	I	S
Criterios para la Familia <i>Moraxellaceae</i> (<i>Moraxella</i> spp).					
Ampicilina	AM	10 µg	≤20	21-28	≥29
Carbencilina	CB	100 µg	≤18	19-23	≥24
Cefalotina	CF	30 µg	≤14	15-17	≥18
Cefotaxima	CXT	30 µg	≤14	15-22	≥24
Ciprofloxacina	CIP	5 µg	≤15	15-20	≥21
Cloranfenicol	CL	30 µg)	≤12	13-17	≥18
Nitrofurantoina	NF	300 µg	≤14	15-16	≥17
Netilmicina	NET	30 µg	≤12	13-14	≥15
Gentamicina	GE	10 µg	≤12	13-14	≥15
Amikacina	AK	30 µg	≤14	15-16	≥17
Sulfametoxazol/ Trimetropim	SXT	25 µg	≤10	11-15	≥16
Norfloxacin	NOR	10 µg	≤12	13-16	≥17
Tetraciclina	TE	30 µg	≤14	15-18	≥19
Ácido Nalidixico	NA	30 µg	≤22	23-27	≥28

Genes de Resistencia antimicrobiana.

La identificación molecular de los genes de resistencia antimicrobiana en *Moraxella* spp., se llevó a cabo mediante la amplificación de diversos genes que confieren resistencia a diversos antibióticos como las sulfonamidas *sul1/sul2*, tetraciclinas *teB*, quinolonas *qnrA/qnrS*, cloranfenicol y florfenicol *floR*, betalactámicos *BlaTEM*, como controles positivos se tomaron aislados de *Escherichia coli* ATCC 25922 y *Escherichia coli* aislada de campo de agua residuales en rastros donadas del estudio (Talavera-González *et al.*,). Como se observa en el Cuadro 7 se muestran las secuencias y el tamaño del amplicón de cada uno de los genes de resistencia.

Cuadro 7. Secuencia, tamaño de los fragmentos de los genes de resistencia antimicrobiana utilizados en *Moraxella* spp.

Resistencia	Cebadores	Secuencia 5'-3'	Tamaño del fragmento	Referencia.
Sulfonamidas	<i>sul1 F</i>	5' CGG CGT GGG CTA CCT GAA CG 3'	433 pb	Kern <i>et al.</i> (2002)
	<i>sul1 R</i>	5' GCC GAT CGC GTG AAG TTC CG 3'		
	<i>sul2 F</i>	5' GCG CTC AAG GCA GAT GGC ATT 3'	293 pb	Kern <i>et al.</i> (2002)
	<i>sul2 R</i>	5' GCG TTT GAT ACC GGC ACC CGT 3'		
Tetraciclinas	<i>tet B F</i>	5' TTG GTT AGG GGC AAG TTT TG 3'	650 pb	Martí <i>et al.</i> (2006)
	<i>tet B R</i>	5' GTA ATG GGC CAA TAA CAC CG 3'		
Quinolonas	<i>qnrA F</i>	5' AGA GGA TTT CTC ACG CCA GG 3'	580 pb	Cattoir <i>et al.</i> (2007)
	<i>qnrA R</i>	5' TGC CAG GCA CAG ATC TTG AC 3'		
	<i>qnrB F</i>	5' GGM ATH GAA ATT CGC CAC TG 3'	264 pb	Cattoir <i>et al.</i> (2007)
	<i>qnrB R</i>	5' TTT GCY GYY CGC CAG TCG AA 3'		
β-lactámicos	<i>MultiTSO-T Bla_{TEM} F</i>	5' CAT TTC CGT GTC GCC CTT ATT C 3'	800 pb	Dallenne <i>et al.</i> (2010)
	<i>MultiTSO-T Bla_{TEM} R</i>	5' CGT TCA TCC ATA GTT GCC TGA C 3'		
Florfenicol/ cloranfenicol	<i>floR F</i>	5' CTT TGG CTA TAC TGG CGA TG 3'	266 pb	Chiu <i>et al.</i> (2006)
	<i>floR R</i>	5' GAT CAT TAC AAG CGC GAC AG 3'		

Y=T o C; R=A or G, S=G or C, D=A or G or T, H=A or C or T; M=A o C.

Genes de resistencia a las sulfonamidas, *sul1* y *sul2*.

Se realizó un PCR punto final con una mezcla de reacción total de 25 µL. Se usó 12.5 µL de Master Mix (Gotaq Green Master Mix, Cat M7122 Promega), 1 µL de cebadores conjunto (*sul1R* / *sul1F* y *sul2R* / *sul2F*), 5 µL de extracción de ADN bacteriano y 5.5 µL de agua libre de nucleasas (Cat.P1195, Promega). Las reacciones de PCR se realizaron en un termociclador (MultiGene™ Mini, TC 020-24, Labnet International Inc, California, USA), para la amplificación de los genes *sul1* y *sul2* (Mini-Bis 16mm, DNr Bio-Imaging Systems Transluminador, Israel), se usó el siguiente protocolo de temperaturas: una desnaturalización inicial a 94°C durante 5 min; seguido de 30 ciclos a 94°C por 15 s, 69°C por 30s y 72°C por 60 s y una extensión final 72°C por 7 min. La calidad de los productos de PCR se determinó en un gel de agarosa al 2% y posteriormente se realizó una tinción con bromuro de etidio y se visualizó mediante irradiación UV (Mini-Bis 16mm, DNr Bio-Imaging Systems Transluminador), en el cual se observó el tamaño del amplicón para *sul1* de 433 pb y para *sul2* de 293 pb (Kernn *et al.*, 2002).

Genes de resistencia a las quinolonas, *qnrA* y *qnrB*.

Se llevó a cabo la mezcla de reacción total de 25 µL d PCR multiplex. Se usó 12.5 µL de Master Mix (Gotaq Green Master Mix, Cat M7122 Promega), 1 µL de cebadores conjunto (*qnrA F*/*qnrA R*, *qnrB F*/*qnrB R*), 5 µL de extracción de ADN bacteriano y 3.5 µL de agua libre de nucleasas (Cat.P1195, Promega). La amplificación se llevó a cabo de la siguiente manera: una desnaturalización inicial a 95°C durante 10 minutos; por 35 ciclos de 95°C durante 60s, alineación de 54°C durante 60s y extensión de 72°C durante 1 min; y una etapa de extensión final a 72°C durante 10 minutos El producto de PCR fue separado en un gel de agarosa al 2%, posteriormente se realizó una tinción con bromuro de etidio y se visualizó mediante irradiación ultravioleta (Mini-Bis 16mm, DNr Bio-Imaging Systems Transluminador) el tamaño del producto de PCR fue de 580 pb para el gen *qnrA* y de 264 pb para el gen *qnrB* (Cattoir *et al.*, 2007).

Genes de resistencia a los betalactámicos, *Bla_{TEM}*.

Se llevó a cabo la mezcla de reacción total de 25 µL del PCR punto final. Se usó 12.5 µL Master Mix (Gotaq Green Master Mix, Cat M7122 Promega), 1 µL de cebadores conjunto (*Bla_{TEM} F*/*Bla_{TEM} R*) 5 µL extracción de ADN y 5.5 µL agua libre de nucleasas (Cat.P1195, Promega). La amplificación se llevó a cabo de la siguiente manera: desnaturalización inicial a 94°C durante 10 minutos; 30 ciclos de 94°C durante 40 s, 60°C durante 40 s y 72°C durante 1 min; y una etapa de elongación final a 72°C

durante 7 minutos El producto de PCR fue separado en un gel de agarosa al 2%, posteriormente se realizó una tinción con bromuro de etidio y se visualizó mediante irradiación ultravioleta (Mini-Bis 16mm, DNr Bio-Imaging Systems Transluminador) el tamaño del producto de PCR fue 800 pb para *Bla_{TEM}* (Dallene *et al.*, 2010).

Genes de resistencia a las tetraciclinas, *tetB*.

Se llevó un PCR punto final con una mezcla de reacción total de 25 µL. Se usó 12.5 µL de Master Mix (Gotaq Green Master Mix, Cat M7122 Promega), 1 µL de cebadores conjunto (*tetB F/tetB R*), 5 µL de extracción de ADN bacteriano y 5.5 µL de agua libre de nucleasas (Cat.P1195, Promega). Para la amplificación del gen *tetB* se usó el siguiente protocolo de temperaturas; una desnaturalización inicial a 94° C durante 5 min, seguido de 30 ciclos a 94 °C durante 1 min, 55 °C durante 1 min y 72 °C durante 1 min, con una extensión final de 72 °C durante 5 min. El producto de PCR fue separado en un gel de agarosa al 1,5% y posteriormente se realizó una tinción con bromuro de etidio y se visualizó mediante irradiación ultravioleta (Mini-Bis 16mm, DNr Bio-Imaging Systems Transluminador, Israel) el tamaño de los productos de PCR fue de 650 pb para *tetB* (Martí *et al.*, 2006)

Genes de resistencia a los cloranfenicoles, *floR*.

Se llevó a cabo la mezcla de reacción total de 25 µL del PCR punto final. Se usó 12.5 µL de Master Mix (Gotaq Green Master Mix, Cat M7122 Promega), 1 µL de cebadores conjunto (*floR F/ floR*), 5 µL de extracción de ADN bacteriano y 5.5 µL de agua libre de nucleasas (Cat.P1195, Promega). La amplificación se llevó a cabo de la siguiente manera: una desnaturalización inicial a 95°C durante 5 minutos; seguido de 35 ciclos a 95°C durante 45 s, 56°C durante 45 s y 72°C durante 1 min; y una etapa de elongación final a 72°C durante 5 minutos. El producto de PCR fue separado en un gel de agarosa al 2% y posteriormente se realizó una tinción con bromuro de etidio y se visualizó mediante irradiación ultravioleta (Mini-Bis 16mm, DNr Bio-Imaging Systems Transluminador, Israel) el tamaño del producto de PCR fue 266 pb para *FloR* (Chiu *et al.*, 2006).

Determinación de conteo unidades formadoras de colonias *Moraxella* spp.

El conteo de las UFC de la placa se realizó después del crecimiento bacteriano a las 24 h de incubación a 37 °C y se aplicó la siguiente ecuación para determinar las UFC/mL.

$$\frac{UFC}{mL} = \frac{No. de colonias * 1000 \mu L}{10 \mu L}$$

Dónde: No. de colonias corresponde al número de UFC contadas después de la incubación,

1000 μ L es el volumen final

10 μ L es la cantidad inoculada en la superficie de la placa de conteo.

Actividad antimicrobiana de las nanopartículas de plata.

Se evaluó mediante tres métodos la actividad antimicrobiana de las nanopartículas de plata comerciales (AgNPs-C) \leq 100 nm estabilizadas polivinilpirrolidona (PVP) (Cat. 576832-5G, Sigma Aldrich) en cepas de *Moraxella* spp. con diversos perfiles de sensibilidad antimicrobiana y se compararon contra bacterias controles, *Escherichia coli* ATCC 25922 como representantes de grupo Gram negativas y *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 para las Gram positivas. Las concentraciones de las AgNPs-C utilizadas fueron 2.69 a 21.57 μ g/L (25 a 200 mM) y se utilizó gentamicina (10 μ g) como control positivo y agua destilada estéril como control negativo en cada método.

Método 1. Evaluación de las AgNPs-C utilizando el método estándar de difusión en disco. Se usó un cultivo puro de 24 h de cada bacteria. Para la preparación de la suspensión bacteriana, se ajustó a una concentración de 10^8 UFC/mL para *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 y *Escherichia coli* ATCC 25922 y a una concentración de 10^6 UFC/mL para *Moraxella* spp. a través de espectrofotometría (Espectrofotómetro VIS, Milton Roy, Spectronic 21 D, USA) a una absorbancia de 0.08 a 0.13 a una longitud de onda de 625 nm. Se utilizó unidiscos de papel de filtro Whatman (N.º 1) de 5 mm de diámetro estériles y se impregnaron por separado con 20 μ L de una solución de las AgNPs-C con las concentraciones mencionadas anteriormente. Los discos se evaporaron a 37°C hasta secar y luego se impregnaron en agar Mueller-Hinton (AMH, BD Bioxon, Becton, Dickinson de México). Las placas se incubaron a 37°C durante 24 h y los ensayos se realizaron por triplicado Figura 7. Los diámetros de las zonas de inhibición se midieron y el valor medio para cada organismo se registró y expresó en milímetro (Bernal y Guzmán, 1984; Geethalakshmi y Sarada, 2012).

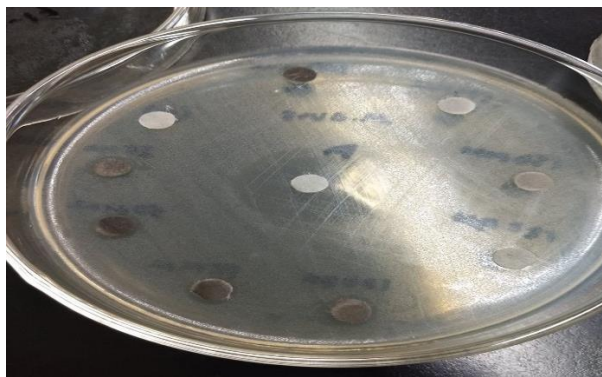


Figura 7. Método de difusión en disco con las AgNPs. Imagen Original

Método 2. Conteo de UFC/mL suplementando las AgNPs-C en el agar. Se emplearon placas de agar Mc Conkey (MC, BD212123, Difco, Bioxon Dickson de México), agar Sal y Manitol (SyM, BD214600, Difco, Bioxon Dickson de México) y agar Trypticasa Soya (TSA, Cat. BD2100800, Bioxon Dickson de México) suplementadas con AgNPs-C en concentraciones de 25 hasta 200 mM/mL por cm^3 para *Escherichia coli* ATCC 25922, *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 y *Moraxella* spp. y se usaron placas libres de AgNPs-C como controles negativos Figura 8. Se agregaron a cada placa 1000 μL de la suspensión bacteriana de cada bacteria ajustada por espectrofotometría antes mencionada. Las placas se incubaron durante 24 h a 37°C y los ensayos se realizaron por triplicado, posteriormente se realizó el conteo de colonias de las placas correspondientes de cada muestras en particular (Sondi y Salopek-Sondi, 2004).



Figura 8. Método de suplementación de las AgNPs en agar. (A) Agar Mac Conkey, (B) Agar Sal y Manitol, (C) Agar Trypticasa de Soya suplementadas con AgNPs. Imágenes Originales.

Método 3. Conteo de UFC/mL utilizando las AgNPs-C en la superficie del agar. La actividad antibacteriana de AgNPs-C se monitorizó mediante un ensayo de inhibición del crecimiento líquido realizado en placas descrito por (Bulet et al. 1993). Se agregaron 10 μL de AgNP-C a diferentes concentraciones 2.69 a 21.57 $\mu\text{g/L}$ (25 a 200 mM) a 90 μL de suspensión de los cultivos bacterianos ajustada por espectrometría mencionada anteriormente en caldo Mueller-Hinton (MH, BBL TM,

Becton, Dickinson en México) como se observa en la Figura 9. Los ensayos se llevaron a cabo por triplicado y el crecimiento microbiano se evaluó después de la incubación 24 h a 37°C.

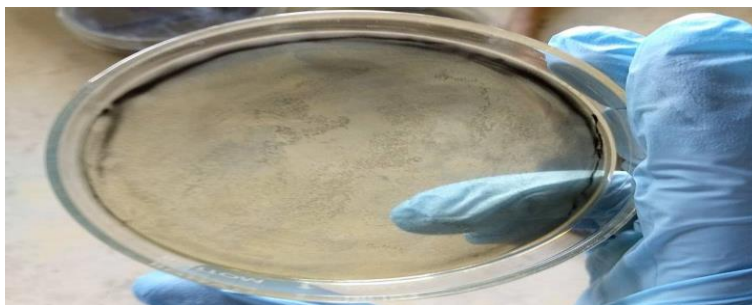


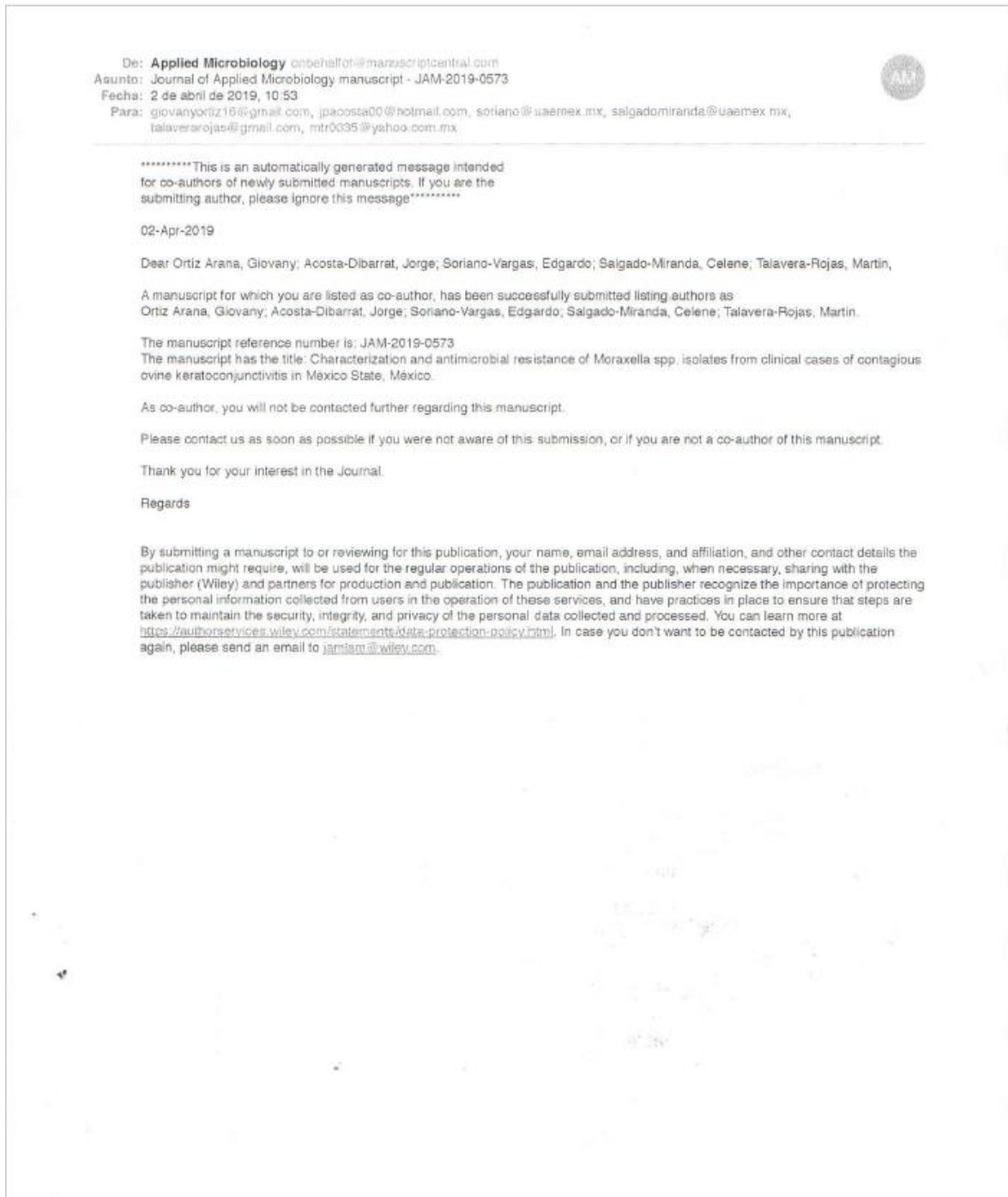
Figura 9. Método de conteo de colonia en placa utilizando las AgNPs en superficie del agar. Imagen original

Análisis Estadístico.

Para el análisis de los resultados se utilizó un Análisis de Varianza Paramétrico (ANOVA), Prueba de Tukey y T student con un nivel de significancia de ≤ 0.05 utilizando el paquete estadístico SPSS Statistics Standard Versión 20. ©Copyright IBM Corporation and its licensor 1989.2011, IBM, IBM logo (IBM, Armonk, NY, USA).

VII. RESULTADOS.

Envió del artículo científico a revista indexada.



De: Applied Microbiology onbehalf of @manuscriptcentral.com
Asunto: Manuscript submitted to Journal of Applied Microbiology - JAM-2019-0573
Fecha: 2 de abril de 2019, 10:53
Para: talaverarojas@gmail.com, mtr0035@yahoo.com.mx
Cc: giovanyortiz16@gmail.com, jpacosta00@hotmail.com, soriano@usemex.mx, salgadomiranda@usemex.mx, talaverarojas@gmail.com, mtr0035@yahoo.com.mx



02-Apr-2019

Dear Dr. Talavera-Rojas

The following manuscript has been successfully submitted to Journal of Applied Microbiology.

Manuscript ID: JAM-2019-0573

Title: Characterization and antimicrobial resistance of *Moraxella* spp. isolates from clinical cases of contagious ovine keratoconjunctivitis in Mexico State, México

Authors: Ortiz Arana, Giovany, Acosta-Dibarrat, Jorge, Soriano-Vargas, Edgardo, Salgado-Miranda, Celene, Talavera-Rojas, Martin

If there are any errors in the manuscript details above or in your contact details, please contact us at jamlam@wiley.com.

Your manuscript will now be checked for compliance with the guidelines to authors, and you will be contacted if further information is required. Once the submission is confirmed as complete, the Chief Editor will then assign the manuscript to a handling Editor, who assesses the manuscript for suitability in the journal. At this screening stage a decision to reject or to go to full review is made. This step ensures a rapid rejection of unsuitable manuscripts for the journal, and authors should not expect full comments if papers are rejected at this stage. Manuscripts that go to full review are assigned a minimum of two reviewers. Following the return of two reports, the handling Editor provides a report to the Chief Editor, who takes the decision to accept, revise or reject the manuscript.

You can keep track of your manuscript by logging on to ScholarOne Manuscripts at:
<https://mc.manuscriptcentral.com/appliedmicrobiology>

The summary status of your manuscript will be displayed in your Author Centre. Should you have any queries please contact jamlam@wiley.com, using your Manuscript ID as a reference.

Co-authors: Please contact me at jamlam@wiley.com as soon as possible if you disagree with being listed as a co-author for this manuscript. As co-author, you will not be contacted again during the review process of this manuscript; all further correspondence will be sent to Dr. Martin Talavera-Rojas.

Thank you for your submission to Journal of Applied Microbiology.

Kind regards

Ms. Emma Stephens
Journal of Applied Microbiology



Journal of Applied Microbiology



Edited By: A. Gilmour

Impact factor: 2.16

ISI Journal Citation Reports® Ranking: 2017: 84/161 (Biotechnology & Applied Microbiology)

ISI Journal Citation Reports® Ranking: 2017: 80/126 (Microbiology)

Online ISSN: 1365-2672

© The Society for Applied Microbiology



LATEST ISSUE >

Volume 126, Issue 4

April 2019

HOME

ABOUT ▾

CONTRIBUTE ▾

BROWSE ▾



Call for Papers

Call for Papers for a Special Issue on Recent Advances in Plant-Fungal Interactions

About the Special Issue:

Fungi likely contribute more to both the health and detriment of plants than any other organism. The extensive co-evolution of fungi with host plants has led to complex signaling and response mechanisms that facilitate and control a broad spectrum of plant-fungal interactions. We seek high quality contributions in the form of original research or review papers that focus on the latest discoveries serving to expand the knowledge of this important frontier, spanning mycorrhizal associations to pathogenic systems.

Guest Editors: Joseph E. Flaherty (Coker College, USA) and Ahmad Fakhoury (Southern Illinois University, USA)

The deadline for submissions: **April 25th, 2019.**

Submissions will need to be prepared in accordance with the Journal of Applied Microbiology Author Guidelines, available at [http://onlinelibrary.wiley.com/journal/10.1111/\(ISSN\)1365-2672/homepage/ForAuthors.html](http://onlinelibrary.wiley.com/journal/10.1111/(ISSN)1365-2672/homepage/ForAuthors.html).

Manuscripts should be submitted online at <http://mc.manuscriptcentral.com/appliedmicrobiology>, where they will be considered by the Special Issue editors and sent for review as appropriate.

Please ensure the manuscript type 'JAM - Special Issue Article', is selected at the submission stage, to ensure that your paper is assigned to the Special Issue editors and processed accordingly.

Articles

Most Recent

Most Cited

Most Accessed

Open Access Articles

Free Access

Submit an Article

Browse free sample issue

Get content alerts

Subscribe to this journal

Published on behalf of the Society for Applied Microbiology



More from this journal

- News
- Virtual Issue on Plant Pathology
- Virtual Issue on Campylobacter
- Wiley Job Network
- Highly Cited Content
- Virtual Issue on Probiotics
- Virtual Issue on Plant Resistance
- Virtual Issue on Lactic Acid Bacteria
- Virtual Issue on Food Safety

Characterization and antimicrobial resistance of *Moraxella* spp. isolates from clinical cases of contagious ovine keratoconjunctivitis in México State, México.

Journal:	<i>Applied Microbiology</i>
Manuscript ID	JAM-2019-0573
Journal Name:	Journal of Applied Microbiology
Manuscript Type:	JAM - Original Article
Date Submitted by the Author:	02-Apr-2019
Complete List of Authors:	Ortiz Arana, Giovany; Universidad Autonoma del Estado de Mexico, Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia Acosta-Dibarrat, Jorge; Universidad Autonoma del Estado de Mexico, Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia Soriano-Vargas, Edgardo; Universidad Autonoma del Estado de Mexico, Centro de Investigación y Estudios Avanzados en Salud Animal Salgado-Miranda, Celene; Universidad Autonoma del Estado de Mexico, Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia Talavera-Rojas, Martin; Universidad Autonoma del Estado de Mexico, CENTRO DE INVESTIGACION Y ESTUDIOS AVANZADOS EN SALUD ANIMAL
Key Words:	Resistance, Antibiotics, Genes, PCR (polymerase chain reaction), Pathogenesis

SCHOLARONE™
Manuscripts

15 **Abstract**

16 **Objective:** The aim of this study was to identify the phenotypic-genotypic relationship
17 of the antimicrobial resistance from *Moraxella* spp. isolates obtained from clinical cases
18 of contagious ovine keratoconjunctivitis (OKC) in the state of México.

19 **Methods and results:** A total of 209 samples were obtained and 58 isolates of
20 *Moraxella ovis* and two *Moraxella bovoculi* were identified by bacteriological
21 techniques and amplification of *16s rRNA* and *rtxA* genes by PCR. All isolates were
22 evaluated in terms of antimicrobial resistance by the method of disk diffusion
23 susceptibility test and the amplification of genes of resistance by PCR respectively. We
24 determined 14 isolates of *Moraxella* spp. with antimicrobial resistance (AMR) and five
25 multiresistant (MDR) and amplified the genes of antimicrobial resistance *sul1*, *sul2*,
26 *tetB*, *qnrA*, *qnrB*, *Bla_{TEM}* and not amplified the gene *floR*.

27 **Conclusion:** is the first report of isolation of *M. bovoculi* and *M. ovis* in ocular lesions
28 in ovines in the state of México and the identification of genes of antimicrobial
29 resistance.

30 **Significance and impact of the study:** It is suggested that *Moraxella* spp. plays an
31 important role in the course of the disease and provides a panorama of interest in
32 molecular epidemiological surveillance and bacterial resistance.

33 **Key words:** *Moraxella* spp., contagious ovine keratoconjunctivitis, antimicrobial
34 resistance, resistance genes, PCR.

35 Introduction.

36 Contagious ovine keratoconjunctivitis (OKC) is a disease that causes temporary or
37 permanent blindness in ovine and caprine animals, the clinical signs are conjunctivitis,
38 nasal and lacrimal secretion, photophobia, blepharospasm, lymphofollicular
39 hyperplasia, keratitis and on rare occasions corneal ulcers. The clinically important
40 microorganisms of OKC are *Moraxella ovis*, *Mycoplasma conjunctivae* and *Chlamydia*
41 *psittaci* (Dagnall 1994a, 1994b; Akerstedt and Hofshagen 2004; Nietfeld 2001
42 Fernández-Aguilar *et al.* 2013). Particularly, *Moraxella bovis* (Karthik *et al.* 2017) and
43 *Moraxella Bovoculi* (Farias *et al.* 2015) have been isolated from ovine cases, however,
44 it is associated with bovine infectious keratoconjunctivitis (IBK) and characterized by
45 the development of conjunctivitis and corneal ulcers, the microorganisms involved are;
46 *Moraxella bovis*, *Moraxella ovis* and *Moraxella bovoculi* (Angelos *et al.* 2007; Shen *et al.*
47 *et al.* 2011; O'Connor *et al.* 2012). The differential biochemical tests of *Moraxella* spp.
48 species are fenilalaninadesaminasa and gelatinase tests although they may be
49 inconsistent (Angelos and Ball 2007; Angelos *et al.* 2007). The molecular tests are
50 based on the amplification of the *I6s* and *23S rRNA* genes (ITS) (Shen *et al.* 2011; Sosa
51 and Zunino 2013) and the *rx1A* gene that encodes cytotoxin A (Farias *et al.* 2015).

52 For the treatment of keratoconjunctivitis are used sulfonamides, tetracyclines (Scott
53 2007; Alexander 2010; Maboni *et al.* 2015) and florfenicol (Gokce *et al.* 2002) in a
54 local or systemic manner for which resistance has already been reported (Elad *et al.*
55 1988; Catry *et al.* 2007; Maboni *et al.* 2015).

56 Antibiotic-resistant pathogenic bacteria are a serious problem worldwide due in part to
57 their indiscriminate and massive use in animals and humans (Corvec *et al.* 2013;
58 Cameron and McAllister 2016). More than 890 beta-lactamase genes have been
59 characterized worldwide in Enterobacterias linked to betalactamase resistance some of

60 the most important are: *Bla_{TEM}*, *Bla_{SHV}*, *Bla_{CTX-M}*, *Bla_{GES}*, *Bla_{OXA-1}* y *Bla_{CARB}* (Bush and
61 Jacoby 2010; Dallenne *et al.* 2010). On the other hand, resistance to quinolones lies in
62 the plasmid gene transfer mainly by conjugation, as well as *qnr* genes that encode the
63 family of *qnr* proteins (*qnrA*, *qnrB*, *qnrS*, *qnrC* and *qnrD*) which bind to the DNA
64 gyrase (*gyrA* and *gyrB*) and the topoisomerase IV (*parC* and *parE*) reducing the action
65 of quinolones (Cattoir *et al.* 2007; Jacoby *et al.* 2008).

66 Resistance to tetracyclines is related to the acquisition of *tet* genes. Currently at least 40
67 *tet* genes are described (*tetA*, *tetB*, *tetG*, *tetM*, among others) and 3 *otr* (*otrA*, *otrB*² and
68 *otrC*) that intervene with; the active efflux proteins system; ribosomal protection
69 proteins (RPPs); the tetracycline enzyme inactivation. (Levy *et al.* 1989; Chopra and
70 Roberts 2001; Martí *et al.* 2006; Mosquito *et al.* 2011).

71 Antimicrobial resistance to chloramphenicol/florfenicol, is related to the following
72 genes: *cat* (*catA* and *catB*), *cmlA* and *floR*, within its main mechanisms of action is the
73 enzymatic inactivation by acetylation, encoding the chloramphenicol acetyltransferases
74 enzyme and the of the specific exporter mediating resistance systems of
75 chloramphenicol/florfenicol (Schwarz *et al.* 2004; Chiu *et al.* 2006).

76 The mechanisms of resistance to sulfonamides and trimethoprim are linked to the
77 acquisition of mutant genes through mobile elements. The genes *sul* (*sul1*, *sul2* and
78 *sul3*) have been described for Sulfonamides (Kerm *et al.* 2002; Bailey *et al.* 2010) and
79 were related to the integrons and these encode mutant forms of the dihydropteroate
80 enzyme synthetase that cannot be inhibited by the antibiotic action. As well as
81 trimethoprim, multiple genes have also been described *dhfr* (*dhfrA1*, *dhfrA5*, *dhfrA7*, *dhfrA12*
82 and *dhfrA17*) (Infante *et al.* 2005; Ho *et al.* 2009; Dahmen *et al.* 2010).

83 *Moraxella* spp. isolates were isolated and identified in various countries, and found to
84 be resistant to various antibiotics involved in both cases of OKC and IBK. Therefore, in
85 this study aims to isolate *Moraxella* spp from ocular lesions in sheep in the state México
86 and the phenotypic-genotypic characterization of the bacterial antimicrobial resistance
87 in order to elucidate and understand the pathogenesis of these microorganisms in the
88 disease.

89 **Materials and methods.**

90 *Bacteriological sampling and isolation.*

91 Samples (n=209) from sheep with ocular lesions were collected from 15 production
92 units distributed in six municipalities in the state of México between February and June,
93 2017. Specimens were obtained by conjunctival swabs in the lesion area without
94 touching the palpebral edge, the samples were placed in Stuart transport medium (STM,
95 Cat. 1058-A, Dibico in México) and maintained in refrigeration at 4°C until processing
96 (Akerstedt and Hofshagen 2004).

97 Regarding the isolation of the collected samples, the inoculations were performed on
98 5% ovine blood agar plates (ABS, BLL, Cat. BD211037 Becton, Dickison in Mexico)
99 and were incubated in aerobic conditions at 37 °C for 24-48 hrs. Colony growth criteria
100 and classical biochemical tests described in the literature were used for the identification
101 of *Moraxella* species involved in keratoconjunctivitis (Angelos *et al.* 2007; Angelos and
102 Ball 2007; Shen *et al.* 2011).

103 Sample size was calculated considering the clinical cases of OKC through the finite
104 population sampling formula (Arango 2009; EpiInfo™). A pilot sampling was carried
105 out for the estimation of the *p* indicator, obtaining a prevalence of 23.56% (107/454).

106

107 *Genotypic identification through the 16s rRNA and rtxA genes of Moraxella spp.*

108 DNA extraction using a heated colony in a total volume of 100 μ l of sterile distilled
109 water, which was heated to 95 ° C for 10 minutes followed by a centrifugation stage of
110 the cell suspension for 5 minutes at 9279 G (Eppendorf centrifuge 5415D, USA) and
111 subsequent DNA collection (Dallenne *et al.* 2010).

112 The genes *16s rRNA* and *rtxA* were amplified by a multiplex PCR with a final reaction
113 volume of 25 μ l for each one containing: 12.5 μ l Master Mix (Gotaq Green Master mix,
114 Cat M7122 Promega), 1 μ l of each primer (*Ovi16S1 F/Ovis1849 R*, *Bviv16S1*
115 *F/Bovi1541 R* and *Bovo1915 R*) for the gene 16s rRNA and for the Gene *RtxA (MbxA*
116 *F/MbxA R*, *MbvA F* and *MovA R*), 4 μ l of bacterial DNA and 7.5 μ l nucleases free water
117 (Nuclease-Free Water Cat. P1195, Promega). DNA sequences and the PCR product
118 sizes are described in the (Table 1).

119 The PCR protocol was established as follows: Regarding *16s rRNA* gene; initial
120 denaturation of 5 min at 95°C followed by 35 cycles: denaturation of 40 s at 95°C,
121 alignment of 40 s at 55°C, extension 1 min at 72°C; and a final extension of 7 min at 72
122 °c and for the gene *rtxA* 35 Cycles denaturation of 50 s at 95 °c s, alignment of 50 s at
123 65 ° C, extension 1 min at 72 ° C and a final extension 4 min at 72 °c carried out in a
124 ThermoCycler (MultiGene™ Mini, TC 020-24, Labnet International Inc, California,
125 USA). All the amplification products were identified through horizontal electrophoresis
126 in 1% agarose gels stained with 0.5 μ g/mL of ethidium bromide and visualized with a
127 UV transilluminator (Mini-Bis 16mm, DNr Bio-Imaging Systems Transluminor, Israel)
128 (Shen *et al.* 2011; Farias *et al.* 2015). *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 strain was
129 used as negative control.

130

131 *Antimicrobial susceptibility tests.*

132 The susceptibility tests were carried out using disk diffusion method on agar Mueller
133 Hinton (AMH, BD Bioxon, Becton, Dickinson of México) supplemented to 5% with
134 ovine blood defibrinated according to the guidelines of the Institute of Clinical and
135 Laboratory standards (CLSI 2012, 2013, 2016). The bacterial solution turbidity
136 suspended Mueller-Hinton was adjusted (MH, BBL™, Becton, Dickinson in Mexico)
137 at a scale of 0.5 Mc Farland equivalent to a concentration of $1-2 \times 10^8$ CFU/mL, the
138 following antimicrobials were used; ampicillin (10 µg), carbencilina (100 µg),
139 cephalothin (30 µg), cefotaxime (30 µg), ciprofloxacin (5 µg), chloramphenicol (30 µg),
140 nitrofurantoin (30 µg) netilmicin (30 µg), gentamicin (10 µg), amikacin (30 µg),
141 sulfamethoxazole/trimethoprim (25 µg), norfloxacin (10 µg), tetracycline (30 µg) and
142 nalidixic acid (30 µg) (BBL™ Sensi-Disc™ Becton Dickinson. United States), the
143 plates were incubated at 37 °c for 18-24 hours. Regarding the interpretation of the
144 results the following profiles were established: sensitive (S), intermediate (I) and
145 resistant (R). *Escherichia coli* ATCC 25922 strain was used as control.

146 *Antimicrobial resistance genes.*

147 Polymerase chain reaction (PCR) was used for the identification of antimicrobial
148 resistance genes, seven primers were used, sequences and the amplification products
149 sizes are described in (Table 2), for the detection of genes *sul1* and *sul2* (sulfonamides),
150 *Bla_{TEM}* (β-Lactams), *tetB* (tetracyclines), *floR* (Florfenicol/chloramphenicol), As well as,
151 multiplex PCR for *qnrA* and *qnrB* genes (quinolones), following the same reaction
152 condition previously published (Kerm *et al.* 2002; Chiu *et al.* 2006; Marti *et al.* 2006;
153 Cattoir *et al.* 2007; Dallenne *et al.* 2010). As positive controls, were used *Escherichia*
154 *coli* ATCC 25922 and other *E. coli* isolates from residual water and sewage
155 characterized phenotypically resistant for AM, CB, CF, CL, NA, TE, NET, NF * CPF *

156 and genotypically possess *qnrA+*, *qnrB+* and *Bla_{TEM+}* genes (Talavera-González *et al.*)
157 in the process of publication.

158

159 **Results.**

160 A total of 209/861 examined animal (24.27% prevalence) in six municipalities in the
161 state of Mexico, presented lesions compatible with OKC. With respect to the total
162 number of the studied samples (209), we identified 60 isolates of *Moraxella* spp.
163 biochemically by amplification of the genes; 16s *rRNA* 90% (52 *M. ovis* and 2
164 *Moraxella bovoculi* out of 60 samples); and *rtxA* 95% (55 *M. ovis* and 2 *Moraxella*
165 *bovoculi* out of 60 samples) (Table 3).

166 90% (54/60) of the isolates amplified the gene *16s rRNA*, was correctly identified 52/54
167 as *Moraxella ovis* observing a band of 1849 pb and the 2/54 as *Moraxella bovoculi*
168 observing a band of 1859 pb (table 3), no isolated amplified a band of 1541 pb
169 corresponding *M. bovis* (Figure 1).

170 For the gene *RtxA* was amplified 95% (57/60) of the isolates, was correctly identified
171 55/57 as *M. ovis* and 2/57 *M. bovoculi* observing a band of 990 pb, no isolated amplified
172 a band of 943 pb corresponds *M. bovis* (Figure 2).

173

174 *Antibiotic sensitivity tests.*

175 The 58 isolates of *Moraxella ovis* were sensitive to gentamicin and norfloxacin 100%
176 (58/58). Antimicrobial resistance of 15.51% (9/58) to nalidixic acid was observed,
177 12.06% (7/58) to nitrofurantoin, 10.34% (6/58) to ampicillin, 6.89% (4/58) to
178 chloramphenicol 3.44% (2/58) to cephalothin, 3.44% (2/58) to tetracycline and 1.72%

179 (1/58) to cefotaxime, to netilmicin, to amikacin and sulfamethoxazole/trimetropim. The
180 two isolates of *M. bovoculi* showed resistance to nalidixic acid and one also presented
181 intermediate resistance to ciprofloxacin and cefotaxime.

182 68.33% (41/60) of the isolates showed sensitivity to all the antibiotics used, and 31.66%
183 (19/60) were resistant to one or more antibiotics. It was determined that 21.66% (14/60)
184 of the isolates were resistant to one to two antibiotics and 8.33% (5/60) were multi-
185 resistant strains.

186

187 *Phenotypic and genotypic profiles.*

188 *Moraxella ovis* presented 36.20% (21/58) and 34.48% (20/58) amplification of *sul1* and
189 *sul2* gene respectively (figure 3). As well, *M. bovoculi* Amplified *sul1* gene (table 5).
190 Isolates of *M. ovis* 46.66% (26/60) amplified the gene *Bla_{TEM}* and only one of the two
191 isolates of *M. bovoculi* amplified Gene *Bla_{TEM}*. (table 5 figure 4). The gene that confers
192 resistance to tetracyclines, 8.62% (5/58) of the isolates of *M. ovis* amplified a band 650
193 pb corresponding to *tetB*, meanwhile, *M. bovoculi* (2 isolates) did not amplify the gene
194 *tetB* (Table 5 figure 5). *florR* gene which confers resistance to chloramphenicol and
195 florfenicol was not amplified by any of the tested isolates (table 5). *M. ovis* isolates
196 (22/58) 37.93% amplified the *qnrA* gene and (20/58) 34.48% the *qnrB* gene (figure 6).
197 One of the two isolates of *M. bovoculi* amplified the gene *qnrA* and both isolated
198 amplified the gene *qnrB*. (table 5).

199

200 **Discussion.**

201

202 In this study was obtained a prevalence of animals (24.27%, 209/861) with lesions of
203 OKC in the state of México, lower than reported in the United Kingdom by Dagnall
204 (1994a) observing a prevalence of 72% (97/134) from sheep with some degree of eye
205 injury, which could be related to the period taken from the samples, to the type of sheep
206 raising systems and predisposing factors. An increase in cases of OKC in Norway
207 during autumn and winter seasons, this is due to the way in which sheep farming is
208 practiced in this country where in summer the animals take them to graze without
209 human intervention and in winter they are collected and, are confined in barns
210 (Akerstedt and Hofshagen, 2004), contrary to what happens in México that the sheep
211 breeding systems are of intensive form, semi intensive extensive, mixed and grazing
212 (Diaz 1999), sampling process was carried out in the spring winter period, which is
213 characterized by the presence of flies, dust, direct sunlight and the variety of
214 microorganisms as well as other factor involved in the evolution of the disease (Onwa *et*
215 *al.* 1989). Dagnall (1994a) reported a prevalence of 28.57% (28/97) for *M. ovis* from
216 ovine isolates, similarly, Akerstedt and Hofshagen (2004) obtained a prevalence of 28%
217 (24/85) in sheep herds with the disease, similar data were obtained in this work
218 reporting 27.7% (58/209) of *M. ovis* isolates from sheep with OKC.

219 The first isolation of *Moraxella bovoculi* was reported in the United States (Angelos *et*
220 *al.* 2007) and later in different states of the American Union (Gould *et al.* 2013; Loy and
221 Brodersen 2014), Uruguay (Sosa and Zunino 2013), Argentina, Norway and Brazil
222 (Libardoni *et al.* 2012; Farias *et al.* 2015) in cases of infectious bovine quaternities IBK.
223 Regarding ovines, the first report of *M. bovoculi* was made by Farias *et al.* (2015) in
224 Brazil, however, this is the second study which reports the isolation of two *M. bovoculi*
225 strains in ovines in Latin America. But it is the first report of *M. bovoculi* isolates
226 obtained from clinical cases of OKC in México.

227 O'Connor *et al.* (2012) isolated *M. bovis* from bovine animals with IBK infections
228 afterwards Karthik *et al.* (2017) was the second author to identify the same causative
229 agent in India but from ovine samples, in our study it was not possible to isolate *M.*
230 *bovis* from ovine samples.

231 Shen *et al.* (2011) amplified the 16s *rRNA* gene in 89.5% (51/57) of the isolates
232 identifying correctly as *M. bovoculi* (44/51) and *M. bovis* (7/51), in this study were
233 amplified 90.0% (54/60) of the isolates correctly identified as *M. ovis* (52/58) and *M.*
234 *bovoculi* (2/2). Respecting the isolates that did not amplify the 16s *rRNA* gene might be
235 due to the primers design of that lead to different results, which shows a variety in the
236 union affinity of the conserved regions, and the resolution of each variable region in the
237 organism (Gordal *et al.* 2012).

238 Farias *et al.* (2015) amplified the gene *rtxA* in 100% (33/33) of the isolates, from bovine
239 and ovine with keratoconjunctivitis, identifying *Moraxella bovis* (15/33), *Moraxella*
240 *bovoculi* (11/33) and *Moraxella ovis* (7/33), in this study we amplified the *rtxA* gene
241 95% (57/60) of all isolates identifying; *M. ovis* (55/58) and *Moraxella bovoculi* (2/2). *M.*
242 *ovis* isolates did not show any amplification for *rtxA* gene, which possibly could be
243 related to the variations in the reading frame of the sequences by deletions or absence of
244 repeated sequence regions surrounding the RTX operon which has been reported in non-
245 hemolytic *M. bovis* Strains (Angelos *et al.* 2003) in recent studies by (Dickey *et al.*
246 2018) detected a recombination in the nucleotide sequences within the non-coding
247 regions in the *rRNA* and *RTX* genes in strains of *M. bovoculi*.

248 The first study of antimicrobial sensitivity in vitro *Moraxella bovoculi* performed by
249 Angelos *et al.* (2011) reported resistance to penicillin (12.3%), the second report
250 (Maboni *et al.* 2015) found 9% (1/11) of strains resistant to penicillin and in both works
251 the isolates of *M. bovoculi* were sensitive to ampicillin, oxytetracycline, gentamicin,

252 florfenicol and sulfamethoxazole/trimethoprim. There are insufficient studies on the
253 phenotypic and genotypic characterization of antimicrobial sensitivity of *M. ovis* and *M.*
254 *bovoculi*, therefore, the present study is the third work carried out, which identifies
255 strains of *M. bovoculi* resistant to nalidixic acid 100% (2/2), and intermediate resistance
256 to ciprofloxacin and cefotaxime 50% (1/2) and is reported in a similar sensitivity to the
257 antibiotics mentioned.

258 *M. ovis* strains resistant to penicillin, ampicillin, streptomycin and neomycin were
259 reported previously (Elad *et al.* 1988), in another study conducted by Catry *et al.* (2007)
260 reported strains resistant to erythromycin. The most recent work by Maboni *et al.*
261 (2015), showed strains resistant to oxytetracycline 9% (1/11) and penicillin 18% (2/11).
262 All the mentioned authors described *M. ovis* strains sensitive to gentamicin,
263 chloramphenicol, florfenicol and sulfonamides, in this study we reported strains of *M.*
264 *ovis* susceptible to gentamicin 100% (58/58), as well as resistant strains to ampicillin
265 10.34% (6/58), chloramphenicol 6.89% (4/58), tetracycline 3.44% (2/58) and
266 sulfamethoxazole/trimethoprim 1.72% (1/58).

267 Oxytetracycline is usually the first choice for the antimicrobial treatment of
268 keratoconjunctivitis (Alexander 2010), however *Moraxella* spp. showed resistance over
269 time to this antibiotic (Maboni *et al.* 2015). Likewise, florfenicol was reported as an
270 effective therapeutic option to combat keratoconjunctivitis (Gokce *et al.* 2002; Angelos
271 *et al.* 2011). The use of antibiotics is essential in the controlling of OKC by *M. ovis*, in
272 order to avoid exacerbation of the lesions associated with other bacterial infections
273 (Dagnall 1994b).

274 This is the first study to amplify the antimicrobial resistance genes *sul1*, *sul2*, *tetB*, *qnrA*
275 *qnrB* y *Bla_{TEM}* in *Moraxella ovis* and genes *sul1*, *qnrA*, *qnrB* and *Bla_{TEM}* in *Moraxella*
276 *bovoculi*. The unique study associated with antimicrobial resistance determinants

277 (ARD) in *M. bovoculi* was performed by Dickey *et al.* (2016) in that he described ten
278 ARD that were located on a genomic island greater than 27 kb in the sequences of *M.*
279 *bovoculi* and Mb58069 isolates that were resistant to florfenicol, oxytetracycline,
280 sulfonamides and showed intermediate resistance to macrolides.

281 In a similar study conducted by (Roberts *et al.* 1991) he described in tetracycline-
282 resistant strains of *Moraxella catarrhalis* that carry the *tetB* gene on its chromosome.
283 The *tetB* gene has the widest range of Gram-negative bacteria such as *E. coli* (Medina
284 *et al.* 2011; Mirzaagha *et al.* 2011), *Acinetobacter baumannii* (Marti *et al.* 2006),
285 *Actinobacillus Actinomycetemcomitans* (Roe *et al.* 1995), *Haemophilus influenzae*
286 (Robert and Smith 1980) and *Treponema Denticolaum* (Roberts 1996).

287 Bacteria carrying genes of resistance *sul1*, *sul2*, *sul3* and *Bla_{TEM}* such as *E. coli* (Kern
288 *et al.* 2002) have been reported in other countries; (Grape *et al.* 2003; Infante *et al.*
289 2005; Ho *et al.* 2009; Medina *et al.* 2011; Gnida *et al.* 2014; Memariani *et al.* 2015),
290 *Klebsiella pneumoniae*, *Pseudomona aeruginosa* (Peymani *et al.* 2017), *Proteus*
291 *mirabilis* (Feizabadi *et al.* 2010; Gong *et al.* 2018), *Salmonella* spp. (Maka *et al.* 2015),
292 *Stenotrophomonas Maltophilia* (Hu *et al.* 2011). Bacteria carriers of genes *qnrA* and
293 *qnrB* as *Klebsiella pneumoniae* (Rodríguez-Martínez *et al.* 2003), *E. coli* (Wang *et al.*
294 2003; Jiang *et al.* 2008; Aguilar-Montes de Oca *et al.* 2015), *P. aeruginosa*,
295 *Enterobacter cloacae* (Wu *et al.* 2007), *Actinobacter baumannii* (Touati *et al.* 2008),
296 *Salmonella enterica* (Murray *et al.* 2008), *Enterobacter Aerogenes*, *Citrobacter freundii*
297 (Park *et al.* 2007), *Kluyvera* (Kraychete *et al.* 2016) and among others.

298

299 **Acknowledgment.**

300 This paper was funded by the Secretary of public Education (key registry:
301 3998/2016RED, UAEM-CA-215) and the Autonomous University of the State of
302 Mexico. This study is part of the project: "Characterization, phenotypic and genotypic
303 and antimicrobial resistance of *Moraxella* spp. obtained from clinical cases of ovine
304 keratoconjunctivitis (key registry: 4629 / 2019SF, UAEM).

305

306 **Conflicts of interest.**

307 Authors declare no conflict of interest.

308

309 **Conclusion.**

310 In this study is identified *Moraxella ovis* and *Moraxella bovoculi* correctly using the
311 genes *16s rRNA* and *RtxA* by PCR, making the most sensitive tests for the diagnosis of
312 agents involved in keratoconjunctivitis. It will be possible to establish new criteria for
313 the choice of antimicrobial treatments based on the phenotypic and genotypic
314 characteristics of antimicrobial resistance of the results obtained, which will also allow
315 the surveillance molecular epidemiology of antimicrobial resistance genes in bacterial
316 populations of *Moraxella* spp.

317

318 **Reference.**

319 Aguilar-Montes de Oca, S., Talavera-Rojas, M., Soriano-Vargas, E., Barba-León, J. and
320 Vázquez-Navarrete, J. (2015) Determination of extended spectrum β -lactamases / AmpC β -
321 lactamases and plasmid-mediated quinolone resistance in *Escherichia coli* isolates obtained
322 from bovine carcasses in Mexico. *Trop Anim Health Prod*, 47, 975–981. doi: 10.1007/s11250-

- 323 015-0818-3.
- 324 Akerstedt, J. and Hofshagen, M. (2004) Bacteriological investigation of infectious
325 keratoconjunctivitis in Norwegian sheep. *Acta Vet Scand*, **45**, 19–26. doi: 10.1186/1751-0147-
326 45-19.
- 327 Alexander, D. (2010) Infectious Bovine Keratoconjunctivitis: A Review of Cases in Clinical
328 Practice. *Vet Clin North Am Food Anim Pract*, **26**, 487–503. doi: 10.1016/j.cvfa.2010.09.006.
- 329 Angelos, J.A., Spinks, P.Q., Ball, M.L. and George, L.W. (2007) *Moraxella bovoculi* sp. nov.,
330 isolated from calves with infectious bovine keratoconjunctivitis. *Int J Syst Evol Microbiol*, **57**,
331 789–795. doi: 10.1099/ijss.0.64333-0.
- 332 Angelos, J.A. and Ball, L.M. (2007) Differentiation of *Moraxella bovoculi* sp. nov. from other
333 coccoid *Moraxellae* by the use of polymerase chain reaction and restriction endonuclease
334 analysis of amplified DNA. *J Vet Diagn Invest*, **19**, 532–534. doi:
335 10.1177/104063870701900511.
- 336 Angelos, J.A., Ball, L.M. and Byrne, B.A. (2011) Minimum inhibitory concentrations of
337 selected antimicrobial agents for *Moraxella bovoculi* associated with infectious bovine
338 keratoconjunctivitis. *J Vet Diagn Invest*, **23**, 552–555. doi: 10.1177/1040638711404154.
- 339 Angelos, J.A., Hess, J.F. and George, L.W. (2003) An RTX operon in hemolytic *Moraxella*
340 *bovis* is absent from nonhemolytic strains. *Vet Microbiol*, **92**, 363–377. doi: 10.1016/S0378-
341 1135(02)00410-8.
- 342 Arango, C.J.J. and Maya, J.J.M. (2009). Epidemiología veterinaria. Editorial El Manual
343 Moderno
- 344 Bailey, J.K., Pinyon, J.L., Anantham, S. and Hall, R.M. (2010) Commensal *Escherichia coli* of
345 healthy humans : a reservoir for antibiotic-resistance determinants. *J Med Microbiol*, **59**, 1331–
346 1339. doi: 10.1099/jmm.0.022475-0.
- 347 Bush, K. and Jacoby, G.A. (2010) Updated functional classification of β -lactamases. *Antimicrob*

- 348 *Agents and Chemother*, **54**, 969–976. doi: 10.1128/AAC.01009-09.
- 349 Cameron, A. and McAllister, T.A. (2016) Antimicrobial usage and resistance in beef
350 production. *J Anim Sci and Biotech*, **7**, 1–23. doi: 10.1186/s40104-016-0127-3.
- 351 Catry, B., Boyen, F., Baele, M., Dewulf, J., de Kruif A., Vaneechoutte, M., Haesebrouck, F. and
352 Decostere, A. (2007) Recovery of *Moraxella ovis* from the bovine respiratory tract and
353 differentiation of *Moraxella* species by tDNA-intergenic spacer PCR. *Vet Microbiol*, **120**, 375–
354 380. doi: 10.1016/j.vetmic.2006.10.037.
- 355 Cattoir, V., Poirel, Rotimi, V., Soussy, C.J. and Nordmann, P. (2007) Multiplex PCR for
356 detection of plasmid-mediated quinolone resistance *qnr* genes in ESBL-producing
357 enterobacterial isolates *J Antimicrobi Chemother*, **60**, 394–397. doi: 10.1093/jac/dkm204.
- 358 Chiu, C.H., Su, L.H., Chu, C.H., Wang, M.H., Yeh, C.M., Weill, F.X. and Chu, C. (2006)
359 Detection of multidrug-resistant *Salmonella enterica* serovar typhimurium phage types DT102,
360 DT104, and U302 by multiplex PCR. *J Clin Microbiol*, **44**, 2354–2358. doi:
361 10.1128/JCM.00171-06.
- 362 Chopra, I. and Roberts, M. (2001) Tetracycline Antibiotics: Mode of action, applications,
363 molecular biology, and epidemiology of bacterial resistance. *Microbiol Mol Biol Rev*, **65**, 232–
364 260. doi: 10.1128/MMBR.65.2.232.
- 365 CLSI (2012) Clinical and Laboratory Standard Institute. Performance standards for
366 antimicrobial susceptibility testing, 22nd informational supplement.m100-s22.Wayne, PA.
- 367 CLSI (2013) Clinical and Laboratory Standards Institute. Antimicrobial disk and dilution
368 susceptibility tests for bacteria isolated from animals. Approved Standard - 4 edition. CLSI
369 document VET01-A4, Wayne, PA.
- 370 CLSI (2016) Clinical and Laboratory Standard Institute. Methods for antimicrobial dilution and
371 disk susceptibility testing of infrequently isolated or fastidious bacteria; Approved Guideline- 3

- 372 Edition. CLSI document M45, Wayne, PA.
- 373 Corvec, S., Beyrouthy, R., Crémet, L., Aubin, G.G., Robin, F., Bonnet, R. and Reynaud, A.
374 (2013) TEM-187, a new extended-spectrum β -lactamase with weak activity in a *Proteus*
375 *mirabilis* clinical strain. *Antimicrob Agents Chemother*, **57**, 2410–2412. doi:
376 10.1128/AAC.01761-12.
- 377 Dagnall, G.J.R. (1994a) An Investigation of colonization of the conjunctival sac of sheep by
378 bacteria and Mycoplasmas. *Epidemiol Infect*, **112**, 561–567. doi: 10.1017/S0950268800051268.
- 379 Dagnall, G.J.R. (1994b) The role of *Branhamella ovis*, *Mycoplasma conjunctivae* and
380 *Chlamydia psittaci* in conjunctivitis of sheep. *Br Vet J*, **150**, 65–71. doi: 10.1016/S0007-
381 1935(05)80097-1.
- 382 Dahmen, S., Mansour, W., Boujaafar, N., Arlet, G. and Bouallégue, O. (2010) Distribution of
383 cotrimoxazole resistance genes associated with class 1 integrons in clinical isolates of
384 *Enterobacteriaceae* in a University Hospital in Tunisia. *Microb Drug Resist*, **16**, 43–47. doi:
385 10.1089/mdr.2009.0091.
- 386 Dallenne, C., Da Costa, A., Decré, D., Favier, C. and Arlet, G. (2010) Development of a set of
387 multiplex PCR assays for the detection of genes encoding important β -lactamases in
388 *Enterobacteriaceae*. *J Antimicrob Chemother*, **65**, 490–495. doi: 10.1093/jac/dkp498.
- 389 Díaz, P. (1999) Manejo general del rebaño. Producción sustentable de ovinos tropicales. En:
390 Torres HG y Díaz RP (Eds.). X Congreso Nacional de Producción Ovina. AMTEO. Veracruz,
391 Veracruz. 83-90 pp
- 392 Dickey, A.M., Loy, J.D., Bono, J.L., Smith, T.P., Apley, M.D., Lubbers, B.V., DeDonder, K.D.,
393 Capik, S.F., Larson, R.L., White, B.J., Blom, J., Chitko-McKown, C.G. and Clawson, M.L.
394 (2016) Large genomic differences between *Moraxella bovoculi* isolates acquired from the eyes
395 of cattle with infectious bovine keratoconjunctivitis versus the deep nasopharynx of
396 asymptomatic cattle. *Vet Res*, **47**, 1–11. doi: 10.1186/s13567-016-0316-2.

- 397 Dickey, A.M., Schuller, G., Loy, J.D. and Clawson, M.L. (2018) Whole genome sequencing of
398 *Moraxella bovoculi* reveals high genetic diversity and evidence for interspecies recombination at
399 multiple loci. *PLOS ONE*, 13, 1-14. doi.org/10.1371/journal.pone.0209113
- 400 Elad, D., Yeruham, I. and Bernstein, M. (1988) *Moraxella ovis* in cases of infectious bovine
401 keratoconjunctivitis (IBK) in Israel. *Journal of Veterinary Medicine, Series B*, 35, 431-434. doi:
402 10.1111/j.1439-0450.1988.tb00516.x.
- 403 Egwu, G.O. (1989). Ovine infectious keratoconjunctivitis: some studies on the role of
404 *Mycoplasma conjunctivae*. PhD., University of Liverpool
- 405 Farias, L.D.A., Maboni, G., Matter, L.B., Scherer, C.F., Libardoni, F. and de Vargas, A.C
406 (2015) Phylogenetic analysis and genetic diversity of 3' region of rtxA gene from
407 geographically diverse strains of *Moraxella bovis*, *Moraxella bovoculi* and *Moraxella ovis*. *Vet*
408 *Microbiol*, 178, 283-287. doi: 10.1016/j.vetmic.2015.05.025.
- 409 Feizabadi, M.M., Delfani, S., Raji, N., Majnooni, A., Aligholi, M., Shahcheraghi, F., Parvin, M.
410 and Yadegarinia, D. (2010) Distribution of *Bla*(TEM), *Bla*(SHV), *Bla*(CTX-M) Genes among clinical
411 isolates of *Klebsiella pneumoniae* at Labbafinejad Hospital, Tehran, Iran. *Microbial Drug Resist*,
412 16, 49-53. doi: 10.1089/mdr.2009.0096.
- 413 Fernández-Aguilar, X., Cabezón, O., Marco, I., Mentaberre, G., Frey, J., Lavín, S. and López-
414 Olvera, J.R. (2013) *Mycoplasma conjunctivae* in domestic small ruminants from high mountain
415 habitats in Northern Spain. *BMC Vet Res*, 9, 1-5. doi: 10.1186/1746-6148-9-253.
- 416 Gnida, A., Kunda, K., Ziemińska, A., Luczkiewicz, A., Felis, E. and Surmacz-Górska, J.
417 (2014) Detection of sulfonamide resistance genes via in situ PCR-FISH. *Pol J Microbiol*, 63,
418 167-173.
- 419 Gokce, H.I., Cıtlı, M., Genç, O., Erdogan, H.M., Vehbi, G. and Kankavi, O. (2002) A
420 comparison of the efficacy of florfenicol and oxytetracycline in the treatment of naturally
421 occurring infectious bovine keratoconjunctivitis. *Irish Veterinary Journal*, 55, 573-576.

- 422 Gong, J., Zhuang, D., Zhang, P., Dou, X. and Wang, C. (2018) Establishment of a multiplex
423 loop-mediated isothermal amplification method for rapid detection of sulfonamide
424 (*sul1,sul2,sul5*) in clinical *Enterobacteriaceae* isolates from poultry. *Foodborne Pathog Dis*, **15**,
425 413–419. doi: 10.1089/fpd.2017.2410.
- 426 Gould, S., Dewell, R., Tofflemire, K., Whitley, R.D., Millman, S.T., Opiessing, T.,
427 Rosenbusch, R., Trujillo, J. and O'Connor, A.M. (2013) Randomized blinded challenge study to
428 assess association between *Moraxella bovoculi* and infectious bovine keratoconjunctivitis in
429 dairy calves. *Vet Microbiol*, **164**, 108–115. doi: 10.1016/j.vetmic.2013.01.038.
- 430 Grape, M., Sundström, L. and Kronvall, G. (2003) Sulphonamide resistance gene *sul3* found in
431 *Escherichia coli* isolates from human sources. *J Antimicrob Chemother*, **52**, 1022–1024. doi:
432 10.1093/jac/dkg473.
- 433 Ho, P.L., Wong, R.C., Chow, R.H. and Que, T.L. (2009) Distribution of integron-associated
434 trimethoprim-sulfamethoxazole resistance determinants among *Escherichia coli* from humans
435 and food-producing animals. *Lett Appl Microbiol*, **49**, 627–634. doi: 10.1111/j.1472-
436 765X.2009.02717.x.
- 437 Hu, L., Chang, X., Ye, Y., Wang, Z.X., Shao, Y.B., Shi, W., Li, X. and Li, J.B. (2011)
438 *Stenotrophomonas maltophilia* resistance to trimethoprim/sulfamethoxazole mediated by
439 acquisition of *sul* and *dhfrA* genes in a plasmid-mediated class 1 integron. *Int J Antimicrob*
440 *Agents*, **37**, 230–234. doi: 10.1016/j.ijantimicag.2010.10.025.
- 441 Infante, B., Grape, M., Larsoon, M., Kristiansoon, C., Pallecchi, L., Rossolini, G.M. and
442 Kronvall, G. (2005) Acquired sulphonamide resistance genes in faecal *Escherichia coli* from
443 healthy children in Bolivia and Peru. *Int J Antimicrob Agents*, **25**, 308–312. doi:
444 10.1016/j.ijantimicag.2004.12.004.
- 445 Jacoby, G., Cattoir, V., Hooper, D., Martinez- Martinez, L., Nordmann, P., Pascual, A., Poirel,
446 L. and Wang, M. (2008) *Qnr* gene nomenclature. *Antimicrob Agents Chemother*, **52**, 2297–
447 2299. doi: 10.1128/AAC.00147-08.

- 448 Jiang, Y., Zhou, Z., Qian, Y., Wei, Z., Yu, Y., Hu, S. and Li, L. (2008) Plasmid-mediated
449 quinolone resistance determinants *qnr* and *aac(60)-Ib-cr* in extended-spectrum β -lactamase-
450 producing *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae* in China. *J Antimicrob Chemother*, **61**,
451 1003–1006. doi: 10.1093/jac/dkn063.
- 452 Karthik, K., Manimaran, K., Mahaprabhu, R. and Shoba, K. (2017) Isolation of *Moraxella sp.*
453 from cases of keratoconjunctivitis in an organized sheep farm of India. *Open Journal of*
454 *Veterinary Medicine*, **07**, 138–143. doi: 10.4236/ojvm.2017.710014.
- 455 Kern, M.B., Klemmensen, T., Frimodt-Møller, N. and Espersen, F. (2002) Susceptibility of
456 Danish *Escherichia coli* strains isolated from urinary tract infections and bacteraemia, and
457 distribution of *sul* genes conferring sulphonamide resistance. *J Antimicrob Chemother*, **50**, 513–
458 516. doi: 10.1093/jac/dkf164.
- 459 Krachete, G.B., Botelho, L.A., Campana, E.H., Picão, R.C. and Bonelli, R.R. (2016) Updated
460 multiplex PCR for detection of all six plasmid-mediated *qnr* gene families', *Antimicrob Agents*
461 *Chemother*, **60**, 7524–7526. doi: 10.1128/AAC.01447-16.
- 462 Levy, S.B., McMurry, L.M, Burdett, V., Courvalin, P., Hillen, W., Roberts, M.C. and Taylor,
463 D.E. (1989) Nomenclature for tetracycline resistance determinants. *Antimicrob Agents*
464 *Chemother*, **33**, 1373–1374.
- 465 Libardoni, F., Scherer, C.F.R., Farias, D.L.A., Vielmo, A., Balzan, C. and Vargas, A.C. (2012)
466 *Moraxella bovoculi* em casos de ceratoconjuntivite infecciosa bovina no Rio Grande do Sul.
467 *Pesq Vet Bras*, **32**, 743–746. doi: 10.1590/S0100-736X2012000800011.
- 468 Loy, J.D. and Brodersen, B.W. (2014) *Moraxella spp.* isolated from field outbreaks of infectious
469 bovine keratoconjunctivitis: a retrospective study of case submissions from 2010 to 2013. *J Ver*
470 *Diagn Invest*, **26**, 761–768. doi: 10.1177/1040638714551403.
- 471 Maboni, G., Gressier, L.T., Espindola, J.P., Schwab, M., Tasca, C., Potter, L. and de Vargas,
472 A.C. (2015) Differences in the antimicrobial susceptibility profiles of *Moraxella bovis*, *M.*

- 473 *bovoculi* and *M. ovis*. *Braz J Microbiol*, **46**, 545–549. doi: 10.1590/S1517-838246220140058.
- 474 Maka, L., Maćkiw, E., Ścieżyńska, H., Modzelewska, M. and Popowska, M. (2015) 'Resistance
475 to sulfonamides and dissemination of *sul* genes among *Salmonella* spp. isolated from food in
476 Poland. *Foodborne Pathog Dis*, **12**, 383–389. doi: 10.1089/fpd.2014.1825.
- 477 Martí, S., Fernández-Cuenca, F., Pascual, A., Ribera, A., Rodríguez-Baño, J., Bou, G., Miguel
478 Cisneros, J., Pachón, J., Martínez- Martínez, L., Villa J., Grupo de Estudio de Infección
479 Hospitalaria (GEIH) (2006) Prevalencia de los genes *tetA* y *tetB* como mecanismo de resistencia
480 a tetraciclina y minociclina en aislamientos clínicos de *Acinetobacter baumannii*. *Enferm Infecci*
481 *Microbiol Clin*, **24**, 77–80. doi: 10.1157/13085012.
- 482 Medina, A., Horcajo, P., Jurado, S., De la Fuente, R., Ruiz-Santana-Quintera, J.A., Domínguez-
483 Bernal, G. and Orden, J.A. (2011) Phenotypic and genotypic characterization of antimicrobial
484 resistance in enterohemorrhagic *Escherichia coli* and atypical enteropathogenic *E. coli* strains
485 from ruminants. *J Vet Diagn Invest*, **23**, 91–95. doi: 10.1177/104063871102300114.
- 486 Memariani, M., Najar Peerayeh, S., Zahraei Salehi, T. and Shokouhi Mostafavi, S.K. (2015)
487 Occurrence of *SHV*, TEM and CTX-M β -Lactamase genes among Enteropathogenic *Escherichia*
488 *coli* strains isolated from children with diarrhea. *Jundishapur J Microbiol*, **8**, 1–8. doi:
489 10.5812/jjm.8(4)2015.15620.
- 490 Mirzaagha, P., Louie, M., Sharma, R., Yanke, L.J., Topp, E.D. and McAllister, T.A. (2011)
491 Distribution and characterization of ampicillin- and tetracycline-resistant *Escherichia coli* from
492 feedlot cattle fed subtherapeutic antimicrobials. *BMC Microbiol.*, **11**, 1–15. doi: 10.1186/1471-
493 2180-11-78.
- 494 Mosquito, S., Ruiz, J., Bauer, J.L. and Ochoa, T.J. (2011) Mecanismos moleculares de
495 resistencia antibiótica en *Escherichia coli* asociadas a diarrea. *Rev Per Med Exp Salud Pública*,
496 **28**, 648–656. doi: 10.1590/S1726-46342011000400013.
- 497 Muray, A., Mather, H., Coia, J.E. and Brown, D.J. (2008) Plasmid-mediated quinolone

- 498 resistance in nalidixic-acid-susceptible strains of *Salmonella enterica* isolated in Scotland. *J*
499 *Antimicrob Chemother*, **62**, 1153–1155. doi: 10.1093/jac/dkn340.
- 500 Nietfeld, J.C. (2001) Chlamydial infections in small ruminants. *Vet Clin North Am Food Anim*
501 *Pract.* **17**, 301–314. doi: 10.1016/S0749-0720(15)30030-X.
- 502 O'Connor, A.M., Shen, H.G., Wang, C. and Opriessnig, T. (2012) Descriptive epidemiology of
503 *Moraxella bovis*, *Moraxella bovoculi* and *Moraxella ovis* in beef calves with naturally occurring
504 infectious bovine keratoconjunctivitis (Pinkeye). *Vet Microbiol*, **155**, 374–380. doi:
505 10.1016/j.vetmic.2011.09.011.
- 506 Park, Y., Yu, J.K., Lee, S., Oh, E.J. and Woo, G.J. (2007) Prevalence and diversity of qnr alleles
507 in *AmpC*-producing *Enterobacter cloacae*, *Enterobacter aerogenes*, *Citrobacter freundii* and
508 *Serratia marcescens*: a multicentre study from Korea. *J Antimicrob Chemother*, **60**, 868–871.
509 doi: 10.1093/jac/dkm266.
- 510 Peymani, A., Naserpour-Farivar, T., Zare, E. and Azarhoosh, K.H. (2017) Distribution of
511 *Bla_{TEM}*, *Bla_{SHV}*, and *Bla_{CTX-M}* genes among ESBL-producing *P. aeruginosa* isolated from Qazvin
512 and Tehran hospitals, Iran. *J Prev Med Hyg*, **58**, 155–160.
- 513 Roberts, M.C. and Smith, A.L. (1980) Molecular characterization of “plasmid-free” antibiotic
514 resistant *Haemophilus influenzae*. *J. Bacteriol.* **144**:476–479.
- 515 Roberts, M.C., Pang, Y.J, Spencer, R.C., Winstanley, T.G., Brown, B.A. and Wallace, J.R.
516 (1991) Tetracycline resistance in *Moraxella (Branhamella) catarrhalis*: Demonstration of two
517 clonal outbreaks by using pulsed-field gel electrophoresis. *Antimicrob Agents Chemother*, **35**,
518 2453–2455. <https://doi.org/10.1128/AAC.35.11.2453>
- 519 Roberts, M.C., Chung, W.O. and Roe, D.E. (1996) Characterization of tetracycline and
520 erythromycin determinants in *Treponema denticola*. *Antimicrob Agents Chemother*, **40**, 1690–
521 1694.

- 522 Roe, D.E., Braham, P., Weinberg, A. and Roberts, M.C. (1995) Characterization of tetracycline
523 resistance in *Actinobacillus actinomycetemcomitans*. *Oral Microbiol. Immunol*, 10, 227–232.
524 doi.org/10.1111/j.1399-302X.1995.tb00147.x.
- 525
- 526 Rodríguez-Martínez, Pascual, A., García, I. and Martínez-Martínez, L. (2003) Detection of the
527 plasmid-mediated quinolone resistance determinant *qnr* among clinical isolates of *Klebsiella*
528 *pneumoniae* producing AmpC-type β -lactamase. *J Antimicrob Chemother*, 52, 703–706. doi:
529 10.1093/jac/dkg388.
- 530 Schwarz, S., Kehrenberg, C., Doublet, B. and Cloeckaert, A. (2004) Molecular basis of bacterial
531 resistance to chloramphenicol and florfenicol. *FEMS Microbiol Rev*, 28, 519–542. doi:
532 10.1016/j.femsre.2004.04.001.
- 533 Scott, R. Philip., (2007). *Sheep Medicine*. Gratos S. A. España
- 534 Shen, H.G., Gould, S., Kinyon, J., Opiressing, T. and O'Connor, A.M. (2011) Development and
535 evaluation of a multiplex real-time PCR assay for the detection and differentiation of *Moraxella*
536 *bovis*, *Moraxella bovoculi* and *Moraxella ovis* in pure culture isolates and lacrimal swabs
537 collected from conventionally raised cattle. *J Appl Microbiol*, 111, pp. 1037–1043. doi:
538 10.1111/j.1365-2672.2011.05123.x.
- 539 Soergel, D.A.W., Dey, N., Knight, R. and Brenner, S.E. (2012). Selection of primers for optimal
540 taxonomic classification of environmental *16S rRNA* gene sequences. *ISME J*, 6, 1440–1444.
541 <https://doi.org/10.1038/ismej.2011.208>
- 542 Sosa, V. and Zunino, P. (2013) Diversity of *Moraxella* spp. strains recovered from infectious
543 bovine keratoconjunctivitis cases in Uruguay. *J Infect Dev Ctries*, 7, 819–824. doi:
544 10.3855/jidc.3458.
- 545 Touati, A., Brasme, L., Benallaoua, S., Gharout, A., Madoux, J. and De Champs, C. (2008) First
546 report of *qnrB*-producing *Enterobacter cloacae* and *qnrA*-producing *Acinetobacter baumannii*

547 recovered from Algerian hospitals. *Diagn Microbiol Infect Dis*, **60**, 287–290. doi:
 548 10.1016/j.diagmicrobio.2007.10.002.

549 Wang, M., Tran, J.H. and Jacoby, G. (2003) Plasmid-mediated quinolone resistance in clinical
 550 isolates of *Escherichia coli* from Shanghai, China. *Antimicrob Agents*
 551 *Chemother.*, **47**, 2242–2248. doi: 10.1128/AAC.47.7.2242.

552 Wu, J., Ko, W.C., Tsai, S.H. and Yan, J.J. (2007) Prevalence of Plasmid-Mediated Quinolone
 553 Resistance Determinants *QnrA*, *QnrB*, and *QnrS* among Clinical Isolates of *Enterobacter*
 554 *cloacae* in a Taiwanese Hospital. *Antimicrob Agents Chemother.*, **51**, 1223–1227. doi:
 555 10.1128/AAC.01195-06.

556

Table 1 Primer designing for *Moraxella* species identification using PCR.

Gene	species	Primers	sequences 5'-3'	Fragment size	Reference
rtxA		MbxAF	GCA AAA CTG GCA ATG ACG A	943 bp	(Farias et al. 2015)
	<i>M. bovis</i>	MbxAR	GTG CCA TTG ACC CAA CTA GC		
	<i>M. bovocull</i>	MbvAF	AAT GCT GGT GCT GGT AAC GA	990 bp	Farias et al. (2015)
	<i>M. ovis</i>	MovAR	TGG TTG CAG GGT ATT GGA GC		
		Ov110S1F	GAA CGA TGA GTA TCC AGC TTG CT	1849 bp	Shen et al. (2011)
	<i>M. ovis</i>	Ov1s1849R	CTC TTT ACT TTG GTT AAT TAT TTT GTT GGA		
16s rRNA	<i>M. bovocull</i>	Bovo1015R	TGT ATT GGG TAC AAT CAC CAT GG	1859 bp	Shen et al. (2011)
		Bov10S1F	GAA CGA TGA CTA TCT AGC TTG CTA GAT ATG	1541 bp	Shen et al. (2011)
	<i>M. Bovis</i>	Bov1541R	AGC TAT AGA CCC AAT TTA ACT TAC GCT ACT		

557

558

559

560

561

562

563

Table 2 Antimicrobial resistant used for the identification of *Moraxella* spp.

Resistance	Primers	Sequences 5'-3'	Fragment size	Reference
<i>Sulfonamides</i>	<i>sul1 F</i>	CGG OGT GGG CTA CCT GAA CG	433 bp	Kern <i>et al.</i> (2002)
	<i>sul1 R</i>	GCC GAT CGC GTG AAG TTC CG		
	<i>sul2 F</i>	GCG CTC AAG GCA GAT GGC ATT	293 bp	Kern <i>et al.</i> (2002)
	<i>sul2 R</i>	GCG TTT GAT ACC GGC ACC CGT		
<i>Tetracyclines</i>	<i>tet BF</i>	TTG GTT AGG GGC AAG TTT TG	650 bp	Mart <i>et al.</i> (2006)
	<i>tet BR</i>	GTA ATG GGC CAA TAA CAC CG		
<i>Quinolones</i>	<i>qnrA F</i>	AGA GGA TTT CTC ACG CCA GG	580 bp	Cattoir <i>et al.</i> (2007)
	<i>qnrA R</i>	TGC CAG GCA CAG ATC TTG AC		
	<i>qnrB F</i>	GGM ATH GAA ATT CGC CAC TG	264 pb	Cattoir <i>et al.</i>

					2007)
	<i>qnrB R</i>		TTT GCY GYY CGC CAG TCG AA		
<i>β-lactamases</i>	<i>MultiTSO-T Bla_{TEM} F</i>		CAT TTC CGT GTC GCC CTT ATT C	800 bp	Dalozzo <i>et al.</i> (2010)
	<i>MultiTSO-T Bla_{TEM} R</i>		CGT TCA TCC ATA GTT GCC TGA C		
<i>Florfenicol/ Chloramphenicol</i>	<i>floR F</i>		CTT TGG CTA TAC TGG CGA TG	266 bp	Chiu <i>et al.</i> (2006)
	<i>floR R</i>		GAT CAT TAC AAG CGC GAC AG		

564

Table 3 *Moraxella* spp. isolates in the State of México.

N° UPP	Municipal	Total no. of animals	Animals sampled	<i>M. ovis</i>	<i>M. bovoculi</i>	16S rRNA	<i>rtxA</i>
1	Capulhuac	43	15 (34%)	4 (26%)	-	4 (100%)	4 (100%)
1	Calimaya	150	17 (11%)	8 (47%)	-	7 (87%)	8 (100%)
3	Xonacatlán	117	23 (19%)	4 (17%)	-	4 (100%)	4 (100%)
3	Lerma	80	31 (38%)	9 (29%)	1 (3%)	10 (100%)	10 (100%)
3	Tenango	282	67 (23%)	28 (41%)	1 (1%)	26 (89%)	26 (89%)
4	Toluca	189	56 (29%)	5 (8%)	-	3 (60%)	5 (100%)
15	Total/	861	209	58(27.7%)	2 (0.9%)	54	57
	Prevalence		(24.27%)	(96.6%)	(3.3%)	(90%)	(95%)

565

Table 4 Sensibility tests of *Moraxella* spp. causing OKC.

Antibiotic	<i>Moraxella ovis</i> (n= 58) (P)			<i>Moraxella bovoculi</i> (n=2) (P)		
	R	I	S	R	I	S
AM	6(10.34)	7(12.06)	45(77.58)	-	-	2(100)
CB	-	1(1.72)	57(98.27)	-	-	2(100)
CF	2(3.44)	3(5.17)	53(91.37)	-	-	2(100)
CFX	1(1.72)	5(8.62)	52(89.66)	-	1(50)	1(50)
CP	-	2(3.44)	56(96.55)	-	1(50)	1(50)

CL	4(6.89)	2(3.44)	52(89.55)	-	-	2(100)
NF	7(12.06)	1(1.72)	50(86.20)	-	-	2(100)
NET	1(1.72)	-	57(98.27)	-	-	2(100)
GE	-	-	60(100)	-	-	2(100)
AK	1(1.72)	-	57(98.27)	-	-	2(100)
SXT	1(1.72)	1(1.72)	56(96.55)	-	-	2(100)
NOF	-	-	60(100)	-	-	2(100)
TE	2(3.44)	1(1.72)	55(94.82)	-	-	2(100)
NA	9(15.51)	8(13.79)	41(70.68)	2(100)	-	-

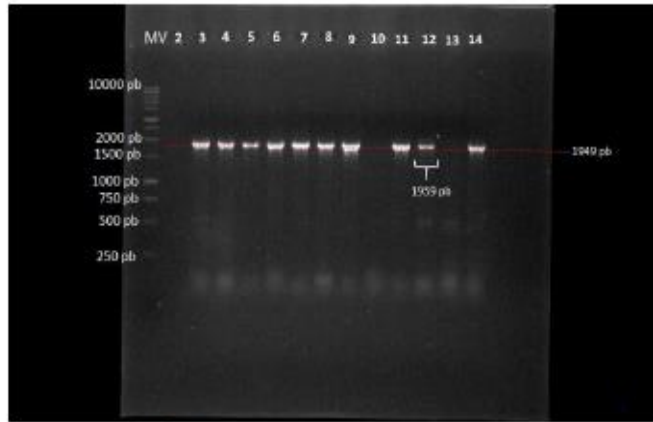
(P) percentage, (S) susceptible, (I) intermediate, (R) resistance. AM ampicillin; CB Carbenicillin; CF Cephalothin; CFX cefotaxime; CP ciprofloxacin; CL chloramphenicol; NF nitrofurantoin; NET netilmicin; GE gentamicin; AK amikacin; STX sulfamethoxazole/trimethoprim; NOF norfloxacin; TE tetracycline; NA nalidixic acid.

566

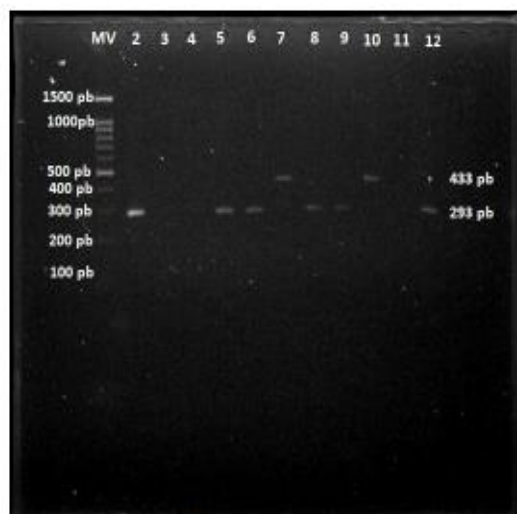
Table 5. Phenotypic and genotypic profile of antimicrobial resistance in *Moraxella*.

Phenotypical Resistance	Resistance Genes	<i>Moraxella ovis</i> (n= 58)			<i>Moraxella bovoculi</i> (n= 2)			Prevalence of resistance genes
		R	I	S	R	I	S	
AM	<i>Bla_{AM}</i>	5(6)	6(7)	16(45)	-	-	1(2)	28 (46.66%)
TE	<i>tetB</i>	1(2)	0(1)	4(55)	-	-	0(2)	5 (8.33%)
CL	<i>floR</i>	0(4)	0(2)	0(52)	-	-	0(2)	0 (0.00%)
	<i>sul1</i>	1(1)	1(1)	19(56)	-	-	1(2)	22 (36.66%)
STX	<i>sul2</i>	1(1)	1(1)	18(56)	-	-	0(2)	20 (33.33%)
	<i>qnrA</i>	7(9)	1(8)	14(41)	1(2)	-	-	23 (38.33%)
NA	<i>qnrB</i>	6(9)	2(8)	12(41)	2(2)	-	-	22 (36.66%)

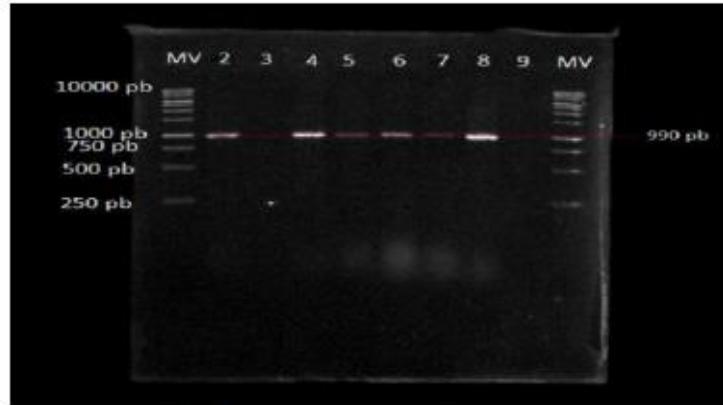
567



or Peer Review

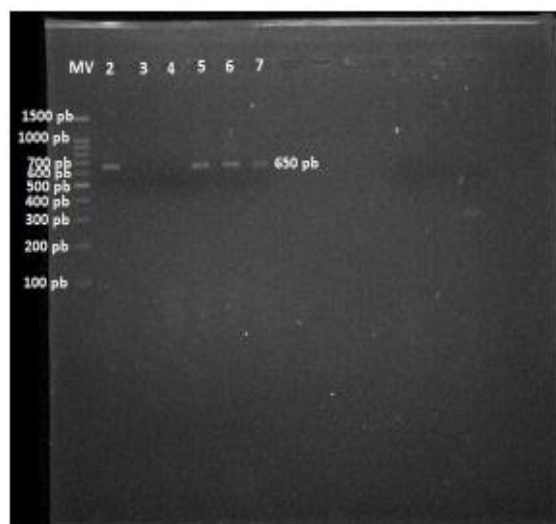


Peer Review

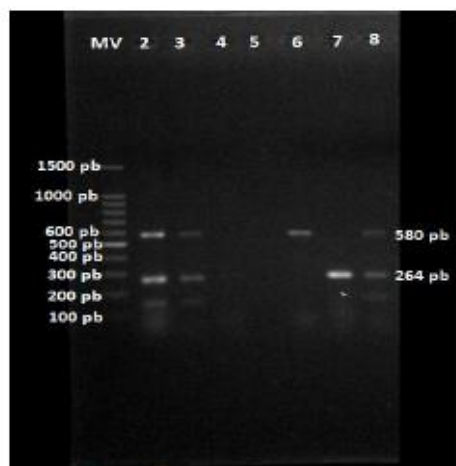




For Peer Review



Peer Review



Peer Review

Se recolectó un total de 209 muestras de hisopados del saco conjuntival en ovinos sugerentes a casos clínicos de queratoconjuntivitis contagiosa ovina obtenidos de 11 localidades en 6 municipios en el Estado de México Figura 10, de un total de 861 animales. Se obtuvo una prevalencia del 24.27% (209/861) de la enfermedad de QCO en el Estado de México (Anexo 1).

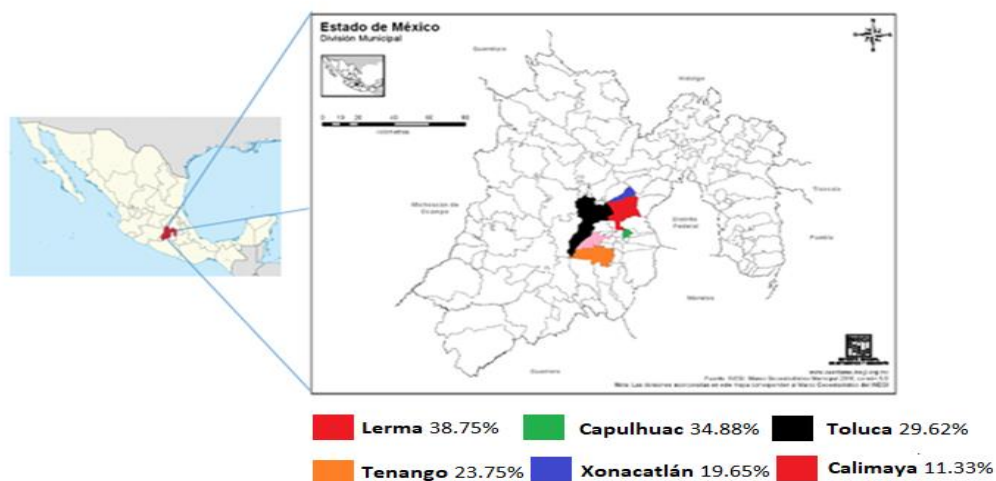


Figura 10. Municipios del Estado de México muestreados en busca de casos de clínicos de queratoconjuntivitis ovina.

Las lesiones que se observan con mayor frecuencia en los casos de QCO son: conjuntivitis con un 78.94% (165/209), seguido de queratoconjuntivitis con un 18.66% (39/209), de queratitis con un 1.91% (4/209) y de una ulcera corneal 0.47% (1/209), la forma de presentación son de forma unilateral el 18.66% (39/209) y bilateral 81.33% (170/209) en los animales afectados Cuadro 8.

Cuadro 8. Presentación de lesiones de queratoconjuntivitis contagiosa ovina.

Presentación	Unilateral Izquierdo.	Bilateral.	Unilateral derecho.	Total.
Conjuntivitis	23	126	16	165
Queratoconjuntivitis	-	39	-	39
Queratitis	-	4	-	4
Ulcera Corneal	-	1	-	1
Total	23	170	16	209

De las 209 muestras recolectadas, se identificaron 60 aislados de *Moraxella* spp. mediante pruebas bacteriológicas los cuales mostraron crecimiento de colonias pequeñas grisáceas con presencia de un halo β -hemólisis alrededor de las colonias, con morfología de cocos Gram negativos Figura 11.



Figura 11. Aspecto de colonias de *Moraxella* spp. Crecimiento de *M. ovis* en placa agar sangre (5% sangre desfibrilada ovina) Imagen original.

Posteriormente se realizaron las pruebas complementarias para la identificación de especies de los 60 aislados. Se identificó el 3.3% (2/60) de los aislados con reacción positiva a fenilalaninadesaminasa Figura 12, el 21.66% (13/60) con reacción positiva a reducción de nitratos y el 100 % (60/60) con reacción negativa de gelatinasa y actividad DNAsa, se identificó por técnicas bacteriológicas el 96.6% (58/60) de aislados de *Moraxella ovis* y 3.3% (2/60) de *Moraxella bovoculi* con como se muestra en el Cuadro 9.

Cuadro 9. Resultados de pruebas bacteriológicas de los aislados de *Moraxella* spp.

Tinción Gram	B-Hemolisis	Respiración	Catalasa	Oxidasa	TSI	SIM	MIO	OF	Urea	Mac Conkey	Sal Manitol	Adnasa	Gelatinasa	Caldo nitrato	Fenilalaninadesaminasa	Resultados Aislamientos	Total	Identificación Bacteriológica
Coco	+	Aerobia	+	+	----	---	---	--	-	-	-	-	-	-	-	47	58	<i>Moraxella ovis</i>
Coco	+	Aerobia	+	+	----	---	---	--	-	-	-	-	-	+	-	11		
Coco	+	Aerobia	+	+	----	---	---	--	-	-	-	-	-	+	+	2	2	<i>Moraxella bovoculi</i>



Figura 12. Prueba de Fenilalaninadesaminasa en aislados de *Moraxella* spp. Reacción positiva a dos aislados de *Moraxella* spp. y controles negativos. Imágenes originales.

Genes de identificación de especies de *Moraxella*.

Se llevó a cabo la amplificación de los genes *16S rRNA* y *rtxA* que son específicas para la diferenciación de las tres especies de *Moraxella bovis*, *Moraxella bovoculi* y *Moraxella ovis* involucradas en la QCO y QIB.

Del total de los 60 aislamientos de *Moraxella* spp. obtenidos por pruebas bacteriológicas, solo el 90% (54/60) de los aislados amplificó el gen *16S rRNA* mediante PCR. De los 58 aislados presuntivos a *M. ovis* solo el 89.65% (52/58) amplificó una banda de 1849 pb que corresponde a *Moraxella ovis* y de los dos aislados presuntivos de *M. bovoculi* el 100% (2/2) amplificó una banda 1859 pb que corresponde a *Moraxella bovoculi* y ninguna aislado amplificó una banda de 1541 pb pertenece a *M. bovis* como se observa en la Figura 13.

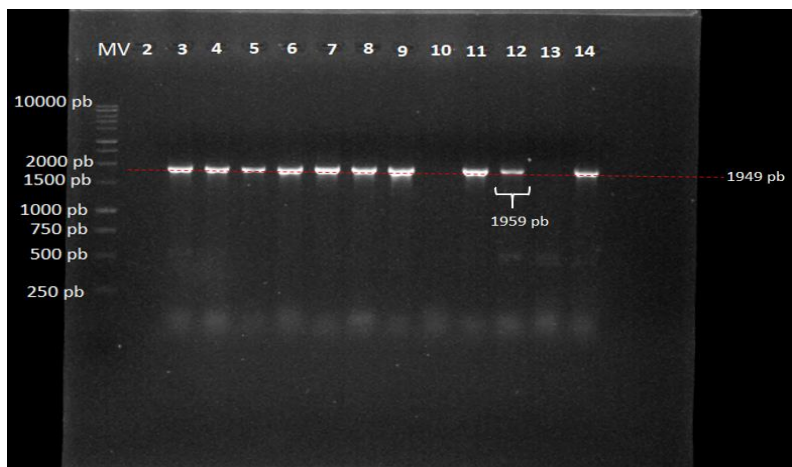


Figura 13. Amplificación del gen *16S rRNA*, identificación molecular de *Moraxella ovis* y *Moraxella bovoculi*. PCR Multiplex. Gel agarosa 1.0% (MV) Marcador de peso molecular 1Kb DNA Ladder (Cat.G5711 Promega). Carril (2) Muestra blanco H₂O. Carril (3-11 y 14) Aislados de *Moraxella ovis*. Carril (12) Aislado de *Moraxella bovoculi*. Carril (13) Control negativo *Staphylococcus aureus* ATCC 25923.

Para la amplificación del gen *rtxA* solo el 95% (57/60) de los aislamientos amplificó una banda 990 pb. Se identificó solo el 94.82% (55/58) como *M. ovis* y el 100% (2/2) como *M. bovoculi* y ningún aislado amplificó una banda de 943 pb corresponde *M. bovis* como se observa en la Figura 14.

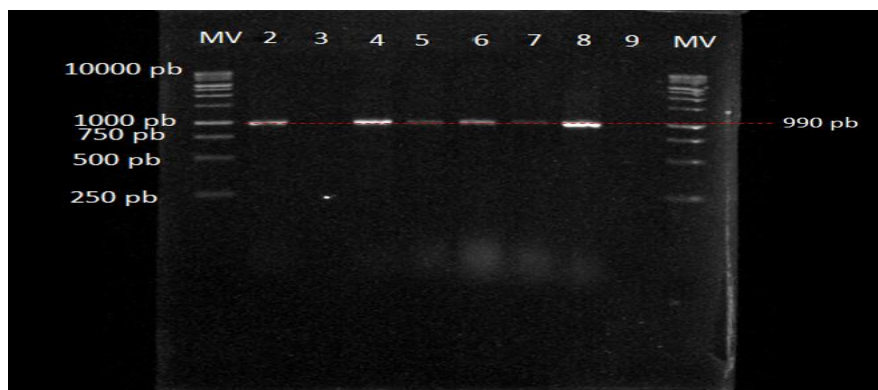


Figura 14. Amplificación del gen *rtxA* para la identificación molecular de *Moraxella ovis* y *Moraxella bovoculi*. PCR Multiplex. Gel agarosa 1.0% (MV) Marcador de peso molecular 1Kb DNA Ladder (Cat.G5711 Promega). Carril (2, 4, 5 y 8) Aislados de *Moraxella ovis*. Carril (3) Control negativo *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 Carril (6 y 7) Aislado de *Moraxella bovoculi*. Carril (9) Muestra blanco H₂O.

Pruebas de sensibilidad antimicrobiana.

Las bacterias empleadas se identificaron fenotípicamente como *Moraxella ovis* y *Moraxella bovoculi*, con base a las características microbiológicas y moleculares, después de la identificación de los 60 aislados, se realizó la prueba sensibilidad antimicrobiana Figura 15.



Figura 15. Pruebas de sensibilidad antimicrobiana de *Moraxella* spp. Imagen Original

Los 58 aislados de *Moraxella ovis* resultaron sensibles a gentamicina y norfloxacin 100% (58/58), se observó una resistencia antimicrobiana; del 15.51% (9/58) al ácido nalidixico, 12.06% (7/58) a nitrofurantoina, 10.34% (6/58) a ampicilina, 6.89% (4/58) a cloranfenicol, 3.44% (2/58) a cefalotina, 3.44% (2/58) a tetraciclina, 1.72% (1/58) cefotaxima, 1.6% (1/60) netilmicina, 1.72% (1/58) a amikacina y 1.72% (1/58) sulfametoxazol/trimetropim. Para los dos aislados de *Moraxella bovoculi* se mostró resistencia antimicrobiana del 100% (2/2) al ácido nalidixico, el 50% (1/2) mostró resistencia intermedia a ciprofloxacino y cefotaxima y el resto de los antibióticos fueron sensibles Cuadro 10.

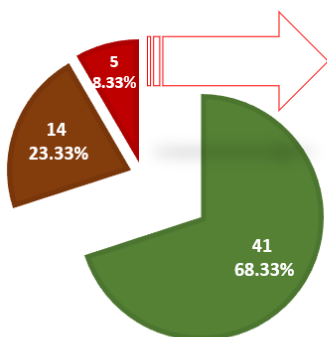
Cuadro 10. Sensibilidad antimicrobiana de los aislados de *Moraxella* spp. por compuesto antimicrobiano.

Antibióticos	<i>Moraxella ovis</i> (n= 58) (P)			<i>Moraxella bovoculi</i> (n= 2)		
	R	I	S	R	I	S
AM	6(10.34)	7(12.06)	45(77.58)	0(0)	0(0)	2(100)
CB	0(0)	1(1.72)	57(98.27)	0(0)	0(0)	2(100)
CF	2(3.44)	3(5.17)	53(91.37)	0(0)	0(0)	2(100)
CFX	1(1.72)	5(8.62)	52(89.66)	0(0)	1(50)	1(50)
CP	0(0)	2(3.44)	56(96.55)	0(0)	1(50)	1(50)
CL	4(6.89)	2(3.44)	52(89.55)	0(0)	0(0)	2(100)
NF	7(12.06)	1(1.72)	50(86.20)	0(0)	0(0)	2(100)
NET	1(1.72)	0(0)	57(98.27)	0(0)	0(0)	2(100)
GE	0(0)	0(0)	60(100)	0(0)	0(0)	2(100)
AK	1(1.72)	0(0)	57(98.27)	0(0)	0(0)	2(100)
SXT	1(1.72)	1(1.72)	56(96.55)	0(0)	0(0)	2(100)
NOF	0(0)	0(0)	60(100)	0(0)	0(0)	2(100)
TE	2(3.44)	1(1.72)	55(94.82)	0(0)	0(0)	2(100)
NA	9(15.51)	8(13.79)	41(70.68)	2(100)	0(0)	0(0)

P Porcentaje; AM ampicilina; CB carbencilina; CF cefalotina; CFX cefotaxima; CP ciprofloxacino; CL cloranfenicol; NF nitrofurantoina; NET netilmicina; GE gentamicina; AK amikacina; STX sulfametoxazol/trimetropim; NOF norfloxacin; TE tetraciclina; NA ácido nalidixico.

En este estudio se demostró que 68.33% (41/60) de los aislados resultaron sensibles a todos los antibióticos utilizados y 31.66% (19/60) resultaron resistentes a uno o más antibióticos. En la Figura 16 se observa que 23.33% (14/60) de los aislados fueron resistentes y 8.33% (5/60) aislados multirresistentes.

■ Sensible ■ Resistente ■ Multiresistente



Identificación del aislado de <i>Moraxella</i> spp		Cantidad de antibióticos resistentes	Antibióticos resistentes	Clasificación
R6-10	<i>M ovis</i>	4	Ácido nalidixico, sulfametoxazol/trimetropim, amikacina, netilmicina	MR
R7-25	<i>M ovis</i>	4	Ampicilina, nitrofurantoina, cloranfenicol, cefalotina	MR
R7-26	<i>M ovis</i>	4	Ampicilina, nitrofurantoina, cloranfenicol, cefalotina	MR
R7-11	<i>M ovis</i>	3	Ampicilina, nitrofurantoina, cloranfenicol	MR
R2-9	<i>M ovis</i>	3	Ácido nalidixico, tetraciclina, cloranfenicol	MR
R11-17	<i>M ovis</i>	2	Ácido nalidixico, tetraciclina.	R
R7-12	<i>M ovis</i>	2	Ampicilina, nitrofurantoina	R
R7-23	<i>M ovis</i>	2	Ampicilina, nitrofurantoina	R
R8-11	<i>M ovis</i>	2	Ampicilina, cefotaxima	R
R6-16	<i>M ovis</i>	1	Ácido nalidixico	R
R6-21	<i>M ovis</i>	1	Ácido nalidixico	R
R6-23	<i>M ovis</i>	1	Ácido nalidixico	R
R6-24	<i>M ovis</i>	1	Ácido nalidixico	R
R6-4	<i>M ovis</i>	1	Ácido nalidixico	R
R1-1	<i>M ovis</i>	1	Ácido nalidixico	R
R5-8	<i>M ovis</i>	1	Nitrofurantoina	R
R7-2	<i>M ovis</i>	1	Nitrofurantoina	R
R6-15	<i>M. Bovoculi</i>	1	Ácido nalidixico	R
R12-8	<i>M. bovoculi</i>	1	Ácido nalidixico	R

AM ampicilina; NF nitrofurantoina; CL cloranfenicol; CF cefalotina; STX sulfametoxazol/trimetropim; AK amikacina; NET netilmicina; TE tetraciclina; NA ácido nalidixico.

Figura 16. Perfil de resistencia antimicrobiana por aislamiento de *Moraxella* spp.

Genes de resistencia antimicrobiana.

Se llevó a cabo la amplificación de diversos genes que confieren resistencia antimicrobiana en los 60 aislados de *Moraxella* y como controles positivos se tomaron aislados *Escherichia coli* ATCC 25922 y *Escherichia coli* aislados de campo de agua residuales en rastos y de superficie de alcantarilla. De los cuales fueron obtenidos los siguientes resultados.

Los genes que confieren resistencia a las sulfonamidas (*sul1* y *sul2*). Se amplificó en 36.66% (22/60) de los aislados una banda de 293 pb que corresponde a *sul1* y el 33.33% (20/60) de los aislados una banda de 433 pb que corresponde a *sul2* como se observa en la Figura 17. Los aislados de *Moraxella ovis*, el 36.20% (21/58) amplificó el gen *sul1* y 34.48% (20/58) para *sul2*, mientras que, solo uno de los dos aislados *M. bovoculi* amplificó el gen *sul1*.



Figura 17. Amplificación de los genes *sul1* y *sul2* en aislados de *Moraxella*. Imagen Original. PCR Punto final. Gel agarosa 2.0%. (MV) Marcador de peso molecular 100 bp DNA Ladder (Cat.D001 GOLDBIO´COM). Carril (3) *Escherichia coli* ATCC 25922 *sul1* Carril (4) *Escherichia coli* ATCC 25922 *Sul2*. (Carril 2 y 5-9) Aislado de *Moraxella ovis*. Carril (10) Control positivo *Escherichia coli* I-I *sul2*. Carril (11) Muestra blanco H₂O. Carril (12) Control positivo *Escherichia coli* I-I *sul1*.

Los genes que confieren resistencia a las tetraciclinas (*tetB*). En el 8.33% (5/60) de los aislados se amplificó una banda 650 pb que corresponde a *tetB*. Para *M. ovis* solo el 8.62% (5/58) amplificó el gen y en los dos aislamientos de *M bovoculi* no se amplificó el gen *tetB* como se visualiza en la Figura 18.

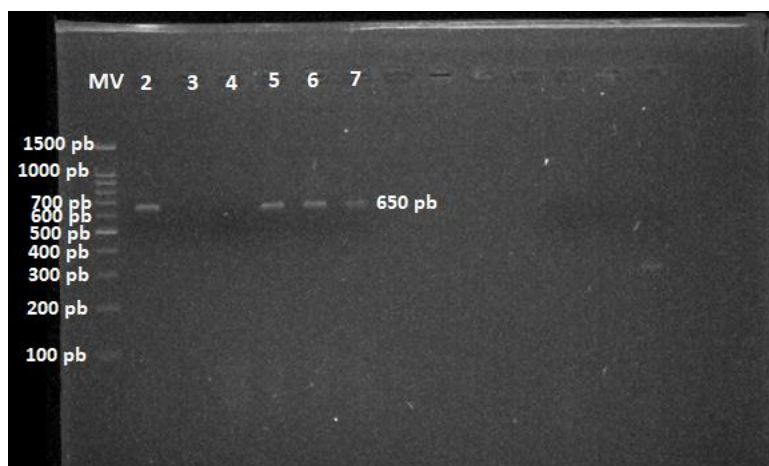


Figura 18. Amplificación de los genes *tetB* en aislados de *Moraxella*. Imagen Original. PCR Punto Final. Gel agarosa 1.5% (MV) Marcador de peso molecular 100 bp DNA Ladder (Cat.D001 GOLDBIO´COM). Carril (2) Control Positivo *Escherichia coli* 0-5 *tetB*. Carril (3) Muestra blanco H₂O. Carril (4) *Escherichia coli* ATCC 25922 *tetB*. Carril (5,6 y 7) Aislado de *Moraxella ovis tetB*.

Los genes que confieren resistencia contra quinolonas (*qnrA* y *qnrB*). El 38.33% (23/60) de los aislados amplificaron una banda de 580 pb que corresponde a *qnrA* y 36.66% (22/60) de los aislados una banda de 264 pb que corresponde a *qnrB* Figura 19. Los aislados de *Moraxella ovis*, el 37.93% (22/58) amplificó el gen *qnrA* y el 34.48% (20/58) para *qnrB* mientras solo uno de los dos aislados *M. bovoculi* amplificó el gen *qnrA* y los dos aislados amplificaron el gen *qnrB*.

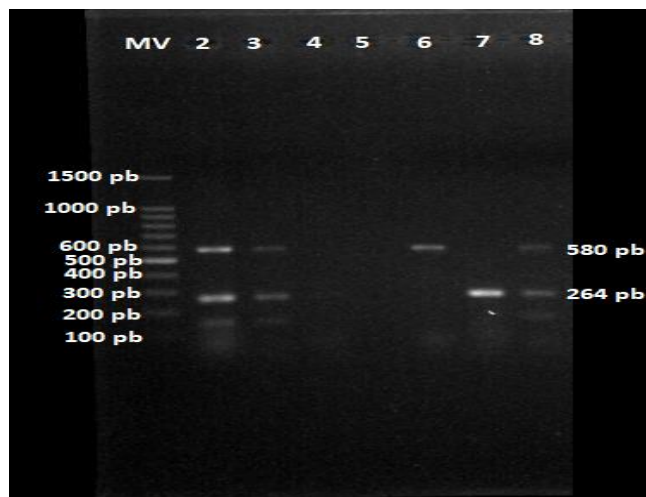


Figura 19. Amplificación de los genes *qnrA* y *qnrB* en aislados de *Moraxella*. Imagen Original. PCR Multiplex. Gel agarosa 2.0% (MV) Marcador de peso molecular 100 bp DNA Ladder (Cat.D001 GOLDBIO'COM). Carril 5) Muestra blanco H₂O. Carril (2-3) Control positivo *Escherichia coli* I-I *qnrA* y *qnrB*. Carril (4) *Escherichia coli* ATCC 25922. (Carril 6) Aislado de *Moraxella ovis qnrA* (Carril 7) Aislado de *Moraxella ovis qnrB*. (Carril 8) Aislado de *Moraxella ovis qnrA* y *qnrB*.

Para el gen que confieren resistencia contra betalactámicos (*Bla_{TEM}*), se amplificó en el 46.66% (26/60) de los aislados una banda de 800 pb que corresponde a *Bla_{TEM}* Figura 20. Los aislados de *M. ovis* el 46.56% (27/58) amplificó el gen *Bla_{TEM}* y solo uno de los dos aislados *M. bovoculi* amplificó el gen *Bla_{TEM}*.

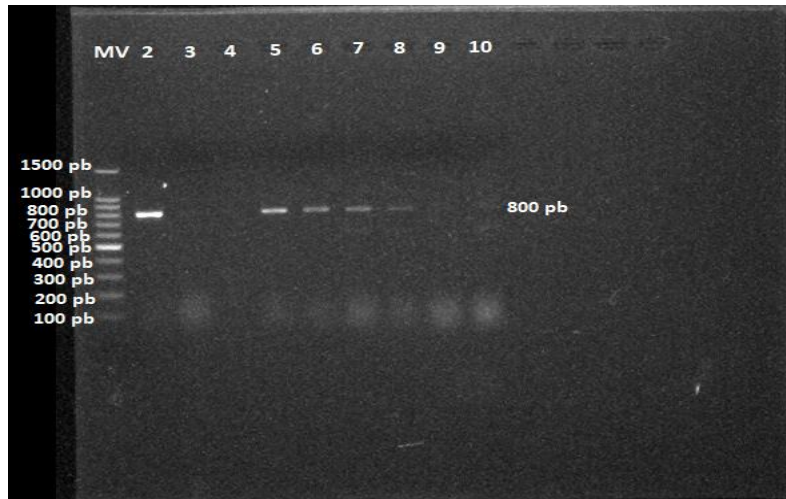


Figura 20. Amplificación de los genes *Bla_{TEM}* en aislados de *Moraxella*. Imagen Original PCR Punto final. Gel agarosa 2.0% (MV) Marcador de peso molecular 100 bp DNA Ladder (Cat.D001 GOLDBIO´COM). Carril (2) Control positivo *Escherichia coli* I-I *Bla_{TEM}*. Carril (3) *Escherichia coli* ATCC 25922. (Carril 4) Muestra blanco H₂O Carril (5-8) Aislado de *Moraxella ovis*. *Bla_{TEM}*. Carril (9 y 10) Aislado de *Moraxella ovis*. sin amplificación *Bla_{TEM}*.

Para el gen que confiere resistencia contra cloranfenicol y florfenicol (*floR*), no se logró amplificar ninguna banda de 266 pb que corresponde al gen *floR* en los aislados de *M ovis* y *M bovoculi* Figura 21.

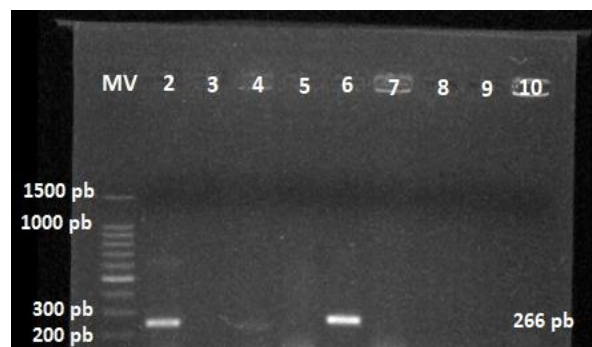


Figura 21. Amplificación de los genes *floR* en muestras controles. Imagen Original. PCR Punto Final. Gel agarosa 2.0% (MV) Marcador de peso molecular 100 bp DNA Ladder (Cat.D001 GOLDBIO´COM). Carril (2) Control positivo *Escherichia coli* ATCC 25922 *floR*. Carril (3) *Escherichia coli* A-7. Carril (4) Muestra blanco H₂O. Carril (6) Control positivo *Escherichia coli* I-I *floR*. Carril (7-10 y 5) Aislado de *Moraxella ovis*. Sin amplificación del gen *floR*

Se observa en Cuadro 11, el perfil fenotípico y genotípico de resistencia antimicrobiana en aislados de *Moraxella* spp. obtenidos de casos de QCO en el Estado de México.

Cuadro 11. Perfil fenotípico y genotípico de resistencia antimicrobiana en cepas de *Moraxella*

Resistencia	Genes de resistencia	<i>Moraxella ovis</i> (n= 58)			<i>Moraxella bovoculi</i> (n= 2)			Prevalencia
		R	I	S	R	I	S	
AM	<i>Blat_{TEM}</i>	5(6)	6(7)	16(45)	0	0	1(2)	28(46.66%)
TE	<i>tetB</i>	1(2)	0(1)	4(55)	0	0	0(2)	5(8.33%)
CL	<i>floR</i>	0(4)	0(2)	0(52)	0	0	0(2)	0(0.00%)
	<i>Sul1</i>	1(1)	1(1)	19(56)	0	0	1(2)	22(36.66%)
STX	<i>Sul2</i>	1(1)	1(1)	18(56)	0	0	0(2)	20(33.33%)
	<i>qnrA</i>	7(9)	1(8)	14(41)	1(2)	0	0	23(38.33%)
NA	<i>qnrB</i>	6(9)	2(8)	12(41)	2(2)	0	0	22(36.66%)

AM ampicilina; **CL** cloranfenicol; **TE** tetraciclina; **STX** sulfametoxazol/trimetropim; **NA** ácido nalidixico.

Actividad antimicrobiana de las AgNPs-C en *Moraxella* spp.

A través del método de difusión en disco se observó que a partir de la concentración de 10.78 µg/L (100mM) de las AgNPs-C se demostraron diferencias estadísticamente significativas en la actividad antimicrobiana en los aislamientos de *Moraxella ovis* y *M. bovoculi*, expreso el mayor diámetro de halos de inhibición de *M. ovis* (MDR y R) de 9.67 mm ± 0.83, *M. ovis* (S) de 8.67 mm ± 0.24 y *M. bovoculi* (R) de 9.33 mm ± 0.0 (Anexo 2, Figura 22), con respecto a la inhibición de las cepas controles, las concentraciones de las AgNPs-C fueron menores de 5.39 µg/L (50mM) y 8.09 µg/L (75mM) para *E. Coli* y *S. aureus* respectivamente.

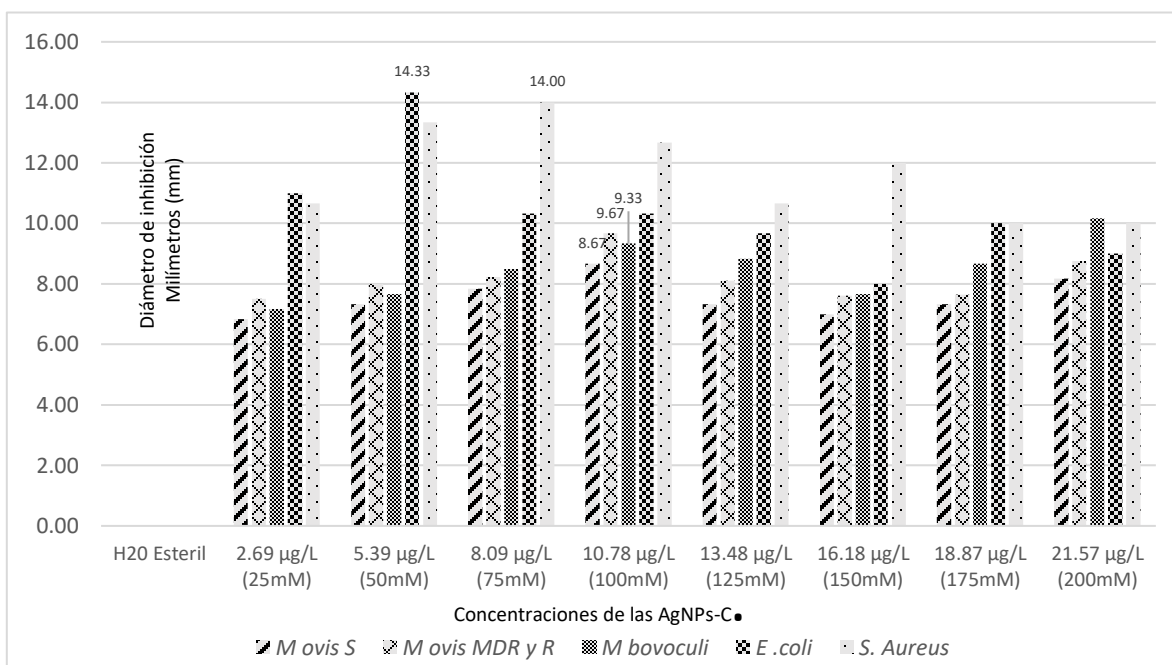


Figura 22. Actividad antimicrobiana de las AgNPs en *Moraxella* spp., por el método de difusión en disco.

Cuando se emplean las AgNPs-C en la superficie del agar, se observa una actividad en el efecto bactericida a partir de la concentración 8.09 µg/L (75 mM) mostrando diferencias estadísticamente en la disminución de UFC/mL en placa de *Moraxella* spp. Se visualizó una disminución en UFC/mL en *M. ovis* (MDR y R) de 1.33 ± 1.16 UFC/mL, en *M. ovis* (S) el 1.82 ± 0.94 UFC/mL y para *M. bovoculi* (R) hasta el 1.00 ± 0.47 UFC/mL con respecto a la muestra control Anexo 3, Figura 23. Para las cepas controles de *E. coli* y *S. Aureus* se determinó que a partir de las concentraciones 5.39 µg/L (50 mM) y 8.09 µg/L (75 mM) se visualizó una disminución de UFC/mL en placa respectivamente de cada aislamiento.

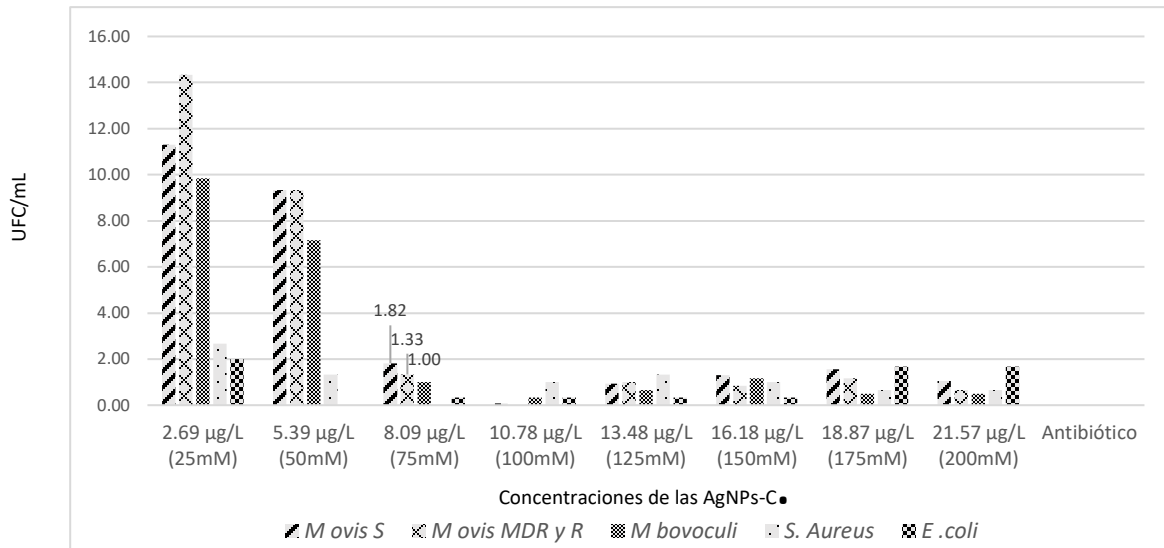


Figura 23. Actividad antimicrobiana de las AgNPs-C en *Moraxella* spp., por el método de conteo de colonias en superficie del agar.

Por el método de suplementación de las AgNPs-C en el agar, se determinó que a partir de la concentración de 10.78 µg/L (100 mM) mostró diferencias estadísticamente significativas en el efecto microbicida disminuyendo las UFC/mL en placa de *Moraxella* spp. Se visualizó para las cepas de *M. ovis* (MDR, R y S) y para *M. bovoculi* (R) una disminución hasta cero UFC/mL del conteo en placa con respecto a la muestra control Anexo 4 Figura 24, de la misma forma se observó una disminución total de UFC/mL en placa para las cepas controles de *E. coli* y *S. Aureus* partir de las concentraciones 5.39 µg/L (50 mM) y 8.09 µg/L (75 mM) respectivamente de cada cepa.

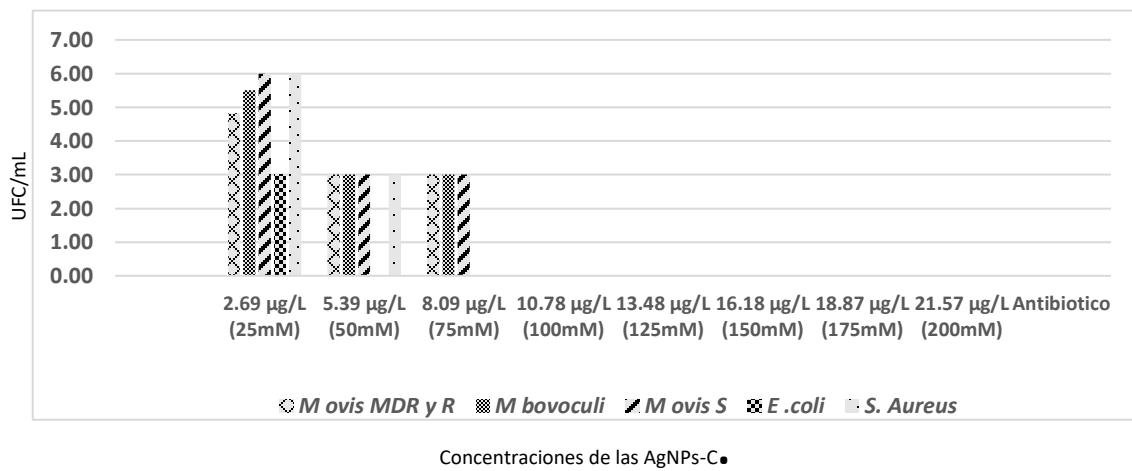


Figura 24. Actividad antimicrobiana de las AgNPs-C en *Moraxella* spp., por el método de conteo de colonias en suplementación de las AgNPs en el agar.

VIII. DISCUSIÓN.

En este estudio se obtuvo una prevalencia de 24.27% (209/861) de animales con lesiones de QCO en los municipios estudiados (Lerma, Xonacatlán, Capulhuac, Toluca, Calimaya y Tenango) del Estado de México, estos resultados son inferiores a lo reportado por (Dagnall, 1994a) en el Reino Unido donde observó una prevalencia de 72% (97/134) de animales con lesiones de ojos, la diferencia de los resultados puede deberse a diversos factores como; al periodo de la toma de las muestras, al tipo de sistema de crianza de ovejas en los diferentes países así como de factores medioambientales. En países como Noruega se ha observado un incremento de casos de QCO en periodos de otoño e invierno esto debido al sistema de crianza de ovejas en este país, donde en verano los animales son llevados al pastoreo y en invierno son estabulados (Akerstedt y Hofshagen, 2004), al contrario de lo que ocurre en México donde los sistemas de crianza de ovejas son de forma intensiva, semi intensiva extensiva, mixta y pastoreo (Díaz, 1999), en este estudio se realizó la recolección de muestras en el periodo de primavera verano y recolectadas en diferentes sistemas de crianza de ovejas este país, son factores que intervienen en los resultados obtenidos en este estudio sobre la enfermedad. Se ha reportado que la presencia de moscas, polvo, la luz solar y la presencia de otros microorganismos implicados son considerados factores de riesgo en la enfermedad (Egwu *et al.*, 1989).

Dagnall (1994a) reportó una prevalencia de 28.57% (28/97) de aislamientos de *Moraxella ovis* y (Akerstedt y Hofshagen, 2004), 28% (24/85) en rebaños con la enfermedad, datos similares se obtuvieron en este trabajo reportando el 27.7% (58/209) de aislamientos de *M. ovis* de ovinos con QCO.

El primer aislamiento de *Moraxella bovoculi* fue reportado en los Estados Unidos (Angelos *et al.*, 2007), posteriormente en diversos estados de la Unión Americana (Gould *et al.*, 2013; Loy y Brodersen, 2014), también se ha reportado en Uruguay (Sosa y Zunino, 2013), Argentina, Noruega y Brasil (Farias *et al.*, 2015; Libardoni *et al.*, 2012) todos en casos de QIB en bovinos, en estudios recientemente se ha reportado el aislamiento de *M. bovoculi* de renos semidomesticados en Suecia (Sanchez Romano *et al.*, 2019). En el caso de ovinos el primer reporte de *Moraxella bovoculi* lo realizaron Farias *et al.* (2015) en Brasil, sin embargo, este es el segundo estudio donde se reporta el aislamiento de dos cepas *M. bovoculi* en ovinos en Latinoamérica. Pero es el primer reporte de aislamientos de *M. bovoculi* obtenidos en casos clínicos de QCO en México.

En el caso de *Moraxella bovis* solo se ha aislado en casos de QIB en bovinos (O'Connor *et al.*, 2012) y solo hay un reporte en el 2017 en la India de ovinos (Karthik *et al.*, 2017) en nuestro estudio no fue posible aislarlo de muestras ovinas.

Estudios realizados por Shen *et al.* (2011), donde amplificaron mediante PCR multiplex el gen *16S rRNA* se obtuvo que el 89.5% (51/57) fue identificado correctamente como *M. bovoculi* (44/51) y *M. bovis* (7/51), en este estudio se amplificó el 90.0% (54/60) de los aislados identificando correctamente como *M. ovis* (52/58) y *M. bovoculi* (2/2). Para los aislados que no amplificaron el gen *16S rRNA* puede deberse al diseño de cebadores que conduce a resultados diferentes, debido a la afinidad de unión en las regiones conservadas, en la resolución de cada región variable en el microorganismo (Soergel *et al.*, 2012).

Farias *et al.* (2015) amplificaron el gen *rtxA* en el 100% (33/33) de los aislados, provenientes de bovinos y ovinos con queratoconjuntivitis, identificando correctamente como *Moraxella bovis* (15/33), *Moraxella bovoculi* (11/33) y *Moraxella ovis* (7/33), en este estudio se amplificó el gen *rtxA* en 95% (57/60) de los aislados identificando como *Moraxella ovis* (55/58) y *Moraxella bovoculi* (2/2). Los aislamientos de *M. ovis* que no amplificaron el gen *rtxA*, puede deberse a posibles variaciones en el marco de lectura en la secuencias por deleciones o ausencia de regiones de secuencias repetidas que rodean al operón RXT, la cual se ha reportado en cepas de *M. bovis* no hemolíticas (Angelos *et al.*, 2003), en estudios recientes, realizado por (Dickey *et al.*, 2018) ellos detectaron una recombinación en las secuencias de nucleótidos dentro de las regiones no codificantes en los genes *rRNA* y *RTX* en cepas de *M. bovoculi*.

Según la Organización Mundial de la Salud, existen dos métodos de supervisión de la resistencia antimicrobiana: *in vivo* (fracasos terapéuticos) o *in vitro* (pruebas de laboratorio). Dentro de los métodos *in vitro*, están los fenotípicos (Kirby-Bauer o concentración mínima inhibitoria) y los moleculares cuando se hacen pruebas genéticas (OMS, 2001).

Son escasos los datos disponibles en la literatura sobre caracterización fenotípica y genotípica de sensibilidad antimicrobiana de *M. ovis* y *M. bovoculi*. El primer estudio de sensibilidad antimicrobiana *in vitro* de *Moraxella bovoculi* lo realizaron Angelos *et al.* (2011) y reportaron resistencia a la penicilina (12.3%), el segundo estudio lo realizaron Maboni *et al.* (2015) donde determinaron 9% (1/11) de las cepas de *M. bovoculi* resistentes a la penicilina, en ambos trabajos los aislamientos de *M. bovoculi* resultaron sensibles a la ampicilina, oxitetraciclina, gentamicina, florfenicol y sulfametoxazol/trimetropim. Este estudio es el tercer trabajo realizado, donde se reportan cepas de *M. bovoculi* resistentes al ácido nalidixico 100% (2/2), y resistencia intermedia a ciprofloxacino y cefotaxima 50% (1/2) y se reporta de forma similar sensibilidad a los antibióticos mencionados.

Elad *et al.* (1988) reportaron cepas de *M. ovis* resistentes a la penicilina, ampicilina, estreptomina y neomicina, en otro estudio realizado por Catry *et al.* (2007) encontraron cepas de *M. ovis* resistentes a la eritromicina, el trabajo más reciente realizado por Maboni *et al.* (2015), demostraron aislado de *M. ovis* resistentes a la oxitetraciclina 9% (1/11) y a penicilina 18% (2/11), todos los autores describen cepas de *M. ovis* sensibles a la gentamicina, cloranfenicol, florfenicol y sulfonamidas en este estudio se reporta de forma similar que todos los aislados *M. ovis* fueron sensibles a la gentamicina 100% (58/58), pero se encontró el 10.34% (6/58) de cepas resistentes a la ampicilina, 6.89% (4/58) al cloranfenicol, 3.44% (2/58) a la tetraciclina, y el 1.72% (1/58) al sulfametaxazol/trimetropim.

La oxitetraciclina suele ser la primera opción para el tratamiento de la queratoconjuntivitis (Alexander, 2010), sin embargo el uso indiscriminado de oxitetraciclina a lo largo de los años puede estar relacionado con la selección de *Moraxella* spp. resistentes a este fármaco (Maboni *et al.*, 2015). Al igual que la oxitetraciclina, se ha informado que el florfenicol es una opción terapéutica eficaz para combatir la queratoconjuntivitis (Gokce *et al.*, 2002; Angelos *et al.*, 2011). Es importante señalar que el control de *M. ovis* en la QCO, es por medio del uso de antibióticos, con el fin de evitar la exacerbación de lesiones causadas principalmente por otros agentes bacterianos tales como *M. conjunctivae* y *C. psittaci* (Dagnall, 1994a).

Este el primer estudio que se amplifican los genes *sul1*, *sul2*, *tetB*, *qnrA* *qnrB* y *Bla_{TEM}* en cepas de *Moraxella ovis* tanto resistentes como sensibles y los genes *sul1*, *qnrA*, *qnrB* y *Bla_{TEM}* en *Moraxella bovoculi* resistentes obtenidos de casos clínicos de QCO. El único estudio asociado a determinantes de resistencia antimicrobiana (AMR) en *Moraxella bovoculi* lo realizaron Dickey *et al.* (2016) y describieron diez determinantes de AMR que fueron ubicados en una isla genómica mayor de 27 kb en las secuencias de los aislados de *M. bovoculi* y *Mb58069* que era resistente al florfenicol, oxitetraciclina, sulfonamidas y mostró resistencia intermedia a los macrólidos.

En un estudio similar realizado por Roberts (1991) se describieron cepas de *Moraxella catarrhalis* resistentes a la tetraciclina que portan el gen *tetB* en su cromosoma. El gen *tetB* tiene el rango más amplio de hospedadores entre las especies Gram negativas como *E.coli* (Medina *et al.*, 2011; Mirzaagha *et al.*, 2011), *Acinetobacter baumannii* (Martí *et al.*, 2006), *Actinobacillus actinomycetemcomitans* (Roe *et al.*, 1995), *Haemophilus influenzae* (Robert, 1980) y *Treponema denticola* (Roberts, 1996).

Además, se han reportado otros géneros bacterianos portadores de los genes de resistencia *sul1*, *sul2* y *Bla_{TEM}* como es el caso en cepas de *E. coli* (Kern *et al.*, 2002; Grape *et al.*, 2003; Infante *et al.*,

2005; Ho *et al.*, 2009; Medina *et al.*, 2011; Gnida *et al.*, 2014; Memariani *et al.*, 2015), *Klebsiella pneumoniae*, *Pseudomona aeruginosa* (Peymani *et al.*, 2017), *Proteus mirabilis* (Feizabadi *et al.*, 2010; Gong *et al.*, 2018), *Salmonella* spp. (Maka *et al.*, 2015), *Stenotrophomonas maltophilia* (Hu *et al.*, 2011), así mismo bacterias portadores de los genes *qnrA* y *qnrB* como *Klebsiella pneumoniae* (Rodríguez-Martínez *et al.*, 2003), *E. coli* (Wang *et al.*, 2003; Jiang *et al.*, 2008; Aguilar-Montes de Oca *et al.*, 2015), *P. aeruginosa*, *Enterobacter cloacae* (Wu *et al.*, 2007), *Actinobacter baumannii* (Touati *et al.*, 2008), *Salmonella enterica* (Murray *et al.*, 2008), *Enterobacter aerogenes*, *Citrobacter freundii* (Park *et al.*, 2007), *Kluyvera* (Kraychete *et al.*, 2016), entre otros.

De manera general existe una amplia gama de reportes que muestran el efecto bactericida de las AgNPs con diferentes métodos de evaluación como difusión en disco, microdilución en placa o en agar, placas de agar suplementadas y evaluación en superficie (Abbaszadegan *et al.* 2014; Bondarenko *et al.* 2013; Inbaneson *et al.* 2011; Morones *et al.* 2005 y Salopek-Sondi 2004). La diferencia entre los métodos de evaluación genera resultados diferentes.

Cuando las AgNPs-C ≤ 100 nm estabilizadas con PVP se emplean por el método difusión en disco muestran una actividad bactericida en los aislamientos de *Moraxella ovis* (MDR, R y S) y *M. bovoculi* (R) a una concentración de 10.78 $\mu\text{g/L}$ (100mM), mientras que en *E. coli* y *S. aureus* requiere concentraciones menor de 5.39 $\mu\text{g/L}$ (50mM) y 8.09 $\mu\text{g/L}$ (75mM) para mostrar el mismo efecto, estos resultados obtenidos concuerdan con la literatura, ya que, cuando aumenta el tamaño de la partícula, aumenta también la CMI, como se compara con el estudio realizado por (Saeb *et al.*, 2014) cuando se emplean las AgNPs de 4-30 nm sintetizadas mediante microorganismos como *Escherichia hermannii*, *Citrobacter sedlakii* y *Pseudomonas putida* requieren una concentración de 0.0002 $\mu\text{g}/20\mu\text{L}$ para mostrar efecto bactericida contra agentes patógenos como *K. pneumonia*, *S. epidermidis*, *S. aureus* y *E. coli*, sin embargo se han visto estudios como el de (Umashankari *et al.*, 2012) empleando el mismo método de evaluación con las AgNPs de diámetro 4-26 nm sintetizadas a partir de extracto de *R. mucronata* requiere una concentración de 75 $\mu\text{g/L}$ para mostrar un efecto antimicrobiano en cepas de *Flavobacterium* spp, *Pseudomona floescence*, *Proteus* spp. Sin embargo concordamos que a medida que, disminuye el tamaño de partícula aumenta la actividad antibacteriana (Espinosa-Cristóbal *et al.*, 2009).

El estudio hecho por Muthukrishnan *et al.* (2015), donde encontraron que por el método de difusión en disco, la actividad antimicrobiana de las AgNPs de 100 a 110 nm de diámetro sintetizadas a partir de extracto de planta de *Ceropegia thwaitesii* mostraron tener un efecto bactericida en *Salmonella typhi* y *Bacillus subtilis*, sin embargo las cepas *Staphylococcus aureus* y *Staphylococcus epidermis*

mostraron menor actividad antimicrobiana, así mismo, en otro estudio realizado por (Nalwade y Jadhav, 2013) evaluaron las AgNPs de 28.42 nm sintetizada de extracto de *Daturaalba Nees* mostraron actividad en cepas de *C. diphtheriae*, también el estudio realizado por (Kim *et al.*, 2007) evaluaron las AgNPs de 13.5 nm \pm 2.6 mostraron un efecto en levaduras, *E. coli* O157:H7 y *S. aureus*, en otro estudio reportado por (Jacob Inbaneson *et al.*, 2011) evaluaron las AgNPs estabilizadas con citrato trisódico mostraron actividad antimicrobiana contra *P. aeruginosa*, *Enterobacter* spp. a concentraciones de 5-20 mg/disc⁻¹ y por último, el estudio realizado por (Geethalakshmi y Sarada, 2012) donde emplearon las AgNPs sintetizadas de *Trianthema decandra* de 36-94 nm a una concentración de 10 mg/mL contra bacterias de interés clínico reportaron una actividad antimicrobiana en *Y. enterocolitica*, *P. vulgaris*, *E. coli*, *S. aureus* y *S. faecalis*., En gran parte de los estudios el efecto antimicrobiano fue más pronunciado en bacterias Gram negativas que en Gram positivas, esto se debe a las propiedades de las AgNPs con respecto a su tamaño ya que entre más pequeñas las nanopartículas, aparentemente tiene mejor capacidad de penetración en las bacterias, especialmente en Gram negativas (Morones *et al.*, 2005), además, el potencial antimicrobiano de las AgNPs también es influenciado por las características de los microorganismos como el espesor y la composición de la pared celular, esto es debido a que bacterias Gram positivas poseen una pared celular que está compuesta de una capa de peptidoglicano (grosor de 30 nm), en el caso contrario de bacterias Gram negativas tienen una membrana más delgada (grosor de 3–4 nm) lo que hace que sean más susceptibles a las AgNPs (Rai *et al.*, 2012).

En este estudio el uso de las AgNPs-C \leq 100 nm en la superficie en placa demostraron la inhibición del desarrollo de *Moraxella ovis* (MDR, R y S), *M. bovoculi* (R) y *S. aureus* a una concentración 8.09 μ g/L (75mM) y en *E. coli* de 5.39 μ g/L (50mM), las CMI encontradas en este estudio fueron similares a lo reportado por (Lara *et al.*, 2010) ellos reportaron que a concentraciones de 79.4 mM de las AgNPs-C de 100 nm mostraron un efecto bactericida en cepas de *Streptococcus pyogenes* resistentes eritromicina, *Escherichia coli* O157:H7 resistentes ampicilina, *Pseudomona aeruginosa* MDR y el mismo efecto a concentraciones de 65.3 mM en cepas sensibles de las mismas bacterias. Mientras que este estudio las CMI fueron inferiores a lo reportado por (Kim *et al.*, 2011) ellos demostraron la inhibición de crecimiento de *S. aureus* y *E. coli* utilizando AgNPs-C a una concentración 100 μ g/mL.

Estudio similar realizado por (Ayala-Núñez *et al.*, 2009) evaluaron tres tipos de AgNPs-C con diferentes diámetros \leq 100 nm, de 30-40 nm y \leq 10 nm en *S. aureus* MRSA y no MRSA, demostraron que el tamaño de las AgNPs importa, debido a que las AgNPs de \leq 10 nm a una concentración 1.35 mg /mL resultaron ser las más efectivas en cuanto a la actividad bactericida y su efecto no citotóxico en células epiteliales mientras que las AgNPs-C \leq 100 nm no inhibió las cepas de *S. aureus* MRSA y

no MRSA a concentraciones que no afectaran la viabilidad celular, no obstante el tamaño de las AgNPs es una de las propiedades más importantes del efecto de toxicidad (Carlson *et al.*, 2008; Choi y Hu, 2008), sin embargo, existen otros factores fisicoquímicos que afectan la toxicidad de las AgNPs que no depende solo del tamaño, sino también de la forma, superficie específica, estado de aglomeración, solubilidad y carga superficial. En general, los mayores efectos tóxicos han sido observados con las AgNPs más pequeñas (Ávalos *et al.*, 2013).

La suplementación de las AgNPs-C \leq 100 nm en agar demostró de igual manera la inhibición de *Moraxella ovis* y *M. bovoculi* a una concentración de 10.78 $\mu\text{g/L}$ (100mM) y para *E. coli* y *S. aureus* de 5.39 $\mu\text{g/L}$ (50mM) y 8.09 $\mu\text{g/L}$ (75mM), sin embargo, las CMI de este estudio fueron superiores a lo reportado por (Le *et al.*, 2010) en la cual emplearon la suplementación en el agar con las AgNPs estabilizadas con ácido oleico y de las AgNPs con ácido mirístico, entre diámetro de 6 -10 nm demostrando una inhibición en el crecimiento para *E. coli* y *S. aureus* a una concentración de 2 $\mu\text{g/mL}$ con las AgNPs estabilizadas con ácido oleico y cuatro veces más con AgNPs estabilizadas con mirístico, comparando con el estudio realizado por (Sondi y Salopek-Sondi, 2004) dicho autores reportaron que a partir de una concentración de 50-60 mg/cm^3 de AgNPs se tiene un efecto antimicrobiano en *E. coli*, por lo tanto los resultados fueron similares en las CMI para la inhibición en el crecimiento de *E. coli* en ambos trabajos, aunque en este estudio se demostró que se requieren concentraciones superiores para la inhibición de crecimiento de *M. ovis* y *M. bovoculi* y *S. aureus*, concordando lo que mencionan (Sondi y Salopek-Sondi, 2004) a pesar de las diferencias encontradas entre el/los tipo (s) de AgNPs que se usan en cada estudio, las respuesta de cada bacterias es única para cada especie.

El efecto antimicrobiano de las AgNPs en cepas de *M. ovis* (MDR, R y S) y *M. bovoculi* (R) fueron similares utilizando el método de suplementación en el agar y en superficie en placa, no obstante se observó que el método superficie en placa la CMI fue menor, aunque se ha descrito que se puede asociar a que el uso de las AgNPs en un medio líquido e incluso en altas concentraciones, produce solo el retraso del crecimiento de las bacterias debido a que la concentración de las nanopartículas disminuye gradualmente. Este proceso se rige por la interacción de estas partículas con las sustancias intracelulares de las células destruidas, lo que provoca su aglomeración y eliminación del sistema líquido (Sondi y Salopek-Sondi, 2004), aunado a la respuesta de las bacterias por la diferencia en la estructura (membrana interna, membrana externa y presencia o ausencia de pared celular), en los mecanismo de resistencia y adaptaciones (formación de biofilm) de las bacterias (Martínez y Baquero, 2002) y del estado al estado fisiológico (en fase de adaptación exponencial, estacionaria o de latencia)

de la célula (Lara *et al.*, 2011) así como el número de células expuestas a las AgNPs (Sondi y Salopek-Sondi, 2004).

Se determinó que se requieren las mismas CMI de las AgNPs para la inhibición del crecimiento de las cepas de *Moraxella ovis* y *Moraxella bovoculi* con perfiles de resistencia distintos, este efecto con las AgNPs ya se tiene reportado, coincidiendo con el estudio de (Ayala-Núñez *et al.*, 2009) que menciona que el efecto antibacteriano de las AgNPs depende de la concentración, pero el efecto es independiente de la adquisición de resistencia antimicrobiana por parte de las bacterias.

Con base a lo último mencionado y con los resultados aquí mostrados como los encontrados en la literatura con respecto a las concentraciones de AgNPs y el uso de estas en la actividad antimicrobiana en diversas bacterias cabe la posibilidad de aceptar la hipótesis que las nanopartículas de plata tienen un efecto bactericida contra cepas distintos perfiles de resistencia de *Moraxella* spp, sin embargo se necesita más estudios para evaluar los riesgos y sus efectos nanotoxicológicos *in vitro* e *in vivo* de las AgNPs (Buzea *et al.*, 2007; Frejo *et al.*, 2011).

IX. CONCLUSIONES.

En este estudio se aisló e identificó a *Moraxella ovis* y por primera vez a *Moraxella bovoculi* de casos clínicos de queratoconjuntivitis contagiosa ovina en el Estado de México. Se realizó la identificación genética mediante PCR específico de los genes *16s rRNA* y *rtxA*, haciendo la prueba más sensible para el diagnóstico de los agentes involucrados en la queratoconjuntivitis.

Se amplificaron por primera vez en aislados de *M. ovis* y *M. bovoculi* siete genes que confieren de resistencia antimicrobiana a las sulfonamidas (*sul1* y *sul2*), quinolonas (*qnrA* y *qnrB*), tetraciclinas (*tetB*), betalactámicos (*Bla_{TEM}*) y cloranfenicol/florfenicol (*floR*), por lo que es estudio representa una parte trascendental de la política de control en el uso de antibióticos y representa un panorama del futuro de la vigilancia de resistencia antimicrobiana.

Se determinó que la actividad bactericida de las AgNPs-C en aislados de *Moraxella ovis* (MDR, R y S) y *Moraxella Bovoculi* (R) se observó a partir de la concentración de 10.78 µg/L (100mM), mientras que la inhibición del crecimiento de las cepas controles de *E. coli* y *S. aureus* fueron a concentraciones de 5.39 µg/L (50mM) y 8.09 µg/L (75mM) respectivamente.

Con base a lo mencionado anteriormente y además los resultados aquí mostrados, así como los encontrados en la literatura con respecto a las enfermedades oculares en ovinos, a la aparición de bacterias con resistencia antimicrobiana y a la utilización de las AgNPs, es posible decir que las nanopartículas de plata son una buena alternativa para el tratamiento de casos clínicos de queratoconjuntivitis contagiosa ovina provocada por bacterias del género *Moraxella*, con el fin de evitar el uso indiscriminado de antimicrobianos.

X. SUGERENCIAS.

- I. Evaluar el tiempo de la actividad antimicrobiana de las AgNPs y los efectos nanotoxicológicos de las AgNPs en modelos *in vitro* e *in vivo*.
- II. Realizar la genotipificación y análisis filogenético de los aislamientos de *Moraxella ovis* y *Moraxella bovoculi* obtenidos de ovinos en el Estado México.
- III. Caracterizar factores de virulencia de los aislamientos de *Moraxella ovis* y *Moraxella bovoculi*.
- IV. Identificar la asociación de otros agentes bacterianos y virales asociados lesiones oculares en ovinos en el Estado de México.

XI. LITERATURA.

- Aarestrup, F. M. (2005). Veterinary drug usage and antimicrobial resistance in bacteria of animal origin. *Basic and Clinical Pharmacology and Toxicology*, 96(4), 271–281.
- Abbaszadegan, A., Ghahramani, Y., Gholami, A., Hemmateenejad, B., Dorostkar, S., Nabavizadeh, M., & Sharghi, H. (2015). The effect of charge at the surface of silver nanoparticles on antimicrobial activity against Gram-positive and Gram-negative bacteria : a preliminary study. *Journal of Nanomaterials*, 2015, 1.8.
- Aguilar-Montes de Oca, S., Talavera-Rojas, M., Soriano-Vargas, E., Barba-León, J., & Vazquez-Navarrete, J. (2015). Determination of extended spectrum β -lactamases / AmpC β -lactamases and plasmid-mediated quinolone resistance in *Escherichia coli* isolates obtained from bovine carcasses in Mexico. *Trop Anim Health Prod*, 47(5), 975–981.
- Akerstedt, J., & Hofshagen, M. (2004). Bacteriological investigation of infectious keratoconjunctivitis in Norwegian sheep. *Acta Veterinaria Scandinavica*, 45(1), 19–26.
- Alexander, D. (2010). Infectious Bovine Keratoconjunctivitis: A Review of Cases in Clinical Practice. *Veterinary Clinics of North America - Food Animal Practice*, 26(3), 487–503.
- Allahverdiyev, A. M., Abamor, E. S., Bagirova, M., Ustundag, C. B., Kaya, C., Kaya, F., & Rafailovich, M. (2011). Antileishmanial effect of silver nanoparticles and their enhanced antiparasitic activity under ultraviolet light. *International Journal of Nanomedicine*, 6, 2705–2714.
- Allaker, R. P., & Ren, G. (2008). Potential impact of nanotechnology on the control of infectious diseases. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*, 102(1), 1–2.
- Angelos, J. A. (2015). Infectious bovine keratoconjunctivitis (pinkeye). *Veterinary Clinics of North America - Food Animal Practice*, 31(1), 61–79.
- Angelos, J. A., & Ball, L. M. (2007). Differentiation of *Moraxella bovoculi* sp. nov. from other coccoid moraxellae by the use of polymerase chain reaction and restriction endonuclease analysis of amplified DNA. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation*, 19(5), 532–534.
- Angelos, J. A., Ball, L. M., & Byrne, B. A. (2011). Minimum inhibitory concentrations of selected antimicrobial agents for *Moraxella bovoculi* associated with infectious bovine keratoconjunctivitis. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation*, 23(3), 552–555.
- Angelos, J. A., Ball, L. M., & Hess, J. F. (2007). Identification and characterization of complete RTX operons in *Moraxella bovoculi* and *Moraxella ovis*. *Veterinary Microbiology*, 125(1–2), 73–79.

- Angelos, J. A., Dueger, E. L., George, L. W., Carrier, T. K., Mihalyi, J. E., Cosgrove, S. B., & Johnson, J. C. (2010). Efficacy of florfenicol for treatment of naturally occurring infectious bovine keratoconjunctivitis. *J Am Vet Med Assoc*, *216*(1), 1998–2000.
- Angelos, J. A., Hess, J. F., & George, L. W. (2001). Cloning and characterization of a *Moraxella bovis* cytotoxin gene. *American Journal of Veterinary Research*, *62*(8), 1222–1228.
- Angelos, J. A., Hess, J. F., & George, L. W. (2003). An RTX operon in hemolytic *Moraxella bovis* is absent from nonhemolytic strains. *Veterinary Microbiology*, *92*(4), 363–377. [https://doi.org/10.1016/S0378-1135\(02\)00410-8](https://doi.org/10.1016/S0378-1135(02)00410-8)
- Angelos, J. A., Spinks, P. O., Ball, L. M., & George, L. W. (2007). *Moraxella bovoculi* sp. nov., isolated from calves with infectious bovine keratoconjunctivitis. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, *57*(4), 789–795.
- Ávalos, a., Haza, A., & Morales, P. (2013). Nanopartículas de plata: aplicaciones y riesgos tóxicos para la salud humana y el medio ambiente. *Revista Complutense de Ciencias Veterinarias*, *7*(2), 1–23.
- Ayala-Núñez, N. V., Lara Villegas, H. H., Del Carmen Ixtepan Turrent, L., & Rodríguez Padilla, C. (2009). Silver nanoparticles toxicity and bactericidal effect against methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*: Nanoscale does matter. *Nanobiotechnology*, *5*(1–4), 2–9.
- Bailey, J. K., Pinyon, J. L., Anantham, S., Hall, R. M., & Hall, R. M. (2010). Commensal *Escherichia coli* of healthy humans : a reservoir for antibiotic-resistance determinants printed in Great Britain. *Journal of Medical Microbiology*, *59*(11), 1331–1339.
- Baker, C., Pradhan, A., Pakstis, L., Pochan, D., & Shah, S. I. (2005). Synthesis and antibacterial properties of silver nanoparticles. *Journal of Nanoscience and Nanotechnology*, *5*(2), 244–249.
- Barton, M. D. (2000). Antibiotic use in animal feed and its impact on human health. *Nutrition Research Reviews*, *13*(2), 279–299.
- Belloy, L., Janovsky, M., Vilei, E. M., Pilo, P., Giacometti, M., & Frey, J. (2003). Molecular epidemiology of *Mycoplasma conjunctivae* in caprinae: transmission across species in natural outbreaks. *Applied and Environmental Microbiology*, *69*(4), 1913–1919.
- Bernal, Maye, R Guzman, Miguel, U. (1984). El antibiograma de discos. tecnica de Kirby-Bauer. *Biomedica*, *4*(3–4), 112–121.
- Bhattacharya, R., & Mukherjee, P. (2008). Biological properties of “naked” metal nanoparticles. *Advanced Drug Delivery Reviews*, *60*(11), 1289–1306.

- Biel, M. A., Sievert, C., Usacheva, M., Teichert, M., & Balcom, J. (2011). Antimicrobial photodynamic therapy treatment of chronic recurrent sinusitis biofilms. *International Forum of Allergy and Rhinology*, 1(5), 329–334.
- Bush, K., & Jacoby, G. A. (2010). Updated functional classification of β -lactamases. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 54(3), 969–976.
- Buzea, C., Pacheco, I. I., & Robbie, K. (2007). Nanomaterials and nanoparticles: Sources and toxicity. *Biointerphases*, 2(4), MR17-MR71.
- Cameron, A., & McAllister, T. A. (2016). Antimicrobial usage and resistance in beef production. *Journal of Animal Science and Biotechnology*, 7(68), 1–23.
- Carlson, C., Hussain, S. M., Schrand, A. M., Braydich-Stolle, L. K., Hess, K. L., Jones, R. L., & Schlager, J. J. (2008). Unique cellular interaction of silver nanoparticles: size-dependent generation of reactive oxygen species. *Journal Physical Chemistry B*, 112(43), 13608–13619.
- Catlin, B. W. (1991). *Branhamaceae* fam . nov ., a proposed family to accommodate the genera *Branhamella* and *Moraxella*. *International Journal of Systematic Bacteriology*, 41(2), 320–323.
- Catry, B., Boyen, F., Baele, M., Dewulf, J., de Kruif, A., Vanechoutte, M., Haesebrouck, F., & Decostere, A. (2007). Recovery of *Moraxella ovis* from the bovine respiratory tract and differentiation of *Moraxella* species by tDNA-intergenic spacer PCR. *Veterinary Microbiology*, 120(3–4), 375–380.
- Cattoir, V., Poirel, L., Rotimi, V., Soussy, C. J., & Nordmann, P. (2007). Multiplex PCR for detection of plasmid-mediated quinolone resistance qnr genes in ESBL-producing enterobacterial isolates. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 60(2), 394–397.
- Cerny, H. E., Rogers, D. G., Gray, J. T., Smith, R., Hinkley, S., & Smith, D. R. (2006). Effects of *Moraxella* (*Branhamella*) *ovis* culture filtrates on bovine erythrocytes, peripheral mononuclear cells, and corneal epithelial cells. *Journal of Clinical Microbiology*, 44(3), 772–776.
- Chamakura, K., Perez-ballesteros, R., Luo, Z., Bashir, S., & Liu, J. (2011). Comparison of bactericidal activities of silver nanoparticles with common chemical disinfectants. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 84(1), 88–96.
- Chen, X., & Schluesener, H. J. (2008). Nanosilver: a nanoproduct in medical application. *Toxicology Letters*, 176(1), 1–12.
- Chiu, C. H., Su, L. H., Chu, C. H., Wang, M. H., Yeh, C. M., Weill, F. X., & Chu, C. (2006). Detection of multidrug-resistant *Salmonella enterica* serovar *typhimurium* phage types DT102, DT104,

- and U302 by multiplex PCR. *Journal of Clinical Microbiology*, 44(7), 2354–2358.
- Chopra, I., & Roberts, M. (2001). Tetracycline antibiotics : mode of action , applications , molecular biology , and epidemiology of bacterial resistance. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 65(2), 232–260.
- Corvec, S., Beyrouthy, R., Crémet, L., Aubin, G., Robin, F., & Bonnet, R. (2013). TEM-187, a new extended-spectrum β -lactamase with weak activity in a *Proteus mirabilis* clinical strain. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 57(5), 2410–2412.
- Cota-Rubio, E., Hurtado-Ayala, L., Pérez-Morales, E., & Alcántara-Jurado, L. (2014). Resistencia a antibióticos de cepas bacterianas aisladas de animales destinados al consumo humano. *Revista Iberoamericana de Ciencias*, 1(1), 75–85.
- Dagnall, G. J. R. (1994a). An investigation of colonization of the conjunctival sac of sheep by bacteria and mycoplasmas. *Epidemiology and Infection*, 112(3), 561–567.
- Dagnall, G. J. R. (1994b). The role of *Branhamella ovis*, *Mycoplasma conjunctivae* and *Chlamydia psittaci* in conjunctivitis of sheep. *British Veterinary Journal*, 150(1), 65–71.
- Dallenne, C., da Costa, A., Decré, D., Favier, C., & Arlet, G. (2010). Development of a set of multiplex PCR assays for the detection of genes encoding important β -lactamases in *Enterobacteriaceae*. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 65(3), 490–495.
- De Souza, A., Mehta, D., & Leavitt, R. W. (2006). Bactericidal activity of combinations of silver-water dispersion™ with 19 antibiotics against seven microbial strains. *Current Science*, 91(7), 926–929.
- Degiorgis, M.-P., Abdo, E.-M., Nicolet, J., Frey, J., Mayer, D., & Giacometti, M. (2000). Immune responses to *Mycoplasma Conjunctivae* in alpine ibex, alpine chamois, and domestic sheep in Switzerland. *Journal of Wildlife Diseases*, 36(2), 265–271.
- Devi, P., Patil, S. D., Jeevanandam, P., Navani, N. K., & Singla, M. L. (2014). Synthesis, characterization and bactericidal activity of silica/silver core–shell nanoparticles. *Journal of Materials Science: Materials in Medicine*, 25(5), 1267–1273.
- Dickey, A. M., Loy, J. D., Bono, J. L., Smith, T. P. L., Apley, M. D., Lubbers, B. V., DeDonder, K.D., Capil, S.F., Larson, R.L., White, B.J., Blom, J., & Clawson, M. L. (2016). Large genomic differences between *Moraxella bovoculi* isolates acquired from the eyes of cattle with infectious bovine keratoconjunctivitis versus the deep nasopharynx of asymptomatic cattle. *Veterinary Research*, 47(31), 1–11.

- Dickey, A. M., Schuller, G., Loy, J. D., & Clawson, M. L. (2018). Whole genome sequencing of *Moraxella bovoculi* reveals high genetic diversity and evidence for interspecies recombination at multiple loci. *PLOS ONE*, *December 1*, 1–14.
- Doddapaneni, S. J. D. S., Amgoth, C., Kalle, A. M., Suryadevara, S. N., & Alapati, K. S. (2018). Antimicrobial and anticancer activity of AgNPs coated with *Alphonsea sclerocarpa* extract. *3 Biotech*, *8*(3), 1–9.
- Dos Santos, C. A., Seckler, M. M., Ingle, A. P., Gupta, I., Galdiero, S., Galdiero, M., Gade, A., & Rai, M. (2014). Silver nanoparticles: therapeutical uses, toxicity, and safety issues. *Journal of Pharmaceutical Sciences*, *103*(7), 1931–1944.
- Edwards-Jones, V. (2009). The benefits of silver in hygiene, personal care and healthcare. *Letters in Applied Microbiology*, *49*(2), 147–152.
- Eidam, C., Poehlein, A., Brenner Michael, G., Kadlec, K., Liesegang, H., Brzuszkiewicz, E., Daniel, R., Sweeney, M.T., Murray, R. W., Watts, J. L., & Schwarz, S. (2013). Complete genome sequence of *Mannheimia haemolytica* strain 42548 from a case of bovine respiratory disease. *Genome Announcements*, *1*(3), 1–2.
- Eidam, C., Poehlein, A., Leimbach, A., Michael, G. B., Kadlec, K., Liesegang, H., Daniel, R., Sweeney, M.T., Murray, R. W., Watts, J. L., & Schwarz, S. (2015). Analysis and comparative genomics of ICEMh1, a novel integrative and conjugative element (ICE) of *Mannheimia haemolytica*. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, *70*(1), 93–97.
- Elad, D., Yeruham, I., & Bernstein, M. (1988). *Moraxella ovis* in cases of infectious bovine keratoconjunctivitis (IBK) in Israel. *Journal of Veterinary Medicine, Series B*, *35*(1–10), 431–434.
- Espinosa-Cristóbal, L. F., Martínez-Castañón, G. A., Martínez-Martínez, R. E., Loyola-Rodríguez, J. P., N. Patiño-Marín, Reyes-Macías, J. F., & Ruiz, F. (2009). Antibacterial effect of silver nanoparticles against *Streptococcus mutans*. *Materials Letters*, *63*(29), 2603–2606.
- Eustis, S., Krylova, G., Smirnova, N., Eremenko, A., Tabor, C., Huang, W., & El-Sayed, M. A. (2006). Using silica films and powders modified with benzophenone to photoreduce silver nanoparticles. *Journal of Photochemistry and Photobiology A: Chemistry*, *181*(2–3), 385–393.
- Fajardo, A., & Martínez, J. L. (2008). Antibiotics as signals that trigger specific bacterial responses. *Current Opinion in Microbiology*, *11*(2), 161–167. <https://doi.org/10.1016/j.mib.2008.02.006>
- Falagas ME, K. D. (2008). Pandrug resistance (PDR), extensive drug resistance (XDR), and

- multidrug resistance (MDR) among Gram-negative *Bacilli*: need for international harmonization in terminology. *Clinical Infectious Diseases*, 46(7), 1121–1122.
- Fallon, R., O’Sullivan, N., Maher, M., & Carroll, C. (2003). Antimicrobial resistance of *Campylobacter jejuni* and *Campylobacter coli* isolates from broiler chickens isolated at an Irish poultry processing plant. *Letters in Applied Microbiology*, 36(5), 277–281.
- Farias, L. D. A., Maboni, G., Matter, L. B., Scherer, C. F. C., Libardoni, F., & de Vargas, A. C. (2015). Phylogenetic analysis and genetic diversity of 3’ region of rtxA gene from geographically diverse strains of *Moraxella bovis*, *Moraxella bovoculi* and *Moraxella ovis*. *Veterinary Microbiology*, 178(3–4), 283–287.
- Feizabadi, M. M., Delfani, S., Raji, N., Manjooi, A., Aligholi, M., Shahcheraghi, F., Parvin, M., & Yadegarinia, D. (2010). Distribution of *blaTEM*, *blaSHV*, *blaCTX-M* genes among clinical isolates of *Klebsiella pneumoniae* at Labbafinejad Hospital, Tehran, Iran. *Microbial Drug Resistance*, 16(1), 49–53.
- Fernández-Aguilar, X., Cabezón, Ó., Marco, I., Mentaberre, G., Frey, J., Lavín, S., & López-Olvera, J. R. (2013). *Mycoplasma conjunctivae* in domestic small ruminants from high mountain habitats in Northern Spain. *BMC Veterinary Research*, 9(253), 1–5. <https://doi.org/10.1186/1746-6148-9-253>
- Franci, G., Falanga, A., Galdiero, S., Palomba, L., Rai, M., Morelli, G., & Galdiero, M. (2015). Silver nanoparticles as potential antibacterial agents. *Molecules*, 20(5), 8856–8874.
- Frejo, M., Díaz, M., Lobo, M., García, J., & Capó, M. (2011). Nanotoxicología ambiental: retos actuales. *Medicina Balear*, 26(2), 36–46.
- Frey, J. (2011). The role of RTX toxins in host specificity of animal pathogenic *Pasteurellaceae*. *Veterinary Microbiology*, 153(1–2), 51–58.
- Ge, L., Li, Q., Wang, M., Ouyang, J., Li, X., & Xing, M. M. Q. (2014). Nanosilver particles in medical applications: synthesis, performance, and toxicity. *International Journal of Nanomedicine*.
- Geethalakshmi, R., & Sarada, D. V. L. (2012). Gold and silver nanoparticles from *Trianthema decandra*: synthesis, characterization, and antimicrobial properties. *International Journal of Nanomedicine*, 7, 5375–5384. <https://doi.org/10.2147/IJN.S36516>
- Gehring, R., Baynes, R. E., & Riviere, J. E. (2006). Application of risk assessment and management principles to the extralabel use of drugs in food-producing animals. *Journal Veterinary Pharmacology Therapeutics*, 29(1), 5–14.

- Gnida, A., Kunda, K., Ziemińska, A., Łuczkiwicz, A., Felis, E., & Surmacz-Górska, J. (2014). Detection of sulfonamide resistance genes via in situ PCR-FISH. *Polish Journal of Microbiology*, 63(2), 167–173.
- Gokce, H. I., Cital, M., Genc, O., Erdogan, H. M., Gunes, V., & Kankavi, O. (2002). A comparison of the efficacy of florfenicol and oxytetracycline in the treatment of naturally occurring infectious bovine keratoconjunctivitis. *Irish Veterinary Journal*, 55(11), 573–576.
- Gong, J., Zhuang, L., Zhang, D., Zhang, P., Dou, X., & Wang, C. (2018). Establishment of a multiplex loop-mediated isothermal amplification method for rapid detection of sulfonamide (*sul1*, *sul2*, *sul3*) in clinical *Enterobacteriaceae* isolates from Poultry. *Foodborne Pathogens and Disease*, 15(7), 413–419.
- Gould, S., Dewell, R., Tofflemire, K., Whitley, R. D., Millman, S. T., Opriessnig, T., Opriessnig, T., rosenbusch, R., Trujillo, J., & O'Connor, A. M. (2013). Randomized blinded challenge study to assess association between *Moraxella bovoculi* and infectious bovine keratoconjunctivitis in dairy calves. *Veterinary Microbiology*, 164(1–2), 108–115.
- Grape, M., Sundström, L., & Kronvall, G. (2003). Sulphonamide resistance gene *sul3* found in *Escherichia coli* isolates from human sources. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 52(6), 1022–1024.
- Ho, P. L., Wong, R. C., Chow, K. H., & Que, T. L. (2009). Distribution of integron-associated trimethoprim-sulfamethoxazole resistance determinants among *Escherichia coli* from humans and food-producing animals. *Letters in Applied Microbiology*, 49(5), 627–634.
- Hsueh, Y. H., Lin, K. S., Ke, W. J., Hsieh, C. Te, Chiang, C. L., Tzou, D. Y., & Liu, S. T. (2015). The antimicrobial properties of silver nanoparticles in *Bacillus subtilis* are mediated by released Ag⁺ ions. *PLoS ONE*, 10(12), 1–17.
- Hu, L., Chang, X., Ye, Y., Wang, Z., Shao, Y., Shi, W., Li, X., & Li, J. (2011). *Stenotrophomonas maltophilia* resistance to trimethoprim/sulfamethoxazole mediated by acquisition of *sul* and *dfrA* genes in a plasmid-mediated class 1 integron. *International Journal of Antimicrobial Agents*, 37(3), 230–234.
- Huh, & Kwon. (2011). “ Nanoantibiotics ” : A new paradigm for treating infectious diseases using nanomaterials in the antibiotics resistant era. *Journal of Controlled Release*, 156(2), 128–145.
- Ibar, M. P., Vigo, G., Piñeyro, P., Caffer, M. I., Quiroga, P., Perfumo, C., Centrón, P., & Giacoboni, G. (2009). Serovariedades de *Salmonella enterica* subespecie *enterica* en porcinos de faena y su resistencia a los antimicrobianos. *Revista Argentina de Microbiología*, 41(3), 156–162.

- Infante, B., Grape, M., Larsson, M., Kristiansson, C., Pallecchi, L., Rossolini, G. M., & Kronvall, G. (2005). Acquired sulphonamide resistance genes in faecal *Escherichia coli* from healthy children in Bolivia and Peru. *International Journal of Antimicrobial Agents*, 25(4), 308–312.
- Iniesta, A. A., McGrath, P. T., Reisenauer, A., McAdams, H. H., & Shapiro, L. (2006). A phospho-signaling pathway controls the localization and activity of a protease complex critical for bacterial cell cycle progression. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 103(29), 10935–10940.
- Irwin, P., Martin, J., Nguyen, L. H., He, Y., Gehring, A., & Chen, C. Y. (2010). Antimicrobial activity of spherical silver nanoparticles prepared using a biocompatible macromolecular capping agent: evidence for induction of a greatly prolonged bacterial lag phase. *Journal of Nanobiotechnology*, 8, 1–12.
- Jacob Inbaneson, S., Ravikumar, S., & Manikandan, N. (2011). Antibacterial potential of silver nanoparticles against isolated urinary tract infectious bacterial pathogens. *Applied Nanoscience*, 1(4), 231–236.
- Jacoby, G., Cattoir, V., Hooper, D., Martínez-Martínez, L., Nordmann, P., Pascual, A., Poirel, L., & Wang, M. (2008). *Qnr* gene nomenclature. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 52(7), 2297–2299.
- Jain, P., & Pradeep, T. (2005). Potential of silver nanoparticle-coated polyurethane foam as an antibacterial water filter. *Biotechnology and Bioengineering*, 90(1), 59–63.
- Jana, S., & Pal, T. (2007). Synthesis, characterization and catalytic application of silver nanoshell coated functionalized polystyrene beads. *Journal of Nanoscience and Nanotechnology*, 7(6), 2151–2156.
- Jiang, Y., Zhou, Z., Qian, Y., Wei, Z., Yu, Y., Hu, S., & Li, L. (2008). Plasmid-mediated quinolone resistance determinants *qnr* and *aac(60)-Ib-cr* in extended-spectrum β -lactamase-producing *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae* in China. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 61(5), 1003–1006.
- Jung, W. K., Koo, H. C., Kim, K. W., Shin, S., Kim, S. H., & Park, Y. H. (2008). Antibacterial activity and mechanism of action of the silver ion in *Staphylococcus aureus* and *Escherichia coli*. *Applied and Environmental Microbiology*, 74(7), 2171–2178.
- Kakuda, T., Sarataphan, N., Tanaka, T., & Takai, S. (2006). Filamentous-haemagglutinin-like protein genes encoded on a plasmid of *Moraxella bovis*. *Veterinary Microbiology*, 118(1–2), 141–147.

- Karthik, K., Manimaran, K., Mahaprabhu, R., & Shoba, K. (2017). Isolation of *Moraxella* sp. from cases of keratoconjunctivitis in an organized sheep farm of India. *Open Journal of Veterinary Medicine*, 07(10), 138–143.
- Kern, M. B., Klemmensen, T., Frimodt-Møller, N., & Espersen, F. (2002). Susceptibility of Danish *Escherichia coli* strains isolated from urinary tract infections and bacteraemia, and distribution of *sul* genes conferring sulphonamide resistance. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 50(4), 513–516.
- Kim, J. S., Kuk, E., Yu, K. N., Kim, J. H., Park, S. J., Lee, H. J., Kim, S. H., Park, S. J., Park, Y. H., Hwang, C. Y., Kim, Y. K., Lee, Y. S., Jeong, D. H., & Cho, M. H. (2007). Antimicrobial effects of silver nanoparticles. *Nanomedicine: Nanotechnology, Biology, and Medicine*, 3(1), 95–101.
- Kim, S. H., Lee, H. S., Ryu, D. S., Choi, S. J., & Lee, D. S. (2011). Antibacterial activity of silver nanoparticles against *Staphylococcus aureus* and *Escherichia coli*. *Korean Journal of Microbiology and Biotechnology*, 39(1), 77–85.
- Kirstein, J., & Turgay, K. (2006). A new tyrosine phosphorylation mechanism involved in signal transduction in *Bacillus subtilis*. *Journal of Molecular Microbiology and Biotechnology*, 9(3–4), 182–188.
- Klasen, H. J. (2000). A historical review of the use of silver in the treatment of burns. II. Renewed interest for silver. *Burns*, 26(2), 131–138.
- Klima, C. L., Zaheer, R., Cook, S. R., Booker, C. W., Hendrick, S., Alexander, T. W., & McAllister, T. A. (2014). Pathogens of bovine respiratory disease in North American feedlots conferring multidrug resistance via integrative conjugative elements. *Journal of Clinical Microbiology*, 52(2), 438–448.
- Klueh, U., Wagner, V., Kelly, S., Johnson, A., & Bryers, J. D. (2000). Efficacy of silver-coated fabric to prevent bacterial colonization and subsequent device-based biofilm formation. *Journal of Biomedical Materials Research*, 53(6), 621–631.
- Kolter, R., & Greenberg, E. P. (2006). Microbial sciences: the superficial life of microbes. *Nature*, 441(7091), 300–302.
- König, C. D. (1983). “Pink eye” or “zere oogjes” or keratoconjunctivitis infectiosa ovis (KIO). Clinical efficacy of a number of antimicrobial therapies. *The Veterinary Quarterly*, 5(3), 122–127.
- Kraychete, G. B., Alvarenga, L., Botelho, B., Campana, E. H., & Picão, R. C. (2016). Updated

- multiplex pcr for detection of all six plasmid-mediated *qnr* gene families. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 60(12), 7524–7526.
- Kumar, N., Das, S., Jyoti, A., & Kaushik, S. (2016). Synergistic effect of silver nanoparticles with doxycycline against *Klebsiella pneumonia*. *International Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences*, 8(7), 183–186.
- Lara, H. H., Ayala-Núñez, N. V., Ixtepan Turrent, L. del C., & Rodríguez Padilla, C. (2010). Bactericidal effect of silver nanoparticles against multidrug-resistant bacteria. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 26(4), 615–621.
- Lara, H. H., Garza-Treviño, E. N., Ixtepan-Turrent, L., & Singh, D. K. (2011). Silver nanoparticles are broad-spectrum bactericidal and virucidal compounds. *Journal of Nanobiotechnology*, 9, 2–9.
- Lazar, V. (2011). Quorum sensing in biofilms - How to destroy the bacterial citadels or their cohesion/power? *Anaerobe*, 17(6), 280–285.
- Le, A. T., Tam, L. T., Tam, P. D., Huy, P. T., Huy, T. Q., Van Hieu, N., Kudrinskiy, A. A., & Krutyakov, Y. A. (2010). Synthesis of oleic acid-stabilized silver nanoparticles and analysis of their antibacterial activity. *Materials Science and Engineering C*, 30(6), 910–916.
- Levy, S. B., Mcmurry, L. M., Burdett, V., Courvalin, P., Hillen, W., Roberts, M. C., & Taylor, D. E. (1989). Nomenclature for Tetracycline Resistance Determinants. *Antimicrob Agents Chemother.*, 33(8), 1373–1374.
- Libardoni, F., Scherer, C. F. C., Farias, L., Vielmo, A., Balzan, C., & Vargas, A. C. (2012). *Moraxella bovoculi* em casos de ceratoconjuntivite infecciosa bovina no Rio Grande do Sul. *Pesquisa Veterinaria Brasileira*, 32(8), 743–746.
- Lok, C., Ho, C., Chen, R., & He, Q. (2006). Proteomic analysis of the mode of antibacterial action of silver nanoparticles. *Journal of Proteome Research*, 5(4), 916–924.
- Loy, J. D., & Brodersen, B. W. (2014). *Moraxella* spp. isolated from field outbreaks of infectious bovine keratoconjunctivitis: a retrospective study of case submissions from 2010 to 2013. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation*, 26(6), 761–768.
- Maboni, G., Gressler, L. T., Espindola, J. P., Schwab, M., Tasca, C., Potter, L., & de Vargas, A. C. (2015). Differences in the antimicrobial susceptibility profiles of *Moraxella bovis*, *M. bovoculi* and *M. ovis*. *Brazilian Journal of Microbiology*, 46(2), 545–549.
- Magiorakos, a, Srinivasan, A., Carey, R. B., Carmeli, Y., Falagas, M. E., Giske, C. G., Olson-

- Lijequist, B., Paterson, D. L., Rice, L. B., Stelling, J., Struelens, M. J., Vatopoulos, A., & Hindler, J. F. (2011). Multidrug-resistance, extensively drug-resistance and pandrug resistant bacteria: an international expert proposal for interim standard definitions for acquired resistance. *Microbiology*, *18*(3), 268–281.
- Maka, L., Mackiw, E., Scienzynska, H., Modezelewska, M., & Popowska, M. (2015). Resistance to sulfonamides and dissemination of *sul* Genes among *Salmonella spp.* Isolated from food in Poland. *Foodborne Pathogens and Disease*, *12*(5), 383–389.
- Malarkodi, C., Rajeshkumar, S., Paulkumar, K., Gnana Jobitha, G., Vanaja, M., & Annadurai, G. (2013). Biosynthesis of semiconductor nanoparticles by using sulfur reducing bacteria *Serratia nematodiphila*. *Advances in Nano Research*, *1*(2), 83–91.
- Marinou, I., Bersimis, S., Ioannidis, A., Nicolaou, C., Mitroussia-Ziouva, A., Legakis, N. J., & Chatzipanagiotou, S. (2012). Identification and antimicrobial resistance of *Campylobacter* species isolated from animal sources. *Frontiers in Microbiology*, *3*(FEB), 1–6.
- Martí, S., Fernández-Cuenca, F., Pascual, Á., Ribera, A., Rodríguez-Baño, J., Bou, G., Cisneros, J. M., Pachón, J., Martínez- Martínez, L., Vila, J., Grupo de Estudios de Infeccion Hospitalaria (GEIH). (2006). Prevalencia de los genes *tetA* y *tetB* como mecanismo de resistencia a tetraciclina y minociclina en aislamientos clínicos de *Acinetobacter baumannii*. *Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica*, *24*(2), 77–80.
- Martínez, L., & Baquero, F. (2002). Interactions among strategies associated with bacterial infection: pathogenicity, epidemicity, and antibiotic resistance. *Clinical Microbiology Reviews*, *15*(4), 647–679.
- Mateo, D., Morales, P., Avalos, A., & Haza, A. I. (2013). Gold nanoparticles: Applications and in vitro cytotoxicity. *Acta Toxicológica Argentina*, *21*(2), 102–109.
- Máttar, S., Calderón, A., Sotelo, D., Sierra, M., & Tordecilla, G. (2009). Detección de antibióticos en leches: un problema de Salud Pública. *Revista de Salud Pública*, *11*(4), 579–590.
- McDonnell, G., & Russell, D. (1999). Antiseptics and disinfectants: activity, action, and resistance. *Clinical Microbiology Reviews*, *12*(1), 147–179.
- Medina, A., Horcajo, P., Jurado, S., & Fuente, R. D. La. (2011). Phenotypic and genotypic characterization of antimicrobial resistance in enterohemorrhagic *Escherichia coli* and atypical enteropathogenic *E. coli* strains from ruminants. *Journal Veterinary Diagnostic Investigation*, *23*(1), 91–95.

- Memariani, M., Najar-peerayeh, S., Salehi, T. Z., & Khalil, S. (2015). Occurrence of *SHV*, *TEM* and *CTX-M* β -lactamase genes among enteropathogenic *Escherichia coli* strains isolated from children with diarrhea. *Jundishapur Journal of Microbiology*, 8(4), 1–8.
- Menoueri, N., Richard, Y., Brunet, J., & Oudar, J. (1988). Flore bactérienne aérobie et aéro-anaérobie des cavités nasales de L' agneau de bergerie. *Annales Recherches Vétérinaires*, 19(3), 175–180.
- Michael, G. B., Kadlec, K., Sweeney, M. T., Brzuszkiewicz, E., Liesegang, H., Daniel, R., Murray, R. W., Watts, J., & Schwarz, S. (2012). ICEPmu1, an integrative conjugative element (ICE) of *Pasteurella multocida*: structure and transfer. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 67(1), 91–100.
- Mijakovic, I., Petranovic, D., Bottini, N., Deutscher, J., & Jensen, P. R. (2005). Protein-tyrosine phosphorylation in *Bacillus subtilis*. *Journal of Molecular Microbiology and Biotechnology*, 9(3–4), 189–197.
- Mijakovic, I., Petranovic, D., Macek, B., Cepo, T., Mann, M., Davies, J., Jensen, P. R., & Vujaklija, D. (2006). Bacterial single-stranded DNA-binding proteins are phosphorylated on tyrosine. *Nucleic Acids Research*, 34(5), 1588–1596.
- Mijakovic, I., Poncet, S., Boël, G., Mazé, A., Gillet, S., Jamet, E., Decottignies, P., Grangeasse, C., Doublet, P., Maréchal, P. L., & Deutscher, J. (2003). Transmembrane modulator-dependent bacterial tyrosine kinase activates UDP-glucose dehydrogenases. *EMBO Journal*, 22(18), 4709–4718.
- Mirzaagha, P., Louie, M., Sharma, R., Yanke, L. J., Topp, E., & McAllister, T. A. (2011). Distribution and characterization of ampicillin- and tetracycline-resistant *Escherichia coli* from feedlot cattle fed subtherapeutic antimicrobials. *BMC Microbiology*, 11(78), 1–15.
- Mohanraj, V. ., & Chen, Y. (2006). Nanoparticles – A review. *Tropical Journal of Pharmaceutical Research*, 5(June), 561–573.
- Monteiro, D. R., Gorup, L. F., Takamiya, A. S., de Camargo, E. R., Filho, A. C. R., & Barbosa, D. B. (2012). Silver distribution and release from an antimicrobial denture base resin containing silver colloidal nanoparticles. *Journal of Prosthodontics*, 21(1), 7–15.
- Moore, C. P., & Whitley, R. D. (1984). Ophthalmic diseases of small domestic ruminants. *The Veterinary Clinics of North America. Large Animal Practice*, 6(3), 641–665.
- Morones, J. R., Elechiguerra, J. L., Camacho, A., Holt, K., Kouri, J. B., Ramírez, J. T., & Yacaman, M. J. (2005). The bactericidal effect of silver nanoparticles. *Nanotechnology*, 16(10), 2346–

2353.

- Mosquito, S., Ruiz, J., Bauer, J. L., & Ochoa, T. J. (2011). Mecanismos moleculares de resistencia antibiótica en *Escherichia coli* asociadas a diarrea. *Revista Peruana de Medicina Experimental y Salud Pública*, 28(4), 648–656.
- Mukha, I. P., Eremenko, A. M., Smirnova, N. P., Mikhienkova, A. I., Korchak, G. I., Gorchev, V. F., & Chunikhin, A. Y. (2013). Antimicrobial activity of stable silver nanoparticles of a certain size. *Applied Biochemistry and Microbiology*, 49(2), 199–206.
- Murray, A., Mather, H., Coia, J. E., & Brown, D. J. (2008). Plasmid-mediated quinolone resistance in nalidixic-acid-susceptible strains of *Salmonella enterica* isolated in Scotland. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 62(5), 1153–1155.
- Murugan, K., Usha, M., Malathi, P., Al-Sohaibani, A. S., & Chandrasekaran, M. (2010). Biofilm forming multi drug resistant *Staphylococcus* spp. among patients with conjunctivitis. *Polish Journal of Microbiology*, 59(4), 233–239.
- Muthukrishnan, S., Bhakya, S., Senthil Kumar, T., & Rao, M. V. (2015). Biosynthesis, characterization and antibacterial effect of plant-mediated silver nanoparticles using *Ceropegia thwaitesii* - An endemic species. *Industrial Crops and Products*, 63, 119–124.
- Nadworny, P. L., Wang, J., Tredget, E. E., & Burrell, R. E. (2008). Anti-inflammatory activity of nanocrystalline silver in a porcine contact dermatitis model. *Nanomedicine: Nanotechnology, Biology, and Medicine*, 4(3), 241–251.
- Nair, L. S., & Laurencin, C. T. (2007). Silver nanoparticles: synthesis and therapeutic applications. *Journal of Biomedical Nanotechnology*, 3(4), 301–316.
- Nalwade, A. R., & Jadhav, A. (2013). Biosynthesis of silver nanoparticles using leaf extract of *Daturaalba* Nees. and evaluation of their antibacterial activity. *Scholars Research Library*, 5(3), 45–49.
- Nayak, R., Stewart, T., Wang, R. F., Lin, J., Cerniglia, C. E., & Kenney, P. B. (2004). Genetic diversity and virulence gene determinants of antibiotic-resistant *Salmonella* isolated from preharvest turkey production sources. *International Journal of Food Microbiology*, 91(1), 51–62.
- Niakan, S., Niakan, M., Hesarak, S., Nejadmoghaddam, M. R., Moradi, M., Hanafiabdar, M., Allamezadeh, R., & Sabouri, M. (2013). Comparison of the antibacterial effects of nanosilver with 18 antibiotics on multidrug resistance clinical isolates of *Acinetobacter baumannii*.

Jundishapur Journal of Microbiology, 6(5), 1–5.

- Nietfeld, J. C. (2001). Chlamydial infections in small ruminants. *The Veterinary Clinics of North America. Food Animal Practice*, 17(2), 301–314.
- Novais, C., Coque, T. M., Costa, M. J., Sousa, J. C., Baquero, F., & Peixe, L. V. (2005). High occurrence and persistence of antibiotic-resistant *Enterococci* in poultry food samples in Portugal. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 56(6), 1139–1143.
- Nowack, B., Krug, H. F., & Height, M. (2011). 120 years of nanosilver history: implications for policy makers. *Environmental Science and Technology*, 45(4), 1177–1183.
- O'Connor, A. M., Shen, H. G., Wang, C., & Opriessnig, T. (2012). Descriptive epidemiology of *Moraxella bovis*, *Moraxella bovoculi* and *Moraxella ovis* in beef calves with naturally occurring infectious bovine keratoconjunctivitis (Pinkeye). *Veterinary Microbiology*, 155(2–4), 374–380.
- Panáček, A., Kvítek, L., Prucek, R., Kolář, M., Večeřová, R., Pizúrová, N., Sharma, K., Nevečna, T., & Zbořil, R. (2006). Silver colloid nanoparticles: synthesis, characterization, and their antibacterial activity. *Journal of Physical Chemistry B*, 110(33), 16248–16253.
- Panáček, A., Kvítek, L., Smékalová, M., Večeřová, R., Kolář, M., Röderová, M., Dyčka, F., Šebela, M., Prucek, P., Tomanec, O., & Zbořil, R. (2018). Bacterial resistance to silver nanoparticles and how to overcome it. *Nature Nanotechnology*, 13(1), 65–71.
- Paredes, D., Ortiz, C., & Torres, R. (2014). Synthesis, characterization, and evaluation of antibacterial effect of Ag nanoparticles against *Escherichia coli* O157:H7 and methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA). *International Journal of Nanomedicine*, 9(1), 1717–1729. <https://doi.org/10.2147/IJN.S57156>
- Park, Y., Yu, J. K., Lee, S., Oh, E., & Woo, G. (2007). Prevalence and diversity of *qnr* alleles in *AmpC*-producing *Enterobacter cloacae*, *Enterobacter aerogenes*, *Citrobacter freundii* and *Serratia marcescens*: a multicentre study from Korea. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 60(4), 868–871.
- Pedersen, K. B. (1972). Isolation and description of a haemolytic species of *Neisseria* (*N. ovis*) from cattle with infectious keratoconjunctivitis. *Acta Pathologica Microbiologica Scandinavica Section B Microbiology and Immunology*, 80 B(1), 135–139.
- Pellieux, B. C., Dewilde, A., & Pierlot, C. (2000). Bactericidal and virucidal activities of singlet oxygen generated by thermolysis of naphthalene endoperoxides. *Methods in Enzymology*, 319, 197–207.

- Pettersson, B., Kodjo, a, Ronaghi, M., Uhlén, M., & Tønjum, T. (1998). Phylogeny of the family Moraxellaceae by 16S rDNA sequence analysis, with special emphasis on differentiation of *Moraxella* species. *International Journal of Systematic Bacteriology*, 48 Pt 1(1 998), 75–89.
- Peymani, A., Naserpour-Farivar, T., Zare, E., & Azarhoosh, K. H. (2017). Distribution of *bla TEM* , *bla SHV* , and *bla CTX-M* genes among ESBL-producing *P. aeruginosa* isolated from Qazvin and Tehran hospitals , Iran. *Journal of Preventive Medicine and Hygiene.*, 58(2), 155–160.
- Prieto, C., Serra, D. O., Martina, P., Jacobs, M., Bosch, A., & Yantorno, O. M. (2013). Evaluation of biofilm-forming capacity of *Moraxella bovis*, the primary causative agent of infectious bovine keratoconjunctivitis. *Veterinary Microbiology*, 166(3–4), 504–515.
- Radzig, M. A., Nadtochenko, V. A., Koksharova, O. A., Kiwi, J., Lipasova, V. A., & Khmel, I. A. (2013). Antibacterial effects of silver nanoparticles on Gram-negative bacteria: influence on the growth and biofilms formation, mechanisms of action. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 102, 300–306.
- Rai, M., Deshmukh, S. D., Ingle, A. P., Gupta, I. R., Galdiero, M., & Galdiero, S. (2014). Metal nanoparticles: the protective nanoshield against virus infection. *Critical Reviews in Microbiology*, 42(1), 46–56.
- Rai, M. K., Deshmukh, S. D., Ingle, A. P., & Gade, A. K. (2012). Silver nanoparticles: The powerful nanoweapon against multidrug-resistant bacteria. *Journal of Applied Microbiology*, 112(5), 841–852.
- Rajaram, K., Aiswarya, D. C., & Sureshkumar, P. (2015). Green synthesis of silver nanoparticle using *Tephrosia tinctoria* and its antidiabetic activity. *Materials Letters*, 138, 251–254.
- Re, F., Moresco, R., & Masserini, M. (2012). Nanoparticles for neuroimaging. *Journal of Physics D: Applied Physics*, 45(7).
- Richard, Y., Borges, E., Favier, C., & Oudar, J. (1989). Flores nasale et pulmonaire de la chèvre T *Ann Rech Vét*, 20(3), 269–276.
- Rigo, C., Ferroni, L., Tocco, I., Roman, M., Munivrana, I., Gardin, C., Cairns, W. R. L., Vindigni, V., Azzena, B., Barbante, C., & Zavan, B. (2013). Active silver nanoparticles for wound healing. *International Journal of Molecular Sciences*, 14(3), 4817–4840.
- Rodríguez-Martínez, J. M., Pascual, A., García, I., & Martínez-Martínez, L. (2003). Detection of the plasmid-mediated quinolone resistance determinant *qnr* among clinical isolates of *Klebsiella pneumoniae* producing AmpC-type β -lactamase. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*,

52(4), 703–706.

- Rossau, R., Van Landschoot, A., Gillis, M., & De Ley, J. (1991). Taxonomy of *Moraxellaceae* fam. nov., a New Bacterial Family To Accommodate the Genera *Moraxella*, *Acinetobacter*, and *Psychrobacter* and Related Organisms. *International Journal of Systematic Bacteriology*, 41(2), 310–319.
- Ruehl, W. W., Marrs, C., Beard, M. K., Shokooki, V., Hinojoza, J. R., Banks, S., Bieber, D., & Mattick, J. S. (1993). Q pili enhance the attachment of *Moraxella bovis* to bovine corneas in vitro. *Molecular Microbiology*, 7(2), 285–288.
- Russell, A. D. (2002). Introduction of biocides into clinical practice and the impact on antibiotic-resistant bacteria. *Journal of Applied Microbiology*, 92(s1), 121S–135S.
- Saeb, A. T. M., Alshammari, A. S., Al-Brahim, H., & Al-Rubeaan, K. A. (2014). Production of silver nanoparticles with strong and stable antimicrobial activity against highly pathogenic and multidrug resistant bacteria. *Scientific World Journal*, 2014, 1–9.
- Salata, O. V. (2004). Applications of nanoparticles in biology and medicine. *Journal of Nanobiotechnology*, 2(3), 1–6.
- Sanchez Romano, J., Hagström, Å., Jinnerot, T., Rockström, U. K., & Tryland, M. (2019). *Chlamydia pecorum* associated with an outbreak of infectious keratoconjunctivitis in semi-domesticated reindeer in Sweden. *Frontiers in Veterinary Science*, 6(14), 1–9.
- Saravanan, M., & Nanda, A. (2010). Extracellular synthesis of silver bionanoparticles from *Aspergillus clavatus* and its antimicrobial activity against MRSA and MRSE. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 77(2), 214–218.
- Schwarz, S., Kehrenberg, C., Doublet, B., & Cloeckaert, A. (2004). Molecular basis of bacterial resistance to chloramphenicol and florfenicol. *FEMS Microbiology Reviews*, 28(5), 519–542.
- Senturk, S., Cetinf, C., Temizel, M., & Ozel, E. (2007). Evaluation of the clinical efficacy of subconjunctival injection of clindamycin in the treatment of naturally occurring infectious bovine keratoconjunctivitis. *Veterinary Ophthalmology*, 10(3), 186–189.
- Shahverdi, A. R., Fakhimi, A., Shahverdi, H. R., & Minaian, S. (2007). Synthesis and effect of silver nanoparticles on the antibacterial activity of different antibiotics against *Staphylococcus aureus* and *Escherichia coli*. *Nanomedicine: Nanotechnology, Biology, and Medicine*, 3(2), 168–171.
- Sharma, V. K., Yngard, R. A., & Lin, Y. (2009). Silver nanoparticles: Green synthesis and their antimicrobial activities. *Advances in Colloid and Interface Science*, 145(1–2), 83–96.

- Shen, H. G., Gould, S., Kinyon, J., Opriessnig, T., & O'Connor, A. M. (2011). Development and evaluation of a multiplex real-time PCR assay for the detection and differentiation of *Moraxella bovis*, *Moraxella bovoculi* and *Moraxella ovis* in pure culture isolates and lacrimal swabs collected from conventionally raised cattle. *Journal of Applied Microbiology*, *111*(5), 1037–1043.
- Shryock, T. R., White, D. W., & Werner, C. S. (1998). Antimicrobial susceptibility of *Moraxella bovis*. *Veterinary Microbiology*, *61*(4), 305–309.
- Sommer, M. O. A., Dantas, G., & Church, G. M. (2009). Functional characterization of the antibiotic resistance reservoir in the human microflora. *Science*, *325*(5944), 1128–1131.
- Sondi, I., & Salopek-Sondi, B. (2004). Silver nanoparticles as antimicrobial agent: A case study on *E. coli* as a model for Gram-negative bacteria. *Journal of Colloid and Interface Science*, *275*(1), 177–182.
- Sosa, V., Umpiérrez, A., Acquistapace, S., & Zunino, P. (2015). Virulence genes in *Moraxella* spp. isolates from infectious bovine keratoconjunctivitis cases. *Journal of Infection in Developing Countries*, *9*(9), 1028–1032.
- Sosa, V., & Zunino, P. (2012). Molecular and phenotypic analysis of *Moraxella* spp. associated with infectious bovine keratoconjunctivitis in Uruguay. *Veterinary Journal*, *193*(2), 595–597.
- Sosa, V., & Zunino, P. (2013). Diversity of *Moraxella* spp. strains recovered from infectious bovine keratoconjunctivitis cases in Uruguay. *Journal of Infection in Developing Countries*, *7*(11), 819–824.
- Soucy, S. M., Huang, J., & Gogarten, J. P. (2015). Horizontal gene transfer: building the web of life. *Nature Reviews Genetics*, *16*(8), 472–482.
- Spradbrow, P. B. (1968). The bacterial flora of the ovine conjunctival sac. *Australian Veterinary Journal*, *44*(3), 117–118.
- Sun, Y., & Xia, Y. (2002). Shape-controlled synthesis of gold and silver nanoparticles. *Science*, *298*(5601), 2176–2179.
- Szmacinski, H., Lakowicz, J. R., Catchmark, J. M., Eid, K., Anderson, J. P., & Middendorf, L. (2008). Correlation between scattering properties of silver particle arrays and fluorescence enhancement. *Applied Spectroscopy*, *62*(7), 733–738.
- Taraszkiewicz, A., Fila, G., Grinholc, M., & Nakonieczna, J. (2013). Innovative Strategies to Overcome Biofilm Resistance. *BioMed Research International*, *2013*, 1–13.

- Ter Laak, E. A., Schreuder, B. E. C., & Schreuder, B. E. C. (1988). The occurrence of *Mycoplasma conjunctivae* in the Netherlands and its association with infectious keratoconjunctivitis in sheep and goats. *Veterinary Quarterly*, *10*(2), 73–83.
- Tian, J., Wong, K. K. Y., Ho, C. M., Lok, C. N., Yu, W. Y., Che, C. M., Chiu, J. F., & Tam, P. K. H. (2007). Topical delivery of silver nanoparticles promotes wound healing. *ChemMedChem*, *2*(1), 129–136.
- Tindall, B. J. (2008). Note challenging opinion 83. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, *58*(May), 1772–1774.
- Touati, A., Brasme, L., Benallaoua, S., & Gharout, A. (2008). First report of *qnrB* -producing *Enterobacter cloacae* and *qnrA* -producing *Acinetobacter baumannii* recovered from Algerian hospitals. *Diagnostic Microbiology Infectious Disease*, *60*(3), 287–290.
- Tryland, M., Sanchez Romano, J., Marcin, N., Nymo, I. H., Josefsen, T. D., Sørensen, K. K., & Mørk, T. (2017). Cervid herpesvirus 2 and not *Moraxella bovoculi* caused keratoconjunctivitis in experimentally inoculated semi-domesticated Eurasian tundra reindeer. *Acta Veterinaria Scandinavica*, *59*(23), 1–11.
- Umashankari, J., Inbakandan, D., Ajithkumar, T. T., & Balasubramanian, T. (2012). Mangrove plant, *Rhizophora mucronata* (Lamk, 1804) mediated one pot green synthesis of silver nanoparticles and its antibacterial activity against aquatic pathogens. *Aquatic Biosystems*, *8*(1), 1–7.
- Van, T. T. H., Moutafis, G., Istivan, T., Tran, L. T., & Coloe, P. J. (2007). Detection of *Salmonella* spp. in retail raw food samples from vietnam and characterization of their antibiotic resistance. *Applied and Environmental Microbiology*, *73*(21), 6885–6890.
- Vijayakumar, M., Priya, K., Nancy, F. T., Noorlidah, A., & Ahmed, A. B. A. (2013). Biosynthesis, characterisation and anti-bacterial effect of plant-mediated silver nanoparticles using *Artemisia nilagirica*. *Industrial Crops and Products*, *41*(1), 235–240.
- Wang, M., Tran, J., & Jacoby, G. (2003). Plasmid-mediated quinolone resistance in clinical isolates of *Escherichia coli* from Shanghai, China. *Antimicrob Agents Chemother.*, *47*(7), 2242–2248.
- Wu, J., Ko, W., Tsai, S., & Yan, J. (2007). Prevalence of plasmid-mediated quinolone resistance determinants *qnrA* , *qnrB* , and *qnrS* among clinical isolates of *Enterobacter cloacae* in a Taiwanese Hospital. *Antimicrob Agents Chemother.*, *51*(4), 1223–1227.
- Yang, H., Chen, S., White, D. G., Zhao, S., McDermott, P., Walker, R., & Meng, J. (2004). Characterization of multiple - antimicrobial - resistant *Escherichia coli* isolates from diseased

chickens and swine in China. *Journal of Clinical Microbiology*, 42(8), 3483–3489.

Yao, Shenglin, Feng, Xuji, Lu, Jiaju, Zheng, Yudong, Wang, Xiumei, Volinsky, Alex, A, Wang, L. N. (2018). Antibacterial activity and inflammation inhibition of ZnO nanoparticles embedded TiO₂ nanotubes. *Nanotechnology.*, 29(24), 1–29.

Zhang, G., Niu, A., Peng, S., Jiang, M., Tu, Y., Li, M. E. I., & Wu, C. H. I. (2001). Formation of Novel Polymeric Nanoparticles. *Accounts of Chemical Research.*, 34(3), 249–256.

XII. ANEXOS.

Anexo 1. Identificación de especies de *Moraxella* por municipio en el Estado de México.

UPP	Municipio	Total, de animales	Animales muestreados	<i>M. ovis</i>	<i>M. Bovoculi</i>	<i>16S rRNA</i>	<i>rtxA</i>
1	Capulhuac	43	15(34%)	4(26%)	-	4/100%	4/100%
1	Calimaya	150	17(11%)	8(47%)	-	7/87%	8/100%
3	Xonacatlán	117	23(19%)	4(17%)	-	4/100%	4/100%
3	Lerma	80	31(38%)	9(29%)	1(3%)	10/100%	10/100%
3	Tenango	282	67(23%)	28(41%)	1(1%)	26/89%	26/89%
4	Toluca	189	56(29%)	5(8%)	-	3/60%	5/100%
15	Total/ Prevalencia	861	209 24.27%	58(27.7%) 96.6%	2(0.9%) 3.3%	54 90%	57 95%

*Las muestras recolectadas corresponden al número de animales muestreados.

Anexo 2. Actividad antimicrobiana de las AgNPs-C por el método difusión en disco

Cepas	Concentración de las AgNPs-C/milímetros									Control	
	21.57µg/L (200 mM)	18.87µg/L (175 mM)	16.18µg/L (150 mM)	13.48µg/L (125 mM)	10.78µg/L (100 mM)	8.09µg/L (75 mM)	5.39µg/L (50 mM)	2.69µg/L (25 mM)	H ₂ O Estéril	(G)10µg/mL	
<i>M. ovis</i> S (2)	8.17±0.24*	7.33±0.47*	7.00±0.0*	7.33±0.47*	8.67±0.47*	7.83±0.24	7.33±0.47	6.83±0.24	-	20.83±1.65	
<i>M. ovis</i> (17) MDR y R	8.76±0.64*	7.65±0.43*	7.61±0.68*	8.10±0.81*	9.67±0.83*	8.24±0.51	8.00±0.35	7.51±0.47	-	20.04±2.40	
<i>M. bovoculi</i> R (2)	10.7±0.71*	8.67±0.47*	7.67±0.47*	8.83±0.70*	9.33±0.0*	8.50±0.24	7.67±0.47	7.17±0.24	-	22.50±2.12	
<i>E. coli</i> (1)	9.0±0.0*	10.0±0.0*	8.0±0.0*	9.67±0.0*	10.33±0.0*	10.33±0.0	14.33±0.0	11.0±0.0	-	18.33±0.0	
<i>S. aureus</i> (1)	10.0±0.0*	10.0±0.0*	12.0±0.0*	10.67±0.0*	12.67±0.0*	14.0±0.0*	13.33±0.0	10.67±0.0	-	22.33±0.0	

(*) Estadísticamente significativo; (±) Desviación estándar; (MDR y R) multirresistentes y resistentes; (S) sensibles; (R) Resistentes (G) Gentamicina

Anexo 3. Actividad antimicrobiana de las AgNPs-C en la superficie del agar.

Cepas	Concentración de las AgNPs-C/UFC/mL								Control	
	21.57µg/L (200 mM)	18.87µg/L (175 mM)	16.18µg/L (150 mM)	13.48µg/L (125mM)	10.78µg/L (100 mM)	8.09µg/L (75mM)	5.39µg/L (50 mM)	2.69µg/L (25 mM)	H ₂ O Estéril	P (G) 10µg/mL
<i>M. ovnis</i> S (2)	1.06±0.0*	1.55±1.24*	1.31±0.24*	0.94±0.0*	0.08±0.0*	1.82±0.94*	9.33±4.71	11.29±0.47	≥25	0.0
<i>M. ovnis</i> (17) MDR y R	0.67±0.78*	1.17±1.08*	0.83±0.82*	1.0±0.64*	0.0±0.15*	1.33±1.16*	9.33±3.70	14.33±4.67	≥25	0.0
<i>M. bovoculi</i> R (2)	0.50±0.0*	0.50±0.24*	1.17±0.24*	0.67±0.47*	0.33±0.0*	1.0±0.47*	7.17±2.12	9.83±4.48	≥25	0.0
<i>E. coli</i> (1)	1.67±0.0*	1.67±0.0*	0.33±0.0*	0.33±0.0*	0.33±0.0*	0.33±0.0*	0.0*	2.0±0.0	≥25	0.0
<i>S. aureus</i> (1)	0.67±0.0*	0.67±0.0*	1.0±0.0*	1.33±0.0	1.0±0.0*	0.0*	1.33±0	2.67±0.0	≥25	0.0

(*) Estadísticamente significativo; (±) Desviación estándar; (MDR y R) multirresistentes y resistentes; (S) sensibles; (R) Resistentes (G) Gentamicina.

Anexo 4. Actividad antimicrobiana de las AgNPs-C suplementando en el agar.

Cepas	Concentración de las AgNPs-C/UFC/mL								Control	
	21.57µg/L (200 mM)	18.87µg/L (175 mM)	16.18µg/L (150 mM)	13.48µg/L (125mM)	10.78µg/L (100 mM)	8.09µg/L (75mM)	5.39µg/L (50 mM)	2.69µg/L (25 mM)	H ₂ O Estéril	P (G) 10µg/mL
<i>M. ovnis</i> S (2)	0.0*	0.0*	0.0*	0.0*	0.0*	3.0±0.0	3.0±0.0	4.82±1.41	≥25	0.0
<i>M. ovnis</i> MDR y R (17)	0.0*	0.0*	0.0*	0.0*	0.0*	3.0±0.0	3.0±0.0	6.0±0.73	≥25	0.0
<i>M. bovoculi</i> R (2)	0.0*	0.0*	0.0*	0.0*	0.0*	3.0±0.0	3.0±0.0	5.50±0.71	≥25	0.0
<i>E. coli</i> (1)	0.0*	0.0*	0.0*	0.0*	0.0*	0.0*	0.0*	3.0±0.0	≥25	0.0
<i>S. aureus</i> (2)	0.0*	0.0*	0.0*	0.0*	0.0*	0.0*	3.0±0.0	6.±0.0	≥25	0.0

(*) Estadísticamente significativo; (±) Desviación estándar; (MDR y R) multirresistentes y resistentes; (S) sensibles; (R) Resistentes (G) Gentamicina.

Anexo 5. Cepario del proyecto de investigación.											
Genes			Identificación		Genes de resistencia antimicrobiana						
Identificación	Especie	Clasificación	16S rRNA	RxtA	sul1	sul2	qnrA	qnrB	floR	Bla _{TEM}	tetB
R2-9	<i>M. ovis.</i>	MR	(+)	(+)	(-)	(-)	(+)	(-)	(-)	(+)	(+)
R6-10	<i>M. ovis.</i>	MR	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(-)	(-)	(-)
R7-11	<i>M. ovis.</i>	MR	(-)	(+)	(+)	(-)	(+)	(+)	(-)	(-)	(-)
R7-25	<i>M. ovis.</i>	MR	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(-)	(-)	(-)
R7-26	<i>M. ovis.</i>	MR	(+)	(+)	(-)	(+)	(-)	(+)	(-)	(+)	(-)
R1-1	<i>M. ovis.</i>	R	(+)	(+)	(-)	(+)	(+)	(+)	(-)	(+)	(-)
R5-8	<i>M. ovis.</i>	R	(+)	(+)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(+)	(-)
R6-4	<i>M. ovis.</i>	R	(+)	(+)	(+)	(-)	(+)	(+)	(-)	(-)	(-)
R6-16	<i>M. ovis.</i>	R	(+)	(+)	(-)	(+)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)
R6-21	<i>M. ovis.</i>	R	(+)	(+)	(-)	(-)	(+)	(-)	(-)	(+)	(-)
R6-23	<i>M. ovis.</i>	R	(+)	(+)	(-)	(+)	(+)	(+)	(-)	(-)	(-)
R6-24	<i>M. ovis.</i>	R	(+)	(+)	(-)	(-)	(-)	(+)	(-)	(+)	(-)
R7-12	<i>M. ovis.</i>	R	(+)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(+)
R7-23	<i>M. ovis.</i>	R	(+)	(+)	(+)	(+)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)
R8-11	<i>M. ovis.</i>	R	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(-)	(-)	(-)
R11-17	<i>M. ovis.</i>	R	(+)	(+)	(-)	(+)	(+)	(+)	(-)	(+)	(-)
R7-2	<i>M. ovis.</i>	S	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(-)	(+)	(-)
R6-15	<i>M. bovoculi</i>	R	(+)	(+)	(-)	(-)	(+)	(+)	(-)	(-)	(-)
R12-8	<i>M. bovoculi</i>	R	(+)	(+)	(+)	(-)	(-)	(+)	(-)	(+)	(-)
R2-2	<i>M. ovis.</i>	S	(+)	(+)	(-)	(+)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)
R2-4	<i>M. ovis.</i>	S	(+)	(+)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)
R4-4	<i>M. ovis.</i>	S	(+)	(+)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)
R5-1	<i>M. ovis.</i>	S	(+)	(+)	(-)	(+)	(+)	(+)	(-)	(-)	(-)
R5-4	<i>M. ovis.</i>	S	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(-)	(-)	(-)
R5-5	<i>M. ovis.</i>	S	(+)	(+)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)
R5-7	<i>M. ovis.</i>	S	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(-)	(+)	(-)
R6-2	<i>M. ovis.</i>	S	(+)	(+)	(-)	(+)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)
R6-3	<i>M. ovis.</i>	S	(+)	(+)	(-)	(-)	(-)	(+)	(-)	(+)	(-)
R6-8	<i>M. ovis.</i>	S	(+)	(+)	(+)	(-)	(-)	(-)	(-)	(+)	(-)
R6-11	<i>M. ovis.</i>	S	(+)	(+)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)
R6-13	<i>M. ovis.</i>	S	(-)	(+)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(+)	(+)
R6-14	<i>M. ovis.</i>	S	(-)	(+)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(+)	(-)
R6-20	<i>M. ovis.</i>	S	(+)	(-)	(-)	(+)	(+)	(+)	(-)	(+)	(-)

R6-22	<i>M ovis.</i>	S	(+)	(+)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(+)	(-)
R6-25	<i>M ovis.</i>	S	(+)	(+)	(-)	(-)	(+)	(+)	(-)	(+)	(-)
R7-10	<i>M ovis.</i>	S	(+)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)
R7-14	<i>M ovis.</i>	S	(+)	(+)	(+)	(-)	(-)	(-)	(-)	(+)	(+)
R7-20	<i>M ovis.</i>	S	(+)	(+)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)
R7-21	<i>M ovis.</i>	S	(+)	(+)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)
R7-22	<i>M ovis.</i>	S	(+)	(+)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)
R8-2	<i>M ovis.</i>	S	(+)	(+)	(-)	(-)	(+)	(+)	(-)	(-)	(-)
R9-4	<i>M ovis.</i>	S	(+)	(+)	(+)	(-)	(+)	(+)	(-)	(+)	(-)
R9-6	<i>M ovis.</i>	S	(+)	(+)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)
R9-10	<i>M ovis.</i>	S	(+)	(+)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)
R9-12	<i>M ovis.</i>	S	(+)	(+)	(+)	(+)	(-)	(-)	(-)	(+)	(-)
R10-2	<i>M ovis.</i>	S	(-)	(+)	(+)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)
R10-13	<i>M ovis.</i>	S	(+)	(+)	(+)	(-)	(-)	(-)	(-)	(+)	(-)
R10-15	<i>M ovis.</i>	S	(-)	(+)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)
R10-17	<i>M ovis.</i>	S	(+)	(+)	(+)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)
R10-19	<i>M ovis.</i>	S	(+)	(+)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)
R11-1	<i>M ovis.</i>	S	(+)	(+)	(+)	(-)	(+)	(-)	(-)	(-)	(-)
R11-3	<i>M ovis.</i>	S	(+)	(+)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(+)	(-)
R11-6	<i>M ovis.</i>	S	(+)	(+)	(-)	(-)	(+)	(-)	(-)	(+)	(+)
R11-8	<i>M ovis.</i>	S	(+)	(+)	(-)	(-)	(+)	(-)	(-)	(+)	(-)
R11-10	<i>M ovis.</i>	S	(+)	(+)	(+)	(-)	(-)	(-)	(-)	(+)	(-)
R11-11	<i>M ovis.</i>	S	(+)	(+)	(+)	(+)	(-)	(-)	(-)	(+)	(-)
R11-13	<i>M ovis.</i>	S	(-)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(-)	(+)	(-)
R12-1	<i>M ovis.</i>	S	(+)	(+)	(+)	(+)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)
R12-5	<i>M ovis.</i>	S	(+)	(+)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(+)	(-)
R12-14	<i>M ovis.</i>	S	(+)	(+)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)