

***Histophilus somni* (*Haemophilus somnus*) aislado en casos de problemas del aparato reproductor de ganado lechero. Primer informe en México**

***Histophilus somni* (*Haemophilus somnus*) isolated from dairy cattle with reproductive disorders. First report in Mexico**

Francisco Aguilar Romero^a, Francisco José Trigo Tavera^b, Enrique Herrera López^c, Jorge Ávila García^d, Francisco Suárez Güemes^e

RESUMEN

Histophilus somni (*Haemophilus somnus*) es reconocido como un patógeno importante de los bovinos, asociado a desórdenes reproductivos como vaginitis, endometritis, infertilidad y aborto. El objetivo del presente trabajo fue determinar si *H. somni* se encuentra presente en vacas lecheras con enfermedades del aparato reproductor. Se realizó un muestreo de conveniencia en seis establos de la zona central de México, en donde se colectaron muestras de exudado vaginal de 67 vacas enfermas del tracto reproductor y de 45 vacas clínicamente sanas. Las muestras fueron inoculadas en Agar Chocolate e incubadas a 37 °C durante 24 a 48 h con 10 % de CO₂. Para la identificación de las cepas de campo se realizaron pruebas bioquímicas, perfiles de proteínas totales por electroforesis, inmunotransferencia y la prueba de reacción en cadena de la polimerasa (PCR); siempre se utilizó como control positivo una cepa de referencia de la ATCC. De un total de 112 animales muestreados, se recuperaron 10 cepas de *Histophilus somni* (8.9%). Las cepas fueron recuperadas únicamente de vacas enfermas del aparato reproductor y representaron un 14 % (10/67) de aislamientos dentro de este grupo. De las 45 vacas clínicamente sanas muestreadas, no se obtuvo ningún aislamiento de este microorganismo. Este es el primer informe en México de la presencia de *Histophilus somni* en vacas lecheras con padecimientos del aparato reproductor.

PALABRAS CLAVE: *Histophilus somni* (*Haemophilus somnus*), Aparato reproductor, Vacas lecheras.

ABSTRACT

Histophilus somni (*Haemophilus somnus*) has been recognized as an important pathogen of cattle, associated with reproductive disorders such as vaginitis, endometritis, infertility, and abortion. The purpose of this research was to determine whether *H. somni* is found in dairy cattle with reproductive tract disease. Convenience sampling was performed in 6 dairies located in central Mexico. Vaginal exudate samples were obtained from 67 cows with reproductive tract disease and from 45 clinically healthy cows. Samples were seeded in chocolate agar then incubated at 37 °C for 24 to 48 h with 10% CO₂. Field isolates were characterized using biochemical tests, total protein profile electrophoresis, immunotransference (Western blot), and PCR. An ATCC reference strain was used at all times as a positive control. From a total of 112 animals sampled, 10 (8.9%) *H. somni* isolates were obtained. Isolates were recovered only from cows with reproductive tract disease, representing 14 % (10/67) within this group. The organism was not isolated from any of the 45 clinically healthy cows. This is the first report of the presence of *H. somni* in dairy cattle with reproductive disorders in Mexico.

KEY WORDS: *Histophilus somni* (*Haemophilus somnus*), Reproductive tract, Dairy cows.

Recibido el 14 de septiembre de 2004 y aceptado para su publicación el 29 de noviembre de 2004.

a CENID-Microbiología Veterinaria. Instituto Nacional de Investigaciones Forestales, Agrícolas y Pecuarias (INIFAP). Carretera libre México-Toluca Km 15.5, Col. Palo Alto, Cuajimalpa 05110. México D.F. Tel 5570-3100 ext.59. franciscoaguilar69@yahoo.com.mx Correspondencia al primer autor.

b Departamento de Patología. Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia. Universidad Nacional Autónoma de México.

c Práctica privada

d Departamento de Rumiantes. Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia. Universidad Nacional Autónoma de México.

e Departamento de Microbiología e Inmunología. Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia. Universidad Nacional Autónoma de México.

Este estudio se financió parcialmente con recursos del proyecto CONACYT clave G-38590-B

El presente trabajo forma parte de la tesis del primer autor para obtener el grado de Doctor en Ciencias Veterinarias por la FMVZ-UNAM

INTRODUCCIÓN

Histophilus somni anteriormente conocido como *Haemophilus somnus*, ha sido descrito como un bacilo gram-negativo, oxidasa positivo, pleomórfico, requiere de una atmósfera parcial de 10 % de CO₂ y no necesita factores de crecimiento. Normalmente es indol positivo y produce pigmento amarillento^(1,2). El criterio para reclasificarlo está basado en varios aspectos tales como el no requerir de los factores X ni V para su crecimiento, existir similitud con otras especies como *Histophilus ovis* y *Haemophilus agni*, por lo que con estudios filogenéticos, de hibridización DNA-DNA, de secuenciación del gen *rpoB* y el desarrollo de una prueba de reacción en cadena de la polimerasa (PCR) especie-específica, se demostró que *Haemophilus somnus*, *Haemophilus agni* e *Histophilus ovis* representan la misma especie; por lo que se propuso reclasificar a este microorganismo y nombrarlo *Histophilus somni*^(3,4).

Esta bacteria está asociada con un complejo de enfermedades de los bovinos como la meningoencefalitis tromboembólica⁽⁵⁾, bronconeumonía⁽⁶⁾, infertilidad^(7,8), endometritis^(9,10), aborto^(11,12,13), nacimiento de becerros débiles⁽¹⁴⁾, reabsorciones embrionarias⁽¹⁵⁾, cervicitis y vaginitis^(16,17), orquiepididimitis⁽¹⁸⁾. También se ha aislado de semen y prepucio de toros clínicamente sanos^(19,20). Se asocia a casos de miocarditis⁽²¹⁾, otitis⁽²²⁾, conjuntivitis⁽²³⁾, mastitis^(24,25) y poliartritis⁽²²⁾. En ovinos se ha encontrado en casos de epididimitis, mastitis, septicemias, aborto, sinovitis y meningoencefalitis^(26,27,28,29,30). El papel de este microorganismo como un patógeno del aparato reproductor resulta controversial, debido a que en diversos estudios de campo y experimentales se ha observado que causa inflamación en el aparato genital de las vacas, aunque también puede colonizar la mucosa genital sin causar daño^(20,22). Datos experimentales revelan la capacidad de causar muerte en embriones, lo que sugiere un papel importante en la muerte embrionaria temprana⁽¹⁵⁾, así como la presentación de abortos esporádicos después de una bacteremia^(7,12). En estudios efectuados en rastro se ha aislado frecuentemente de útero y de casos de endometritis⁽¹⁷⁾.

INTRODUCTION

Histophilus somni –formerly known as *Haemophilus somnus*– has been described as a Gram negative, oxidase positive, pleomorphic rod that requires a partial (10%) CO₂ atmosphere. No additional growth factors are required. It is typically indol positive and produces a yellowish pigment^(1,2). Reclassification criterion was based on several bacterial traits such as not requiring factor X or factor V to grow *in vitro*. In addition, this germ has similarities with other bacterial species such as *Histophilus ovis* and *Haemophilus agni*. In phylogenetic, DNA-DNA hybridization, *rpoB* gene sequencing, and species-specific polymerase chain reaction (PCR) studies, *Haemophilus somnus*, *Haemophilus agni*, and *Histophilus ovis* showed to represent the same species. Therefore, this organism was proposed to be reclassified as *Histophilus somni*^(3,4).

The bacterium is associated with a cattle disease complex that includes thromboembolic meningoencephalitis⁽⁵⁾, bronchopneumonia⁽⁶⁾, infertility^(7,8), endometritis^(9,10), abortion^(11,12,13), weak calves at birth⁽¹⁴⁾, embryo resorption⁽¹⁵⁾, cervicitis and vaginitis^(16,17), and orchiepididymitis⁽¹⁸⁾. The organism has also been isolated from the semen and prepuce of clinically healthy bulls^(19,20). *H. somni* has been associated with myocarditis⁽²¹⁾, otitis⁽²²⁾, conjunctivitis⁽²³⁾, mastitis^(24,25), and polyarthritis⁽²²⁾. In sheep it has been found in cases of epididymitis, mastitis, septicemia, abortion, synovitis, and meningoencephalitis^(26,27,28,29,30). The role of this organism as a reproductive pathogen is controversial, since in several field/experimental trials it has been found to cause inflammation of the genital tract of cows, but it can also colonize the genital mucosa with no damage^(20,22). Experimental data reveal the ability of *H. somni* to cause embryonic death, suggesting an important role in early embryo losses⁽¹⁵⁾, as well as sporadic abortions following bacteremia^(7,12). The organism has been frequently isolated in processing plants from the uterus in cases of endometritis⁽¹⁷⁾.

The above-mentioned findings are important since we know that calves born from infected cows show the “weak calf syndrome”, and they die soon after

Lo anterior resulta importante porque se sabe que los becerros nacidos de vacas infectadas padecen el “síndrome del becerro débil” y mueren poco después⁽¹⁴⁾. Esta infección genital puede causar infertilidad, aumento del intervalo de días abiertos y aumento en el número de dosis de semen por concepción⁽³¹⁾.

En México, las primeras evidencias de la presencia de esta bacteria se registran en un estudio serológico en bovinos con problemas reproductivos y respiratorios, encontrándose un 25 % de positivos a la prueba de fijación de complemento⁽³²⁾; posteriormente se publicó el aislamiento de *Haemophilus somnus* a partir de pulmones de becerros con lesiones neumónicas⁽³³⁾.

El objetivo del presente trabajo fue determinar si *Histophilus somni* (*H. somnus*) se encuentra presente en vacas lecheras con padecimientos del aparato reproductor en algunos establos de la zona central de México.

MATERIALES Y MÉTODOS

Muestras

Se realizó un muestreo de conveniencia en seis establos lecheros ubicados en los estados de Hidalgo, Estado de México y Puebla, donde se colectaron muestras de exudado vaginal de 67 vacas Holstein clínicamente enfermas del tracto reproductor (casos), y de 45 vacas clínicamente sanas (no casos). Las muestras de moco vaginal se obtuvieron por aspiración de la porción craneal de la vagina, usando pipetas de plástico para inseminación artificial conectada a una jeringa de 10 ml para realizar la succión. De inmediato, con el exudado se impregnó de forma abundante un hisopo estéril, que se depositó en medio de transporte de Stuart, conservado en refrigeración durante su traslado hasta el laboratorio.

Estudio bacteriológico

Con los hisopos se inocularon placas de agar chocolate (ACH) preparado con Infusión cerebro corazón agar suplementado con 10 % de sangre desfibrinada de bovino y 0.5% de extracto de

birth⁽¹⁴⁾. This genital infection can result in infertility, increased open days, and increased numbers of semen doses per conception⁽³¹⁾.

The first evidence of the presence of this organism in Mexico was recorded in a serological survey performed in cattle with reproductive/respiratory problems, where 25 % complement fixation positive results were obtained⁽³²⁾. The isolation of *Haemophilus somnus* from the pneumonic lungs of calves was further published⁽³³⁾.

The purpose of this research was to determine whether *Histophilus somni* (*H. somnus*) is present in dairy cattle with reproductive disorders in central Mexico dairies.

MATERIALS AND METHODS

Samples

Vaginal exudate samples were conveniently obtained in six dairies located in the Mexican States of Hidalgo, Mexico, and Puebla, from 67 Holstein cows with clinical reproductive disease (cases) and 45 clinically healthy cows (no case). Vaginal mucus samples were obtained by aspiration from the cranial vagina using artificial insemination (AI) plastic pipettes hooked to a 10-ml suction syringe. A sterile swab was immediately and thoroughly impregnated with the exudate, placed in Stuart's transportation medium then refrigerated until delivery in the laboratory.

Bacteriological study

The above-mentioned swabs were used to inoculate chocolate agar (CHA) plates. CHA was prepared with brain/heart infusion agar supplemented with 10% de-fibrinated bovine blood, and 0.5% yeast extract. Plates were incubated at 37 °C for 24 to 48 h with 10% CO₂^(1,34).

Strain identification

Isolates were characterized using several traits such as colonial characteristics, microscopic morphology, biochemical reactions, total protein profiles using polyacrylamide gel electrophoresis (SDS/PAGE), antigenic recognition by immunoelectrophoresis with

levadura, e incubaron a 37 °C durante 24 a 48 h con atmósfera de 10% de CO₂^(1,34).

Identificación de la cepas

Se realizó una identificación tomando en cuenta varios aspectos: características de la colonia, morfología microscópica, reacciones bioquímicas, perfiles de proteínas totales por electroforesis en geles de poliacrilamida (SDS-PAGE), reconocimiento antigénico por inmunoelectroforesis con suero policlonal de conejo producido con cepa tipo, y la PCR especie-específica. En todos los análisis realizados se utilizó como control una cepa tipo de *Histophilus somni* de la American Type Culture Collection (ATCC).

Pruebas bioquímicas

Después de 48 h de incubación, se seleccionaron las colonias por sus características morfológicas como su forma circular, convexa, brillante, tamaño aproximado de 1 a 2 mm, pigmento ligeramente amarillento y consistencia similar a la mantequilla. A cada aislamiento se le realizaron pruebas de afinidad tintorial, morfología microscópica, y se determinaron sus reacciones bioquímicas y utilización de azúcares^(1,2).

Electroforesis

Se compararon los perfiles de proteínas de cada uno de los 10 aislamientos de campo contra la cepa tipo de *Histophilus somni*. Las cepas de campo fueron sembradas en placas de ACH e incubadas durante 48 h. Las bacterias fueron cosechadas en solución amortiguadora de fosfatos (PBS) pH 7.2, por centrifugación la pastilla fue lavada y resuspendida en PBS, y ajustada en espectrofotómetro a una densidad de 75 % de transmitancia a una longitud de onda de 610 nm, para una concentración de 1x10⁸ UFC/ml. Se tomaron 1.5 ml de esta suspensión bacteriana y se centrifugó a 15,000 xg durante 15 min. Se desechó el sobrenadante y el paquete bacteriano fue resuspendido en 30 ml de PBS y 30 ml de buffer de muestra; la suspensión final fue hervida durante 5 min⁽³⁵⁾. De la misma forma se prepararon muestras de bacterias del grupo *Haemophilus-Actinobacillus-Pasteurella* (HAP) como *Mannheimia*

polyclonal rabbit serum produced with the type strain, and species-specific PCR. An American Type Culture Collection (ATCC) *Histophilus somni* type strain was used in all cases as a control.

Biochemical tests

After 48 h of incubation, colonies were selected in accordance with their morphological features (i.e. circular, convex, 1 to 2 mm in size, slightly yellowish colonies, with butter-like consistency). Each isolate was subjected to staining affinity, microscopic morphology, biochemical reactions, and sugar utilization tests^(1,2).

Electrophoresis

Protein profiles of each of the 10 field isolates were compared with that of the *Histophilus somni* type strain. Field strains were seeded in CHA plates then incubated for 48 h. Bacterial isolates were harvested in pH 7.2 phosphate buffer solution (PBS), and centrifuged. The pellet was further washed and re-suspended in PBS. Density was then spectrophotometrically adjusted to 75 % transmittance, at a 610 nm wavelength, for a concentration of 1x10⁸ colony forming units (CFU)/ml. One and a half (1.5) ml of this bacterial suspension was taken and centrifuged at 15,000 xg for 15 min. The supernatant was discarded and the bacterial pellet was re-suspended in 30 ml PBS and 30 ml buffered sample. The final suspension was boiled for 5 min⁽³⁵⁾. Additionally, bacterial samples of the *Haemophilus/Actinobacillus/Pasteurella* (HAP) group including *Mannheimia haemolytica* A1 (*Pasteurella haemolytica*), *Pasteurella multocida* type A, and the *Histophilus somni* type strain were prepared using the same procedure.

Fifteen (15) ml of sample containing 10 mg protein from the test isolate were placed in each well of 12.5% polyacrylamide gel plates. Forty volts (40 V) were applied during the first hour, then increased to 80 V for 3 h, until sample run through the separating gel was completed. Gel plates were then stained with Coomassie's blue in order to observe protein profiles, or they were subjected to the nitrocellulose membrane immunotransference assay (Western blot)⁽³⁵⁾.

haemolytica A1 (*Pasteurella haemolytica*), *Pasteurella multocida* tipo A y cepa tipo de *Histophilus somni*.

En geles de poliacrilamida al 12.5% se depositaron en cada pozo 15 ml de muestra, conteniendo 10 µg de proteína, de la cepa por identificar y se aplicaron 40 volts (V) durante la primera hora, para posteriormente incrementar a 80 v durante 3 h aproximadamente, hasta verificar que la muestra completara el recorrido en el gel separador. Posteriormente, los geles se tiñeron con azul de Coomassie para observar los perfiles de proteínas o se les realizó la inmunotransferencia a membrana de nitrocelulosa⁽³⁵⁾.

Inmunotransferencia

Los geles elaborados fueron transferidos a membrana de nitrocelulosa durante 1 h a 400 mA, posteriormente la membrana fue bloqueada durante 2 h con leche descremada al 5% y lavada durante tres ciclos de 5 min con TBS-Tween 20. La membrana fue incubada con suero de conejo policlonal hiperinmune producido con la cepa tipo de *Histophilus somni*, a diluciones de 1:250 ó 1:500 durante 2 h. Se realizaron tres ciclos de lavados de 5 min cada uno con TBS y se incubó durante 2 h con anti IgG de conejo marcado con peroxidasa diluido 1:1000. Se repitieron los ciclos de lavado tres veces, y finalmente la membrana fue colocada en 100 ml de TBS; se le agregó la solución reveladora compuesta por 20 ml de metanol frío con 60 mg de 4-cloro-1-naftol y 100 ml de peróxido de hidrógeno al 30%. Las bandas se evidenciaron aproximadamente a los 10 min y la reacción se detuvo con agua destilada fría⁽³⁵⁾.

Reacción en cadena de la polimerasa

Con cada aislamiento se formó una suspensión bacteriana que fue utilizada para la extracción de ADN siguiendo un método convencional⁽³⁶⁾. Se utilizaron iniciadores específicos de un fragmento de ADN que codifica para el RNAr de la subunidad ribosomal 16S. El iniciador 1 en dirección 3'5' comienza en la base 453 con la secuencia GAAGGCGATTAGTTTAAGAG, y el iniciador 2 en dirección 5'3' comienza en la base 860 con la

Immunotransference

The gels prepared as stated above, were transferred to a nitrocellulose membrane for 1 h at 400 mA. The membrane was then blocked for 2 h with 5% skim milk, and subjected to three 5-min washing cycles with TBS-Tween 20. The membrane was incubated with hyper-immune polyclonal rabbit serum produced with the *H. somni* type strain for 2 h, at the 1:250 or 1:500 dilutions. Three 5-min washing cycles were performed with TBS, then incubated for 2 h with a 1:1000 dilution peroxidase-labeled rabbit anti-IgG, for 2 h. Washing cycles were repeated 3 times, and the membrane was finally placed in 100 ml TBS. Development solution (20 ml cold methanol with 60 mg 4-chloro-1-naphtol and 100 ml 30% hydrogen peroxide) was added. Approximately 10 min later bacteria were evident and the reaction was stopped with cold distilled water⁽³⁵⁾.

Polymerase chain reaction

A bacterial suspension was prepared with each isolate and subjected to DNA extraction following the conventional method⁽³⁶⁾. Specific primers from a DNA fragment codifying for the 16S ribosomal subunit rRNA were used. Primer 1 in the 3'5' direction starts at the 453 base with the GAAGGCG ATTAGTTTAAGAG sequence. Primer 2 in direction 5'3' starts at the 860 base with the TTCG GGCACCAAGTATTCA sequence. Therefore, a 407 base pair (bp) fragment is amplified^(3,37).

The following premix was used: 3 µl 1,5 mM +MgCl₂; 5 µl 1x s/Mg++ Buffer; 2 µl 100 mM dNTP ea.; 65 ng of each of the primers; 1 U *Taq* polymerase; 3 µl sample including the DNA of the test isolate, and miliQ H₂O qs 50 µl. Samples were placed in the thermocycler using the following program: denaturation at 94 °C for 3 min; followed by 35 1-min cycles at 94 °C; alignment for 1 min at 55 °C; and extension for 1 min at 72 °C. Final extension was performed at 72 °C for 7 min. Ten (10) µl of the PCR amplification products were subjected to 1% agarose gel electrophoresis with etidium bromide in agreement with the standard protocols, then visualized under an image analyzer^(3,37).

secuencia TTCGGGCACCAAGTATTCA, por lo que se amplifica un fragmento de 407 pares de bases^(3,37).

Se utilizó la siguiente premezcla: 3 él de +MgCl₂ 1,5 mM; 5 él de Buffer 1x s/Mg++; 2 él de dNTP 100  M de c/u; 65 ng de cada uno de los iniciadores; 1 U de *Taq* polimerasa; 3 él de muestra con ADN del aislamiento a identificar y H₂O miliQ cbp 50 él. Las muestras fueron puestas en el termociclador con el siguiente programa: desnaturalización a 94  C por 3 min, seguido de 35 ciclos a 94  C por 1 min, alineamiento a 55  C por 1 min y extensión a 72  C por 1 min. La extensión final a 72  C durante 7 min. Los productos de amplificación de la PCR (10 él) se sometieron a electroforesis en un gel de agarosa al 1% con bromuro de etidio de acuerdo a los protocolos estándares y se visualizaron en un analizador de im genes^(3,37).

En la PCR, la cepa tipo de *Histophilus somni* se utilizó como control positivo, y como control negativo se utilizaron cepas de *Salmonella enteritidis*, *Manheimia (Pasteurella) haemolytica*,

In the PCR, the *H. somni* type strain was used as a positive control, while the negative control included *Salmonella enteritidis*, *Mannheimia (Pasteurella) haemolytica*, *Pasteurella multocida*, *Actinobacillus seminis*, and *Escherichia coli*.

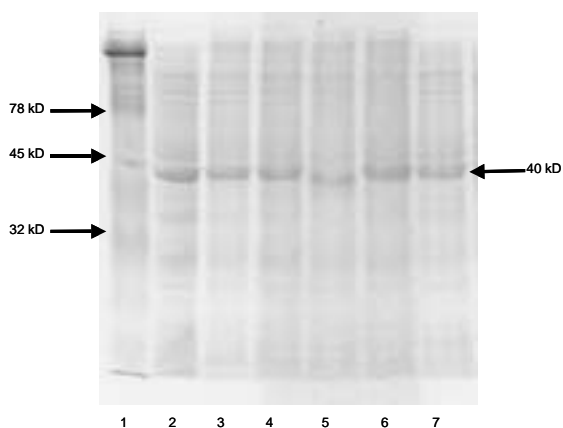
RESULTS

Isolates matching the reference strain as judged by colonial morphology stain affinity, pigmentation, consistency, microscopic morphology, and biochemical tests were selected so that they were preliminarily identified as *H. somni*. The total protein profile comparison (Figures 1,2) showed that the strains selected were consistent with the ATCC strain. Similarly, the immunotransference assays showed major *H. somni* protein (14, 20, and 40 kD) recognition by a rabbit polyclonal serum produced with the type strain (Figures 3,4), while substantial differences were observed in both tests with *Mannheimia haemolytica* and *Pasteurella multocida*.

The species-specific PCR assays performed with all 10 isolates from clinical reproductive disease,

Figura 1. Perfiles de proteínas totales de aislamientos de *H somni* de casos de metritis, en geles de poliacrilamida al 12.5 %

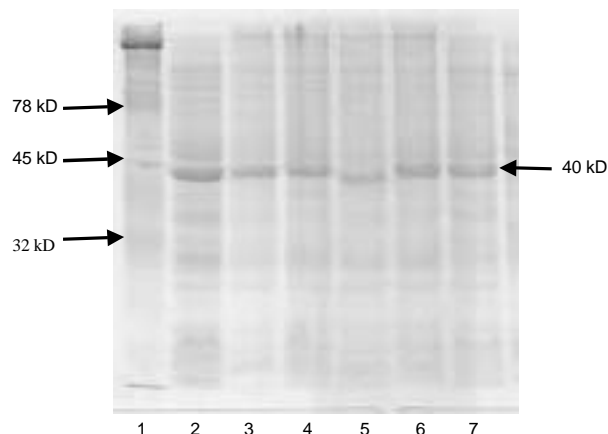
Figure 1. Total protein profiles in 12.5 % polyacrylamide gel plates of *H somni* isolates from metritis cases



Lane 1: molecular weight marker; 2: ATCC type strain; 3 - 7: field isolates

Figura 2. Perfiles de proteínas totales de aislamientos de *H somni* de vacas con metritis, en geles de poliacrilamida al 12.5 %

Figure 2. Total protein profiles in 12.5 % polyacrylamide gel plates of *H somni* isolates from metritic cows



Lane 1: molecular weight marker; 2: ATCC type strain; 3 - 7: field isolates

Pasteurella multocida, *Actinobacillus seminis*, y *Escherichia coli*.

RESULTADOS

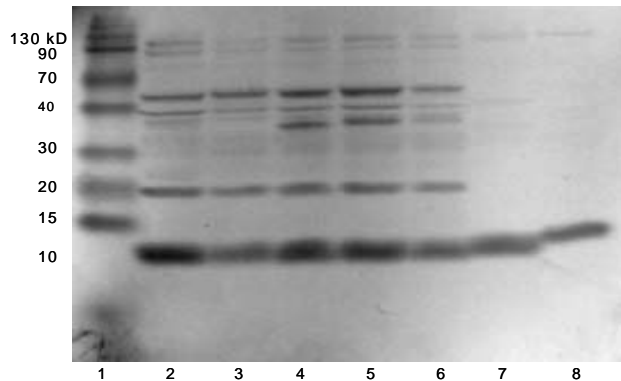
Se seleccionaron 10 aislamientos que de acuerdo a las características de morfología colonial, afinidad tintorial, pigmento, consistencia, morfología microscópica y pruebas bioquímicas, concordaron con la cepa de referencia, por lo que de forma preliminar se identificaron como *Histophilus somni*. Al realizar la comparación de los perfiles de proteínas totales (Figuras 1,2) se encontró que las cepas seleccionadas coincidieron en sus perfiles de proteínas totales con la cepa tipo de la ATCC, así mismo en las inmunotransferencias hubo reconocimiento de las proteínas más importantes de *H. somni* con pesos de 14, 20 y 40 kD por un suero policlonal de conejo producido con la cepa tipo (Figuras 3,4), notándose una diferencia sustancial en ambas pruebas con respecto a *Mannhemia haemolytica* y *Pasteurella multocida*.

Los 10 aislamientos, obtenidos de los casos clínicos de padecimiento en aparato reproductor, al ser probados con la PCR especie-específica, amplificaron un segmento de 407 pb, igual que el obtenido con la cepa tipo de *H. somni*, por lo que

amplified with the 407 bp segment, similar to that obtained with the *H. somni* type strain. This, together with all other results, definitely characterized our isolates as *H. somni* (Figure 5).

Figura 4. Inmunotransferencia de proteínas totales de aislamientos de *H. somni* de tracto reproductor vacas

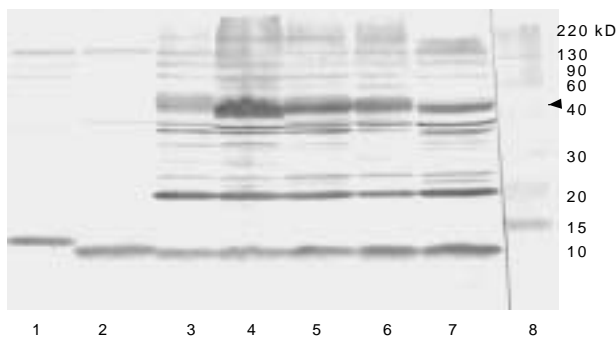
Figure 4. Total protein immunotransference of *H. somni* isolates from cow reproductive tracts



Lane 1: Molecular weight marker; 2: ATCC type strain; 3 - 6: *H. somni* field strains; 7: *M. haemolytica*; 8: *P. multocida*.

Figura 3. Inmunotransferencia de las cepas de *H somni* utilizando suero hiperinmune policlonal (1:500) producido en conejo con cepa tipo ATCC

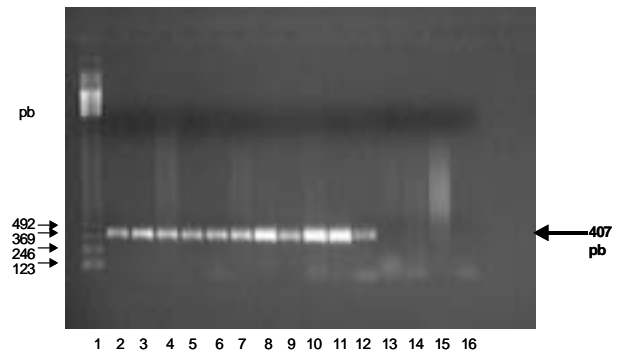
Figure 3. Immunotransference of *H somni* isolates using rabbit polyclonal hyperimmune serum (1:500) against the ATCC type strain



Lane 1: *P.multocida*; 2: *M. haemolytica*; 3 - 6: *H. somni* field isolates; 7: ATCC type strain; 8: molecular weight marker.

Figura 5. Productos de amplificación obtenidos por PCR en cepas de campo de *H. somni* de tracto reproductor de vacas

Figure 5. PCR amplification products from *H. somni* field isolates from cow reproductive tracts



Lane 1: molecular weight marker 123; 2: ATCC type strain; 3 - 12: isolates from cows with clinical reproductive tract disorders; 13: *P. multocida*; 14: *M. haemolytica*; 15: *E. coli*; 16: negative control.

aunado a los demás resultados obtenidos se identificaron en forma definitiva como *Histophilus somni* (Figura 5). En las cepas usadas como control negativo no se observó ninguna amplificación.

De las 112 muestras estudiadas se obtuvieron un total de 10 (8.9 %) aislamientos de *Histophilus somni* en cultivo puro, que fueron recuperadas del grupo de 67 vacas con problemas de tracto reproductor, y que para este grupo representan el 14.9 %. Las vacas con aislamiento positivo pertenecieron a un establo ubicado en el estado de Hidalgo con siete animales, un establo con dos vacas en el Estado de México y un animal del estado de Puebla. En las 57 vacas restantes de este mismo grupo la bacteria que con más frecuencia se encontró fue *Corynebacterium bovis* con 8.77 % (5/57) y en menor proporción *E. coli* con 5.26 % (3/57) *Staphylococcus spp.*, 3.5 % (2/57), *Bacillus spp.* 5.26 % (3/57) y *Proteus spp.* 7.01 % (4/57). De las 45 muestras de vacas clínicamente sanas no se obtuvo ningún aislamiento de *H. somni*, aunque en el 6.6 % (3/45) crecieron colonias de *E. coli*, que se atribuyen a contaminación en el momento de la toma de muestra.

DISCUSIÓN

En el presente trabajo se obtuvo un 14.8 % de aislamientos de *Histophilus somni* en el grupo de animales enfermos; cifras similares son informadas en estudios de campo realizados en Estados Unidos, donde se aisló en 15 % de las muestras de vagina⁽³⁸⁾, mientras que en un hato lechero de Polonia con antecedentes de casos de abortos y vaginitis, se encontró un 15.6 % de aislamientos a partir de vagina y cervix⁽³⁹⁾.

Una cifra mayor que las anteriores es la encontrada en estudios realizados en Australia, en donde obtuvieron aislamientos del 28.6 % de las vacas muestreadas durante un brote de enfermedad genital inflamatoria asociada a *H. somni*, y que fue relacionada con la monta natural de toros infectados^(9,17). En este mismo país, esta bacteria ha sido aislada frecuentemente en casos de vaginitis purulenta, cervicitis y endometritis de ganado lechero y se ha identificado como el patógeno

No amplification was observed in the negative controls whatsoever.

The 112 samples analyzed yielded a total of 10 (8.9 %) *H. somni* isolates in pure culture. These isolates were obtained from the group of 67 cows with reproductive disorders (14.9 %) of this particular group. The location of the cows with positive isolates was as follows: seven cows in a State of Hidalgo dairy; two cows in a State of Mexico dairy; and one cow in a State of Puebla dairy. From all other 57 cows in this group, the most frequent isolates were *Corynebacterium bovis* (8.77 %, 5/57); followed by *E. coli* (5.26 %, 3/57); *Staphylococcus spp.*, (3.5 %, 2/57); *Bacillus spp.* (5.26 %, 3/57); and *Proteus spp.* (7.01 %, 4/57). No *H. somni* isolates were obtained whatsoever from the 45 clinically healthy cows. These animals yielded *E. coli* (6.6 %, 3/45) and this was attributed to contamination at sampling.

DISCUSSION

In this research, 14.8 % *H. somni* isolates were obtained from the group of sick animals. Similar figures have been reported in US field trials (15 % from vaginal samples)⁽³⁸⁾. Also, 15.6 % positive isolates were obtained in Polish dairies from the vagina and cervix of cows with history of abortion and vaginitis⁽³⁹⁾.

An Australian report showed a higher isolation rate, where 28.6 % of the cows sampled were positive a *H. somni*-associated inflammatory genital disease^(9,17). In Australia this organism has been frequently isolated from purulent vaginitis, cervicitis and endometritis in dairy cattle, and it has been identified as the pathogen responsible for reproductive diseases affecting fertility. Purulent vaginal discharge is more associated with vaginitis and cervicitis than with endometritis, and it is significantly associated with natural mating with bulls carrying *H. somni* in their prepuces, or during AI when using the same catheter in more than one cow⁽⁹⁾.

Lower isolation rates (6.8 %) have been reported in Germany in studies using genital tracts from slaughtered cows⁽⁴⁰⁾. In Canada, 8 % isolation

responsable de enfermedades reproductivas que afectan la fertilidad. La descarga vaginal purulenta es debida más a la vaginitis y cervicitis, que a la endometritis, y está significativamente asociada con la monta natural de toros portadores de *H. somni* en cavidad prepucial, o el uso del mismo catéter en más de una vaca al realizar prácticas de inseminación artificial⁽⁹⁾.

Porcentajes menores de aislamiento han sido informados en Alemania, al realizar estudios del aparato genital de vacas sacrificadas en rastros, donde se encontró un 6.8 % de aislamientos a partir de vagina⁽⁴⁰⁾, mientras que en Canadá se encontró un 8 % a partir de vagina, glándulas vestibulares, cervix y útero⁽¹⁰⁾. Los porcentajes anteriores son similares al porcentaje general del presente trabajo, que fue de 8.9 %, pero las condiciones de muestreo fueron diferentes, ya que en nuestro estudio las muestras fueron de casos clínicos y de animales sanos en centros de producción.

En términos generales, la tasa de aislamientos de esta bacteria a partir de aparato reproductor en vacas es menor que la encontrada en bovinos machos, cuyas cifras reportadas han sido hasta del 77 %⁽²⁰⁾.

El papel de *Histophilus somni* (*Haemophilus somnus*) como patógeno del aparato reproductor de los bovinos es controversial, debido a que el microorganismo ha sido aislado tanto de vacas con padecimientos del aparato genital, como de la mucosa vaginal de bovinos clínicamente sanos. Sin embargo *H. somni* es frecuentemente aislado, en cultivo puro o mezclado, de vacas con enfermedades del tracto genital, y que indican una asociación con lesiones inflamatorias de éste^(7,8,17,38) además de ser capaces de producir infecciones en condiciones experimentales^(15,41,42,43).

El hecho de no haber obtenido aislamiento en vacas clínicamente sanas no concuerda con lo esperado, debido a que se sabe que es factible el aislamiento en este tipo de animales aunque en porcentajes bajos, por lo que se considera pudieron interferir algunos factores que repercutieron en los resultados finales. Los diversos factores que pueden influir

rate was obtained from the vagina, vestibular glands, cervix, and uterus⁽¹⁰⁾. These reports are similar to our general isolation rate of 8.9 %, even though sampling conditions differ, since in our study samples were obtained from both sick and healthy cattle in production units.

Generally, the isolation rate of *H. somni* from the reproductive tract of cows is lower than that from bulls, which isolation rates have been reported to be as high as 77 %⁽²⁰⁾.

The role of *Histophilus somni* (*Haemophilus somnus*) as a reproductive pathogen of cattle is controversial, since the organism has been isolated from cows with genital disease as well as from the vaginal mucosa of clinically healthy cattle. Nevertheless, *H. somni* is frequently isolated in either pure or mixed cultures from cows with genital tract disease, showing an association with inflammatory lesions of the genital tract^(7,8,17,38). *H. somni* also has the ability of producing infections under experimental conditions^(15,41,42,43).

The fact of not having isolated *H. somni* from clinically healthy cows was unexpected since it is known that the isolation in this type of animals is feasible at low rates. It is therefore considered that some factors could have played a role in our final results. Factors that can interfere with the isolation of this organism are contaminants (i.e.: *E. coli*, *Proteus* spp.) that inhibit the growth of *H. somni*. It is also important to consider if the animals sampled have received chemotherapy. One other important factor is the use of a transportation medium to preserve bacterial livability in swabs until seeded in the laboratory. Finally, the culture medium used for primary isolation is also important, since it must be specific/selective for *H. somni*⁽³⁴⁾. We did our best to avoid the above-mentioned negative factors, with the exception of chemotherapy, since we were not able to prevent medication or to modify field working conditions during our study.

CONCLUSIONS AND IMPLICATIONS

Despite of the controversy about the role played by *H. somni* in the presentation of genital disease

en la recuperación de este microorganismo son la presencia de contaminantes como *Escherichia coli* y *Proteus* spp., que inhiben el crecimiento de la bacteria de interés; también es importante tomar en cuenta si los animales muestreados fueron sometidos a alguna quimioterapia. Otro aspecto importante puede ser la utilización del medio de transporte donde se incluyen los hisopos para conservar la viabilidad de la bacteria hasta el momento del cultivo, y finalmente es de tomarse en cuenta el medio de cultivo a utilizarse para el aislamiento primario, que debe ser específico y selectivo para *Histophilus somni*⁽³⁴⁾. En el presente estudio se trató en lo posible de evitar los factores negativos antes mencionados, excepto el relacionado con la quimioterapia, en el que no se tuvo posibilidad de evitarlo o modificar las condiciones durante el periodo de estudio.

CONCLUSIONES E IMPLICACIONES

A pesar de la controversia del papel que juega *Histophilus somni* en la presentación de enfermedades genitales de las vacas, actualmente se ha demostrado plenamente en estudios experimentales y de campo su participación en la presentación de dichas enfermedades. Con los resultados obtenidos en el presente estudio, en el que se informa por primera vez en México de la presencia de *Histophilus somni* en casos clínicos de enfermedades del tracto reproductor de vacas lecheras, se confirma lo anterior, por lo que será necesario en un futuro, tomar esto en cuenta, para el manejo y tratamiento de enfermedades del aparato reproductor de los bovinos, además de continuar líneas de investigación tanto básica como aplicada relacionadas con *Histophilus somni*.

LITERATURA CITADA

- García-Delgado GA, Little PB, Barnum DA. A comparison of various *Haemophilus somnus* strains. *Can J Comp Med* 1977;(41):380-388.
- Humphrey JD, Stephens LR. *Haemophilus somnus*: a review. *Vet Bull.* 1983;(53):987-1004.
- Angen O, Ahrens P, Tegmeier C. Development of a PCR test for identification of *Haemophilus somnus* in pure and mixed cultures. *Vet Microbiol* 1998;(63):39-48.

in cows, its participation in such genital disease has now been fully demonstrated through both experimental research and field trials. The results obtained in this research include the first report in Mexico and confirms the presence of *H. somni* in clinical cases of dairy reproductive disorders. Therefore, this germ should be taken into account for the management and treatment of cattle reproductive diseases. Basic/applied research lines on *H. somni* should continue in the future.

End of english version

- Angen O, Ahrens P, Kuhnert P, Christensen H, Mutters R. Proposal of *Histophilus somni* gen. nov., sp. nov. for the three species *incertae sedis* '*Haemophilus somnus*', '*Haemophilus agni*' and '*Histophilus ovis*'. *Int J Syst Evol Microbiol* 2003;(53):1449-1456.
- Stephens LR, Little PB, Wilkie N, Barnum DA. 1981. Infectious thromboembolic meningoencephalitis in cattle: A review. *J Am Vet Med Assoc* 1981;(178):378-384.
- Andrews JJ, Anderson TD, Slife LN, Stevenson GW. Microscopic lesions associated with the isolation of *Haemophilus somnus* from pneumonic bovine lungs. *Vet Pathol* 1985;(22):131-136.
- Kwiecien JM, Little PB. *Haemophilus somnus* and reproductive disease in the cow: A review. *Can J Vet Res* 1991;(32):595-601.
- Kwiecien JM, Little PB. Isolation of pathogenic strains of *Haemophilus somnus* from the female bovine reproductive tract. *Can J Vet Res* 1992;(56):127-134.
- Stephens LR, Slee P, Poullton P, Lancombe M, Kosior E. Investigation of purulent vaginal discharge in cows with particular reference to *Haemophilus somnus*. *Aust Vet J* 1986;(63):182-185.
- Miller RB, Barnum DA, McEntee KE. *Haemophilus somnus* in the reproductive tracts of slaughtered cows: location and frequency of isolations and lesions. *Vet Pathol* 1983;(20):515-521.
- Widders PR, Paisley LG, Gogolewski RP, Evermann JF, Smith JW, Corbeil LB. Experimental abortion and the systemic immune response to "*Haemophilus somnus*" in cattle. *Infect Immun* 1986;(54):555-560.
- Van Dreumel AA, Kierstead MA. Abortion associated with *Haemophilus somnus* in a bovine fetus. *Can Vet J* 1975;(16):367-370.
- Chladek DW. Bovine abortion associated with *Haemophilus somnus*. *Am J Vet Res* 1975;(36):1041.
- Waldhalm DG, Hall RF, Meinershagen BS, Card CS, Frank FW. *Haemophilus somnus* infection in cow as a possible contributing factor to weak calf syndrome: isolation and animal inoculation studies. *Am J Vet Res* 1974;(35):1401-1403.
- Kaneene JB, Coe PH, Gibson CD, Yamini B, Marinez RO, Morrow DA. The role of *Haemophilus somnus* in early

- embryonic death. I. The effect of the organism on embryos by day 8 postbreeding. *Theriogenology* 1986;26(2):189-197.
16. Patterson RM, Hill JF, Shiel MJ, Humphrey JD. Isolation of *Haemophilus somnus* from vaginitis and cervicitis in dairy cattle. *Austr Vet J* 1984;(61):301-302.
 17. Miller RB, Lein DH, Hall CE, Shin S. *Haemophilus somnus* infection of the reproductive tract of cattle: a review. *J Am Vet Med Assoc* 1983;(182):1390-1392.
 18. Metz AL, Haggard DL, Hakomaki MR. Chronic suppurative orchiepididymitis associated with *Haemophilus somnus* in a calf. *J Am Vet Med Assoc* 1984;(184):1507-1508.
 19. Humphrey JD, Little PB, Barnum DA, Doig PA, Stephens LR, Thorsen J. Occurrence of *Haemophilus somnus* in bovine semen and in the prepuce of bulls and steers. *Can J Comp Med* 1982;(46):215-217.
 20. Humphrey JD, Little PB, Stephens LR, Barnum DA, Doig PA, Thorsen J. Prevalence and distribution of *Haemophilus somnus* in the male bovine reproductive tract. *Am J Vet Res* 1982;(43):792-795.
 21. Moisan PG, Fitzgerald SD. *Haemophilus somnus* myocarditis in feedlot cattle. *Agri-Practice* 1995;16(4):21-24.
 22. Harris FW, Janzen ED. The *Haemophilus somnus* disease complex (haemophilosis): a review. *Can J Vet Res* 1989;(30):816-822.
 23. Lamont HH, Hunt BW. *Haemophilus somnus* and conjunctivitis. *Vet Rec* 1982;(111):21.
 24. Hazlett MJ, Little PB, Barnum DA. Experimental production of mastitis with *Haemophilus somnus* in the lactating bovine mammary gland. *Can Vet J* 1983;(24):135-136.
 25. Higgins R, Martin JR, Larouche Y, Goyette G. Mastitis caused by *Haemophilus somnus* in a dairy cow. *Can Vet J* 1987;(28):117-119.
 26. Webb RF. Clinical findings and pathological changes in *Histophilus ovis* infections of sheep. *Res Vet Sci* 1983;35(1):30-34.
 27. McDowell SWJ, Cassidy JP, McConnell W. A case of ovine abortion associated with *Histophilus ovis* infection. *Vet Rec* 1994;(134):504.
 28. Philbey AW, Glastonbury JR, Rothwell JT, Links IJ, Searson JE. Meningoencephalitis and other conditions associated with *Histophilus ovis* infection in sheep. *Aust Vet J* 1991;68(12):387-390.
 29. Cassidy JP, McDowell SW, Reilly GA, Mc Conell WJ, Forster F, Lawler D. Thrombotic meningoencephalitis associated with *Histophilus ovis* infection in lambs in Europe. *Vet Rec* 1997;140(8):193-195.
 30. Kearney KP, Orr MB. An outbreak of *Haemophilus agni-Histophilus ovis* septicaemia in lambs. *N Z Vet J* 1993;(41):149-150.
 31. Ruegg PL, Marteniuk JV, Kaneene JB. Reproductive difficulties in cattle with antibody titers to *Haemophilus somnus*. *J Am Vet Med Assoc* 1998;(193):941-942.
 32. Correa GP, Brown DLN, Bryner JH. Presencia de anticuerpos contra Rinotraqueítis Infecciosa, Diarrea Viral Bovina, Parainfluenza 3, Brucelosis, Leptospirosis, Vibriosis y *Haemophilus somnus* en sueros de bovinos con problemas patológicos reproductores y respiratorios. *Téc Pecu Méx* 1975;(29):26-33.
 33. Aguilar RF, Trigo TE, Jaramillo ML, Sanchez-Mejorada PH. Aislamiento de *Haemophilus somnus* a partir de pulmones neumónicos de bovinos. *Tec Pecu Méx* 1986;(52):67-73.
 34. Inzana TJ, Corbeil LB. Development of a defined medium for *Haemophilus somnus* isolated from cattle. *Am J Vet Res* 1987;(48):366-369.
 35. Ward AC, Jaworski MD, Eddow JM, Corbeil LB. A comparative study of bovine and ovine *Haemophilus somnus* isolates. *Can J Vet Res* 1995;59(3):173-178.
 36. Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis T. *Molecular Cloning. A laboratory manual*. Second edition, USA: Cold Spring Laboratory Press; 1989.
 37. Tegtmeier C, Angen O, Ahrens P. Comparison of bacterial cultivation, PCR, *in situ* hybridization and immunohistochemistry as tools for diagnosis of *Haemophilus somnus* pneumonia in cattle. *Vet Microbiol* 2000;(76):385-394.
 38. Corbeil LB, Widders PR, Gogolewski R, Arthur J, Inzana TJ, Wards ACS: *Haemophilus somnus*: Bovine reproductive and respiratory disease. *Can Vet J* 1986;27:90-93.
 39. Nowackj W, Molenda J, Stefaniak T, Chelmonska A, Nikolajczuk M: Izolacja *Haemophilus somnus* dróg rodnych krów. *Med Weter* 1998;44:36-39.
 40. Weisser W, Albert K: *Haemophilus somnus* und *Corynebacterium pyogenes* vorkommen im vaginalsecret fruchtbarkeit-gestorter rinder in Nordwurttemberg. *Tierarztl Umsch* 1987;42:596-600.
 41. Miller RB, Barnum DA. Effects of *Haemophilus somnus* on the pregnant bovine reproductive tract and conceptus following cervical infusion. *Vet Pathol* 1983;20:584-589.
 42. Kaneene JB, Coe PH, Gibson CD, Yamini B, Morrow DA, Marinez RO. The role of *Haemophilus somnus* in early embryonic death. III. The effect of the organism on embryos by day 21 postbreeding. *Theriogenology* 1987;27:737-749.
 43. Patterson RM, Mitchell GM, Humphrey JD, Stephens LR. Experimental induction of vaginitis in heifers by infection with *Haemophilus somnus*. *Aust Vet J* 1986;20:163-165.

