

## AISLAMIENTO DE *Haemophilus somnus* A PARTIR DE PULMONES NEUMONICOS DE BOVINOS

FRANCISCO AGUILAR R.\*

EMILIO TRIGO T.\*\*

LAURA JARAMILLO M.\*

HECTOR SANCHEZ-MEJORADA P.\*\*

### RESUMEN

Con el objeto de demostrar la presencia de *Haemophilus somnus* (*H. somnus*) en procesos neumónicos de becerros en México, se llevó a cabo el presente estudio. Se colectaron porciones de 49 pulmones neumónicos de becerros Holstein, se les realizó estudio bacteriológico con el empleo del medio de cultivo Agar Chocolate. Un total de 5 aislamientos (10.2%) de *H. somnus* fue obtenido de las muestras examinadas. La identificación de *H. somnus* se basó en la morfología del microorganismo, características de las colonias, requerimientos en el cultivo e incubación y la prueba de doble inmunodifusión. También fue realizado el estudio histopatológico donde se encontraron lesiones de bronconeumonía supurativa severa y difusa.

### INTRODUCCION

El *H. somnus* es un cocobacilo pleomórfico, gramnegativo, conside-

\* Departamento de Bacteriología, Sector Pecuário, INIFAP-SARH, Km. 15.5 Carr. México-Toluca, D. F. Apdo. Postal 652.

\*\* Departamento de Fisiopatología, Sector Pecuário, INIFAP-SARH, Km. 15.5 Carr. México-Toluca, D. F., Apdo. Postal 652.

rado como el agente causal de la meningoencefalitis tromboembólica (METE) de los bovinos. Esta enfermedad fue descrita por primera vez en Colorado, E.U. (Griner y col., 1956). Posteriormente Kennedy y col., (1960) caracterizaron a la bacteria como "*Haemophilus-like organism*" cuando reprodujeron la enfermedad en becerros. Esta enfermedad fue encontrada subsecuentemente en muchas áreas de Estados Unidos (Baillie y col., 1966; Panciera y col., 1968; Shigidi y Hoerlein, 1970), así como en Canadá, Alemania, Italia, Suiza, Reino Unido y Rumania (Humphrey y Stephens, 1983). *H. somnus* también ha sido relacionado con problemas reproductivos como vaginitis, cervicitis, abortos, endometritis y orquiepididimitis (Chladek, 1975; Van Dreumel y Kierstead, 1975; Miller y col., 1983; Metz y col., 1984). La bacteria ha sido aislada también de bovinos con problemas respiratorios (Pritchard y Macleod, 1977; Molenda y Kocyrczak, 1980; Saunders y col., 1980; Forray y col., 1984; Andrews y col., 1985), de lavados prepuciales (Humphrey y col., 1982a), de muestras de semen (Janzen y col., 1981; Humphrey y col., 1982b; Krogh y col., 1983), en casos de conjuntivitis (Lamont y Hunt, 1982) y se ha relacionado con el nacimiento

de becerros débiles (Waldhalm y col., 1974). Además la inoculación experimental produjo mastitis en bovinos (Hazlett y col., 1983).

En México Correa y col., (1975) realizaron el primer estudio relacionado con este microorganismo e informaron la presencia de anticuerpos en sueros de bovinos con historia clínica de padecimientos reproductivos y respiratorios.

Aguilar y col., (1985), aislaron por primera vez en México cepas de **H. somnus** a partir de lavados prepuciales de toros clínicamente sanos. Con base en trabajos anteriores (Olander y col., 1970; Saunders y col., 1980; Stephens y col., 1981) se considera que la presencia de **H. somnus** en el aparato reproductor es importante, pues la excreción urinaria acompañada de este microorganismo es un modo de diseminación significativo.

En un estudio previo sobre bacteriología de pulmones neumónicos de bovinos adultos (Trigo y col., 1979) se informa sobre los microorganismos más comunmente aislados en este tipo de problemas, aunque no concretamente sobre el número de casos que se detectan. En otro estudio similar realizado con becerros (Trigo y col., 1982) se notificó que un porcentaje de 8.9 los animales examinados a nivel de rastro presentaron problemas neumónicos, lo cual indica que los problemas respiratorios en bovinos de México son importantes. En ambos informes se destaca el aislamiento de **Pasteurella haemolytica**, **Pasteurella multocida** seguido de **Corynebacterium** spp y **Streptococcus** spp. En estos estudios no se realizó el aislamiento de **Haemophilus somnus**, aunque no se le buscó específicamente con los medios bacteriológicos recomendados.

Por lo anterior el objetivo de este trabajo fue el demostrar por primera

vez la presencia de **H. somnus** en procesos neumónicos de becerros en México.

## MATERIAL Y METODOS

**Muestras.** Se colectaron porciones de 49 pulmones neumónicos de becerros Holstein de 1-4 semanas de edad sacrificados en el rastro municipal de Tlalnepantla Edo. de México, provenientes de diferentes Estados de la zona centro del país, como Querétaro, Jalisco, Aguascalientes, Hidalgo y Estado de México. Las muestras fueron refrigeradas y transportadas al laboratorio para su estudio bacteriológico. Segmentos de pulmón se destinaron a estudios histopatológicos, de acuerdo a las técnicas de rutina (Culling, 1974).

**Medio de cultivo.** Se utilizó Agar Chocolate que tiene como base Agar Cistina Corazón adicionado con 0.5% de extracto de levadura, 10% de suero de equino y 10% de sangre desfibrinada de bovino.

Para la determinación de reacciones de fermentación de carbohidratos se utilizó Base Caldo Rojo de Fenol con un contenido del 10% de suero de equino y 0.5% de extracto de levadura. Los medios para las reacciones bioquímicas incluían 10% de suero de equino y 0.5% de extracto de levadura adicionados al ingrediente basal.

**Estudio Bacteriológico.** Las placas de Agar Chocolate inoculadas por contacto del tejido con la superficie del medio, fueron incubadas en jarra de velobiosis a 37°C durante 24 horas. Se seleccionaron las colonias convexas, redondas, con tamaño aproximado de 1mm de diámetro, brillantes, de consistencia mantequillosa, de color amarillento. Al teñir los frotis de ellas, se observaron al examen microscópico cocobacilos

pleomórficos gramnegativos (García-Delgado y col., 1977) que fueron separados en cultivo puro para efectuar las pruebas bioquímicas y de fermentación de carbohidratos.

Los tubos para las reacciones bioquímicas y de fermentación de carbohidratos se incubaron en jarra de velobiosis a 37°C durante 48 horas y se mantuvieron a temperatura ambiente hasta que los controles no inoculados retornaron a su pH original. En todos los casos se utilizaron controles negativos no inoculados y controles positivos inoculados con la cepa de referencia, ambos se incubaron bajo condiciones idénticas (García-Delgado y col., 1977).

Identificación de *H. somnus*. A las colonias bacterianas características de *H. somnus*, ya descritas anteriormente (García-Delgado y col., 1977), se les realizaron pruebas bioquímicas y de fermentación de carbohidratos. Se hizo la comparación entre los aislamientos y una cepa de referencia de *H. somnus*, mediante la prueba de doble inmunodifusión.

Producción de suero hiperinmune. Para llevar a cabo la prueba de dobleinmunodifusión fue necesario producir suero positivo a *H. somnus* en bovino, mediante la inoculación de la cepa de referencia con adyuvante completo de Freund, de acuerdo a la metodología de inmunización empleada por Simonson y Maheswaran (1982) Se colectó suero antes y después del período de inmunización.

El antígeno inmunizante fue preparado de la siguiente manera: La cepa de *H. somnus* se sembró en cajas de Agar Chocolate, éstas fueron incubadas en jarras de velobiosis durante 48 horas a 37°C. Las células fueron cosechadas y se inactivaron con solución salina formalinizada al 0.5%, posteriormente fueron lavadas 3 veces, y la suspensión de bacterias resultan-

te fue ajustada en un espectrofotómetro (Spectronic 20, Bausch & Lomb, Rochester, N.Y.) a una densidad óptica de 0.39 a 550 nm (Cantó y Biberstein, 1982).

Prueba de doble inmunodifusión. Se realizó en portaobjetos cubiertos con una capa de Agar Noble al 1% (Difco Laboratories, Detroit, Mich.). El agar fue preparado con solución salina fosfatada 0.1 M (pH 7.2). Dos grupos, de 7 pozos cada uno, se perforaron en el portaobjetos; en cada grupo, 6 pozos fueron colocados en forma simétrica alrededor de un pozo central. En los pozos circundantes se colocó el antígeno de las cepas problema y la de referencia, y en el pozo central se agregó el suero hiperinmune positivo a *H. somnus*. La misma operación se realizó en el otro grupo de pozos, sólo que con un suero cuya negatividad a *H. somnus* había sido previamente comprobada, ya que se trataba de suero del mismo animal donde se produjo el suero positivo a *H. somnus*, pero obtenido antes del inicio del calendario de inmunización, además de haberse probado mediante la prueba de doble inmunodifusión contra antígeno sonificado de *Pasteurella haemolytica*, para ver si existía reacción cruzada, y de *H. somnus*, en ambos casos no se presentaron líneas de identidad. El antígeno de cada una de las cepas a probar y de referencia se preparó con bacterias suspendidas en solución salina fosfatada, que fueron sonicadas (Sonicador MSE) durante 10 minutos a una amplitud de 7µm. El sonificado fue centrifugado a 3000 g durante 10 minutos y el sobrenadante fue ajustado a una densidad óptica de 1.0 a 550 nm. Los portaobjetos fueron conservados en cámara húmeda y la lectura se efectuó a las 48 horas (Stephens y col., 1981).

## RESULTADOS

Se obtuvieron 5 cepas de *H. somnus* a partir de 5 diferentes muestras (10.2%) de los 49 pulmones examinados. Tanto las cepas aisladas como la de referencia presentaron las siguientes características: cocobacilos pleomórficos, gramnegativos, inmóviles, colonias color amarillento, oxidasa positiva, catalasa negativo, glucosa positivo, esculina negativo, reducción de nitrato, citrato negativo, Voges-Proskauer negativo, rojo de metilo negativo, no hubo crecimiento en agar Chocolate en ausencia de CO<sub>2</sub>, ni tampoco creció en agar Mac Conkey. Por lo que respecta a las características de la morfología colonial fueron típicas de *H. somnus*. De las 5 cepas aisladas ninguna presentó actividad hemolítica, ni crecieron en medios de cultivo convencionales como Agar Sangre y Agar Infusión Cerebro Corazón.

En la prueba de doble inmunodifusión, se presentaron líneas de identidad entre los antígenos sonicados y el suero hiperinmune producido con la cepa de referencia de *H. somnus*, no así cuando estos mismos antígenos fueron probados contra el suero negativo a *H. somnus*.

El estudio histopatológico de los pulmones de donde se aisló *H. somnus* indicó la presencia de una neumonía supurativa severa y difusa.

## DISCUSION

El presente estudio sugiere que *H. somnus* se encuentra involucrado en problemas respiratorios de bovinos en México, así como también había sido informado en otros países (Pritchard y McCleod, 1977; Molenda y Kozyrczak, 1980; Saunders y col., 1980; Forray y col., 1984; Andrews, 1985). En un trabajo anterior en México, (Correa y

col., 1975) se demostró la presencia de anticuerpos contra *H. somnus* en un alto porcentaje de reactores positivos (25%) y sospechosos (33.5%) en sueros de bovinos con problemas respiratorios y reproductivos. Posteriormente Aguilar y col., (1985) informaron del aislamiento de este microorganismo a partir de prepucio de toro, lo que sugiere que *H. somnus* puede estar involucrado en procesos patológicos que ocasionan pérdidas a la economía de la ganadería nacional, como sucede en países como Canadá (Saunders y col., 1980) y Estados Unidos (Olander y col., 1970).

La presencia de *H. somnus* en México podría ser explicada porque existe la introducción de ganado proveniente de países con este problema, tales como Canadá y Estados Unidos, ya que *H. somnus* puede encontrarse también en animales clínicamente sanos quienes diseminaran el microorganismo, aunque el mecanismo por el cual *H. somnus* se involucra en las enfermedades respiratorias todavía es obscuro (Humphrey y Stephens, 1983).

Se han descrito diferentes medios enriquecidos para obtener un crecimiento óptimo de *H. somnus*, estos incluyen Agar Infusión Cerebro Corazón (AICC) suplementado con 10% de sangre de bovino y 0.5% de extracto de levadura (García-Delgado y col., 1977), AICC con 10% de suero de bovino y 0.5% de extracto de levadura (Gossling, 1966) y Agar Cistina Corazón con 10% de sangre de bovino y 0.5% de extracto de levadura (Shigidi y Hoerlein, 1970). En el presente trabajo se utilizó medio Agar Chocolate compuesto por Agar Cistina Corazón complementado con 10% de sangre desfibrinada de bovino, 10% de suero de equino y 0.5% de extracto de levadura; resultó ser un medio adecuado para aislamientos

primarios, además de poderse diferenciar más fácilmente las colonias de **H. somnus** por tomar su coloración amarillenta, aunque es conveniente considerar que existen cepas atípicas que pueden aislarse en medios como Triptosa Agar no suplementado (Cantó y Biberstein, 1982).

Las lesiones histopatológicas de los pulmones, no fueron las características para **H. somnus**, (neumonía fibrinosa; Andrews y col., 1985) sino que en estos casos se observó una bronconeumonía supurativa. Estas variaciones pudieron deberse a la presencia de diferentes cepas de **H. somnus**, o bien, a la posible presencia de bacterias piógenas como parte del cuadro neumónico.

Es importante tener en cuenta el papel que puede jugar este microorganismo en las enfermedades respiratorias de los bovinos en nuestro país, por lo que deberá efectuarse siempre un diagnóstico diferencial rutinario en los estudios bacteriológicos de problemas neumónicos, con el empleo de los medios de cultivo adecuados, además de que se deberán realizar encuestas serológicas a nivel nacional para conocer la prevalencia y distribución de anticuerpos contra **H. somnus**.

#### AGRADECIMIENTOS

Los autores agradecen a la Dra. Martha Merino Moncada del Departamento de Bacteriología, Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia, U. N.A.M., su asesoría técnica. Asimismo se agradece la colaboración del Dr. Francisco J. Trigo Tavera, del Departamento de Patología, de la misma facultad, por los estudios histopatológicos realizados.

#### SUMMARY

A study was conducted to demonstrate the presence of **Haemophilus somnus** in mexican calves with pneumonia. Forty-nine pneumonic lungs from Holstein calves were collected at the slaughter house, using an enriched Chocolate agar. Five isolations (10.2 %) were obtained from the cultured samples. The identification of **H. somnus** was based on morphology of the bacteria, features of the colonies, culture and incubation requirements and the double immunodiffusion test. The histopathological study of those samples where **H. somnus** was isolated, revealed a severe, diffuse suppurative bronchopneumonia.

#### LITERATURA CITADA

AGUILAR R.F., TRIGO T.E., MERINO M.M., JARAMILLO M.L. y SANCHEZ-MEJORADA P.H., 1985. Aislamiento e identificación de **Haemophilus somnus** en México. *Memorias de la Reunión de Investigación Pecuaria en México 1985*. México, D. F., p.58.

ANDREWS J.J., ANDERSON T.F., SLIFE L. N. and STEVENSON G.W., 1985. Microscopic lesions associated with the isolation of **Haemophilus somnus** from pneumonic bovine lungs. *Vet. Path.* 22:131.

BAILIE W.E., ANTOHONY H.D. and WIDE K.D. 1966. Infectious thromboembolic meningoencephalitis (Sleeper syndrome) in fedlot cattle. *J. Am. Vet. Med. Assoc.* 148:162.

CANTO, G.J. and BIBERSTEIN, E.L. 1982. Serological diversity in **Haemophilus somnus**. *J. Clin. Microbiol.* 15:1009.

CHLADEK, D.W., 1975. Bovine abortion associated with **Haemophilus somnus**. *Am. J. Vet. Res.* 36:1041.

CORREA, G.P., BROWN, L.N. y BRYNER, J.H. 1975. Presencia de anticuerpos contra Rinotraqueitis infecciosa, Diarrea viral bovina, Parainfluenza 3, Brucelosis, Leptospirosis, VI-

- briosis y **Haemophilus somnus** en sueros de bovinos con problemas patológicos reproductores y respiratorios. **Téc. Pec. Méx.** 29:26.
- CULLING, C. 1974. Handbook of histopathological and histochemical techniques. 3rd. ed. Butterworths. London, England.
- FORRAY, A., VARGA, J., AMTSBERG, G., FODOR, L. and SZAZADOS, I. 1984. Isolation of **Haemophilus somnus** from calves. **Magyar Allatorvosok lapja.** 39:209.
- GARCIA-DELGADO, A.G., LITTLE, B.P. and BARNUM, A.D., 1977. A comparison of various **Haemophilus somnus** strains. **Can. J. Comp. Med.** 41:380.
- GOSSLING, J., 1966. The bacteria isolated from lesions of embolic meningoencephalitis of cattle. **Illinois Vet.** 9:14.
- GRINER, L.A., JENSEN, R. and BROWN, W.W. 1956. Infectious embolic meningo-encephalitis in cattle. **J. Am. Vet. Med. Ass.** 129:417.
- HAZLETT, M.J., LITTLE, P.B. and BARNUM, D.A. 1983. Experimental production of mastitis with **Haemophilus somnus** in the lactating bovine mammary gland. **Can. Vet. J.** 24:135.
- HUMPHREY, J. D. LITTLE, P.B., STEPHENS, L.R. BARNUM, D.A. DOIG, P.A. and THORSEN, J., 1982a. Prevalence and distribution of **Haemophilus somnus** in the male bovine reproductive tract. **Am. J. Vet. Res.** 43:791.
- HUMPHREY, J. D., LITTLE, P.B., BARNUM, D.A., DOIG, P.A., STEPHENS, L.R. and THORSEN, J., 1982b. Occurrence of **Haemophilus somnus** in bovine semen and in the prepuce of bulls and steers. **Can. J. Comp. Med.** 46:215.
- HUMPHREY, J.D. and STEPHENS, L.R., 1983. **Haemophilus somnus**: A. Review. **Vet. Bulletin**, 53:987.
- JANZEN, E.D., CATES, W.F., BARTH, A., NECHALA, L., PAWLYSHYN, V., SAUNDERS, J. R. and OSBORNE, A.D., 1981. Prevalence of **Haemophilus somnus** in the semen of bulls in Saskatchewan. **Can. Vet. J.** 22:361.
- KENNEDY, P.C., BIBERSTEIN, E.L., OWARTH J.A., FRAZIER, L.M. and DUNGWORTH, D.L., 1960. Infections meningo-encephalitis in cattle, caused by **Haemophilus like organism**. **Am. J. Vet. Res.** 21:403.
- KROGH, H.V., PADERSEN, K.B. and BLOM, E., 1983. **Haemophilus somnus** in semen from Danish bulls. **Vet. Rec.** 112:460.
- LAMONT, M. H. and HUNT, B.W., 1982. **Haemophilus somnus** and conjunctivitis **Vet. Rec.** 111:21.
- METZ, A.L., HAGGARD, D.L. and HAKAMARI, B.S., 1984. Chronic suppurative orchiepididymitis associated with **Haemophilus somnus** in a calf. **J. Am. Vet. Med. Assoc.** 84:1507.
- MILLER, R.B., VAN CAMP, S.D. and BARNUM, D.A. 1983. The effects of intra-amniotic inoculation of **Haemophilus somnus** on the bovine fetus and dam. **Vet. Path.** 20:574.
- MOLEND, J. and KOZYRCZAK, J., 1980. **Haemophilus somnus** as a etiological agent of pneumonia in calves. **Medycyna Wet.** 36:209.
- OLANDER, H.J., GALLINA, A.M., BECKWITH, D. and MORROW, M. 1970. Observations on thromboembolic meningoencephalitis (TEME) in cattle in Indiana feedlots. **Proc. U.S. Anim. Hlth. Ass.** 74:589.
- PANCIERA, R.J., DAHLGREN, R.R. and RIENKER, H.B., 1968. Observations on septicemia of cattle caused by **Haemophilus like organism** **Path. Vet.** 5:212.
- PRITCHARD, D.G. and MACLEOD, M.S.M., 1977. The isolation of **Haemophilus somnus** following sudden deaths in suckler calves in Scotland. **Vet. Rec.** 100:126.
- SAUNDERS, J.R., THIESSEN, W.A. and JANSEN, L.D., 1980. **Haemophilus somnus** infections. I. A ten year (1969-1979) retrospective study of losses in cattle herds in Western Canada. **Can. Vet. J.** 21:119.
- SHIGIDI, M.A. and HOERLEIN, A.B., 1970. Characterization of the **Haemophilus-like organism** of infectious thromboembolic meningoencephalitis of cattle. **Am. J. Vet. Res.** 31:1017.
- SIMONSON, R.R. and MAHESWARAN, S.K. 1982. Host humoral factors in natural resistance to **Haemophilus somnus**. **Am. J. Vet. Res.** 43:1160.
- STEPHENS, L.R., LITTLE, P.B., WILKIE, B.N. and BARNUM, D. A., 1981. Humoral immunity in experimental thromboembolic meningoencephalitis in cattle caused by **Haemophilus somnus**. **Am. J. Vet. Res.** 42:468.

TRIGO, T.F., CERVANTES, O.R.A., HERNANDEZ, L.G. y ONTIVEROS, C.L., 1979. Patología y Micología de pulmones normales y neumónicos de bovinos. *Tec. Pec. Méx.* 37:15.

TRIGO, T.E., HERNANDEZ, G., RAMIREZ, C. y BERRUECOS, M., 1982. Patología y Bacteriología de pulmones neumónicos de becerros. *Veterinaria-Mex.* 13:131.

VAN DREUMEL, A. A. and KIERSTEAD, M., 1975. Abortion associated with *Haemophilus somnus* infections in a bovine fetus. *Can. Vet. J.* 16:367.

WALDHALM, D.F., HALL, R.F. MEINERSHAGEN, W.A., CARD, C. S. and FRANK, F.W., 1974. *Haemophilus somnus* infections in the cow as a possible contributing factor to weak calf syndrome: isolation and animal inoculation studies. *Am. J. Vet. Res.* 35:1401.