

184
Lej.

T E S I S

QUE PRESENTA FRANCISCO RUIZ TERAN

PARA OBTENER EL TITULO DE

B I O L O G O

"EVALUACION DE CUATRO DIFERENTES ANTIGENOS DE

Haemophilus somnus, AISLADO EN MEXICO, POR EL

METODO DE ANALISIS INMUNO-ABSORBENTE

LIGADO A ENZIMAS (AISLE)"

FACULTAD DE CIENCIAS

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

México, D. F., julio de 1988.



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas Tesis Digitales Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS © PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis está protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

I N D I C E

	Pág.
INTRODUCCION	1
Generalidades	1
Taxonomía	1
DESCRIPCION DEL MICROORGANISMO	3
Morfología colonial	3
Requerimientos nutricionales	4
Condiciones de crecimiento	4
Características bioquímicas	5
Susceptibilidad a antibióticos	5
PATOLOGIA	6
Distribución geográfica	8
Inmunología	9
OBJETIVOS	10

	P á g .
MATERIAL Y METODOS	10
Obtención y caracterización de cepas Nacionales	11
Antígenos utilizados para la obtención de sueros hiperinmunes	11
a) Antígeno celular	12
b) Antígeno sonificado	12
c) Antígeno hervido	12
d) Antígeno soluble	13
Sueros hiperinmunes	13
Doble inmunodifusión	14
Pruebas de AISLE	14
RESULTADOS	16
CUADRO 1 Cuadro Comparativo de las Pruebas Bioquímicas	17
CUADROS 2, 3, 4 y 5	
Lecturas de Densidad Optica de - Pruebas de AISLE para <u>Haemophilus</u>	18
CUADROS 6 y 7	
Promedio de Densidades Opticas resultantes de la Prueba de AISLE - para <u>Pasteurellas</u>	23
DISCUSION Y CONCLUSIONES	26
BIBLIOGRAFIA	28

INTRODUCCION

Generalidades

Haemophilus somnus es una bacteria Gram-negativa, con forma de cocobacilo pequeño, que se encuentra distribuída ampliamente por todo el mundo. Es el agente etiológico de la Meningoencefalitis tromboembólica de los bovinos (METE), una enfermedad del Sistema Nervioso Central, habitualmente de consecuencias fatales (36,50), asociándosele también con casos de Neumonía en bovinos (32,55) y se le encuentra como comensal en el prepucio de estos animales (30,32).

En México se le ha aislado a partir de pulmones neumónicos (1) y de prepucio (2). No se conoce su distribución en el país, por lo cual resultan importantes los estudios epidemiológicos e inmunológicos para facilitar la prevención de los cuadros clínicos y, en consecuencia, evitar pérdidas económicas.

Taxonomía :

En 1960, Kenedy et al., aislaron bacterias de un caso de METE, e hicieron una descripción del organismo, relacionándolo al género Haemophilus (35). Siguieron nuevos aislamientos en 1965 y 1968 (16,48). En 1966, Bailie publica una descripción del microorganismo (7) y en 1969, en base al contenido de ADN, factores necesarios de crecimiento y el fenómeno de satelitismo, propone el nombre de Haemophilus somnus (6).

En 1973, Bailie reconoce que la inclusión de H.somnus en el género de Haemophilus es inconsistente, si se toman en cuenta las características establecidas por el Subcomité de Taxonomía (56) para definir el género Haemophilus, en el aspecto - que H. somnus no requiere de los factores V y/o X para su crecimiento (8). En 1981-1983, se deja firmemente asentado lo anterior (9,10,58).

Utilizando criterios morfológicos, fisiológicos y genéticos, se ha tratado de agrupar a los géneros Actinobacillus, Haemophilus y Pasteurella dentro de una familia AHP, incluyendo H. somnus dentro del grupo; sin embargo, hasta la fecha la situación sigue sin definición (10).

De la misma manera, los trabajos de hibridación de ADN han mostrado una relación tan estrecha entre H. somnus, Haemophilus agni e Histophilus ovis, que puede pensarse que realmente son la misma especie; mientras que se descarta cualquier relación con Actinobacillus seminiis y Haemophilus influenza (66). De esta manera, de acuerdo a los Subcomités de Taxonomía, H. somnus no tiene validez; sin embargo, se sigue utilizando para describir los organismos típicos aislados de casos de METE, neumonías de bovinos y los aislados del tracto genitourinario de los mismos (9).

DESCRIPCION DEL MICROORGANISMO

Haemophilus somnus es una bacteria pequeña, en forma de cocobacilo, altamente pleomórfico; se agrupa en cadenas cortas filamentosas, es inmóvil, no forma esporas ni tiene pilis, y el grado de pleomorfismo disminuye de acuerdo a las resiembrazas que se realicen (24,36,50). Aunque se ha reportado que la cepa 8025 tiene cápsula (44,68), realmente los estudios realizados con microscopía electrónica, utilizando el colorante rojo de rutenio, han demostrado la falta de cápsula y de pilis, lo cual se ha encontrado también en los estudios de microscopía electrónica - de Scanning en bacterias adheridas a células endoteliales en cultivo de tejidos - (60,64). Los estudios de ultraestructura, han demostrado también, que la cubierta celular es igual que la de otras bacterias Gram-negativas (3,6,60) y la descripción de diversos fenotipos antigénicos y bioquímicos, sugiere la existencia de todo un espectro de microorganismos relacionados genéticamente, que deben ser considerados bajo la misma denominación (13,18).

Morfología colonial.

Se han reportado diferencias en la morfología colonial y así se tiene que se han descrito colonias translúcidas, pequeñas y grandes, opacas, húmedas, mucoides, intermedias y rugosas (18,47,48).

Las colonias típicas son amarillentas, el pigmento soluble en agua, con una absorción característica a longitudes de onda de 430 a 435 nm (61,65).

Requerimientos nutricionales.

H. somnus, crece bien en infusión ó agar cerebro corazón (BHI) suplementados con 10% de suero bovino y 0.5% de extracto de levadura (24,26), agar cistina corazón con 10% de sangre de bovino y 0.5% de extracto de levadura y 10% de suero de caballo (58).

Aunque inicialmente fue descrito un factor de crecimiento presente en los tejidos animales ó extractos bacterianos, indiferenciable del factor de crecimiento X, la demostración que H. somnus es capaz de sintetizar porfirinas a partir de ácido levulónico, establece la independencia de la bacteria de los factores V y X (9,67, - 61). El monofosfato de tiamina, así como el pirofosfato, mejoran el crecimiento; sin embargo, el clorhidrato de tiamina, no; esta dependencia de cocarboxilasa se ha demostrado tanto por mediciones turbidimétricas (6), como por el método de difusión en disco (61). Se han descrito otros factores de crecimiento, utilizando diferentes métodos para medir el crecimiento de la bacteria; entre dichos factores se encuentra cistina ó cisteína, ácido aspártico, almidón soluble, etc. (4,43,60); sin embargo, el crecimiento de H. somnus es demasiado complejo a la fecha, dado que se han descrito también, cepas que crecen adecuadamente desde su aislamiento, utilizando agar triptosa no suplementado (13).

Condiciones de crecimiento.

El crecimiento óptimo de H. somnus se logra en una atmósfera con 10% de CO₂ (24), y hay reportes de diferencias pequeñas en el crecimiento, bajo atmósferas con 5, 10 y 20% de CO₂. También existen reportes en los cuales se ha logrado el crecimiento de la bacteria en aerobiosis, después de haberla mantenido en incubación bajo CO₂ durante varias semanas (13,36,39,65).

La bacteria crece óptimamente a temperaturas de 37C, incubando durante 24 a - 48 horas (24); se ha observado crecimiento moderado a 30 y 43C, pero no a temperaturas más altas ó bajas (58). A -70C en yema de huevo, la bacteria se recuperó después de 8 años (24,67).

El pH óptimo para el desarrollo de H. somnus es de 7.8 (58).

Características bioquímicas.

Existen variaciones entre los resultados de las pruebas bioquímicas realizadas: la producción de catalasa, ureasa, dehidrolasa de arginina y licuefacción de gelatina son negativas (6,9,26,36,58), aunque hay reportes diferentes (9,18); asimismo, la prueba de la citocromo oxidasa ha sido reportada como positiva (6,9,24,58), y negativa (50) ó variable (18). La utilización de citrato, descarboxilación de ornitina, lisina y malonato, se reportan como negativas (6,9,24,26,58). Voges-Proskauer es negativa (6,24,58), así como el crecimiento en Agar MacConkey (60). Todas las cepas fermentan glucosa, más del 75% de las cepas aisladas fermentan maltosa, fructosa, xilosa, manosa, levulosa y trehalosa. La mayoría de las cepas fermentan sorbitol y manitol (7,9,18,24,26).

Susceptibilidad a antibióticos.

H. somnus es susceptible a muchos agentes antimicrobianos, los estudios in vitro indican que es susceptible a concentraciones mínimas de penicilina G, ampicilina, colistina y novobiocina, pero se ha reportado resistente a clortetraciclina, lincomicina, neomicina, oxacilina, espiromicina, polimiixina y bacitracina (6,24,36,65).

PATOLOGIA

La lesión característica en METE, es una necrosis multifocal hemorrágica, con diámetro aproximado de 4 cm. En la lesión se observan vasos trombosados, infarto blando con centros aplanados, que con frecuencia se extiende hasta las meninges (7). Las lesiones pueden estar acompañadas de exudados fibrino-purulentos, hemorragia subependimal. En otras ocasiones, se presentan hemorragias focales, formando coágulos y, ocasionalmente, meningitis fibrinopurulenta (48). Estas lesiones se pueden encontrar en médula espinal. Histológicamente, la lesión se caracteriza por una infiltración celular aguda, con gran cantidad de neutrófilos que se encuentra asociada a vasculitis, trombosis, hemorragia y necrosis.

En otros tejidos, como en el sistema óptico, corazón, riñón, vejiga urinaria y músculo esquelético, se presentan lesiones de trombosis, vasculitis e infarto séptico (7,12,16,23,27,35,37,47,53,57,67). Se conocen casos de pericarditis, hidropericarditis, cistitis, poliartritis y sinovitis fibrinopurulentas, linfadenitis, enteritis hemorrágica, perihepatitis, peritonitis y poliserositis (7,12,27,35,47,48,57).

Frecuentemente se han reportado lesiones del tracto respiratorio superior, acompañando a METE : habitualmente se presenta rinitis, sinusitis frontal purulenta, faringitis, laringitis necrosante ó ulcerativa, tromboflebitis en laringitis fibrinonecrótica, traqueitis, hemorragia traqueal y traqueitis fibrinonecrótica, (12, 16, 22, 27, 47, 48, 67). En pulmones se ha descrito neumonía embólica moderada, caracterizada histológicamente por vasculitis, trombosis con daño mínimo al epitelio pulmonar; ocasionalmente, se encuentran lesiones severas, como bronconeumonía exudativa severa, descrita inicialmente por Roberts et al. (51), neumonitis en terneros, caracterizada por consolidaciones de dos terceras partes de los

pulmones, neumonía fibrinohemorrágica, muy parecida a la provocada por Pasteur
ella haemolftica (7,22,27,63,67). Las lesiones neumónicas pueden ó no estar aso-
ciadas a METE y, en ocasiones, acompañadas por lesiones difusas, como pleuro--
neumonía fibrinosa aguda, pericarditis y peritonitis. Las lesiones histológicas se
caracterizan por sedimentación de fibrina alveolar e infiltración leucocítica alveo-
lar y bronquiolar intensa (22,53,56).

Existen pocos datos relacionando H. somnus con patologías reproductivas, se han -
reportado abortos donde se ha encontrado necrosis cotiledonea, hemorragia de pla-
centa, necrosis focal del epitelio coriónico, encontrando en el feto necrosis vascu-
lar, trombosis y leucocitosis en cerebro, pulmón, miocardio y riñón. Inoculaciones
intracervicales producen aborto, lesiones de la membrana fetal y metritis necroti-
zante severa (17,66).

Inoculaciones intracisternales de 600 UFC de H. somnus, se ha demostrado la exis
tencia de cepas distintas antigénicamente con virulencia y morfología distinta, al-
gunas de estas cepas causan meningitis fatales, mientras que otras causan menin-
gitis clínicamente leves con recuperación (13,30,31,47,59,60,68).

Dentro de los mecanismos de patogenia de H. somnus, se piensa que lesiona el en
dotelio vascular con la formación de trombos y hemorragia, las lesiones histológi-
cas se caracterizan, entonces, por un proceso inflamatorio agudo, con una respues-
ta celular casi completamente compuesta de neutrofilos (7,36,37,50). En estudios
in vitro, cultivos de células endoteliales de bovino muestran adherencia bacteriana,
penetración celular, contracción citoplasmática y necrosis. Por tales datos se ha-
pensado que la bacteria posee adhesinas específicas al epitelio respiratorio y que -
las lesiones se deben a la producción de una endotoxina que provoca la lesión pri-

maria del endotelio y activación de los mecanismos de coagulación (29,31,46,47, - 64).

Distribución geográfica.

METE se reportó por primera vez en Colorado, E.U.A.; posteriormente se ha reportado en otras regiones de Estados Unidos, en Alemania, Italia, Inglaterra, Suiza, - Rumania, Polonia, Canadá, etc. (6,7,12,16,35,47,48,67). En México se han hecho aislamientos del prepucio de bovinos clínicamente normales, así como de pulmones neumónicos (1,2).

Aunque inicialmente se consideró una enfermedad de hatos vacunos, también afecta animales de granja, así como ganado de pastoreo (35,48,52,53,57).

La enfermedad se presenta preferencialmente en los meses de invierno, pero se han presentado brotes en períodos de lluvias y calor moderados; se asocia, frecuentemente, con el transporte del ganado, presentándose la epidemia (35,37,47,48,52, 53,57). La edad del ganado donde se presenta con mayor frecuencia, es entre los 7 y 9 meses de edad (53).

H. somnus se ha considerado como parte de la flora transitoria del tracto respiratorio del ganado bovino y que se ha aislado de cavidad nasal y tráquea del ganado clínicamente sano. La presencia de la bacteria en cavidad nasal de terneras se consideró como evidencia de infección temprana de hatos vaca-terneros lactantes (12,18,19,20,28,32,52).

Existe una incidencia muy alta de *H. somnus* en el tracto reproductivo de bovinos machos, donde se ha aislado de prepucio, semen, vejiga y glándulas sexuales accesorias de animales clínicamente normales (18,20,30). También se ha aislado del --

tracto genital de hembras, encontrándose en el moco cervical en el período postparto en vacas asintomáticas (30,65).

La presencia de la bacteria en el tracto genital, permite suponer la transmisión venérea de la enfermedad, aunque la excreción urinaria permite la diseminación ambiental con la posibilidad de inhalación e ingestión (12,52,60,68).

Clínicamente, la enfermedad se presenta en brotes epidémicos, caracterizados por muerte súbita ó animales moribundos. En estadios tempranos, se presenta rigidez de extremidades, dificultad de movimiento, temperaturas de 42C, engrosamiento de las patas, debilidad y paresias; existe un estadio agudo caracterizado por aumento en la frecuencia respiratoria, fiebre y rigidez, y un cuadro subagudo ó síndrome crónico, con rigidez e invalidez (7,27,48).

Inmunología.

Las diferencias en las colonias de H. somnus, se reflejan, también, en diferencias antigénicas; las colonias lisas poseen antígenos protéicos con pesos moleculares de 11,14 y 16,000 daltones; las cepas rugosas tienen antígenos de 11, 12 y 13,800 daltones, encontrándose antígenos compartidos con pesos de 25, 36 y 53,000 daltones. Por reacciones de aglutinación, previa absorción de cepas Americanas y Suizas, se encontró un antígeno A (Americano), un antígeno S (Suizo) y un antígeno C (común) (13,18,21,24,52,58).

En Norteamérica, el ganado clínicamente normal tiene anticuerpos contra H. somnus. Por pruebas de aglutinación se encontró que el 24% de la población muestreada tiene anticuerpos con títulos de 1:25 ó mayores; en Canadá, en cambio, se encontró que el 91% de la población tiene anticuerpos con títulos de 1:4 ó mayores.

Con la prueba de fijación de complemento, se encontraron anticuerpos en el 23% de la población examinada, con títulos de 1:8 ó mayores y, en Canadá, por medio de esta prueba, el 56.5% de la población presenta anticuerpos. Se piensa que la presencia de anticuerpos se deba a la presencia de la bacteria en el tracto genitourinario y en vías respiratorias altas (21,29,31,52,60).

OBJETIVOS

Aislamiento y caracterización de cepas de Haemophilus somnus de toros clínicamente sanos.

Desarrollo de una prueba de Análisis Inmunoabsorbente Ligado a Enzimas AISLE, que permita diferenciar antígenos de H. somnus, de antígenos de Pasteurella haemolítica A1 y Pasteurella multocida A.

MATERIAL Y METODOS

Obtención y Caracterización de Cepas Nacionales.

Se realizaron lavados del prepucio de cinco toros Holstein, mantenidos en el Instituto Nacional de Investigaciones Forestales y Agropecuarias, Palo Alto, México.

El lavado se llevó a cabo con solución salina isotónica estéril, utilizando una jeringa de 20 ml. sin aguja. Una vez hecho el lavado, la solución fue transportada en la misma jeringa hasta el laboratorio, donde se sembró por medio de la técnica de estrías en agar chocolate preparado con una base de agar Cistina corazón, 0.5% de extracto de levadura, 10% de suero de equino y 10% de sangre desfibrinada de bovino (1,2). Las cajas fueron incubadas en velobiosis a 37C durante 24 horas.

Se tomaron las colonias que presentaron un crecimiento circular convexo, húmedo, brillante, de consistencia mantequillosa, con pigmentación amarilla y diámetro -- aproximado de 1 a 2 mm.

De dichas colonias se hicieron frotis para estudiar sus características morfológicas y tintoreales, realizando una tinción de Gram.

Una vez aisladas las colonias sospechosas, se resembraron en medios de cultivo especiales, al igual que se hizo con la cepa de referencia 2336 para analizar sus -- características bioquímicas.

Antígenos utilizados para la obtención de sueros hiperinmunes.

Las cepas de P. haemolítica A1, la de P. multocida grupo A, la cepa de referencia de H. somnus y las cepas aisladas de los toros (vide supra), fueron sembradas en cajas de Petri con agar chocolate suplementado; se incubaron en condiciones -

de velobiosis a 37 C durante 48 horas. Se recogieron las cepas en solución salina fisiológica estéril; se hicieron tres lavados con la misma solución, centrifugando a 4000 xg a 4 C durante 30 minutos en una centrífuga refrigerada Beckman, Modelo J-6B. El paquete celular se resuspendió en solución salina con 0.5% de formaldehído pH 8.0 y se ajustó la concentración de bacterias a una densidad óptica de 0.39, utilizando una longitud de onda de 550 nm en un espectrofotómetro Bausch and Lomb, Modelo Spectronic 20.

Las cepas de H. somnus aisladas de los toros y la de referencia 2336, fueron crecidas a 37 C, durante 24 horas, en agar chocolate suplementado; después, las cepas fueron cosechadas en solución salina isotónica y sonicadas durante 20 minutos a 30 u en un sonicador MSE Modelo 10/74-MK2.

- a) **Antígeno celular** : Las bacterias se crecieron en agar chocolate en las condiciones descritas previamente durante 48 horas. Después de cosechadas y lavadas las bacterias resuspendidas en solución salina isotónica pH 8.0, se calentaron en baño María, a 60 C, durante 90 minutos. Se centrifugaron a 800 xg durante 15 minutos, en una centrífuga Optima II BHG 720 y se resuspendieron ajustando la concentración celular, de acuerdo a lo descrito previamente.
- b) **Antígeno sonicado** : El antígeno celular se colocó en tubos de ensaye, los que a su vez fueron colocados en un vaso de precipitado con hielo; se sonicaron durante 20 minutos y centrifugaron a 4000 xg durante 15 minutos; el sobrenadante constituyó el antígeno.
- c) **Antígeno hervido** : El antígeno celular se colocó en tubos de ensayo y fue sometido a ebullición durante 60 minutos; se centrifugó y el sobrenadante se almacenó a 4 C.

d) **Antígeno soluble** : Las bacterias de H. somnus fueron crecidas en agar chocolate suplementado, y las cepas de Pasteurella se crecieron en gelosa sangre. Se cosecharon en solución salina isotónica estéril y se ajustaron a concentración de 4.0, usando una longitud de onda de 550; la suspensión se almacenó durante 24 horas a 4 C; posteriormente, se centrifugó a 8,000 xg durante 15 minutos y el sobrenadante utilizado como antígeno se almacenó a -20 C, hasta su utilización.

Sueros hiperinmunes.

Con cada una de las cepas obtenidas, de acuerdo a lo descrito previamente, se inocularon dos conejos sanos de 2 meses de edad, utilizando el protocolo descrito por Edwards and Ewin. Brevemente : los conejos se sangraron previamente a la inoculación, el suero se conservó a -20 C hasta su utilización. Posteriormente, se inocularon con 0.5, 1.0, 2.0 y 3.0 en tres ocasiones. La primera inoculación se hizo por vía subcutánea y las siguientes, con intervalos de dos días, se hicieron por vía intravenosa. Cuatro días después de la última inoculación, se hizo una sangría de prueba, probándose los sueros por la técnica de aglutinación, considerándose como positivas cuando se encontraron títulos de 1:1000 ó mayores. Al día siguiente, se realizó sangría a blanco por punción cardíaca, almacenándose el suero a -70 C, hasta su utilización.

Con la cepa de referencia, se inoculó un becerro Holstein, de acuerdo a la técnica descrita por Aguilar et al, tomado de Simonson y Maheswaran (2).

Doble inmunodifusión.

Se preparó Agar noble al 1 %, en solución salina isotónica con 0.1% de azida de sodio. Se prepararon las placas y se hicieron 6 perforaciones simétricas alrededor de un pozo central. En el pozo central se colocó 10 ul del suero de bovino inmunizado con la cepa de referencia y en los pozos del rededor se colocaron 10 ul de los antígenos sonicados de la cepa de referencia y las cepas aisladas de los toros.

Prueba de AISLE.

Se adaptó la técnica descrita por Saunders (15). Brevemente, en placas de polivinil (Falcon, Beckton Dickenson, Oxnard Cal, USA); diluciones 1:5, 1:50, 1:100, de los antígenos, hechas en amortiguador de carbonatos 0.1 M pH 9.6, se incubaron 100 ul por pozo durante toda la noche a 4 C. Las incubaciones se hicieron por duplicado. Posteriormente, los pozos fueron lavados 3 veces con solución salina isotónica amortiguada con fosfatos 7 0.05% de tween 20 pH 7.4 (PBSt).

Las placas fueron incubadas durante 15 min. a 37 C, con 100 ul por pozo de una solución de leche descremada "Sveltes" (Nestlé), con la finalidad de bloquear -- los espacios libres. Posteriormente, se lavó nuevamente con PBSt en tres ocasiones.

Los sueros de los conejos se diluyeron 1:10 y 1:50 con PBSt y 100 ul de cada - dilución por pozo, fueron incubados durante 15 min. a 37 C. Se volvió a lavar con PBSt por tres ocasiones y, posteriormente, se colocaron 100 ul por pozo, de una dilución 1:500 de IgG de bovino anti IgG de conejo conjugada con peroxidasa (Cappell Lab. Conchanville Pa. USA.); se incubó durante 15 min. a 37 C para lavar nuevamente con PBSt.

Finalmente, 100 ul por pozo de O-fenilendiamina a concentración de 40 mM y activados con 40 ul de peróxido de hidrógeno al 30%, fueron incubados a 37 C durante 10 minutos. La reacción se paró, añadiendo 100 ul por pozo, de ácido fluorhídrico al 0.1 M. pH 3.3

Las lecturas se hicieron en un lector para placas (Fisher ELISA Reader), con un filtro de 405 nm.

Se consideraron positivos y negativos los que, de acuerdo a las lecturas obtenidas, se limitan a partir de dos desviaciones estandar de las medias de los controles, según lo reportado por Canto et al. en 1983 (14).

RESULTADOS

De dos de los cinco toros a los cuales se les practicó lavado de prepucio, se logró el aislamiento de bacterias con forma de cocobacilos Gram-negativos, pleomórficos, las cuales se desarrollaron en las placas de agar chocolate suplementado cuando se incubaron en presencia de CO₂. Las colonias aisladas de esta manera, de consistencia mantequillosa y color amarillo, al igual que la cepa de referencia 2336, no crecieron cuando se incubaron en agar chocolate suplementado en ausencia de CO₂ ni cuando se sembraron en agar MacConkey. Presentaron una reacción positiva de oxidasa de citocromo, fermentaron la glucosa, redujeron los nitratos, no produjeron catalasa, no crecieron en Voges-Proskauer, el rojo de metilo fue negativo al igual que citratos y escualina (Cuadro 1).

En la prueba de inmunodifusión, utilizando el antígeno obtenido al sonicar las bacterias y el suero de bovino inmunizado con la cepa de referencia 2336, se encontraron bandas de identidad, por lo cual las cepas aisladas se consideraron como H. somnus y fueron identificadas como cepa A y cepa B; no se observaron líneas de precipitación en los sitios a donde se colocaron los antígenos de Pasteurellas.

En los Cuadros 2, 3, 4, 5, 6 y 7 se observan los resultados obtenidos al realizar la prueba de AISLE, utilizando los antígenos descritos y los sueros de los conejos inmunizados con los antígenos correspondientes.

CUADRO COMPARATIVO DE LAS PRUEBAS BIOQUIMICAS UTILIZADAS EN LA IDENTIFICACION DE LAS CEPAS A y B DE H.somnus; EN DONDE SE MUESTRAN LAS SEMEJANZAS CON LA CEPA DE REFERENCIA.

<u>Pruebas Bioquímicas</u>	<u>H. somn. A</u>	<u>H. somn. B</u>	<u>H. somn.2336</u>
Indol	+	+	+
Oxidasa	+	+	+
Voges-Proskauer	-	-	-
Red.Nitratos	+	+	+
Catalasa	-	-	-
Rojo de Metilo	-	-	-
Citrato	-	-	-
Escualina	-	-	-
Fermentación de Glucosa	+	+	+
Crec. en A. Choc. en O ₂	-	-	-
Crec. Agar MacConkey	-	-	-

CUADROS 2, 3, 4 y 5

Media de las lecturas de densidad óptica, en la prueba de AISLE, utilizando antígenos soluble, celular, sonificado y hervido en las diluciones 1:10, 1:50, contra suero hiperinmune de conejo a 3 diluciones distintas (1:5, 1:50, 1:100), con cada una de las bacterias señaladas (columna 1).

Cociente de las densidades ópticas y el suero control de conejo. Se consideraron positivos los cocientes mayores de 2 (columna 2).

ANTIGENO SOLUBLE DILUIDO 1:10

	SUERO 1:5		SUERO 1:50		SUERO 1:100	
	D.O \bar{x}	D.O. \bar{x}/N	D.O \bar{x}	D.O. \bar{x}/N	D.O \bar{x}	D.O. \bar{x}/N
<u>H. somn.</u> 2336	0.424	3.07	0.326	4.59	0.316	4.57
<u>H. somn.</u> A	0.476	3.44	0.402	5.66	0.440	6.37
<u>H. somn.</u> B	0.425	3.07	0.317	4.46	0.185	2.68
<u>P. mult.</u> A	0.306	2.21	0.128	1.80	0.146	2.11
<u>P. haem.</u> A1	0.171	1.23	0.098	1.38	0.088	1.27
Normal	0.138		0.071		0.069	

DILUIDO 1:50

	SUERO 1:5		SUERO 1:50		SUERO 1:100	
	D.O \bar{x}	D.O. \bar{x}/N	D.O \bar{x}	D.O. \bar{x}/N	D.O \bar{x}	D.O. \bar{x}/N
<u>H. somn.</u> 2336	0.301	3.58	0.278	6.46	0.278	5.14
<u>H. somn.</u> A	0.565	6.72	0.567	13.18	0.500	9.25
<u>H. somn.</u> B	0.336	4.0	0.301	7.0	0.290	5.37
<u>P. mult.</u> A	0.169	2.01	0.142	3.3	0.141	2.61
<u>P. haem.</u> A1	0.181	2.15	0.085	1.97	0.070	1.29
Normal	0.084		0.043		0.054	

ANTIGENO CELULAR DILUIDO 1:10

	SUERO 1:5		SUERO 1:50		SUERO 1:100	
	D.O \bar{x}	D.O. \bar{x} /N	D.O \bar{x}	D.O. \bar{x} /N	D.O \bar{x}	D.O. \bar{x} /N
<u>H. somn.</u> 2336	0.214	1.82	0.197	1.89	0.119	1.11
<u>H. somn.</u> A	0.405	3.46	0.411	3.95	0.319	2.98
<u>H. somn.</u> B	0.235	2.0	0.144	1.38	0.154	1.43
<u>P. mult.</u> A	0.217	1.85	0.185	1.77	0.165	1.54
<u>P. haem.</u> A1	0.139	1.18	0.158	1.51	0.143	1.33
Normal	0.117		0.104		0.107	

ANTIGENO 1:50

	SUERO 1:5		SUERO 1:50		SUERO 1:100	
	D.O \bar{x}	D.O. \bar{x} /N	D.O \bar{x}	D.O. \bar{x} /N	D.O \bar{x}	D.O. \bar{x} /N
<u>H. somn.</u> 2336	0.199	1.93	0.194	2.04	0.190	1.93
<u>H. somn.</u> A	0.450	4.36	0.439	4.62	0.305	3.11
<u>H. somn.</u> B	0.226	2.19	0.141	1.48	0.142	1.44
<u>P. mult.</u> A	0.163	1.58	0.129	1.35	0.125	1.27
<u>P. haem.</u> A1	0.167	1.62	0.135	1.42	0.133	1.35
Normal	0.103		0.095		0.098	

ANTIGENO SONICADO DILUIDO 1:10

	SUERO 1:5		SUERO 1:50		SUERO 1:100	
	D.O \bar{x}	D.O. \bar{x}/N	D.O \bar{x}	D.O. \bar{x}/N	D.O \bar{x}	D.O. \bar{x}/N
<u>H. somn.</u> 2336	0.217	1.85	0.113	0.96	0.073	0.68
<u>H. somn.</u> A	0.436	3.72	0.460	3.93	0.389	3.66
<u>H. somn.</u> B	0.258	2.20	0.164	1.40	0.166	1.56
<u>P. mult.</u> A	0.237	2.02	0.192	1.64	0.173	1.63
<u>P. haem.</u> A1	0.188	1.60	0.129	1.10	0.130	1.22
Normal	0.117		0.117		0.106	

ANTIGENO 1:50

	SUERO 1:5		SUERO 1:50		SUERO 1:100	
	D.O \bar{x}	D.O. \bar{x}/N	D.O \bar{x}	D.O. \bar{x}/N	D.O \bar{x}	D.O. \bar{x}/N
<u>H. somn.</u> 2336	0.215	2.10	0.101	1.13	0.068	0.97
<u>H. somn.</u> A	0.471	4.6	0.472	5.30	0.452	6.45
<u>H. somn.</u> B	0.237	2.32	0.138	1.55	0.112	1.6
<u>P. mult.</u> A	0.188	1.84	0.138	1.55	0.111	1.58
<u>P. haem.</u> A1	0.188	1.84	0.121	1.35	0.134	1.91
Normal	0.102		0.089		0.070	

ANTIGENO HERVIDO DILUIDO 1:10

	SUERO 1:5		SUERO 1:50		SUERO 1:100	
	D.O \bar{x}	D.O. \bar{x} /N	D.O \bar{x}	D.O. \bar{x} /N	D.O \bar{x}	D.O. \bar{x} /N
<u>H. somn.</u> 2336	0.189	1.42	0.122	0.84	0.100	0.95
<u>H. somn.</u> A	0.396	2.97	0.389	2.70	0.468	4.45
<u>H. somn.</u> B	0.213	1.60	0.159	1.10	0.127	1.2
<u>P. mult.</u> A	0.210	1.57	0.202	1.40	0.117	1.11
<u>P. haem.</u> A1	0.186	1.39	0.165	1.14	0.118	1.12
Normal	0.133		0.144		0.105	

ANTIGENO 1:50

	SUERO 1:5		SUERO 1:50		SUERO 1:100	
	D.O \bar{x}	D.O. \bar{x} /N	D.O \bar{x}	D.O. \bar{x} /N	D.O \bar{x}	D.O. \bar{x} /N
<u>H. somn.</u> 2336	0.156	1.69	0.113	1.56	0.077	0.73
<u>H. somn.</u> A	0.452	4.91	0.456	6.33	0.399	3.8
<u>H. somn.</u> B	0.147	1.59	0.134	1.86	0.127	1.2
<u>P. mult.</u> A	0.168	1.82	0.158	2.19	0.147	1.4
<u>P. haem.</u> A1	0.180	1.95	0.152	2.11	0.138	1.31
Normal	0.092		0.072		0.105	

CUADROS 6 y 7

Promedio de las densidades ópticas resultantes de la prueba de AISLE, realizada entre el suero hiperinmune de las bacterias (Dilución 1:5, 1:50), descritas en el Cuadro y 2 diluciones de antígeno (1:10, 1:50) de Pasteurella haemolytica y Pasteurella multocida (primera columna). Cociente del promedio de las densidades ópticas y el suero control de conejo, en donde se muestran las reacciones cruzadas. - Cuando el cociente es mayor de 2, se considera positivo (segunda columna).

Antígeno Diluido 1:10 Pasteurella haemolytica

	Suero 1:5		Suero 1:50	
	D.O \bar{x}	D.O. \bar{x}/N	D.O \bar{x}	D.O. \bar{x}/N
<u>H. somn.</u> 2336	0.165	1.91	0.166	1.48
<u>H. somn.</u> A	0.445	5.17	0.417	3.72
<u>H. somn.</u> B	0.139	1.61	0.130	1.16
<u>P. haem.</u> A	0.230	2.67	0.215	1.91
<u>P. mult.</u>	0.152	1.76	0.191	1.70
Normal :	0.086		0.112	

Antígeno Diluido 1:50 Pasteurella multocida

	Suero 1:5		Suero 1:50	
	D.O \bar{x}	D.O. \bar{x}/N	D.O \bar{x}	D.O. \bar{x}/N
<u>H. somn.</u> 2336	0.148	1.78	0.148	1.52
<u>H. somn.</u> A	0.431	5.19	0.426	4.39
<u>H. somn.</u> B	0.153	1.84	0.142	1.46
<u>P. haem.</u> A	0.225	2.71	0.156	1.60
<u>P. mult.</u> A1	0.154	1.85	0.129	1.32
Normal :	0.083		0.097	

Antígeno Diluido 1:50 Pasteurella multocida

	Suero 1:5		Suero 1:50	
	D.O \bar{x}	D.O. \bar{x}/N	D.O \bar{x}	D.O. \bar{x}/N
<u>H. somn.</u> 2336	0.105	1.38	0.120	2.0
<u>H. somn.</u> A	0.436	5.73	0.425	7.0
<u>H. somn.</u> B	0.116	1.52	0.110	1.83
<u>P. haem.</u> A	0.172	2.26	0.106	1.76
<u>P. mult.</u> A1	0.137	1.80	0.126	2.1
Normal :	0.076		0.060	

Antígeno Diluido 1:50 Pasteurella multocida

	Suero 1:5		Suero 1:50	
	D.O \bar{x}	D.O. \bar{x}/N	D.O \bar{x}	D.O. \bar{x}/N
<u>H. somn.</u> 2336	0.121	1.70	0.107	1.28
<u>H. somn.</u> A	0.421	5.92	0.440	5.30
<u>H. somn.</u> B	0.144	2.02	0.126	1.51
<u>P. haem.</u> A	0.105	1.47	0.110	1.32
<u>P. mult.</u> A1	0.140	1.97	0.126	1.51
Normal :	0.071		0.083	

DISCUSION Y CONCLUSIONES

Para lograr el aislamiento de las bacterias, se tuvieron que inmovilizar por completo los toros, practicar el lavado de prepucio e, inmediatamente, transportar al laboratorio la jeringa con la solución salina para sembrar de inmediato. Se conoce que los hisopos de alginato a 4C pueden conservar H. somnus hasta por 72 horas; asimismo, se ha encontrado que los medios de transporte líquidos ó semisólidos facilitando el crecimiento de la flora contaminante (11). La metodología utilizada en este trabajo, no eliminó este problema y, en las cajas de agar chocolate, se apreció el crecimiento de especies de *Proteus*, *Pseudomonas* y *Estafilococos*, los cuales fueron identificados por morfología colonial, propiedades tintoriales y bioquímicas.

Existen referencias en la literatura, en las cuales se recomienda el uso de lincomicina y ciclohexamida para eliminar el crecimiento de Gram-positivas y hongos, además de adicionar elementos específicos para H. somnus como cistina-cisteína y derivados fosforilados de tiamina (43).

Aunque no se utilizaron todas las pruebas bioquímicas reportadas, se hicieron algunas que se consideraron determinantes para la identificación de la bacteria.

En la doble-inmunodifusión, se encontró que la banda desarrollada en el pozo donde se colocó el antígeno de la cepa A, es más intensa que incluso la desarrollada en el pozo donde se colocó el antígeno de la cepa de referencia, quizá debido a que el antígeno pudiera haber estado en mayor concentración que el de las demás cepas. Sin embargo, es necesario señalar que no hubo bandas en los sitios a donde se colocaron los antígenos de las Pasteurellas.

Por otra parte, la prueba de AISLE demostró que la utilización de antígenos de H. somnus sin purificar, no es adecuada para diferenciar esta bacteria y Pasteurella y, dado que en el país ésta última representa un problema frecuente, este método impide hacer la diferenciación entre los dos problemas; Sin embargo, no se pudieron eliminar las reacciones cruzadas, por lo que es necesario realizar otros estudios para lograr tener una prueba altamente específica y sensible que permita hacer el diagnóstico diferencial de H. somnus con Pasteurellas y otras bacterias identificadas y reportadas previamente.

Por último, se puede concluir que H. somnus existe en México, por lo que se vuelve necesario el contar con una prueba serológica que permita hacer el diagnóstico diferencial y hacer estudios epidemiológicos para plantear medidas tendientes a evitar brotes de la enfermedad.

BIBLIOGRAFIA

1. Aguilar R.F., Trigo, T.E., Jaramillo, M.L., Sánchez-Mejorada H.P. 1986. Aislamiento de Haemophilus somnus a partir de pulmones neumónicos de Bovinos. Tec.Pec.Mex. N°52 Sep. Dic. pp. 58-60.
2. Aguilar, R.F., Trigo, T.L., Merino, M.M., Jaramillo, M.L., Sánchez-Mejorada, P.H. 1985. Aislamiento e identificación de H. somnus en México. Memorias de la Reunión de Investigación Pecuaria en México. México, - D. F. pp. 68-72.
3. Andrews, J.J., Slife, L.N. & Stevenson, G.W. 1981. Microscopic lesions - associated with isolation of Haemophilus somnus from pneumonic bovine lungs. Abst. ann.Meet.Am.Coll.vet.Path. 32 pp. 130-135.
4. Asmussen, M.D. & Baugh, C.L. 1981 a. Isovitalex enrichment for the growth of Haemophilus somnus. Ann.meet.Am.Soc.Microbiol.Abst.1. p.114.
5. Asmussen, M.D. & Baugh, C.L. 1981b. Thiamine pyrophosphate (cocarboxylase) as a growth factor for Haemophilus somnus. J.clin.Microbiol.14. - pp. 178-183.
6. Bailie, W.E. 1969. Characterization of Haemophilus somnus (new species)- a microorganism isolated from infectious thromboembolic meningoencephalomyelitis of cattle. Diss.Abst.30B. p. 2482.
7. Bailie, W.E., Anthony, H.D. & Weide, K.D. 1966. Infectious thromboembolic meningoencephalomyelitis (sleeper syndrome) in feedlot cattle. J.Am.vet.med.Ass.148, pp. 162-166.
8. Bailie, W.E., Coles, E.H. & Weide, K.D. 1973. Deoxyribonucleic acid -- characterization of a microorganism isolated from infectious thromboembolic meningoencephalomyelitis of cattle. Int.J.syst.Bact.23. pp. 231-237.

9. Biberstein, E.L. 1981. Haemophilus somnus and Haemophilus agni. In "Haemophilus, Pasteurella and Actinobacillus" Ed. Academic Press, London, England. pp. 125-132.
10. Biberstein, E.L. & Zinneman, K. 1982. International Committee on Systematic Bacteriology subcommittee on the taxonomy of Haemophilus. Minutes of the meeting, 3 and 4 September 1978. Int.J.syst.Bact.32, pp.244-245.
11. Brewer, R.A., Corbel, M.J., Stuart, F.A. 1985. Development of improved methods for the transport and isolation of Haemophilus somnus.- Res.vet.Sci.39. - pp. 299-306.
12. Brown, L.N., Dillman, R.C. & Dierks, R.E. 1970. The Haemophilus somnus complex. Proc. U.S. Anim. Hlth. Ass.74, pp.94-108.
13. Cantó, G.J. & Biberstein, E.L. 1982. Serological diversity in Haemophilus somnus J.clin.Microbiol.15. pp. 1009-1015.
14. Cantó, G.J., Biberstein, E.L., Schulte, T.A. & Behymer, D. 1983. Cross reactivity of Haemophilus somnus antibody in agglutination and complement fixation test and in the enzyme-linked immunosorbent assay. J.clin.Microbiol.17. pp. 500-506.
15. Cantó, G.J. 1981. Serology of Haemophilus somnus. Thesis. M.S. University of California, Davis.
16. Case, M.T., Raudabaugh, W.G. & Finnell, J.H. 1965. Report of embolic meningoencephalitis in Illinois. Illinois Vet. 8. N°2. pp.31-32.
17. Chladek, D.W. 1975. Bovine abortion associated with Haemophilus somnus. Am. J.vet.Res. 36, pp. 1041-1044.
18. Corboz, L. 1981. Epidemiology of Haemophilus somnus infection in cattle: colonial variants of strain isolated from various sources. In Haemophilus, Pasteurella and Actinobacillus. Ed. Academic Press. London, England. pp.133-142.

19. Corstvet, R.E., Panciera, R.J., Rinker, H.B., Starks, B.D. & Howard, C. 1973. Survey of tracheas of feedlot cattle for Haemophilus somnus and other selected bacteria. J.Am.vet.med.Ass.163, pp. 870-873.
20. Crandell, R.A., Smith, A.R. & Kissil, M. 1977. Colonization and transmission of Haemophilus somnus in cattle. Am.J.vet.Res.38, pp. 1749-1751.
21. Dierks, R.E., Hanna, S. A. & Dillman, R.C. 1973. Epizootiology and pathogenesis of Haemophilus somnus infection. J.Am.vet.med.Ass.163. pp. 866--869.
22. Dillman, R.C. 1972. Laryngitis in feedlot calves and its association with the Haemophilus somnus (somnifer) complex. Proc.U.S.Anim.Hlth.Ass.76. - - pp. 498-501.
23. Dukes, T.W. 1971. The ocular lesions in thromboembolic meningoencephalitis (TEME) of cattle. Can.vet.J.12. pp. 180-182.
24. Garcia-Delgado. G.A., Little, P.B. & Barnum, D.A. 1977. A comparison of - various Haemophilus somnus strains. Can.J.comp.Med.41. pp. 380-388.
25. Garoiu, M., Sandu, I., Istrate N. & Faur, C. 1982. Haemophilus-like bacteria isolated from calves and lambs. Reyta Crest.Animal.32, pp. 50-55.
26. Gossling, J. 1966. The bacteria isolated from lesions of embolic meningoencephalitis in cattle. Illinois Vet. 9. N^o 3. pp. 417-421.
27. Griner, L.A., Jensen, R. & Brown, W.W. 1956. Infectious embolic meningoencephalitis in cattle. J.Am.vet.med.Ass.129. pp. 417-421.
28. Hall, R.F., Williams J.M. & Smith, G.L. 1977. Field evaluation of Haemophilus somnus bacteria. VetMed.small.Anim.Clin. 72. pp. 1368-1370.
29. Humphrey, J.D., Little, P.B., Stephens, L.R., Barnum, D.A., Doig, P.A., & - Thorsens, J. 1982. Prevalence and distribution of Haemophilus somnus in the male bovine reproductive tract. Am.J.vet.Res.43. pp. 791-795.

30. Humphrey, J.D., Little, P.B., Barnum, D.A., Doig, P.A., Stephen L.R. & Thorsen, J. 1982b. Occurrence of Haemophilus somnus in bovine semen and in the prepuce of bulls and steers. Can.J.comp.Med.46. pp. 215-217.
31. Humphrey, J.D., Stephens, L.R.1983. Haemophilus somnus: A Review Vet.bull. vol.53 Nº. 11.
32. Janzen, E.D., Cates, W.F., Barth, A., Nechala, L., Pawlyshyn, V., Saunders J.R. & Osborne, A.D. 1981. Prevalence of Haemophilus somnus in the semen of - bulls in Saskatchewan. Can.vet.J.22, pp. 361-362.
33. Jenzen, R., Lauerman, L.H., Braddy, P.M., Horton, D.P., Flack, D.E., Cox, M.F. Einertson, N., Miller, G.K. & Rehfeld, C.E. 1980. Laryngeal contact ulcers in feedlot cattle. Vet.Path.17, pp. 667-671.
34. Kennedy, P.C. Frazier, L.M., Theilen, G.H. & Biberstein, E.L. 1958. A septicemic disease of lambs caused by Haemophilus agni (New species) Am.vet.-Res. 19. pp. 645-654.
35. Kennedy, P.C., Biberstein, E.L., Howarth, J.A., Frazier, L.M. & Dungworth, D. L. 1960. Infectious-meningo-encephalitis in cattle, caused by a Haemophilus-like organism. Am.J.vet.Res. 21, pp. 403-409.
36. Lamont, H.H. & Hunt, B.W. 1982. Haemophilus somnus and conjunctivitis. - Vet.Rec.111. pp. 21-24.
37. Little, P.B., & Sorensen, D.K. 1969. Bovine polioencephalomalacia, infectious - embolic meningoencephalitis, and acute lead poisoning in feedlot cattle. J.Am. vet.med.Ass. 155, pp. 1892-1903.
38. MacDonald. D.W., Christian, R.G. & Chalmers, G.A. 1973. Infectious thrombo embolic meningo-encephalitis : literature review and occurrence in Alberta, - 1961-1971. Can.vet.J. 14. pp. 57-61.
39. Martin, S.W., Meek, A.H., Davis, D.G., Thomson, R.G., Johnson,J.A. López, A., Stephens, L., Curtis, R.A., Prescott, J.F., Rosendal, S., Savin, M., Zubaidy, A.J.

- & Bolton. M.R. 1980. Factors associated with mortality in feedlot cattle : -
The Bruce County Beef Cattle Project. J.comp.Med.44, pp. 1-10.
40. Martin, S.W., Meek , A.H., Davis, D.G., Johnson, J.A. & Curtis, R.A. 1981.
Factors associated with morbidity and mortality in feedlot calves : The Bruce
County Beef Project, year 2. Can.J.comp.Med.45, pp. 103-112.
41. Martin, S.W., Meek , AH., Davis, D.C., Johnson, J.A. & Curtis, R.A. 1982. -
Factors associated with mortality and treatment cost in feedlot calves : The
Bruce County Beef Project, years 1978, 1979, 1980. Can.J.comp.Med.46. -
pp. 341-349.
42. Merino, M. & Biberstein, E.L. 1982. Growth requirements of Haemophilus --
somnus. J.Clin.Microbiol.16. pp. 798-802.
43. Miles, D.G., Anthony, H.D. & Dennis, S.M. 1972. Haemophilus somnifer (new
species) infection in the sheep. Am.J.vet.Res.33, pp. 431-435.
44. Miller, R.J., Renshaw, H.W. & Evans, J.A. 1975. Haemophilus somnus complex:
antigenicity and specificity of fractions of Haemophilus somnus. Am.J.vet.-
Res.36., pp. 1123-1128.
45. Nayar, P.S.G., Ward, G.E., Saunders, J.R. & MacWilliams, P. 1977. Diagnos-
tic procedures in experimental Haemophilus somnus infection in cattle. Can.
vet.J.18, pp. 159-163.
46. Nivard,J.L., Ward, G.E., Stevens,J.B. & Maheswaran, S.K. 1982. Model infec-
tion of the chicken embryo with Haemophilus somnus. Am.J.vet.Res.43. --
pp. 1790-1792.
47. Olander, H.J., Gallina, A.M., Beckwith, D. & Morrow, M. 1970. Observations
on thromboembolic meningoencephalitis (TEME) in cattle in Indiana feedlots.
Proc.U.S.Anim.Hlth.Ass.74, pp. 589-600.
48. Panciera, R.J. Dahlgren, R.R. & Rinker, H.B. 1968. Observations on septic-
emia of cattle caused by a Haemophilus somnus-like organism. Path.vet.5, -
pp. 212-226.

49. Piechulla, K., Mutters, R., Burbach, S., Klussmeir, R., Pohl, S. & Mannheim, W. 1986. Deoxyribonuclei Acid Relationships of Histophilus ovis, Haemophilus somnus, Haemophilus haemoglobinophilus and Actinobacillus seminis. Int. J. Syst. Bacteriol. vol.36, N^o 1. pp. 1-7.
50. Pritchard, D.G., Shreeve, J. & Bradley, R. 1979. The experimental infection of calves with a British strain of Haemophilus somnus. Res.vet.Sci. 26, pp. 7-11.
51. Roberts, L., Wood, D.A., Hunter, A.R., Munro, R. & Imray, W.S. 1979. Thromboembolic meningoencephalitis related with Haemophilus somnus infection. Vet.Res. 104. p. 605.
52. Saunders, J.R., Janzen, E.D. 1980. Haemophilus somnus infections. A Canadian field trial of a commercial bacteria clinical and serological results. Can.vet.J.21, pp. 219-224.
53. Saunders, J.R., Thiessen, W.A. & Janzen, E.D. 1980. Haemophilus somnus infections. 1. A ten year (1969-1978) retrospective study of losses in cattle herd in Western Canada. Can.vet.J.21. pp. 119-123.
54. Schiefer, B., Ward, G.E. & Moffatt, R.E. 1978. Correlation of microbiological and histological findings in bovine fibrinous pneumonia. Vet.Path.15, pp. 313-321.
55. Shigidi, M.T.A. 1970. Haemophilus of bovine encephalitis. Diss.Abst.Int.30b. pp. 4726-4727.
56. Shigidi, M.A. & Horlein, B.A. 1970. Characterization of the Haemophilus-like organism of infectious thromboembolic meningoencephalitis of cattle. Am.J. vet.Res.31, pp. 1017-1022.
57. Smith, P.B. & Biberstein 1977. Septicemia and meningoencephalitis in pastured cattle caused by a Haemophilus-like organism ("Haemophilus somnus"). Cornell. Vet. 67. pp. 300-305.

58. Stephens, L.R. & Little, P.B. 1981. Ultrastructure of Haemophilus somnus, - causative agente of bovine infectious thromboembolic meningoencephalitis. - Am.J.vet.Res. 42, pp. 1638-1640.
59. Stephens, L.R., Little, P.B., Wilkie, B.N. & Barnum, D.A. 1981a. Infectious thromboembolic meningoencephalitis in cattle : a review. J.Am.vet.med.Ass. 1978, pp. 378-384.