

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA
DE MÉXICO

DOCTORADO EN CIENCIAS
DE LA PRODUCCIÓN Y DE LA SALUD ANIMAL

ESTUDIO DE LOS PERFILES DE PROTEÍNAS TOTALES
EN AISLAMIENTOS DE *Histophilus somni* Y SU
RECONOCIMIENTO ANTIGÉNICO.

T E S I S

PARA OBTENER EL GRADO DE
DOCTOR EN CIENCIAS

P R E S E N T A

F R A N C I S C O A G U I L A R R O M E R O

T U T O R

D R . F R A N C I S C O J O S É T R I G O T A V E R A

C O M I T É T U T O R A L

D R A . C A M I L A A R R I A G A D I A Z

D R . F R A N C I S C O S U Á R E Z G Ü E M E S

CD. UNIVERSITARIA, D.F.

2006.



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



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 esta 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.

ÍNDICE

SUMMARY	2
RESUMEN	3
I. INTRODUCCIÓN	4
II. JUSTIFICACIÓN	10
III. HIPÓTESIS DE TRABAJO	12
IV. OBJETIVO GENERAL	12
4.1 OBJETIVOS PARTICULARES	12
V. MATERIALES Y MÉTODOS.	13
5. Formación del cepario de <i>Histophilus somni</i> .	13
5.1 Aislamiento de <i>Histophilus somni</i> a partir de cuadros neumónicos de becerros.	13
5.2 Aislamiento de <i>Histophilus somni</i> a partir del tracto reproductor.	13
5.2.1. Lavados prepuciales de becerros clínicamente sanos.	13
5.2.2. Muestreo en vacas con padecimientos de tracto reproductor.	14
5.3. Estudio bacteriológico de muestras de encéfalo de bovinos con problemas nerviosos.	14

5.4. Estudio bacteriológico	15
5.5. Criterios de identificación para <i>H. somni</i> de los aislamientos de campo.	15
5.6. Identificación de las cepas por Reacción en Cadena de la Polimerasa.	16
5.6.1. Extracción de ADN cromosomal.	16
5.6.2. Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR)	16
5.7. Comparación de los perfiles de proteínas totales por electroforesis (SDS/PAGE) de las cepas de campo contra una cepa de referencia.	17
5.7.1. Electroforesis.	17
5.8 Reconocimiento antigénico de las proteínas de membrana externa.	18
5.8.1 Producción de suero policlonal contra <i>H. somni</i> en conejo.	18
5.8.2 Reconocimiento antigénico de las proteínas por inmunotransferencia.	19
VI. RESULTADOS.	20
6.1 Aislamiento de <i>Histophilus somni</i> a partir de cuadros neumónicos de becerros.	20

6.2 Aislamiento de <i>Histophilus somni</i> de tracto reproductor de bovinos clínicamente sanos y con padecimientos.	20
6.3. Aislamiento de <i>Histophilus somni</i> a partir de encéfalos de bovinos con signología nerviosa.	21
6.4. Resultados de identificación de las cepas por Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR).	21
6.5 Comparación de los perfiles de proteínas totales por electroforesis (SDS/PAGE) de las cepas de campo contra una cepa de referencia.	22
6.6. Reconocimiento antigénico de las proteínas por inmunotransferencia.	23
VII. DISCUSIÓN	34
VIII. CONCLUSIONES	44
IX. LITERATURA CITADA	45

INDICE DE CUADROS

Cuadro 1. Resultados de pruebas bioquímicas utilizando el sistema API 20 E para identificar cepas de <i>H. somni</i> .	25
Cuadro 2. Relación de muestras de exudado cérvico-vaginal obtenidas de vacas lecheras Holstein con padecimientos del tracto reproductor.	26
Cuadro 3. Relación de las 32 muestras de encéfalo de bovinos con problemas nerviosos	26
Cuadro 4. Relación del origen de los 36 aislamientos que conforman el cepario de <i>Histophilus somni</i> .	27

INDICE DE FIGURAS

Fig. 1. Muestra de tejido pulmonar con lesiones neumónicas.	28
Fig. 2. Aspecto de la morfología colonial y pigmentación de aislamientos de campo de <i>H. somni</i> .	28
Fig. 3. Frotis de un aislamiento de campo de <i>H. somni</i> teñido con GRAM.	29
Figura 4. Gel de agarosa al 1% con bromuro de etidio mostrando ADN obtenido de cepas de campo de <i>H. somni</i> .	29
Figura 5 . Productos de PCR de aislados de prepucio, de neumonía.	30
Figura 6. Perfiles de proteínas totales de aislamientos de <i>Histophilus somni</i> de casos de neumonía	30
Figura 7. Perfiles de proteínas totales de aislamientos de <i>Histophilus somni</i> de casos de neumonía.	31
Figura 8. Perfiles de proteínas totales de aislamientos de <i>Histophilus somni</i> de casos de metritis.	31

Figura 9. Perfiles de proteínas totales de aislamientos de <i>Histophilus somni</i> de neumonías y de prepucio.	32
Figura 10. Perfiles de proteínas totales de aislamientos de <i>Histophilus somni</i> de lavados de prepucio,	32
Figura 11. Inmunotransferencia de aislamientos a partir de neumonías.	33
Figura 12 . Productos de PCR de aislados de prepucio, de neumonía.	33

ESTUDIO DE LOS PERFILES DE PROTEÍNAS TOTALES EN AISLAMIENTOS DE *Histophilus somni* Y SU RECONOCIMIENTO ANTIGÉNICO*

SUMMARY

In cattle, *Histophilus somni* (*Haemophilus somnus*) can cause pneumonia, thromboembolic meningoencephalitis, vaginitis, septicemia, endometritis, mastitis, infertility, arthritis, myocarditis and abortion. The purpose of the present study was to determine the protein profiles of *H. somni* isolates from a culture collection from México. Pneumonic lung tissue from 144 calves, 45 wash preputial from postpubertal bulls, brain tissue from 32 bulls and the genital mucus samples were obtained from 67 cows with reproductive disorders. The samples were inoculated on chocolate agar supplemented with 0.5% yeast extract and were incubated at 37 C in 10% CO₂. Colonies with morphologic and pigmentation features of *H. somni* were evaluated for biochemical characteristics and identified by PCR. Protein profiles were determined by electrophoresis and recognition of main antigens by Western Blot. *H. somni* was isolated from 10 (8.9%) cows with endometritis, 20 from pneumonic lungs and 6 from wash preputial. Protein profiles and major antigens of all strains were similar with the exception of four preputial isolations. An immunodominant 40 kDa antigen was conserved in all isolates except four *H. somni* strains. In this study, the first collection of 36 isolates of *H. somni* in México was established and isolation of *H. somni* from endometritis cases was also reported for the first time.

* Tesis Doctoral financiada por el CONACYT proyecto G38590-B y realizada en el CENID-Microbiología Animal del Instituto Nacional de Investigaciones Forestales, Agrícolas y Pecuarias.

RESUMEN

Histophilus somni (*Haemophilus somnus*) es reconocido como un patógeno importante de los bovinos, asociado a desórdenes reproductivos, del tracto respiratorio, sistema nervioso central e infecciones sistémicas, identificándose en lesiones de vaginitis, endometritis, aborto, neumonías, meningoencefalitis tromboembólica, mastitis, artritis, endocarditis y nacimiento de becerros débiles. El objetivo del presente trabajo fue la formación de un cepario de *H. somni* para realizar un estudio comparativo de los perfiles de proteína totales y determinar su antigenicidad. Para cumplir el objetivo se colectaron 144 muestras de lesiones neumónicas de becerros, 67 de vacas lecheras con metritis, 45 de prepucio de toretes de carne clínicamente sanos en corral y 32 de encéfalos de bovinos productores de carne en pastoreo con problemas nerviosos. Las muestras fueron inoculadas en Agar Chocolate e incubadas a 37 C durante 24 a 48 h con 10 % de CO₂. Se logró un cepario con 36 aislamientos de *Histophilus somni*, identificados con pruebas bioquímicas y PCR. A las cepas confirmadas se les realizó el estudio de perfiles de proteínas totales por electroforesis, se observaron similitudes y diferencias entre cepas y con una cepa la ATCC; además se evaluó su antigenicidad por inmunotransferencia. Los resultados más destacados en el estudio de perfiles proteínicos fue la presencia de una proteína de aproximadamente 40 kDa en la mayoría de los aislamientos de campo y su ausencia en microorganismos relacionados como *Mannheimia haemolytica* y *Pasteurella multocida*. Con la técnica de inmunotransferencia se evidenció la respuesta específica hacia antígenos importantes como la proteína de aproximadamente 40 kDa. No se logró el aislamiento a partir de encéfalos de animales con padecimientos nerviosos. Los resultados anteriores y la utilización rutinaria de la prueba de PCR, podrían en un futuro tener aplicación práctica y servir de apoyo en trabajos de investigación.

I. INTRODUCCIÓN

Dentro de las múltiples afecciones que padece el ganado bovino, las causadas por microorganismos son de gran importancia en la salud de estos animales; dichas infecciones son producidas por bacterias o virus ya sea en forma mixta o secuencial y pueden afectar diversos órganos, lo que trae como consecuencia una baja en la productividad. Un ejemplo de lo anterior es *Histophilus somni*; este microorganismo anteriormente conocido como *Haemophilus somnus*, es un cocobacilo pequeño, altamente pleomórfico, gram-negativo con la tinción de Gram su morfología es similar a otras especies de este género, así como de otros géneros de la familia *Pasteurellaceae*; es oxidasa positivo y generalmente indol positivo. Para su crecimiento requiere de medios enriquecidos como Agar Columbia, Agar Nutritivo, Base de Agar Sangre o Infusión Cerebro Corazón Agar suplementados con 10% de sangre desfibrinada de ovino o bovino y una atmósfera parcial de 10% de CO₂ a 37 C durante 24-48 horas de incubación. Se ha observado que al adicionar tiamina monofosfatada favorece su desarrollo^{1,2} *H. somni* no requiere de los factores X (hemina) o V (NAD) para crecer, por lo que su clasificación en este género siempre fue considerada incierta por el Manual Bergey³, por lo que se decidió reclasificarlo con un criterio basado en varios aspectos tales como los anteriormente mencionados, además de existir similitudes con otras bacterias 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 plenamente 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*^{4,5}. Las colonias de *H. somni* alcanzan un diámetro de aproximadamente 1-2 mm en 48 h, son redondas y convexas con una consistencia de mantequilla y un ligero color amarillento grisáceo², en ocasiones suelen presentar una actividad

hemolítica débil³. La bacteria no presenta cápsula, es inmóvil, no cuenta con pili o flagelos y no produce esporas^{2,3,6}.

Esta bacteria fue aislada por primera vez en Colorado en 1956 como causante de encefalitis en bovinos⁷, posteriormente en corrales de engorda de California fue notificada su presencia e identificada como organismo *Haemophilus*-like en casos de meningoencefalitis infecciosa de los bovinos⁸. El nombre de meningoencefalitis trombótica (MET) es usado comúnmente para describir las afecciones a nivel del Sistema Nervioso Central (SNC) donde *H. somni* causa una severa vasculitis y trombosis^{9,10}.

En un inicio se consideró la afección del SNC como el principal problema causado por *H. somni*, sin embargo en informes anuales posteriores se ha detectado una disminución constante de esta enfermedad, en cambio se han presentado e incrementado otras patologías y manifestaciones nuevas o también llamado “Complejo de enfermedades por *Haemophilus somnus*” o simplemente “Hemofilosis”¹⁰ o “Histofilosis”, dada la nueva nomenclatura.

H. somni participa en síndromes clínicos asociados a los tractos respiratorio y reproductor, además de presentarse en forma septicémica y otras formas misceláneas.

Con respecto al tracto reproductor, este es considerado el nicho ecológico o reservorio de *H. somni* y se ha aislado de toros y novillos clínicamente sanos a partir de prepucio en un 71%, de semen, vejiga, testículos, glándulas sexuales accesorias en 19% y ámpula en 10%^{11,12,13}. En vacas se ha informado de casos de vaginitis, cervicitis, endometritis^{14,15}, infertilidad y aborto^{16,17}. Los becerros de vacas infectadas nacen débiles y mueren en corto tiempo o no se desarrollan adecuadamente¹⁸. Se considera que la infección genital puede resultar en infertilidad, aumento de los días abiertos y repetición de servicios para lograr la gestación^{19,20,21}.

Las infecciones en tracto respiratorio por esta bacteria han cobrado mayor importancia ya que se considera la vía de entrada del microorganismo para producir una septicemia. En el tracto respiratorio alto puede causar traqueítis, así como laringitis, aunque en ocasiones también se pueden recuperar de forma

paralela, bacterias oportunistas como *Mannheimia*, *Pasteurella*, *Actinomyces*, *Fusobacterium spp* y *Clostridium spp*²². En tracto respiratorio bajo *H. somni* puede causar bronconeumonía supurativa^{23,24} y puede participar de forma importante en el síndrome clásico conocido como “fiebre de embarque” y en casos de pleuritis fibrinosa; algunos autores mencionan que no lo encontraron con frecuencia en casos de neumonía fibrinosa^{22,25}.

Cuando *H. somni* penetra al sistema circulatorio se distribuye en varias áreas y órganos del cuerpo y ha sido localizado en el cerebro, corazón, músculo esquelético, articulaciones, laringe, hígado y riñones^{8,26}; la localización de la bacteria puede ser de forma simultánea en mas de un sitio. La MET es la presentación nerviosa, que afecta principalmente a becerros de seis a diez meses de edad que arribaron a los corrales de engorda dos o tres semanas antes²⁷. Otra manifestación de la forma septicémica que es observada frecuentemente es la miocarditis^{28,29,30,31} que causa un falla cardiaca aguda. Dentro de las llamadas formas misceláneas se han notificado casos de otitis^{32,33}, mastitis^{34,35}, conjuntivitis³⁶ y poliartritis²⁷.

En ovinos se ha informado la participación de *H. somni* en casos de epididimitis, mastitis³⁷, aborto³⁸, sinovitis, meningoencefalitis^{39,40} y septicemia⁴¹.

El papel de *H. somni* resulta controversial debido a que en diversos estudios se ha aislado tanto de procesos patológicos, como de ganado clínicamente sano a partir de membranas mucosas, de cavidad nasal, de prepucio o vagina, por lo que se llega a considerar como parte de la flora normal². La prevalencia de *H. somni* como productor de enfermedad es mas frecuente en explotaciones intensivas debido a las condiciones de estrés a las que el ganado es sometido por prácticas de manejo y transporte o infecciones con agentes primarios como los virus o micoplasmas²; sin embargo el modo de diseminación aún no se conoce totalmente, por lo que se deduce que es por inhalación, ingestión de fluidos corporales o transmitido de forma venérea². Este microorganismo puede permanecer viable en moco nasal y sangre hasta por setenta días a 23.5 C^{9,10}. Se ha informado de casos clínicos producidos por *H. somni* en diversos países como Estados Unidos de América, Canadá, Alemania, Italia, Suiza, Rusia, Rumania,

Reino Unido, Bulgaria, República Checa, Egipto, Japón, Nueva Zelanda, Sudáfrica^{2,42}, Argentina⁴³, Australia¹⁴ y México⁴⁴.

Se ha observado que los aislamientos de *H. somni* son heterogéneos considerando su morfología, reacciones bioquímicas y expresión antigénica^{2,45}, además de la existencia de cepas poco virulentas o avirulentas obtenidas a partir de mucosas del tracto respiratorio² y más frecuentemente del tracto reproductor⁴², por lo que su identificación y el diagnóstico serológico resulta aún problemático. La manifestación clínica de la infección por esta bacteria parece ser debida a la respuesta inflamatoria del huésped que da como resultado una vasculitis y muerte de las células endoteliales^{42,46}.

La capacidad de producir enfermedad o factores de virulencia que posee *H. somni* no está totalmente entendida y actualmente se realizan múltiples estudios al respecto. Se conoce que estos mecanismos le permiten a la bacteria protegerse en contra de las defensas del huésped y promueve la colonización de varios sitios anatómicos: ejemplos de estos son la variación de fase de los componentes del lipooligosacárido (LOS), que es el factor de virulencia más estudiado; se encuentra formando parte de la capa externa de la membrana externa, también conocida como endotoxina; está compuesto por un polisacárido (oligosacárido) y un lípido A, pero carece de cadena O ya que no es capaz de sintetizarla. La variación de fase es el resultado de una modificación de la estructura de este oligosacárido debido a un cambio traslacional. Esta fase de variación también ocurre en otras bacterias patógenas que tienen la capacidad de biosintetizar LOS y se sabe que la información sobre la fase de variación se encuentra en los genes relacionados con la virulencia y esto parece ocurrir durante la replicación semiconservativa del ADN⁴². Los estudios realizados sugieren que la variación de fase de éstos podrían alterar la respuesta del huésped hacia la infección por *H. somni*⁴⁶.

Otro factor de virulencia es la sialización de el LOS, importante factor de evasión de la respuesta inmune humoral; que consiste en la unión de ácido siálico también conocido como N-acetil ácido neuramínico a una terminal galactosa, catalizada por una o más sialitrasferasas. La sialización puede ser usada como camuflaje por lo que la bacteria escapa a la inmunodetección debido a que el ácido siálico no es

inmunogénico, ya que forma parte o es componente normal de los tejidos del huésped⁴⁷. Al realizar la comparación genética entre cepas patógenas de *H. somni* y cepas aisladas de prepucio de animales clínicamente sanos, se observó en estas últimas, genes truncados, incompletos o ausentes, relacionados con enzimas como las sialitranferas y la sialisintetasa, necesarias para llevar a cabo esta unión⁴⁸.

La capacidad de producir vasculitis como consecuencia de la citotoxicidad en células endoteliales de bovino (CEB) en condiciones *in vitro*, sugieren que en infecciones por *H. somni* este puede ser el detonador para inducir apoptosis. Esto puede resultar importante dentro de los mecanismos de patogenicidad por ser una vía efectiva para que el microorganismo evada a los leucocitos del huésped. Recientemente se estudió la capacidad de cepas patógenas y de prepucio de *H. somni* para inducir apoptosis, utilizando ensayos citoquímicos y en ambos casos fueron igualmente capaces de inducir apoptosis con la asociación de cambios estructurales^{49,50}. Es importante resaltar que también se probó *in vitro* con cultivos inactivados por calor y sobrenadantes filtrados y en ambos casos indujeron de forma significativa apoptosis. También se probó con sobrenadante filtrado proveniente de cultivo inactivado por calor y la inducción fue reducida pero no eliminada; estos resultados sugieren que los LOS son termoestables y que pueden jugar un papel de mínimo a parcial en la apoptosis de las células endoteliales de bovino^{49,50}.

H. somni posee una variedad de proteínas que pueden estar involucradas en la virulencia e inducir inmunidad protectora, tales como el grupo conocidas como inmunoglobulinas ligadoras o fijadoras de proteínas (IgBPs), que la protegen de la fagocitosis y la inactivación mediada por Complemento. Se ha sugerido que éstas proteínas podrían actuar en conjunto con anticuerpos ligadores no específicos y con lo cual bloquea la adhesión de anticuerpos específicos a *H. somni*. El aumento a la resistencia al suero de animales convalecientes, por cepas patógenas, ha sido atribuido en parte a la acción de las IgBPs. Estas proteínas se encuentran en una red de fibrillas, una proteína periférica de 76 kDa (p76) y una proteína principal de membrana externa (MOMP). *H. somni* también posee otras proteínas de

membrana externa como la de 40 kDa y las lipoproteínas Lpp A y Lpp B que son similares a las lipoproteínas de otras bacterias patógenas como *Mannheimia haemolytica* y *Neisseria meningitidis*. Se ha informado de la existencia de anticuerpos protectivos dirigidos contra el antígeno proteínico de membrana externa de 40 kDa, lo que sugiere que este puede ser un factor de virulencia^{51,52}.

Otro aspecto importante de *H. somni* es la capacidad de sobrevivencia intracelular por medio de la citotoxicidad o interferencia con la función las células mononucleares y neutrófilos de bovino, que pueden verse afectadas de forma adversa por *H. somni* que puede incluso replicarse dentro de las células fagocíticas y evitar la inmunidad humoral⁵³.

La producción de histamina⁵⁴, se ha observado en cepas de *H. somni* en condiciones de crecimiento con dióxido de carbono, aunque no se tiene claro cual es el papel que juega este producto en la virulencia y patogénesis, sin embargo la producción de histamina *in vivo* es un mediador de la respuesta inflamatoria y que en este caso específico, sumando a los LOS, podría aumentar la patogénesis. Si bien la histamina en otras bacterias es formada a partir de histidina por acción de la histidina descarboxilasa, un gen homólogo que codifique para esta enzima no ha sido localizado en el genoma de las dos cepas de *H. somni* que han sido secuenciadas. El mecanismo exacto de la síntesis de la histamina en esta bacteria no se conoce^{42,54}.

Se ha señalado de la producción de una sustancia parecida a un exopolisacárido (ePS) en el sobrenadante de cultivo de *H. somni*⁵⁵ cuya naturaleza y origen no fue caracterizado inicialmente y que investigaciones recientes⁵⁶ confirmaron es regulado bajo condiciones anaeróbicas y altas concentraciones de sal, lo que sugieren que la síntesis de ePS por *H. somni* puede ser una respuesta al estrés y lo libera a la matriz extracelular. El ePS está compuesto por manosa y galactosa y reacciona con el suero de bovino en ELISA, indicando que los bovinos generan anticuerpos contra este antígeno.

Finalmente otra característica de *H. somni* que pudiera estar relacionada con virulencia y patogenicidad, ha sido recientemente encontrada y es la capacidad de formar biopelícula⁵⁷ en paredes de poliestireno o en superficies de vidrio, aunque

no se ha observado o no se sabe que lo forme en condiciones *in vivo*. La formación de biopelícula ayuda en la colonización y persistencia en un órgano en particular⁵⁸. Se piensa que esta característica podría ayudar a *H. somni* a pasar inadvertido para el sistema inmune bovino o aumentar la resistencia bacteriana hacia los antibióticos. Si la síntesis de ePS está relacionada con la formación de biopelícula como en el caso de *Pseudomona aeruginosa*, esto todavía no ha sido determinado en el caso de *H. somni*⁴².

Los primeros diagnósticos fueron realizados por aislamiento e identificación del agente^{7,8,59}, posteriormente se establecieron pruebas serológicas como fijación de complemento, aglutinación, ELISA^{60,61} y coaglutinación⁶²; actualmente se han establecido las pruebas de peroxidasa-antiperoxidasa (PAP)⁶³ y la Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR)⁴.

II. JUSTIFICACIÓN

En México existen pocos estudios al respecto y la primera evidencia de la presencia de esta bacteria se registra en 1975, en un estudio serológico en bovinos con problemas reproductivos y respiratorios, encontrándose un 25% de positivos a *H. somni* utilizando la prueba de fijación de complemento⁶⁴, posteriormente se informa del aislamiento de *H. somni* a partir de pulmones con lesiones de neumonía en becerros sacrificados en rastro⁴⁴, y de prepucio de toros clínicamente sanos⁶⁵.

En un brote de muertes súbitas, en un lote de engorda de bovinos, se informó de la presencia de lesiones histopatológicas en varios órganos sugestivas de infección septicémica por este microorganismo⁶⁶, asimismo al realizar estudios serológicos se encontraron animales positivos en diversos municipios de los estados de Oaxaca⁶⁷, Chiapas⁶⁸ y en un hato cerrado ubicado en Martínez de la Torre Ver. perteneciente a la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia-UNAM⁶⁹. En el norte del país, específicamente en Chihuahua⁷⁰ y Sinaloa⁷¹ se realizaron aislamientos a partir de casos clínicos del tracto respiratorio en bovinos confinados en corrales de engorda; posteriormente se informa del estudio

efectuado en becerras de la cuenca lechera de Tijuana B.C.⁷². Recientemente se informó de la presencia de esta bacteria en casos de metritis en ganado lechero en establos de la zona centro de México⁷³.

Con respecto a los ovinos recientemente se publicó el primer informe de la presencia de *H. somni* en un caso de epididimitis⁷⁴ y de su aislamiento a partir de vagina y prepucio de ovinos jóvenes clínicamente sanos, en hatos de la región poniente del Estado de México⁷⁵.

De acuerdo a lo anterior, es necesario que en nuestro país se realicen mas estudios sobre este microorganismo, partiendo como en el presente estudio, con el inicio de la formación de una colección de cepas, para de ahí efectuar estudios enfocados hacia aspectos de determinar los perfiles de proteínas de las cepas, determinar su capacidad de producir una respuesta antigénica. Para un futuro se puede plantear estudios para conocer algunos mecanismos de patogenicidad, aspectos epidemiológicos, diferencias genéticas, etc. todo con la finalidad de conocer si este microorganismo es importante en la industria ganadera de nuestro país.

III. HIPÓTESIS DE TRABAJO

La mayoría de las cepas de *Histophilus somni* que se aíslan en México son similares entre si y con respecto a una cepa tipo de la ATCC, en sus perfiles de proteínas totales y su antigenicidad.

IV. OBJETIVO GENERAL

Comparar los perfiles de proteínas totales de cepas nacionales de *Histophilus somni*, obtenidas de diferentes padecimientos y determinar su reconocimiento antigénico.

4.1 OBJETIVOS PARTICULARES

- Crear un cepario de *H. somni* con aislamientos a partir de cuadros neumónicos, de padecimientos del tracto reproductor, problemas nerviosos y de animales clínicamente sanos.
- Utilizar la técnica de reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR) para realizar la identificación de los aislamientos .
- Comparar los perfiles de proteínas totales de los diferentes aislamientos, entre sí y contra una cepa de referencia por electroforesis.
- Determinar el reconocimiento antigénico de las proteínas de membrana externa por medio de la inmunotransferencia.

V. MATERIALES Y MÉTODOS.

5. Formación del cepario de *Histophilus somni*.

5.1 Aislamiento de *Histophilus somni* a partir de cuadros neumónicos de becerros.

Durante un periodo de aproximadamente una año se llevaron a cabo muestreos semanales en el rastro de Tlalnepantla Edo. de México, en donde se revisó el sacrificio de 2340 becerros Holstein, de aproximadamente una semana de edad, procedentes de los estados de Jalisco, Aguascalientes, Guanajuato y Querétaro. De los pulmones que presentaron lesiones de neumonía, se colectó una porción representativa que fue puesta en un recipiente estéril y colocada en refrigeración para su traslado al laboratorio.

Por otro lado se trabajó aproximadamente durante 14 meses en diversos establos de la cuenca lechera de Tijuana y Rosarito, Baja California Norte, donde se le dió seguimiento a los casos clínicos de afecciones respiratorias en becerras lecheras de reemplazo. Cuando las becerras murieron a consecuencia de este padecimiento se les practicó la necropsia, y se colectaron muestras de tejido pulmonar con lesiones de neumonía de 100 casos clínicos. Las muestras fueron trasladadas al laboratorio del CENID-Microbiología congeladas en nitrógeno líquido.

5.2 Aislamiento de *Histophilus somni* a partir del tracto reproductor.

5.2.1. Lavados prepuciales de becerros clínicamente sanos.

Se realizaron visitas a explotaciones de bovinos productores de carne en el estado de Querétaro se tomaron muestras para obtener suero sanguíneo con Vacutainer^a y se practicó lavado de prepucio a 45 becerros clínicamente sanos, de 6 a 8 meses de edad, previo al muestreo de prepucio, se realizó un lavado exhaustivo con agua y jabón del área externa del meato urinario. El lavado de prepucio se

^a Becton-Dickinson

efectuó con una solución amortiguadora de fosfatos (PBS) pH 7.2 contenida en jeringa estéril desechable sin aguja; Se procedió a depositar en el interior un volumen de aproximadamente 10 ml efectuando un masaje y recuperando posteriormente la mayor cantidad posible del PBS. Con la muestra recuperada se procedió de inmediato a inocular con un volumen aproximado de 1 ml a cada placa de agar chocolate y colocarlas en una jarra para anaerobiosis^b proporcionándoles una atmósfera de aproximadamente 10% de CO₂ y se trasladaron al laboratorio a temperatura ambiente para incubarlas durante 24-48 h. De cada animal muestreado se realizaron siembras por duplicado.

5.2.2. Muestreo en vacas con padecimientos del tracto reproductor.

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 que presentaban exudado mucopurulento en el tracto reproductor, y de 45 vacas clínicamente sanas. 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^c, conservado en refrigeración durante su traslado hasta el laboratorio.

5.3. Estudio bacteriológico de muestras de encéfalo de bovinos con problemas nerviosos.

Con la finalidad de obtener cepas de casos de problemas de Sistema Nervioso Central, principalmente incoordinación, se trabajaron muestras de 32 encéfalos de

^b BBL Gas-Pack[®] System

^c Merck

bovino de los estados de Tamaulipas, Chiapas, San Luis Potosí y Veracruz, en donde se habían presentado casos de signología nerviosa y de los cuales se requería descartar Meningoencefalitis Tromboembólica, además de realizar un diagnóstico diferencial con otras enfermedades como rabia o listeriosis. Las porciones de encéfalo que fueron seccionadas de forma longitudinal fueron recibidas en el laboratorio y conservadas en refrigeración. La siembra de la muestra se realizó tomando una porción del cerebro de aproximadamente 2 cm³ y realizar una impronta e impregnar una parte de la superficie de la placa de cultivo. Posteriormente se realizó la estría con la técnica de cultivo puro.

5.4. Estudio bacteriológico

Las muestras de tejido con lesiones de neumonía, los lavados de prepucio, hisopos con exudado cérvico-vaginal y muestras de tejido cerebral, se inocularon en placas de Agar Chocolate (ACH) preparado con Infusión Cerebro Corazón Agar^d suplementado con 10 % de sangre desfibrinada de bovino y 0.5% de extracto de levadura^e, se incubaron a 37 C durante 24 a 48 h en una estufa^f con atmósfera de CO₂ a una concentración del 10%^{1,2,76,77}.

5.5. Criterios de identificación para *H. somni* de los aislamientos de campo.

Después de 48 h de incubación, se seleccionaron las colonias por sus características morfológicas: forma circular, convexa, brillante, tamaño aproximado de 1 a 2 mm de diámetro, pigmento ligeramente amarillento y consistencia similar a la mantequilla^{1,2}.

A cada aislamiento se le realizaron pruebas de afinidad tintorial, morfología microscópica, se determinaron sus reacciones bioquímicas y utilización de azúcares utilizando el microsistema API20^g, y finalmente se utilizó una PCR

^d Difco Laboratories

^e Difco laboratories

^f Nuairé

^g Biomérieux

especie-específica para su identificación definitiva. En todos los análisis realizados se utilizó como control una cepa tipo^h de *Histophilus somni*.

5.6. Identificación de las cepas por Reacción en Cadena de la Polimerasa.

5.6.1. Extracción de ADN cromosomal.

Con cada aislamiento se formó una suspensión bacteriana que fue utilizada para la extracción de ADN con tiocianato de guanidina siguiendo un método convencional⁸³.

A partir de cultivo en una placa Agar Chocolate se obtuvo una suspensión bacteriana en 550 µl de solución de lisis (sarcosilⁱ 0.5% p/v, tiocianato de guanidina^j 5M, EDTA^k 0.1M), la que se mezcló, se agregaron 250 µl de acetato de amonio^l 7.4 M y colocó en hielo por 10 minutos, posteriormente se adicionaron 500 µl de cloroformo-alcohol isoamilico^m (25:1) , se mezcló y centrifugóⁿ a 10,000xg por 5 minutos, se recogió el sobrenadante y volvió a lavarse con cloroformo-alcohol isoamilico. Se tomó el sobrenadante y precipitó con 0.7 de volumen de isopropanol por 15 minutos, se centrifugó a 12000xg por 10 minutos y desechó el sobrenadante, posteriormente se adicionaron 200 µl de etanol absoluto, se mezcló y centrifugó a 13000xg durante 15 minutos. Finalmente se decantó y eliminó el sobrenadante, se dejó evaporar el etanol y se resuspendió en 50-100 µl de agua destilada estéril o en solución amortiguadora Tris-EDTA^o (TE) 10:1.

5.6.2. Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR)

Se utilizaron iniciadores específicos^p de un fragmento de ADN que codifica para el RNAr de la subunidad ribosomal 16S. El iniciador 1 en dirección 3'5' comienza en

^h American TypeCollection Culture

ⁱ GIBCO BRL

^j GIBCO BRL

^k USB Cleveland, Ohio.

^l JT Baker Chemical Co.

^m Sigma, Sigma-Aldrich Química S.A. de C.V

ⁿ Centrífuga Eppendor 5403

^o Sigma, Sigma-Aldrich Química S.A. de C.V

^p Sintetizados por Invitrogen

la base 453 con la secuencia GAAGGCGATTAGTTTAAGAG, y el iniciador 2 en dirección 5'3' comienza en la base 860 con la secuencia TTCGGGCACCAAGTATTCA, por lo que se amplifica un fragmento de 407 pares de bases^{4,84}.

Se utilizó la siguiente premezcla^q: 3µl de +MgCl₂ 1,5 mM; 5µl de Buffer 1x s/Mg⁺⁺; 2µl de dNTP 100 µM de c/u; 65 ng de cada uno de los iniciadores; 1 U de *Taq* polimerasa^r; 3µl de muestra con ADN del aislamiento a identificar y H₂O miliQ cbp 50µl. Las muestras fueron puestas en el termociclador^s 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 (10µl) se sometieron a electroforesis en un gel de agarosa^t al 1% con bromuro de etidio^u de acuerdo a los protocolos estándares y se visualizaron en un analizador de imágenes^{v 4,84}.

En la PCR, la cepa tipo de *Histophilus somni* se utilizó como control positivo y se probaron también cepas de *Salmonella enteritidis*, *Mannheimia haemolytica*, *Pasteurella multocida*, *Actinobacillus seminis*, y *Escherichia coli*.

5.7. Comparación de los perfiles de proteínas totales por electroforesis (SDS/PAGE) de las cepas de campo contra una cepa de referencia.

5.7.1. Electroforesis.

Se compararon los perfiles de proteínas de cada uno de los aislamientos de campo contra la cepa tipo (ATCC) de *Histophilus somni*, Las cepas de campo fueron sembradas en placas de ACH y se incubaron durante 48 h. Las bacterias fueron cosechadas en solución amortiguadora de fosfatos (PBS) pH 7.2, por centrifugación a 15000xg por 15 min, la pastilla fue lavada y resuspendida en PBS,

^q GIBCO BRL Life Technologies

^r Invitrogen life Technologies

^s Perkin Elmer Gene Amp PCR System 2400

^t Invitrogen life Technologies

^u Sigma, Sigma-Aldrich Química S.A. de C.V.

^v Chemi System UVP Bioluminescence Systems

y ajustada en espectrofotómetro^w a una densidad de 75 % de transmitancia a una longitud de onda de 610 nm, para una concentración de 1×10^8 UFC/ml. Se tomó 1,5 ml de esta suspensión bacteriana y se centrifugó a $15,000 \times g$ durante 15 min. Se desechó el sobrenadante y el paquete bacteriano fue resuspendido en 30 μ l de PBS y 30 μ l de buffer de muestra; la suspensión final fue hervida durante 5 min⁷⁸. De la misma forma se prepararon muestras de bacterias del grupo *Haemophilus-Actinobacillus-Pasteurella* (HAP) como *Mannheimia haemolytica* A1, *Pasteurella multocida* tipo A y cepa tipo de *Histophilus somni*.

En geles de poliacrilamida^x al 12.5% se depositaron en cada pozo 15 μ l de muestra, conteniendo 10 μ g de proteína, de las diferentes cepas de campo. El corrimiento se efectuó en cámara de electroforesis^y con un voltaje inicial de 40 volts (V) durante la primera hora, para posteriormente incrementar a 80 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^z para observar los perfiles de proteínas o se les realizó la inmunotransferencia a membrana de nitrocelulosa^{aa} 78,79.

5.8 Reconocimiento antigénico de las proteínas de membrana externa.

5.8.1 Producción de suero policlonal contra *H. somni* en conejo.

Se formaron dos grupos de 6 conejos machos Nueva Zelanda de aproximadamente 2 kilos de peso, denominándolos como grupo A y grupo B; cada grupo utilizó una jaula de una batería por separado, se colocaron tres animales en cada jaula. Se procedió a inocular por vía intramuscular en el día 0 del protocolo a los conejos del grupo A con 1 ml de suspensión de *H. somni* viva, cepa ATCC a una concentración de 1×10^8 UFC/ml, repitiendo la operación a los días 15 y 30. Se realizó una prueba preliminar por inmunodifusión doble en agar para evaluar los sueros de este grupo, al comprobar su positividad, se realizó el sangrado en

^w Coleman model 35

^x GIBCO BRL

^y Bio Rad Mini Protean

^z Bio-Rad

^{aa} Bio-Rad

blanco por vía intracardiaca al día 40. Los conejos del grupo B sirvieron como controles negativos, usando el mismo protocolo con inoculaciones de PBS estéril⁸⁰.

5.8.2 Reconocimiento antigénico de las proteínas por 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^{bb} al 5% y lavada durante tres ciclos de 5 min con Tris Buffered Saline TBS-Tween 20^{cc}. La membrana fue incubada con suero de conejo policlonal hiperinmune producido con la cepa de la ATCC 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^{dd} 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^{ee} frío con 60 mg de 4-cloro-1-naftol^{ff} y 100 µl de peróxido de hidrógeno al 30%. Las bandas se evidenciaron aproximadamente a los 10 min y la reacción se detuvo con agua destilada fría^{78,79}.

^{bb} Difco Laboratories

^{cc} Sigma, Sigma-Aldrich Química S.A. de C.V.

^{dd} Sigma, Sigma-Aldrich Química S.A. de C.V.

^{ee} JT Baker

^{ff} Sigma, Sigma-Aldrich Química S.A. de C.V.

VI. RESULTADOS.

6.1 Aislamiento de *Histophilus somni* a partir de cuadros neumónicos de becerros.

Durante el muestreo en el rastro de Tlalnepantla se colectaron 44 pulmones de becerros machos con lesiones neumónicas (Figura 1), a los que se les realizó el estudio bacteriológico; donde se seleccionaron las colonias que presentaron las características más importantes de *H. somni*, como pigmentación ligeramente amarillenta y consistencia similar a la mantequilla (Figura 2); además de tener una morfología microscópica cocobacilar pleomórfica y afinidad tintorial gramnegativa (Figura 3). A los cultivos con estas características se les determinó sus perfiles bioquímicos usando el microsistema API20 (Cuadro 1). De acuerdo a estos criterios, de las 44 muestras colectadas, se obtuvieron 9 (20.45%) aislamientos de *Histophilus somni* de los becerros sacrificados en rastro. Utilizando los parámetros anteriores para el muestreo y estudio bacteriológico, se obtuvieron otras 11 cepas de *H. somni* a partir de tejido pulmonar obtenido durante 100 necropsias practicadas a becerras con historia clínica de haber padecido neumonía en las cuencas lecheras de Tijuana y Rosarito, Baja California Norte. Es conveniente mencionar que de los aislamientos de *H. somni*, realizados en las 9 muestras del rastro de Tlalnepantla en 3 de éstas se aisló de forma combinada con *Pasteurella multocida*, en 2 con *Mannheimia haemolytica*, en 2 con *P. multocida* y *M. haemolytica* y 2 en cultivo puro.

6.2 Aislamiento de *Histophilus somni* de tracto reproductor de bovinos clínicamente sanos y con padecimientos.

Con respecto al tracto reproductor, se realizaron lavados prepuciales en 45 becerros productores de carne, clínicamente sanos, en el estado de Querétaro, de los cuales se obtuvieron 6 (13.33%) aislamientos. Por otra parte en el muestreo realizado a 67 vacas lecheras Holstein con padecimientos del tracto reproductor (Cuadro 2) se realizaron 10 aislamientos de *H. somni* que representaron el 14 % (10/67). En algunos casos hubo crecimiento con microorganismos como *E. coli*,

Proteus spp y *Bacillus spp* en proporción insignificante, por lo que se consideraron contaminantes. La identificación de los 36 aislamientos se realizó siempre con los mismos criterios, usando como control positivo una cepa de la American Type Culture Collection (ATCC).

6.3. Aislamiento de *Histophilus somni* a partir de encéfalos de bovinos con signología nerviosa.

Se trabajaron 32 muestras de tejido encefálico de bovinos que habían presentado signología nerviosa como incoordinación, dificultad para desplazarse, anorexia, por lo que se debía realizar un diagnóstico diferencial con rabia y listeriosis, por lo que de forma paralela a esos estudios específicos se procedió a realizar el estudio bacteriológico para el aislamiento de *H. somni* para descartar la posibilidad de la presentación de casos de Meningoencefalitis Tromboembólica. Se procedió a realizar el estudio rutinario para este microorganismo y después de incubar las placas de Petri durante 72 h se determinó y concluyó que los resultados fueron negativos al aislamiento de *H. somni* (Cuadro 3).

El número total de aislamientos de *H. somni* que constituyeron el cepario fue de 36, obtenidos de varios estados de la República Mexicana (Cuadro 4).

6.4. Resultados de identificación de las cepas por Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR).

En las 36 cepas identificadas como *H. somni* de acuerdo a sus características de morfología colonial, presencia de pigmento, consistencia de la colonia, morfología microscópica, afinidad tintorial y reacciones bioquímicas con el sistema API-20; se corroboraron utilizando la técnica de Reacción en Cadena de la Polimerasa especie-específica; para lo cual se les realizó extracción de ADN cromosomal (Figura 4) y se visualizó en geles de agarosa al 1% para comprobar que no estuviese degradado. Se procedió a efectuar la técnica con la finalidad de evidenciar la amplificación de un segmento de 407 pares de bases (pb) para aquellas cepas que efectivamente fueran *H. somni*. Se utilizó ADN de la cepa tipo

ATCC como control positivo, además de otros microorganismos para confirmar la especificidad de la prueba.

En la Figura 5 se puede observar en los carriles 2 al 12 el producto de la PCR de un segmento de 407 pb, lo que significa que todas las amplificaciones mostradas pertenecen a *Histophilus somni*, localizándose en los carriles 3 al 12 cepas de campo y en el 2 la cepa de referencia. En los carriles 13, 14 y 15 no hubo amplificación a pesar de colocar ADN cromosómico de *Salmonella enteritidis*, *Mannheimia haemolytica* y *Escherichia coli*, lo que demuestra que esta prueba resultó ser específica para identificar a *H. somni*. Es importante resaltar la utilidad de la prueba ya que este microorganismo posee una gran variabilidad en sus reacciones bioquímicas, por lo que dificulta su identificación por otros métodos. Utilizando esta herramienta de biología molecular, se confirmaron como *H. somni* los 36 aislamientos de campo.

6.5. Comparación de los perfiles de proteínas totales por electroforesis (SDS/PAGE) de las cepas de campo contra una cepa de referencia.

Se prepararon muestras de proteínas totales de los 36 aislamientos y se analizaron por SDS-PAGE al 12,5%. Al realizar la comparación de los perfiles de proteínas totales de los aislamientos de neumonías entre si (cepas 30, 31, 33, 34, y 47) y contra la cepa de ATCC (Figura 6), se encontró que las cepas de campo coincidió en sus perfiles de proteínas totales entre si y con la cepa tipo de la ATCC, evidenciándose en todos los casos una banda de aproximadamente 40 kDa, que según los informes de la literatura corresponde a una proteína de la membrana externa presente en la mayoría de los aislamientos que se encuentran en este tipo de padecimientos. Se observa claramente una diferencia sustancial con respecto a los aislamientos de *Mannheimia haemolytica* (PhA1) y *Pasteurella multocida* (Pm A) ya que estas últimas presentaron patrones totalmente diferentes y se nota la presencia de una banda de aproximadamente 35 kDa en la cepa de *P. multocida*.

En la Figura 7 se hace otro comparativo de cepas de campo de *H. somni* obtenidas de neumonías (cepas 88B, 73A, 93A y 24 B) entre sí contra la cepa tipo de la ATCC, además de *Mannheimia haemolytica* y *Pasteurella multocida* repitiéndose los mismos patrones de los perfiles descritos en la Figura 6.

En la Figura 8 se pueden observar los perfiles de proteínas totales de aislamientos de casos de metritis (aislamientos V585, V620, V27, V131 y V439) comparados con la cepa tipo ATCC y se observan perfiles similares entre si y con respecto a la cepa de referencia.

Una variante en los perfiles es lo que se observa en la Figura 9, en la que se compararon algunos aislamientos de origen respiratorio (29B, 38B), de casos de metritis (V385, V585) y de lavado prepucial (Hs1,Hs7), se puede notar que en los dos primeros casos las cepas guardan una similitud de perfiles, no así las dos obtenidas de prepucio que se diferencian con respecto a la cepa tipo y a las de otro origen, evidenciando una banda de mayor intensidad de aproximadamente 35 kDa, no apreciándose ninguna banda de 40 kDa como las demás cepas.

En la Figura 10 se muestra un gel en el que se comparan los aislamientos de prepucio (Hs16, Hs26, Hs11, Hs12) entre sí, contra la cepa de referencia y contra *Mannheimia haemolytica* y *Pasteurella multocida*, donde se puede observar que los aislamientos Hs16 y Hs11 presentan similitud con la cepa de referencia, no así las denominadas Hs26 y Hs12 en las que existen diferencias sustanciales entre sí y con respecto a la de la ATCC. Las cepas de *M. haemolytica* y *P. multocida* tienen perfiles diferentes *H. somni*, como ya se observó en los geles anteriores.

6.6. Reconocimiento antigénico de las proteínas por inmunotransferencia.

El suero policlonal elaborado en conejo con la cepa tipo de ATCC fue probado por inmunotransferencia contra los diferentes aislamientos de distintos padecimientos y regiones anatómicas. Se puede observar (Figura 11) que el patrón de reconocimiento de las cepas de campo entre sí y con la cepa tipo es similar ya que el bandeo que se observa es muy parecido, encontrándose que tanto las cepas aisladas de casos de neumonía como de metritis presentan el mismo perfil de

reconocimiento, haciéndose evidentes proteínas de aproximadamente 10, 18 y 40 kDa. Es importante comentar que las proteínas de aproximadamente 10 y 18 kDa no son evidentes en ninguno de los geles de poliacrilamida teñidos con azul de Coomasie como los son en el reconocimiento inmunológico. Cabe destacar que en la comparación que se realiza contra la cepa de *Mannheimia haemolytica* es evidente la diferencia existente, excepto en una proteína de aproximadamente 10 kDa donde hay cierta similitud; con respecto a la cepa de *Pasteurella multocida* se observa una proteína de aproximadamente 11 ó 12 kDa donde hay un fuerte reconocimiento, aunque ésta proteína tampoco se evidencía en los geles teñidos con azul de Coomasie. Se puede observar que la proteína de 40 kDa es reconocida por el suero policlonal en las cepas de campo presentadas (Figuras 11 y 12).

En la figura 12 se da una situación similar con las cepas de campo aisladas de casos de neumonías y que fueron probadas contra el suero policlonal producido en conejo con la cepa tipo. El comportamiento de las cepas de *M. haemolytica* y *P. multocida* es similar a lo que se observa en la figura anterior (Figura 11) en donde existe un reconocimiento de las mismas proteínas, lo que podría ser de utilidad para poder diferenciar la respuesta inmune por bacterias de estos géneros. La proteína de aproximadamente 40 kDa fue reconocida en todas las cepas de campo de *H. somni* excepto en las cepas aisladas de prepucio Hs1, Hs7, Hs12 y Hs26.

CUADROS

Cuadro 1. Resultados de pruebas bioquímicas utilizando el sistema API 20 E para identificar cepas de *H. somni*.

PRUEBA	C E P A S				
	ATCC	30	31	24B	88B
ONPG	+	+	+	+	+
ADH	-	-	-	-	-
LDC	-	-	-	-	-
ODC	+	+	+	+	+
CIT	-	-	-	-	-
H ₂ S	-	-	-	-	-
UREA	-	-	-	-	-
TDA	-	-	-	-	-
IND	-	-	-	-	-
VP	-	-	-	-	-
GEL	-	-	-	-	-
GLU	+	+	+	+	+
MAN	+	+	+	+	+
INO	+	+	+	+	+
SOR	+	+	+	+	+
RHA	+	+	+	+	+
SUC	+	+	+	+	+
MEL	+	+	+	+	+
AMY	+	+	+	+	+
ARA	+	+	+	+	+
CAT	+	+	+	+	+

Cuadro 2. Relación de muestras de exudado cérvico-vaginal obtenidas de vacas lecheras Holstein con padecimientos del tracto reproductor y aislamientos de *H. somni*.

4 MAYO	5 MUESTRAS	TIZAYUCA	(2) <i>H. somni</i>
11 MAYO	8 MUESTRAS 2 MUESTRAS	EL OLIMPO VILLA MARIA	(3) <i>H. somni</i> 0 AISLAMIENTOS
16 MAYO	8 MUESTRAS	SAN JOSE	(1) <i>H. somni</i>
23 MAYO	5 MUESTRAS	OLIMPO	(1) <i>H. somni</i>
2 JUNIO	6 MUESTRAS 5 MUESTRAS	VILLA MARIA OLIMPO	0 AISLAMIENTOS
6 JUNIO	5 MUESTRAS	SAN JOSE	(1) <i>H. somni</i>
12 JUNIO	9 MUESTRAS	TIZAYUCA	(1) <i>H. somni</i>
29 JUNIO	8 MUESTRAS	PUEBLA	(1) <i>H. somni</i>
14 AGOSTO	6 MUESTRAS	TIZAYUCA	0 AISLAMIENTOS
TOTAL	67 MUESTRAS		10 AISLAMIENTOS DE <i>H. somni</i>.

Cuadro 3. Relación de las 32 muestras de encéfalo de bovinos con problemas nerviosos a los que se les realizó estudio bacteriológico para aislamiento de *H. somni*.

PROCEDENCIA	Dx RABIA	BACTERIOLOGÍA	HISTOPATOLOGÍA
15 Chiapas	10 positivos	Neg. a <i>H. somni</i>	No compatible a <i>H. somni</i> . Autólisis (4).
14 San Luis Potosí	9 positivos	Neg. a <i>H. somni</i>	No compatible a <i>H. somni</i> . Encefalomalacia (1). <i>Listeria</i> (1) Autólisis (3)
2 Tamaulipas	negativos	Neg. a <i>H. somni</i>	No compatible a <i>H. somni</i> . Autólisis (2)
1 Veracruz	negativo	Neg. A <i>H. somni</i>	No compatible a <i>H. somni</i> . Autólisis

Cuadro 4. Relación del origen de los 36 aislamientos que conforman el cepario de *Histophilus somni*.

Origen geográfico	Región anatómica	Padecimiento	# de cepas aisladas
Estado de México	cervix-vagina	metritis	2
	tejido pulmonar	neumonía	9
Hidalgo	cervix-vagina	metritis	7
Puebla	cervix-vagina	metritis	1
Baja California Norte	tejido pulmonar	neumonía	11
Querétaro	prepucio	clínicamente sanos	6
			36 aislamientos en total

FIGURAS

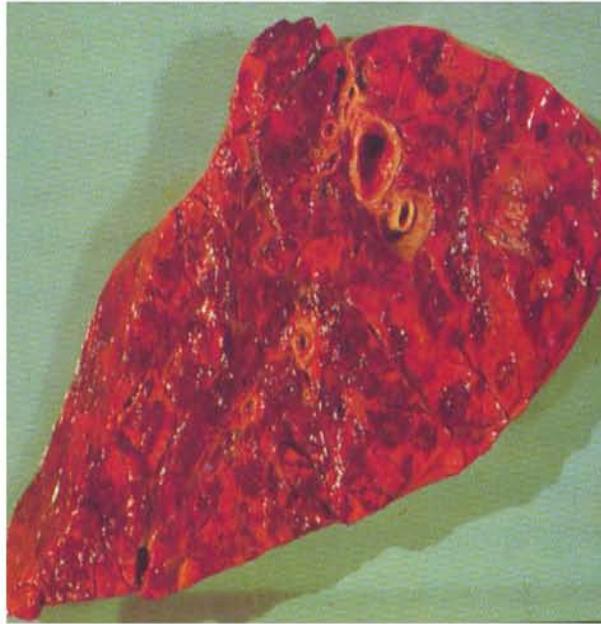


Fig. 1. Muestra de tejido pulmonar con lesiones neumónicas colectada para estudios bacteriológicos enfocados al aislamiento de *H. somni*.



Fig. 2. Aspecto de la morfología colonial y pigmentación ligeramente amarillenta de aislamientos de campo de *H. somni*.

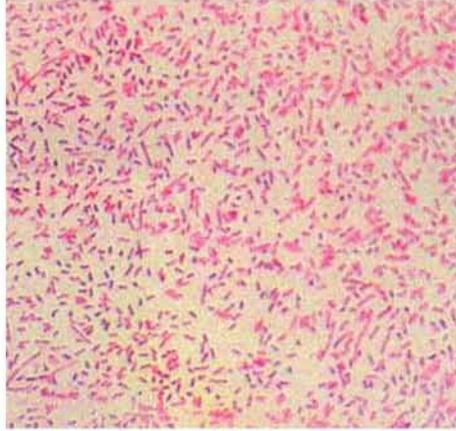


Fig. 3. Frotis de un aislamiento de campo de *H. somni* teñido con GRAM en la que se muestra su pleomorfismo cocobacilar.

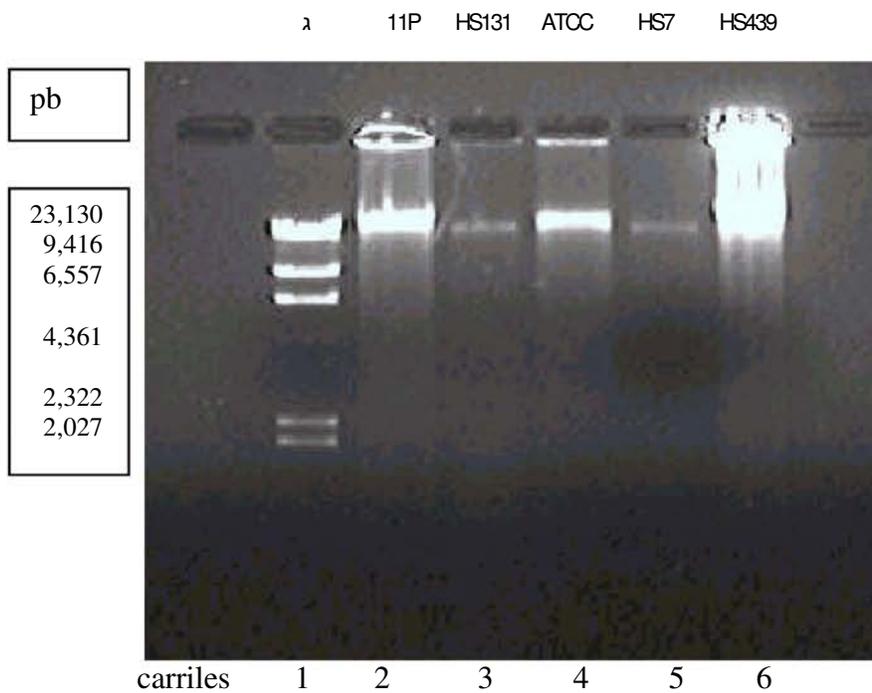


Figura 4. Gel de agarosa al 1% con bromuro de etidio mostrando ADN obtenido de cepas de campo de *H. somni*. Carril 1 marcador de peso molecular, carriles 2,3,5 y 6 cepas de campo, carril 4 cepa tipo de la ATCC.

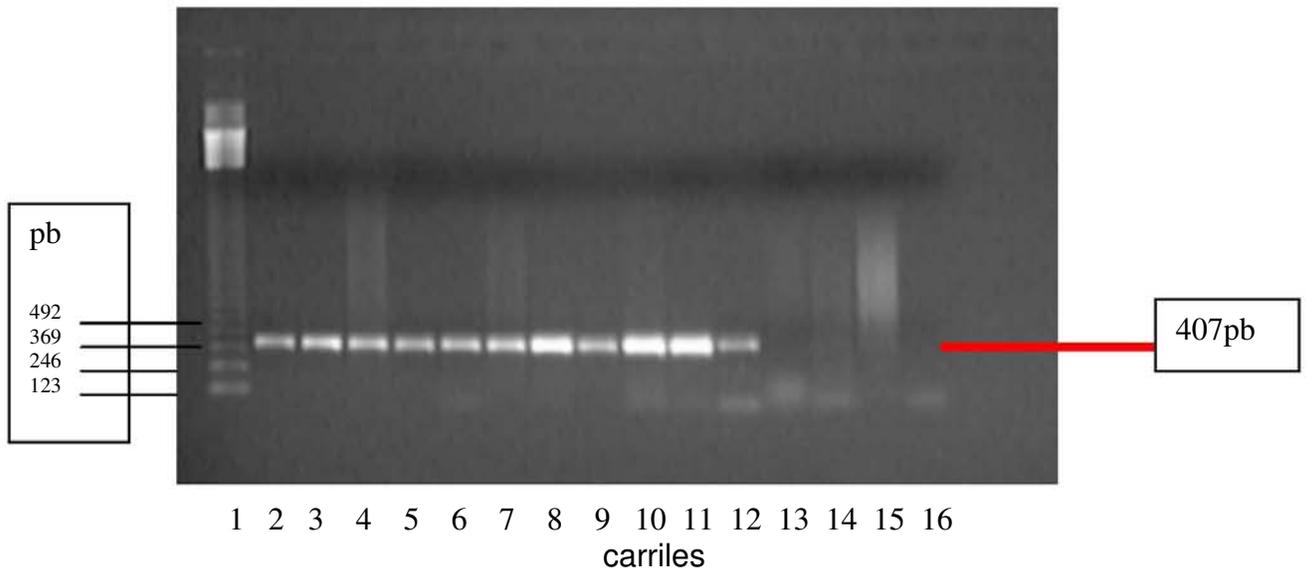


Fig 5 . Productos de PCR de la identificación de las cepas de campo de *H. somni*. Carril 1 Marcador de Peso Molecular 123 (MPM); carril 2 *H. somni* ATCC; carriles del 3 al 6 aislados de prepucio, del 7 al 9 aislados de neumonía, carril 13 *Salmonella enteritidis*; carril 14 *Mannheimia haemolytica*, carril 15 *E. coli*; y 16 control negativo.

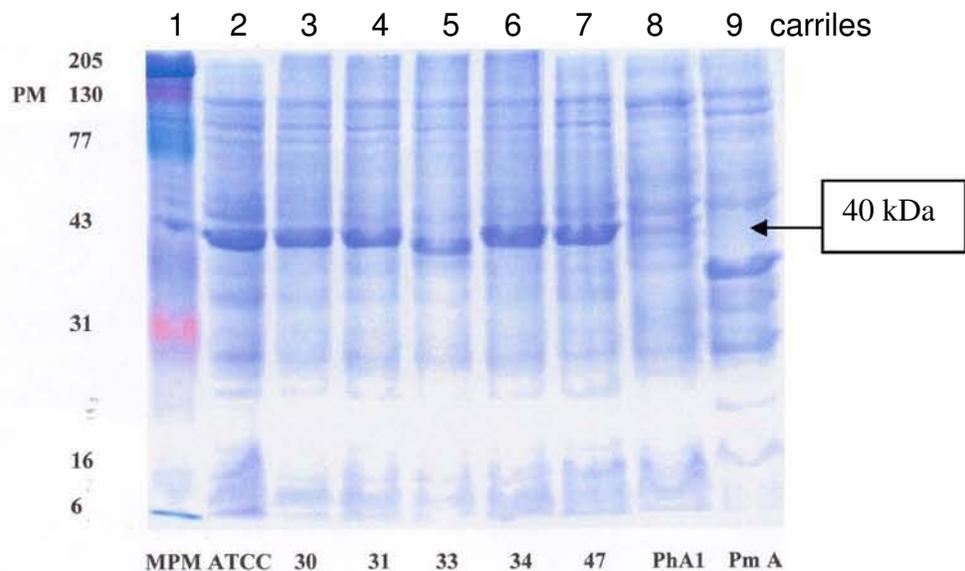


Figura 6. Perfiles de proteínas totales de aislamientos de *Histophilus somni* de casos de neumonía. Carril 1 Marcador de Peso Molecular, carril 2 cepa ATCC, carriles 3 al 7 cepas de campo, carril 8 *Mannheimia haemolytica* y carril 9 *Pasteurella multocida*.

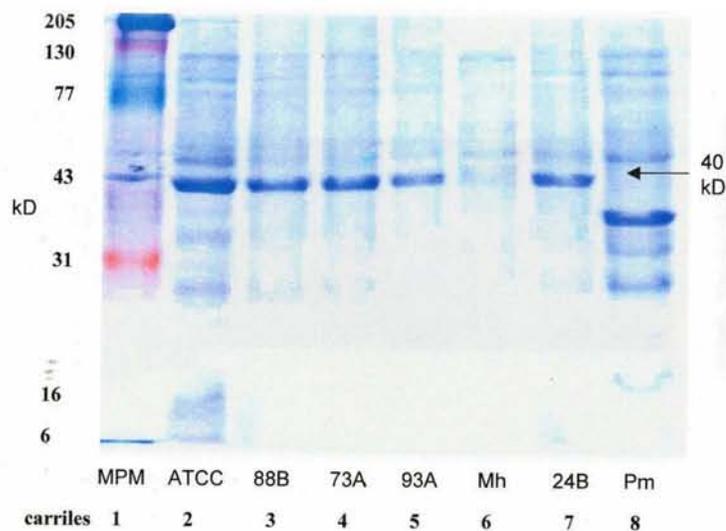


Figura 7. Perfiles de proteínas totales de aislamientos de *Histophilus somni* de casos de neumonía en los carriles 3 al 5 y 7; comparados con la cepa tipo (carril #2), con *Mannheimia haemolytica* y *Pasteurella multocida* (carriles # 6 y 8 respectivamente). Carril 1 Marcador de peso molecular.

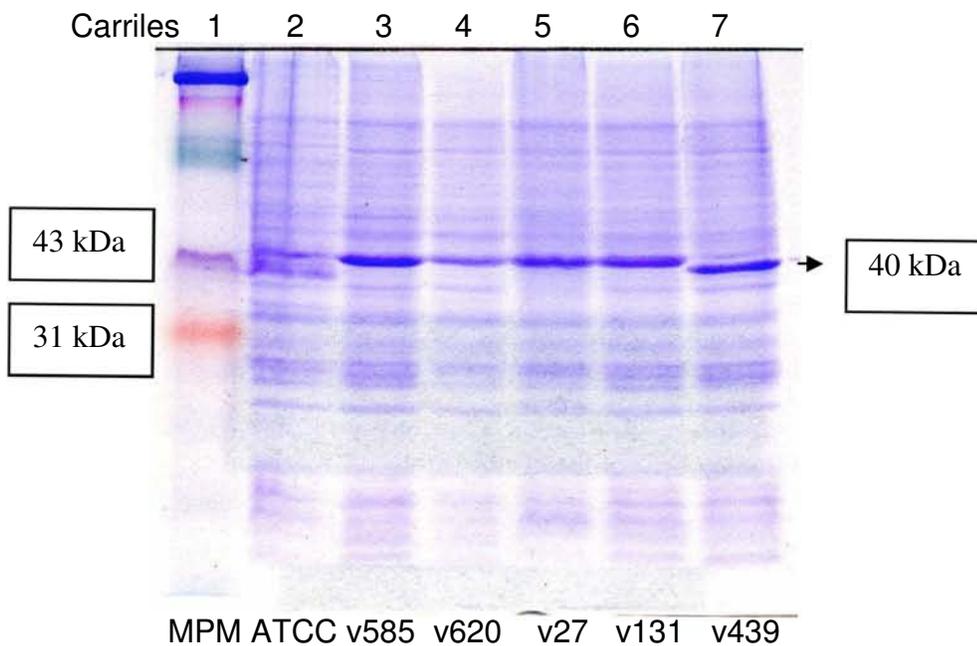


Figura 8. Perfiles de proteínas totales de aislamientos de *Histophilus somni* de casos de metritis en los carriles 3 al 7; comparados con la cepa tipo (carril #2). Carril 1 Marcador de peso molecular.

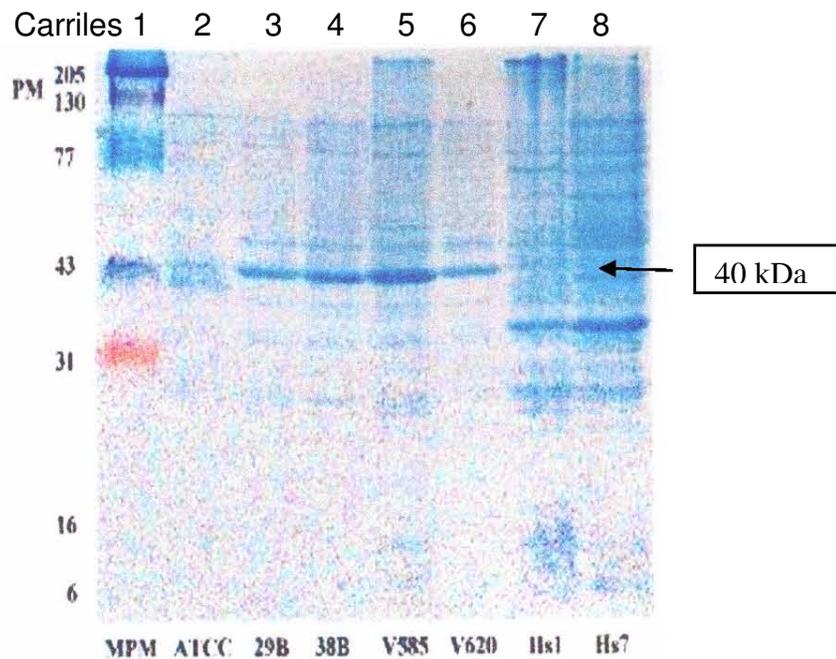


Figura 9. Perfiles de proteínas totales de aislamientos de *Histophilus somni* de neumonías (carriles 3 y 4), metritis (5 y 6) y lavados prepuciales(7 y 8); comparados con la cepa tipo (carril 2).

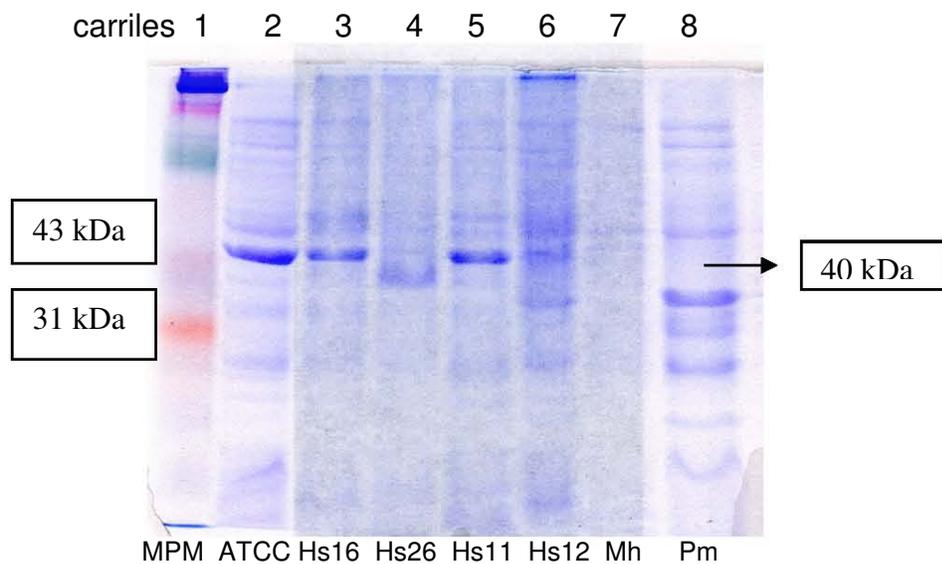


Figura 10. Perfiles de proteínas totales de aislamientos de *Histophilus somni* de lavados de prepucio en los carriles 3 al 6; comparados con la cepa tipo (carril #2), con *Mannheimia haemolytica* y *Pasteurella multocida* (carriles # 7 y 8 respectivamente).

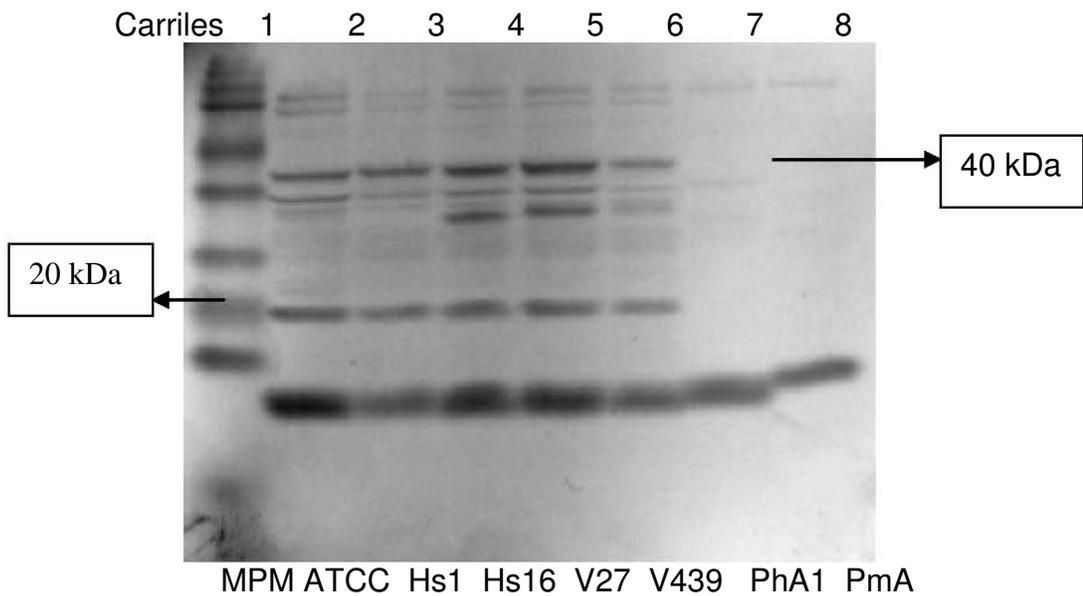


Figura 11. Inmunotransferencia de proteínas totales en la que se utilizó suero policlonal de conejo 1:250 y conjugado 1:500. En el carril 1 marcador de peso molecular, en el 2 la cepa tipo ATCC, en el 3 y 4 cepas de neumonía, 5 y 6 cepas de metritis, el 7 *Mannheimia haemolytica* y el 8 *Pasteurella multocida*.

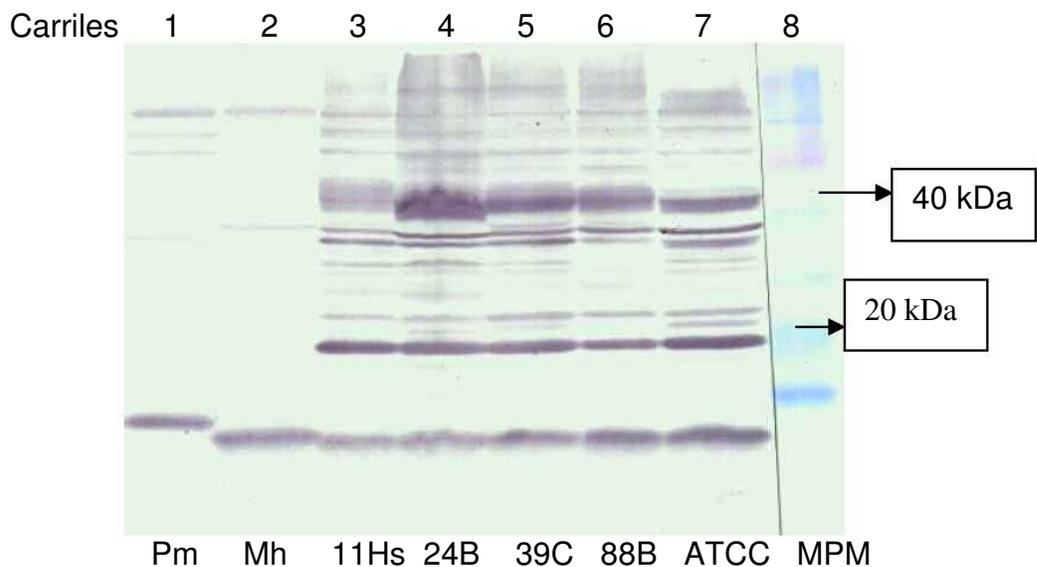


Figura 12. Inmunotransferencia de proteínas totales en la que se utilizó suero policlonal de conejo 1:250 y conjugado 1:500. En el carril 1 *P. multocida*, en el 2 *Mannheimia haemolytica*, del 3 al 6 aislamientos a partir de neumonías, en el 7 cepa tipo y el 8 marcador de peso molecular.

VII. DISCUSIÓN

Durante el proceso del aislamiento de este microorganismo, no se descarta la posibilidad de que se hayan tenido falsos negativos por factores dependientes de los animales muestreados, como que hayan sido sometidos a tratamientos con quimioterapéuticos previos al estudio bacteriológico y por lo tanto el número de bacterias se encontraran disminuidas o inactivadas; también pudo influir una deficiente conservación durante el transporte o almacenamiento de la muestra, antes de su procesamiento en el laboratorio. Es importante señalar que en algunas muestras clínicas se detectó contaminación o microflora normal residente del área anatómica muestreada, lo que pudo repercutir en una baja frecuencia de aislamientos de *H. somni*.

Por otro lado, la identificación de este microorganismo es compleja debido a que presenta una amplia variabilidad en su morfología, reacciones bioquímicas y antigenicidad^{1,2,45}, por lo que fue necesario utilizar herramientas de biología molecular capaces de detectar e identificar material genético de forma específica, como la PCR diseñada específicamente para este microorganismo⁴.

Los resultados obtenidos en el presente estudio con respecto a el aislamiento de cepas a partir de casos de neumonías muestran que para la obtención de muestras de tejido pulmonar, se tuvieron que revisar a lo largo de aproximadamente un año 2340 becerros sacrificados en rastro, de los cuales se obtuvieron 44 muestras, lo que representa el 1.88% del total revisado, lo que parece ser un número bajo, pues representa el haber obtenido menos de una muestra por semana a lo largo del periodo de revisión, de tal forma que con este dato se tiene la impresión de que las neumonías en becerros no es un problema frecuente y por lo tanto sin importancia, sin embargo al comparar estos datos con un estudio previo⁸⁵ realizado en Alemania, en donde revisaron durante 15 meses a 10140 becerros productores de carne sacrificados en rastro se obtuvieron 100 muestras de pulmones con lesiones de neumonía lo que representa un 0.98%, un porcentaje menor que el informado en el presente trabajo. La posible explicación con respecto al presente estudio es que aunque el número de casos de becerros

con lesiones de neumonía fue mucho mayor, éstos no fueron muestreados debido a que llegaron muertos al lugar del sacrificio, procedentes de los diferentes ranchos productores de leche del Valle de México y Tizayuca Hgo.; muchos de ellos incluso con indicios de principios de descomposición. Al extraer las vísceras, los pulmones se observaron con lesiones de neumonía en una gran área de los lóbulos craneales y apicales, con adherencias fibrinosas a la cavidad torácica.

Otro aspecto que pudo influir en el bajo número de pulmones con lesiones de neumonía durante los muestreos fue el día elegido para efectuar el muestreo, aunque había un mayor número de animales para sacrificio y revisión, previo al embarque de los animales para el sitio de sacrificio, se realizaba una selección de los animales en los lugares de acopio como Jalisco, Aguascalientes y Querétaro, descartando los animales con padecimientos. Durante el transporte hasta el sitio del sacrificio es donde probablemente se desarrollaba en algún animal lo que se conoce como fiebre de embarque.

Los resultados del estudio bacteriológico de las 44 muestras indicó que se recuperaron 9 aislamientos de *Histophilus somni* que representan el 20.45% cifra mucho mayor que la encontrada en otro estudio⁸⁵ en donde de 100 muestras aislaron 10 cepas (10%) de *H. somni*, sin embargo en el país anteriormente conocido como Checoslovaquia⁸⁶, se informó que al realizar el estudio bacteriológico de tejido pulmonar de 135 becerros con desórdenes respiratorios aislaron 32 cepas de *H. somni* lo que representa el 23.7%, cifra similar a la del presente estudio.

Por otra parte en el seguimiento que se realizó en establos lecheros de Baja California Norte, en becerras de reemplazo con problemas respiratorios y posteriormente a la necropsia se obtuvieron muestras de 100 animales, en el estudio bacteriológico se aislaron 11 cepas (11%), cifra ligeramente inferior a la encontrada por Buchvarova, 1985⁸⁷, que informó de una recuperación de aislamientos del 13% al trabajar muestras de exudado de 220 becerros con padecimientos respiratorios, los cultivos fueron tanto puros como mixtos con *Pasteurella multocida*, *Mycoplasma bovirhinis* y *M. arginini*, aunque no menciona los porcentaje. Otra cifra similar fue la informada por Binder y col., 1990⁸⁸, al

efectuar el estudio bacteriológico de 162 secreciones traqueobronquiales de becerros con sintomatología de bronconeumonía de donde realizó 16 aislamientos de *H. somni*, en cultivos mixtos con *Mycoplasma bovirhinis* que representan el 9.87%. lo anterior vuelven a confirmar que los problemas respiratorios y en este caso la bronconeumonía de los bovinos es multifactorial, sobre todo participando de manera importante bacterias del género *Mycoplasma* como agente primario.

Al realizar el comparativo de cifras obtenidas en el presente estudio con algunos trabajos similares se encontraron porcentajes de recuperación de cepas de *H. somni* muy parecidos, aunque en el caso particular del muestreo en los establos lecheros es de considerarse que hubo algunos factores que pudieron influir de forma negativa; uno de ellos fue la quimioterapia a la que los animales fueron sometidos como práctica rutinarias de manejo para este tipo de padecimientos, de tal forma que únicamente los animales que no respondieron al tratamiento y murieron a consecuencia de la afección respiratoria, se les realizó la necropsia para obtener la muestra. Al realizar el estudio bacteriológico bajo estas condiciones en las que la presencia bacteriana está disminuida o ausente por el tratamiento, las posibilidades de recuperación de los microorganismos involucrados baja sustancialmente.

Con respecto al muestreo en vacas lecheras con padecimiento en tracto reproductor se obtuvo un 14.8 % de aislamientos de *Histophilus somni*, cifras similares son informadas en estudios de campo realizados en Estados Unidos donde se aisló en 15 % de las muestras de vagina⁸⁹, 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 cervix⁹⁰.

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 con toros infectados^{14,19}. En este mismo país, esta bacteria ha sido aislada frecuentemente en casos de vaginitis purulenta, cervicitis y endometritis postparto de ganado lechero y se ha identificado como el patógeno 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 artificial⁸⁹.

Porcentajes menores de aislamiento han sido informados en Alemania, al realizar estudios del aparato genital de vacas sacrificadas en rastro, donde se encontró un 6.8 % de aislamientos a partir de vagina⁹¹, mientras que en Canadá se encontró un 8 % a partir de vagina, glándulas vestibulares, cervix y útero⁹². Por otro lado también existen otro informe⁹³ de un porcentaje menor de recuperación, ya que al muestrear vacas vivas y obtener exudado cervical de 199 animales obtuvieron 7 aislamientos, significando un 3.5% de recuperación a diferencia de cuando muestrearon a 461 vacas sacrificadas en rastro, recuperaron 28 cepas de *H. somni* siendo un porcentaje del 6.1%.

Las cifras anteriores en general son similares al porcentaje total 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. 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 bajos⁸⁹, por lo que se considera pudieron interferir algunos factores que repercutieron en los resultados finales. Los diversos factores que pudieron haber influido en la recuperación de este microorganismo fue la presencia de contaminantes como *Escherichia coli* y *Proteus* spp., que probablemente inhibieron el crecimiento de la bacteria de interés. Otro aspecto importante pudo haber sido tipo de hisopo y medio de transporte utilizado para conservar la viabilidad de la bacteria hasta el momento del cultivo, ya que en un estudio posterior⁷⁵ al muestrear de prepucio y vagina a un lote de ovinos con un sistema comercial que incluía hisopo y medio de transporte, comparado con el uso de hisopos y medio de transporte de Stuart preparados en el laboratorio, la frecuencia de recuperación fue más alta a partir del hisopo del sistema comercial.

Con respecto al muestreo de prepucio de toros clínicamente sanos, de 45 animales muestreados se obtuvieron 6 aislamientos lo que representa un 13.33%, cifra muy inferior a la informada por Humphrey y col, 1982¹¹ en la que al efectuar el estudio bacteriológico de 23 lavados de prepucio de toros, recupera 14 aislamientos, lo que representa el 60.8%; cifras similares se presentan en otro estudio¹² en el que al estudiar la distribución de la infección por *H. somni* en el tracto reproductor de toros jóvenes sacrificados en rastro, encontraron que a partir de la cavidad prepucial pudieron recuperar 22 cepas de 31 animales estudiados, lo que representa el 71%; igual porcentaje de aislamientos se obtuvieron a partir del orificio prepucial en este mismo estudio.

El papel de *Histophilus somni* como patógeno del aparato reproductor de los bovinos es controversial, debido a que el microorganismo ha sido aislado de animales sin manifestaciones clínicas¹¹, sin embargo también 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^{15,19,21,89,91,92,93} además de ser capaces de producir infecciones en condiciones experimentales^{20,94, 95, 96,97} donde se ha evaluado su participación en la muerte temprana de embriones a diferentes días edad^{20,95} posterior a la inoculación de 1×10^9 microorganismos por vía intrauterina. Otro ejemplo es el establecimiento de la infección en vacas con 6 meses de gestación inoculadas por vía cervical, infección que persistió durante el resto de la gestación y aunque no afectó a los becerros que nacieron aparentemente normales, el microorganismo fue recuperado de algunas membranas de la placenta después del parto, pero de ningún becerro. Una de éstas vacas murió después del parto con una severa metritis necrotizante y neumonía fibrinosa⁹⁴. En otro experimento realizado para evaluar la capacidad de este microorganismo para producir cuadros patológicos, se inocularon 5 vacas con 6 a 7 meses de gestación, con una cepa recuperada de un feto abortado por vía intravenosa con 5 ml de una suspensión a una concentración de 1.1×10^8 UFC/ml provocando aborto en una, otra parió al becerro aparentemente sano aunque la bacteria se recuperó de ambos y las 3 restantes también llegaron a término y la bacteria no se recuperó ni de las vacas o sus crías. Las lesiones

atribuibles a *H. somni* solamente fueron encontradas en el feto abortado⁹⁷. En forma natural se ha encontrado la formación de abscesos asociado a tracto urinario⁹⁸, aspecto importante, debido a que se sabe que la orina es una vía de diseminación y contaminación hacia el medio ambiente al formar aerosoles que son inhalados a vías respiratorias^{99,100}, por lo que se considera podría ser importante incluso en la afección del Sistema Nervioso Central¹⁹, además de considerarse al tracto reproductor como el reservorio mas importante de esta bacteria¹¹.

Del estudio bacteriológico de los 32 encéfalos de bovino con sintomatología nerviosa, no se logró ningún aislamiento de *H. somni*, y en el diagnóstico diferencial paralelo que se efectuó 19 fueron positivos a rabia, uno a listeriosis y otro a encefalomalacia; en los 10 restante no se llegó a el diagnóstico definitivo, dado que los estudios histopatológicos realizados en estos casos no pudieron emitir ningún resultado, debido a que presentaban autólisis, en el resto de las muestras las lesiones microscópicas encontradas no fueron compatibles con las lesiones características causadas por *H. somni*.

En México no se ha informado de ningún caso documentado de Meningoencefalitis Tromboembólica, aunque han existido indicios de esto, como un brote de muertes súbitas en bovinos de corrales de engorda en el Estado de Nuevo León, donde se observó la signología clásica de este padecimiento y al estudio histopatológico se observaron lesiones sugestivas de esta enfermedad⁶⁶, pero no se realizó el estudio bacteriológico, por lo que no se pudo corroborar. Es importante mencionar que en los últimos años, se ha observado una tendencia hacia las disminución de casos de Meningoencefalitis Tromboembólica, surgiendo otras formas de presentación, por lo que actualmente se ha localizado en diferentes sitios anatómicos produciendo mas casos de miocarditis, artritis, mielitis y otitis^{28,29,30,33}. El único caso de afección en el Sistema Nervioso Central debidamente corroborado en América Latina sucedió en Argentina y fue informado por Descarga y col, 2002⁴³.

Las posibles razones de lo anterior no están perfectamente claras, pero algunos autores¹⁰ piensan que es debido a básicamente a dos razones. Actualmente el

diagnóstico rápido y el tratamiento de los casos que se presentan, además de los programas de vacunación y medicación masiva que se han implementado pueden haber modificado la expresión de virulencia de *H. somni*; sin embargo las muertes súbitas y las lesiones subagudas pueden seguirse presentando. La otra situación que pudiera estar sucediendo son las mutaciones y procesos de adaptación que la bacteria sufre como parte de un proceso de selección natural, de tal forma que una gran parte de la población susceptible también puede tener variantes, ya que actualmente gran parte de la población bovina en determinadas áreas geográficas es seropositiva a este microorganismo, por lo que la expresión de la enfermedad puede estarse modificando ^{100,101}.

En México actualmente hay una controversia respecto a la presencia de esta afección en el sistema nervioso, debido a que cuando se presentan brotes de rabia parálitica bovina sobre todo en áreas enzoóticas, o cualquier otra patología con manifestación nerviosa como listeriosis, encefalomalacia o incluso intoxicaciones, los representantes de las compañías farmacéuticas que distribuyen biológicos para la prevención de la histofilosis difunden versiones sin ningún sustento de la presencia de esta enfermedad, con la finalidad de poder comercializar sus productos en la región. Una condición que favorece a crear mayor confusión es la deficiencia en el diagnóstico que se da en determinadas regiones, ya que incluso para el diagnóstico de rabia se llegan a dar resultados diferentes para un mismo caso, además de no contar con los elementos para realizar un diagnóstico diferencial; esto incrementa las dudas entre los Médicos Veterinarios y productores por lo que recurren a utilizar los biológicos propuestos en forma masiva para la prevención de la supuesta enfermedad.

Un factor importante para que esta práctica se dé es la falta de información dentro del gremio de los veterinarios de campo o clínicos dedicados a los bovinos, además de la dificultad diagnóstica ya mencionada, situación que se debe de mejorar o evitar, difundiendo la información concerniente y apoyando con capacitación al personal de esas regiones para poder realizar el diagnóstico diferencial y así conocer realmente la situación referente a este microorganismo sin que estén de por medio los intereses económicos de la industria farmacéutica.

Con respecto a el estudio comparativo de los perfiles de proteínas totales por electroforesis efectuado a las 36 cepas de campo de los diferentes orígenes, se observó que los patrones de los perfiles fueron similares con respecto a la cepa de referencia y entre ellas; excepto en 4 cepas aisladas de prepucio (Hs1, Hs7, Hs12 y Hs26).

Por ejemplo en los 20 aislamientos de origen respiratorio se evidenció una similitud entre sí y con respecto a la cepa tipo; destacando una banda de aproximadamente 40 kDa por presentar una mayor intensidad y una frecuencia constante, datos que coinciden plenamente con una serie de estudios previos^{78, 102, 103} en los que se informa que esta Proteína de Membrana Externa se encuentran en todas las cepas de origen respiratorio de *H. somni*, al igual que en cepas aisladas de abortos, meningoencefalitis y en algunas de prepucio de bovino e incluso en casos de septicemia y de prepucio de ganado ovino⁷⁸. En otros estudios se ha informado de la presencia de una proteína de 41 kDa, por lo que Tagawa y col, 1993,¹⁰⁴ al realizar la purificación y caracterización parcial de proteínas de membrana externa sugiere que esta proteína de 41 kDa, podría ser la misma que la identificada como de 40 kDa.

Perfiles similares se observaron en las cepas obtenidas de casos de metritis en las que fue más evidente la banda de aproximadamente 40 kDa, no así en las cepas aisladas de prepucio en donde hubo 4 cepas que presentaron un perfil diferente, por ejemplo los aislamientos nominados como Hs1, Hs7 y Hs12 presentaron una banda intensa por debajo de los 40 kDa, coincidiendo con lo informado por Ward⁷⁸ que comparó cepas de *Histophilus somni* de origen bovino y ovino obtenido de diferentes órganos, en donde encontró una banda de 33 kDa en las cepas aisladas de prepucio.

De acuerdo con la información existente al respecto, parece ser una constante la presencia de la proteína de aproximadamente 40 kDa en los diferentes aislamientos de *H. somni* e incluso en un trabajo reciente¹⁰⁵ en donde se realizaron 6 aislamientos de esta bacteria a partir de vagina de borregas salvajes (cuernos largos) y se compararon con 2 aislamientos de casos de neumonía de la misma especie, además de 3 aislamientos de borregos domésticos y 2 de bovinos;

los perfiles de proteínas y antígenos fueron similares en todos los casos, aunque se observó que las cepas aisladas de borregos salvajes produjeron menos pigmento y su crecimiento no se vio incrementado por la presencia de CO₂.

Es importante mencionar que otras proteínas de las cuales se ha informado de su existencia constante en la mayoría de las cepas estudiadas en otros trabajos son las de 17.5 y 78 kDa^{106,107}, las cuales no fueron tan evidentes en el presente trabajo, sobre todo la de 17.5 kDa que no se observó en ninguno de los geles teñidos con azul de Coomassie, quizá debido a la poca cantidad de proteína presente en las muestras, pues al utilizar una tinción a base de nitrato de plata en la zona correspondiente a este peso molecular se evidenciaron bandas, que sugieren que esta proteína estaba presente; con respecto a la 78 kDa fue visible aunque con menor intensidad que la banda de 40 kDa.

Con respecto al reconocimiento antigénico de los perfiles de proteínas es evidente la presencia en todas las cepas de *H. somni* de una proteína de aproximadamente 18 kDa la cual no se logró observar en los geles de poliacrilamida, no así en las pruebas de inmunotransferencia que se manifiesta con gran intensidad al ponerla en contacto con un suero policlonal; dicha proteína probablemente sea la que se ha informado se encuentra presente en las cepas estudiadas y que es reconocida como de 17.5 kDa en un estudio previo¹⁰⁶.

Otros estudios corroboran la información anterior, al informar del reconocimiento de estas 3 proteínas por sueros hiperinmunes de becerros que fueron desafiados experimentalmente o que enfermaron y se recuperaron de histofilosis, aunque la proteína de 40 kDa ha sido la más evidente, por lo que estos autores^{102,103,104}, coinciden que esta proteína podría tener un carácter protector. Recientemente Corbeil y col¹⁰⁸, al medir las inmunoglobulinas IgG e IgE en becerros infectados experimentalmente con *Histophilus somni* y Virus Respiratorio Sincitial Bovino, encontró una fuerte respuesta de las IgG fue hacia la proteína de 40 kDa, lo que coincide con los trabajos anteriormente mencionados.

Los resultados obtenidos en el presente estudio sobre el reconocimiento antigénico de estas proteínas, en la que destaca principalmente la proteína de aproximadamente 40 kDa, por su presencia en la mayoría de las cepas

estudiadas, coincide con lo que diversos autores han informado^{102,103,104}, resaltando su importancia en futuras investigaciones donde podría ser usada como un inmunógeno en vacunas subunitarias dirigidas contra el complejo de enfermedades producidas por *H. somni* o bien utilizarla como antígeno para pruebas diagnósticas.

VIII. CONCLUSIONES

- Una aportación de este estudio, que se considera importante, es la formación, por primera vez en México, de una colección de 36 aislamientos de *Histophilus somni*, obtenidos de bovinos con diferente problemática, lo que permitirá en un futuro realizar diferentes estudios con esta colección, tomándola como base e incrementándola.
- Se informa por primera vez en México de la presencia de *Histophilus somni* en casos clínicos de enfermedades del tracto reproductor de vacas lecheras.
- El utilizar como herramienta diagnóstica la prueba de reacción en cadena de la polimerasa (PCR) especie-específica para la identificación de esta bacteria, lo que permitirá una mayor certeza en los estudios que se realicen.
- El estudio comparativo de los perfiles de proteínas totales entre las cepas de campo y la cepa tipo, permitió comprobar que las cepas nacionales tienen un patrón similar a las estudiadas en otros países.
- El reconocimiento antigénico de las proteínas presentes en las cepas de campo, permitió corroborar que la mayoría de las cepas nacionales, independientemente de su origen geográfico y padecimiento de donde fueron aisladas, tienen características antigénicas similares a las cepas estudiadas previamente en otros países.
- Se comprobó la Hipótesis de trabajo planteada en el presente estudio.

IX. LITERATURA CITADA

- 1.-Garcia-Delgado GA, Little PB, Barnum DA. A comparison of various *Haemophilus somnus* strains. Can J Comp Med 1977;(41):380-388.)
- 2.- Humphrey JD, Stephens LR. *Haemophilus somnus*: a review. Vet Bull.1983; (53):987–1004.)
- 3.-Kilian M, Biberstein EL. Genus II. *Haemophilus*, p.558-569. In NR Krieg, Holt JG (ed), Bergey's Manual of Systematic Bacteriology, vol.1. Williams & Wilkins, Baltimore.
- 4.- Angen O, Ahrens P, Tegtmeier C. Development of a PCR test for identification of *Haemophilus somnus* in pure and mixed cultures. Vet Microbiol 1998;(63):39-48.
- 5.- 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.
- 6.- Stephens LR Little PB. Ultrastructure of *Haemophilus somnus*, causative agent of bovine infectious thromboembolic meningoencephalitis. Am J Vet Res. 1981;42:1638:1640
- 7.- Griner LA, Jensen R, Brown W. Infectious embolic meningoencephalitis in cattle. J Am Vet Med Assoc 1956; 129:417-421.
- 8.- Kennedy PC, Biberstein EL, Howarth JA, Frazier LM, Dungworth DL. Infectious meningo-encephalitis in cattle, caused by *Haemophilus*-like organism. Am J Vet Res. 1960; 21:403-409.
- 9.- 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.
- 10.- Harris FW, Janzen ED. The *Haemophilus somnus* disease complex (haemophilosis): a review. Can J Vet Res 1989;(30):816–822
- 11.-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.
- 12.-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.

- 13.-**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.
- 14.-**Stephens LR, Little PB, 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.
- 15.-**Patterson RM, Hill JF, Shiel MJ, Humprey JD. Isolation of *Haemophilus somnus* from vaginitis and cervicitis in dairy cattle. Austr Vet J 1984;(61):301-302.
- 16.-** Van Dreumel AA, Kierstead MA. Abortion associated with *Haemophilus somnus* in a bovine fetus. Can Vet J 1975;(16):367-370.
- 17.-** Chladek DW. Bovine abortion associated with *Haemophilus somnus*. Am J Vet Res 1975;(36):1041.
- 18.-**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.
- 19.-**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.
- 20.-**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):189-198.
- 21.-** Kwiecien JM, Little PB. *Haemophilus somnus* and reproductive disease in the cow: A review. Can J Vet Res 1991;(32):595–601.
- 22.-** Corstvet RE, Panciera RJ, Rinker HB, Starks BL, Howard BS. Survey of tracheas of feedlot cattle for *Haemophilus somnus* and other selected bacteria. J Am Vet Med Assoc 1973; 163:870-873.
- 23.-**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.
- 24.-**Lancaster MJ, McGillivray DJ, Patterson RM. Pneumonia associated with *Haemophilus somnus* in a calf. Aust Vet J 1984;61:269.
- 25.-**Saunders JR, Thiessen WA, Janzen ED. *Haemophilus somnus* infections. I. A ten years (1969-1978) retrospective study of losses in cattle herds in western Canada. Can Vet J 1980; 21:119-123.

- 26.**-Bailie WE, Anthony HD, Weide KD. Infectious thromboembolic meningoencephalitis (sleeper syndrome) in feedlot cattle. J Am Vet Med Assoc 1966; 148:162-166.
- 27.**-Pancieria RJ, Dahlgren RR, Rinker HB. Observations on septicemia of cattle caused by *Haemophilus*-like organism. Pathol Vet 1968; 5: 212-226.
- 28.**-Guichon PT, Pritchard J, Jim GK. *Haemophilus somnus* myocarditis in a feedlot steer. Can Vet J 1988; 29: 1012-1013.
- 29.**-Janzen ED, Myocardial lesions caused by *Hamophilus somnus* in cattle. Can Vet J 1987; 28: 208.
- 30.**-Wessels J, Wessels ME, Thomson L. *Histophilus somni* myocarditis in cattle in the UK. Vet Rec 2004; 154: 608.
- 31.**- Haines DM, Moline KM, Sargent RA, Cambell JR, Myers DJ, Doig PA. Immunohistochemical study of *Haemophilus somnus*, *Mycoplasma bovis*, *Mannheimia haemolytica* and bovine viral diarrhoea virus in death losses due to myocarditis in feedlot cattle. Can Vet J 2004; 45(3) 231-234.
- 32.**-Nation PN, Frelief PF, Gifford GA, Carnal BD, Otitis in feedlot cattle. Can Vet J 1983; 24: 238.
- 33.**-Duarte ER, Hamdan JS. Otitis in cattle, an aetiological review. J Vet Med B Infect Dis Vet Public Health 2004; 51(1):1-7.
- 34.**-Higgins R, Martin JR, Larouche Y, Goyette G. Mastitis caused by *Haemophilus somnus* in dairy cow. Can Vet J 1987; 28: 117-119.
- 35.**-Armstrong KR, Osborne AD, Janzen ED. *Haemophilus somnus* mastitis in a dairy cow. Can Vet J 1986; 27: 211-212.
- 36.**-Lamont HH, Hunt BW. *Haemophilus somnus* and conjunctivitis. Vet Rec 1982; 111: 21.
- 37.**-Webb RF. Clinical findings and pathological changes in *Histophilus ovis* infections of sheep. Res Vet Sci 1983;35(1): 30-34.
- 38.**-McDowell SWJ, Cassidy JP, McConnell W. A case of ovine abortion associated with *Histophilus ovis* infection. Vet Rec 1994;(134): 504.
- 39.**-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.

- 40.-**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.
- 41.-**Kearney KP, Orr MB. An outbreak of *Haemophilus agni-Histophilus ovis* septicaemia in lambs. *N Z Vet J* 1993;(41):149-150.
- 42.-**Siddaramppa S, Inzana TJ. *Haemophilus somnus* virulence factors and resistance to host immunity. *Anim. Health Res Rev* 2004; 5(1): 79-93.
- 43.-**Descarga CO, Piscitelli HG, Zielinski GC, Cipolla AL. Thromboembolic meningoencephalitis due to *Haemophilus somnus* in feedlot cattle in Argentina, *Vet Rec* 2002; 150: 817.
- 44.-**Aguilar RF, Trigo TE, Jaramillo ML, Sanchez-Mejorada PH. Aislamiento de *Haemophilus somnus* a partir de pulmones neumónicos de bovinos. *Tec Pec Méx* 1986;(52):67-73.
- 45.-** Canto GJ, Biberstein EL. Serological diversity in *Haemophilus somnus*. *J Clin Microbiol* 1982; 15: 1009-1015.
- 46.-** Howard MD, Cox AD, Weiserr JN, Schurig GG, Inzana TJ. Antigenic diversity of *Haemophilus somnus* lipooligosaccharide: phase-variable accessibility of the phosphorylcholine epitope. *J Clin Microbiol* 2000 (38): 4412-4419.
- 47.-** Inzana TJ, Glindermann G, Cox AD, Wakarchuk W, Howard MD. Incorporation of N-acetylneuraminic acid into *Haemophilus somnus* lipooligosaccharide (LOS): enhancement of resistance to serum and reduction of LOS antibody binding. *Infection and Immunity* 2002; (70): 4870-4879.
- 48.-** Howard MD, Duncan A, Cox AD, Wakarckuk W, Inzana TJ. Identification of putative genes involved in lipooligosaccharide sialylation in *Haemophilus somnus*. In: Abstracts of the 103rd General Meeting of the American Society for Microbiology, 2003; Abstract Z-003.
- 49.-**Sylte MJ, Corbeil LB, Inzana TJ, Czuprynski CJ. *Haemophilus somnus* induces apoptosis in bovine endothelial cells *in vitro*. *Infection and immunity* 2001; 69:1650:1660.
- 50.-**Sylte MJ, Inzana TJ, Czuprynski CJ, Reactive oxygen and nitrogen intermediates contribute to *Haemophilus somnus* lipooligosaccharide-mediated apoptosis of bovine endothelial cells. *Veterinary Immunology and Immunopathology* 2004; 97:207-217.
- 51.-**Bastida-Corcuera FD, Nielsen KH, Corbeil LB. Binding of bovine IgG2a and IgG2b allotypes to protein A, protein G and *Haemophilus somnus* IgBPs. *Veterinary Immunology and Immunopathology*. 1999; 71: 143-149.

- 52.-**Gogolewski RP, Kania SA, Liggitt HD, Corbeil LB. Protective ability of antibodies against 78 and 40 kilodalton outer membrane antigens of *Haemophilus somnus* strains. *Infect Immun* 1988; 56: 2307-2316.
- 53.-** Czuprynski CJ, Hamilton HL. Bovine neutrophils ingest but do not kill *Haemophilus somnus*. *Infection and Immunity* 1985; 50: 431-436.
- 54.-** Ruby KW, Griffith RW, Kateberle ML. Histamine production by *Haemophilus somnus*. *Comparative Immunology, Microbiology & Infectious Disease* 2002; 25:13-20.
- 55.-**Miller RJ, Renshaw HW, Evans JA. *Haemophilus somnus* complex: antigenicity and specificity of fractions of *Haemophilus somnus* . *Am J Vet Res* 1975;36:1123-1128.
- 56.-**Inzana TJ, Cox A, Glindemann G. Exopolysaccharide production by *Haemophilus somnus*. In: American Society for Microbiology 2002, 102nd General Meeting, Salt Lake City, Utah, Abstrac Z-26.
- 57.-** Inzana TJ, Glindemann G, Larson J, Siddaramppa S. Biofilm formation by *Haemophilus somnus*. In: Proceedings of the 84th Annual meeting of the Conference of Research Workers in Animal Disease, Chicago Il. 2003.
- 58.-** Donlan RM, Costerton JW. Biofilms: survival mechanisms of clinical relevant microorganisms. *Clinical Microbiology Reviews*. 2002; 15: 167-193.
- 59.-** Salmon SA, Watts JL, Yancey RJ. Evaluation of RapID system for identification of *Haemophilus somnus*, *Pasteurella multocida*, *Pasteurella haemolytica* and *Actinobacillus pleuropneumoniae* isolated from cattle and pigs with respiratory disease. *J Clin Microbiol* 1993; 31:1362-1363.
- 60.-** Canto J, Biberstein EL, Schulte TA, Behymer D. Cross-reactivity of *Haemophilus somnus* antibody in agglutination and complement fixation tests and in the enzyme-linked immunosorbent assay. *J Cin Microbiol* 1983; 17(3): 500-503.
- 61.-** Stefaniak T. Detecction of the *Haemophilus somnus* antibodies in the bulls reproductive fluids using ELISA. I. Elaboration of the ELISA for detection of specific antibodies in the IgG, IgM and IgA classes. *Arch Vet Pol* 1993; 33(1):79-88.
- 62.-** Thomson MS, Lauerman LH, Wilt GR. Monoclonal antibodyin the identification of *Haemophilus somnus*. *J Vet Diagn Invest* 1990; 2(2):116-119.
- 63.-** Tegtmeier C, Jensen NE, Jensen HE. Development of a peroxidase-antiperoxidase (PAP) technique for the identification of *Haemophilus somnus* in pneumonic calf lungs in Denmark. *APMIS* 1995; 103(7-8): 540-507.

- 64.-** 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 Pec Méx* 1975;(29):26-33.
- 65.-** Aguilar RF, Trigo TJE, Merino MM, Jaramillo ML, Sánchez-Mejorada PH : Aislamiento de *Haemophilus somnus* de prepucio de toros clínicamente sanos. Memorias del VI Congreso Latinoamericano de Buiatría;1987 agosto; Cd. de México (DF) México: Asociación Mexicana de Médicos Veterinarios Especialistas en Bovinos, A.C. 1987;302-305.
- 66.-** Ramírez RR, Romo GS, Rodríguez LFT, Rivas FM, Rosales CF: Daño septicémico en bovinos y su probable asociación con *Haemophilus somnus*. Memorias del VI Congreso Latinoamericano de Buiatría;1987 agosto; Cd. de México (DF) México: Asociación Mexicana de Médicos Veterinarios Especialistas en Bovinos, A.C. 1987;306-311.
- 67.-** Rodríguez AM, Martínez MJJ, Aguilar RF, Salas TE: Detección de anticuerpos contra *Haemophilus somnus* en bovinos de Tuxtepec, Oaxaca, México. *Vet Méx* 1993;24(4):
- 68.-** Guiris AM, Rosales ME, Báecenas MG, Lara SV, Montaráz CJA. Prevalencia de anticuerpos contra *Haemophilus somnus* en el ganado bovino del estado de Chiapas. *Vet Mex* 2001; 32(3):213-219.
- 69.-** Barajas-Rojas JA, Riemann HP, Franti CE: Application of enzyme-linked immunosorbent assay for epidemiological studies of diseases of livestock in the tropics of México. *Rev sci tech Off int Epiz* 1993;12(3).
- 70.-** Acosta HR, Franco TC, Rodríguez AL, Terán BS, Díaz AE, Aguilar RF: Aislamiento de *Haemophilus somnus* de bovinos productores de carne en el estado de Chihuahua, México. *Tec Pecu Méx* 1995; 33 (1).
- 71.-** Aguilar RF, Juárez BF, Trigo TJF: Neumonía asociada a *Haemophilus somnus* y *Pasteurella multocida* A en bovinos productores de carne confinados en corrales de engorda. Memorias XX Congreso Nacional de Buiatría;1996 agosto. Asociación Mexicana de Médicos Veterinarios Especialistas en Bovinos, AC,
- 72.-** Pijoan AP, Aguilar RF: Resistencia y sensibilidad a antimicrobianos en cepas de *Pasteurella haemolytica*, *P. multocida* y *Haemophilus somnus*, aisladas de becerras lecheras en establos de Tijuana. *Vet Méx* 2000; 31(2):153-156.
- 73.-** Aguilar RF, Trigo TFJ, Herrera LE, Avila GJ, Suárez GF. *Histophilus somni* (*Haemophilus somnus*) aislado en casos de problemas de tracto reproductor de ganado lechero. Primer reporte en México. *Tec Pecu Méx* 2005;43(2) p 185-195.

- 74.-**G. Palomares, F. Aguilar, L. Hernández, J. Acosta, E. Herrera and V. Tenorio Isolation and characterization of *Histophilus somni* (*Haemophilus somnus*) in semen samples of rams with epididymitis. Small Ruminant Research p 221-225: 2005, Vol 60 (3) p 221-225.
- 75.-**Sosa EE. Aislamiento de *Histophilus somni* de tracto reproductor de ovinos clínicamente sanos. (tesis de licenciatura). Unidad Académica Profesional Amecameca,(Edo. de México) México: Universidad Autónoma del Estado de México. 2005.
- 76.-**Quinn PJ, Carter ME, Markey B, Carter GR. Clinical Veterinary Microbiology. España: Ed. Wolfe Publishing, Reimpreso por Mosby International 1998, p 254-258.
- 77.-**Inzana TJ, Corbeil LB. Development of a defined medium for *Haemophilus somnus* isolated from cattle. Am J Vet Res 1987;(48):366–369.
- 78.-**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.
- 79.-**Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis T. Molecular Cloning. A laboratory manual. Second Edition, USA:Cold Spring Laboratory Press; 1989.
- 80.-** Biberstein EL, Gills M, Knight H. Serological types of *Pasteurella haemolytica*. Cornell Vet 1960; 50:283-300.
- 81.-**Williams MJ, Smith LG, Murdock MF. Immunogenicity of a *Haemophilus somnus* bacterin in cattle. Am J Vet Res 1978; 39 (11): 1756-1762.
- 82.-**Behymer D, Riemann H. Enzyme Linked Immunosorbent Assay. Guía de Laboratorio. Laboratorio Multidisciplinario, área de Hematología y Serología. Escuela de Medicina Veterinaria y Zootecnia. Universidad Autónoma de Baja California. México, 1998.
- 83.-**Ausubel F, Brent R, Kingston RE, Moore DD, Seidman JG, Smith JA, Struhl. Short Protocols in Molecular Biology. 3rd. Edition. Wiley and Sons, Inc. USA. 1995.
- 84.-**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.
- 85.-** Haziroglu R, Erdeger J, Gulbahar MY, O Kul O. Association of *Pasteurella haemolytica*, *Pasteurella multocida* and *Haemophilus somnus* with pneumonia in calves. Dtsch Tierarztl Wochenschr 1997; 104(4): 150-153.

- 86.-** Svastova A. *Haemophilus somnus* as a cause of bronchopneumonia in calves. Vet Med (Praha), 1988; 33(4): 193-200.
- 87.-** Buchvarova I. Isolation of *Haemophilus somnus* from cattle. Vet Med Nauki, 1985; 22(7): 15-21.
- 88.-** Binder A, Amtsberg G, Dose S, Fischer W, Scholz H, Kirchhoff H. Examination of cattle with respiratory diseases for Mycoplasma and bacterial bronchopneumonia agents. Zentralbl Veterinarmed B 1990; 37(6): 430-435.
- 89.-** 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.
- 90.-** Nowackj W, Molenda J, Stefaniak T, Chelmonska A, Nikolajczuk M: Izolacja *Haemophilus somnus* dróg rodnych krów. Med Weter 1998; 44: 36-39.
- 91.-** Weisser W, Albert K: *Haemophilus somnus* und *Corynebacterium pyogenes* vorkommen im vaginalsecret fruchtbarkeit-sgestorter rinder in Nordwurttemberg. Tierarztl Umsch 1987; 42: 596-600.
- 92.-** 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.
- 93.-** 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.
- 94.-** 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.
- 95.-** 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.
- 96.-** Patterson RM, Mitchell GM, Humphrey JD, Stephens LR. Experimental induction of vaginitis in heifers by infection with *Haemophilus somnus*. Austr Vet J 1986;20:163-165.
- 97.-** Stuart AF, Corbel JM, Richardson C, Brewer AR, Bradley R, Bridges WA. Experimental *Haemophilus somnus* infection in pregnant cattle. Br vet J 1990; 146 (1) :57-67.
- 98.-** Starost FM. *Haemophilus somnus* isolated from a urachal abscess in a calf. Vet Pathol 2001; 38:547-548.

- 99.-** Dewey KJ, Little PB. Environmental survival of *Haemophilus somnus* and influence of secretions and excretions. *Can J Comp Med* 1984; 48:23-26.
- 100.-** Dierks RE, Hanna SA, Dilliman RC. Epizootiology and pathogenesis of *Haemophilus somnus* infection. *J Am Vet Med Assoc* 1973; 163:866-869.
- 101.-** Sanfacon D, Higgins R. Epidemiology of *Haemophilus somnus* infection in dairy cattle in Quebec. *Can J Comp Med* 1983;47:456-459.
- 102.-** Corbeil LB, Jill EA, Smith JW, Barbet AF. Antigenic specificity of convalescent serum from cattle with *Haemophilus somnus* induced experimental abortion. *Infection and Immunity* 1987; 55(6): 1381-1386.
- 103.-** Corbeil LB, Kania AS, Gogolewski PR. Characterization of immunodominant surface antigens of *Haemophilus somnus*. *Infection and Immunity* 1991; 59 (12): 4295-4301.
- 104.-** Tagawa Y, Ishikawa H, Yuasa N. Purification and partial characterization of the mayor outer protein of *Haemophilus somnus*. *Infection and Immunity* 1993; 61(1): 91-96.
- 105.-** Ward CA, Weiser CG, Anderson CB, Cummings JP, Arnold FK, Corbeil BL. *Haemophilus somnus* (*Histophilus somni*) in bighorn sheep. *Can J Vet Res* 2006; 52 (1): 34-39.
- 106.-** Tagawa Y, Haritani M, Yuasa N. Characterization of an immunoreactive 17.5 kilodalton outer membrane protein of *Haemophilus somnus* by using a monoclonal antibody. *Infection and Immunity* 1993; 61(10): 4153-4157.
- 107.-** Kania AS, Gogolewski PR, Corbeil BL. Characterization of a 78 kilodalton outer membrane protein of *Haemophilus somnus*. *Infection and Immunity* 1990; 58(1): 237-244.
- 108.-** Corbeil LB, Berghaus LJ, Arnold KF, Anderson ML, Kimbal R, Gershwin LJ. Immune response to *Haemophilus somnus* in dual infection with *H. somnus* and BRSV. *ASM Conference Pasteurellaceae 2005, Big Island Hawaii, USA. October 23-26 2005: p58.*