

# Deteción de anticuerpos contra *Haemophilus somnus* en bovinos del municipio de Tuxtepec, Oaxaca, México

Marcos Rodríguez Altamirano\*  
José Juan Martínez Maya\*\*  
Francisco Aguilar Romero\*\*\*  
Enrique Salas Téllez\*\*\*\*

## Resumen

Se buscó la identificación de anticuerpos contra *Haemophilus somnus* en bovinos del municipio de Tuxtepec, Oaxaca. De enero a junio de 1989, se colectaron 300 muestras séricas de bovinos clínicamente sanos seleccionados al azar, las cuales fueron procesadas mediante la prueba de Inmunodifusión en gel, por poseer una alta especificidad ante este microorganismo. Los resultados mostraron 2% de seropositividad.

## Introducción

*Haemophilus somnus* es una bacteria que afecta a los bovinos, produciendo una amplia variedad de alteraciones septicémicas; entre ellas, la meningoencefalitis tromboembólica infecciosa destaca por sus lesiones a nivel de sistema nervioso central.<sup>3, 8, 9, 15</sup> *H. somnus* no requiere de factores nutricionales específicos del género, por lo que se le considera un *Haemophilus* no verdadero, y una especie de clasificación incierta.

Desde que la meningoencefalitis tromboembólica infecciosa fue descrita por primera vez en 1959 en Colorado, EUA.<sup>2, 10, 24, 26</sup> *H. somnus* se ha encontrado con una amplia distribución en el mundo, con mayor presentación de octubre a diciembre.<sup>24</sup> En algunas áreas de Estados Unidos se ha observado hasta un 25% de bovinos con anticuerpos contra *H. somnus*. En Canadá, de 1969 a 1978, se registraron 838 casos; también se ha notificado en diversos países europeos,<sup>3, 8, 9, 21, 25</sup> en Japón,<sup>28</sup> Rusia<sup>14</sup> y Nueva Zelanda.<sup>29</sup>

En México, Correa *et al.*<sup>4</sup> encontraron 25% de seropositividad en bovinos con problemas reproductivos y

respiratorios en el Estado de México, en los de Puebla y Yucatán, así como en el Distrito Federal. Aguilar *et al.* aislaron *H. somnus* en lavados prepuciales de toros clínicamente sanos. En otro estudio, encontraron un 6% de seropositividad mediante la prueba de Inmunodifusión en Gel (IDG), así como el aislamiento en pulmones de becerros con problemas neumónicos en los estados de Chihuahua, Tamaulipas, Puebla e Hidalgo.<sup>1</sup>

El microorganismo es capaz de producir diversas afecciones, con cuadros clínicos que incluyen la meningoencefalitis tromboembólica infecciosa, neumonías,<sup>8</sup> artritis, infección genital,<sup>9, 10, 12, 16, 20, 22, 28</sup> aborto,<sup>6, 7</sup> infertilidad,<sup>3</sup> mastitis,<sup>11</sup> conjuntivitis,<sup>17</sup> síndrome de becerros débiles,<sup>30</sup> orquiepididimitis<sup>19</sup> y muerte embrionaria temprana.<sup>14</sup> Para el diagnóstico se han empleado diversas pruebas serológicas,<sup>9, 13</sup> sin embargo, presentan gran cantidad de reacciones, indeseables o cruzadas.<sup>13</sup> García-Delgado *et al.*<sup>9</sup> encontraron que la prueba de Inmunodifusión en Gel (IDG) es muy específica, mas poco sensible.<sup>27</sup>

En México, falta mayor conocimiento del microorganismo, ya que su presencia puede confundirse con otras enfermedades de cuadros clínicos similares, lo que dificulta el diagnóstico, pudiendo estar involucrado en procesos patológicos que ocasionan pérdidas, sobre todo en regiones eminentemente ganaderas, por lo que es indispensable realizar inicialmente estudios encaminados a determinar la magnitud del problema.

## Material y métodos

De enero a junio de 1989, se colectaron 300 sueros de bovinos clínicamente sanos, de diferente edad, sexo, propósito y raza, en diez ranchos escogidos aleatoriamente mediante un muestreo sistemático en el municipio de Tuxtepec, Oaxaca, tomando 30 animales en cada rancho.

Los sueros se mantuvieron en refrigeración durante su transporte al laboratorio del proyecto Enfermedades Bacterianas de los Rumiantes del Centro Nacional de Investigaciones Disciplinarias en Microbiología (CENID-M), del INIFAP-SARH, donde se conservaron en congelación a -20 C, hasta el momento de realizar la prueba.

**Obtención del antígeno inmunizante.** Se utilizó la cepa de referencia 2336 de *H. somnus*, la cual fue

Recibido para su publicación el 28 de septiembre de 1992

- \* Este trabajo forma parte de la tesis de Licenciatura del primer autor. Escuela de Medicina Veterinaria y Zootecnia. Universidad Autónoma Benito Juárez de Oaxaca. Oaxaca, México.
- \*\* Departamento de Medicina Preventiva y Salud Pública. Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia. Universidad Nacional Autónoma de México, 04510, México, D.F.
- \*\*\* Centro Nacional de Investigaciones Disciplinarias en Microbiología (CENID-M). INIFAP-SARH, km 15.5 Carretera México-Toluca, Palo Alto, Cuajimalpa, México, D.F.
- \*\*\*\* Departamento de Microbiología. Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia, Facultad de Estudios Superiores-Cuautitlán. Universidad Nacional Autónoma de México. México, D.F.

sembrada en agar chocolate y sus agregados como medio específico<sup>1</sup> para obtener suficientes microorganismos. Después de 48 h de incubación la cepa se cosechó y las células fueron diluidas con solución salina formolizada al 0.5% y ajustada a una densidad óptica de 0.39 a 550 nm en un espectrofotómetro,<sup>1,3</sup> lo cual se utilizó para la inmunización de conejos.

**Obtención del suero hiperinmune.** Se realizó en dos conejas clínicamente sanas, siguiendo el protocolo de inmunización sugerido por Cantó y Biberstein.<sup>3</sup> Se efectuó un sangrado en blanco el día 21, para obtener el testigo positivo; previamente a la inmunización se obtuvo suero como testigo negativo, manteniéndose en congelación hasta su uso.

**Preparación del antígeno para la prueba.** El antígeno se preparó destruyendo las estructuras bacterianas por ultrasonido, de acuerdo al método citado por Williams *et al.*<sup>31</sup> y modificado por Aguilar *et al.*<sup>1</sup> al centrifugar este antígeno a 3000 gravedades (xg) en vez de 1086 xg durante 10 min y ajustar el sobrenadante a una densidad óptica de 1.0 a 550 nm.

**Prueba de inmunodifusión.** Antes de probar los sueros, se verificaron los testigos y el antígeno.<sup>2,3</sup> Para la IDG se usó la técnica descrita por Williams *et al.*<sup>31</sup> con la diferencia de que se empleó agar noble al 1% en lugar de agar purificado, utilizando 10 ml en cada caja de Petri en lugar de 5 ml.<sup>1</sup> Las cajas se perforaron, haciendo 8 grupos de 7 pozos;<sup>31</sup> en cada grupo, 6 pozos fueron colocados en forma simétrica alrededor de un pozo central,<sup>1</sup> los que fueron identificados en forma progresiva siguiendo el sentido de las manecillas del reloj. En el pozo central se agregaron diez microlitros de antígeno y en los pozos marcados con los números marcados 1 y 4 se agregó la misma cantidad de suero testigo positivo y testigo negativo respectivamente, empleando los cuatro pozos restantes para los sueros problema. Las cajas fueron colocadas en una cámara húmeda y se incubaron a 37°C durante 72 h.<sup>9</sup>

La lectura se realizó a las 24, 48 y 72 h de acuerdo con el criterio usado por Williams *et al.*<sup>31</sup>

Los resultados se expresan en porcentaje de seropositivos en la población animal muestreada considerando algunos otros factores como edad y sexo.

Para el análisis estadístico de los resultados, se utilizó una diferencia de medias considerando una prueba de Z,<sup>5</sup> con un nivel de significancia de 0.05.

El tamaño de la muestra se determinó tomando en cuenta la prevalencia de 6%<sup>1</sup> y un coeficiente en el estimador de 5% a través de la siguiente ecuación:  $N = (1-P)/(PV)$  donde N = Tamaño de la muestra; P = Prevalencia y V = Coeficiente de variación, lo que da como resultado 313 muestras,<sup>23</sup> valor que se redondeó a 300.

## Resultados

De los 300 sueros de bovinos analizados, 6 (2%) resultaron positivos.

En relación con la edad, de los animales positivos, 1 (16.6%) tenía aproximadamente 1.8 años, 2 (33.3%)

de aproximadamente 4 años, 2 (33.3%) de 5 años y 1 de 6 años (13.3%).

Respecto al sexo, los 6 positivos fueron hembras.

## Discusión

En el muestreo efectuado en el municipio de Tuxtepec, Oaxaca, se encontró un 2% de seropositividad a *H. somnus*, cifra menor que la encontrada por otros autores en diferentes lugares, empleando la misma técnica;<sup>1</sup> sin embargo, no se encontró una diferencia estadísticamente significativa ( $P < 0.05$ ). Cabe señalar que las cifras encontradas en el estado de Puebla (2.9%)<sup>1</sup> son similares a las halladas en la presente investigación; dicha similitud pudo deberse a la proximidad geográfica entre ambas regiones.

En cuanto al sexo, el que todos los positivos hayan sido hembras, pudo deberse a que éstas se conservan en el hato hasta la vida adulta para pie de cría, mientras que los machos son enviados a ranchos o potreros de engorda y en general son llevados a sacrificio a más temprana edad; además, los pocos machos muestreados en el estudio fueron terneros antes del destete y sementales. También pudo haber sucedido que los ganaderos presentaban sólo a ciertos grupos de animales durante el muestreo, por ejemplo, a aquellos que se agrupan más fácilmente. Por lo anterior y sobre todo por el poco número de positivos, no fue posible comparar los resultados en este rubro.

Respecto a edad, se muestrearon animales de diferentes edades y aunque se observa una tendencia a aumentar, y posteriormente a disminuir, con dificultad pueden hacerse inferencias al respecto, por el poco número de reactores positivos. El bajo porcentaje de seropositivos encontrados pudo deberse a varios factores:

**Origen de los animales:** Todos los animales muestreados eran originarios de la región, lo que pudo influir sobre las bajas tasas del problema, pudiendo variar en zonas con mayor movimiento de animales.

**Tipo de explotación:** Generalmente en la zona se presenta un sistema de explotación extensivo. Según algunos autores citados por Humphrey *et al.*,<sup>12</sup> se ha encontrado mayor porcentaje de seropositivos en animales sometidos a un sistema intensivo, donde factores como el hacinamiento y manejo facilitan la difusión del microorganismo.

**Tipo de prueba:** Aunque la ventaja de la prueba es una alta especificidad,<sup>9</sup> tiene el defecto de ser poco sensible,<sup>26</sup> lo que se traduce en una menor capacidad para detectar todos los sueros verdaderamente positivos.<sup>18</sup> En cambio, la prueba de ELISA posee una sensibilidad, mas presenta el riesgo de reaccionar de manera "cruzada". Por ende, hay que buscar pruebas más sensibles y específicas.

Dado que en el área se comprobó la presencia de animales seropositivos, convendría aislar e identificar *H. somnus* para validar las pruebas serológicas, así como dilucidar en forma más concreta sus características epidemiológicas, mediante la estratificación de la mues-

tra por grupos de edad, sexo, tipo de explotación, etcétera.

## Abstract

Identification of antibodies against *Haemophilus somnus* in cattle from Tuxtepec, Oaxaca, Mexico, was searched. Three hundred samples at random of healthy bovine serum were collected from January to June 1989. These samples were processed by the immunodiffusion gel test, which has a high specificity towards the microorganism. Results showed a 2% seropositivity.

## Literatura citada

1. Aguilar, R.F., Jaramillo, M.L. y Trigo, T.F.: *Haemophilus somnus*: Aislamiento en neumonías de becerros y estudio seroepidemiológico. Memorias del VI Congreso Latinoamericano de Buiatría. México, D.F. 1987. 296-301. *Asociación Mexicana de Médicos Veterinarios Especialistas en Bovinos y Pequeños Rumiantes*. México, D.F. (1987).
2. Aguilar, R.F., Trigo, T.E., Merino, M.M., Jaramillo, M.L. y Sánchez-Mejorada, P.H.: Aislamiento e identificación de *Haemophilus somnus* en México. Memorias de la Reunión de Investigación Pecuaria en México. México, D.F. 1985. 58. *Secretaría de Agricultura y Recursos Hidráulicos y Universidad Nacional Autónoma de México*. México, D.F. (1985).
3. Canto, G.J. and Biberstein, E.L.: Serological diversity in *Haemophilus somnus*. *Clin. Microbiol.*, 15: 1009-1015 (1982).
4. Correa, G.P., Brown, L.N. y Bryner, J.H.: Presencia de anticuerpos contra Rinotraqueitis 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.*, 29: 26-33 (1975).
5. Daniel, W.W.: Bioestadística: Bases para el Análisis de las Ciencias de la Salud. *Limusa*, México, D.F., 1985.
6. Dreumel van, A.A. and Kierstead, M.: Abortion associated with *Haemophilus somnus* infection in a bovine fetus. *Can. vet. J.*, 16: 367-370 (1975).
7. Firehammer, B.D.: Bovine abortion due to *Haemophilus* species. *J. Am. vet. med. Ass.*, 135: 421-422 (1959).
8. Forray, A., Varga, J., Amtsberg, G., Fodor, L. and Szazados, I.: Isolation of *Haemophilus somnus* from calves. *Magy. Allatorv. Lapja*, 39: 209-212 (1984).
9. García-Delgado, G.A., Little, P.B. and Barnum, D.A.: A comparison of various *Haemophilus somnus* strains. *Can. J. comp. Med.*, 41: 380-388 (1977).
10. Harris, F. and Janzen, E.: The *Haemophilus somnus* disease complex (Haemophilosis): A review. *Can. vet. J.*, 30: 816-822 (1989).
11. Hazlett, M.J., Little, P.B. and Barnum, D.A.: Experimental production of mastitis with *Haemophilus somnus* in the lactating bovine mammary gland. *Can. vet. J.*, 24: 135-136 (1983).
12. Humphrey, J.D., Little, P.B., Stephens, L.R., Barnum, D.A., Doig, P.A. and Thorsen, J.: Prevalence and distribution of *Haemophilus somnus* in the male bovine reproductive tract. *Am. J. vet. Res.*, 43: 791-795 (1982).
13. Humphrey, J.D. and Stephens, L.R.: *Haemophilus somnus*: A review. *Vet. Bull.*, 53: 987-1004 (1983).
14. Kaneene, J.B., Coe, P.H., Gibson, C.D., Yamini, B., Morrow, D.A. and Marinez, R.O.: The role of *Haemophilus somnus* in bovine early embryonic death. III. The effect of the organism on embryos by day 21 postbreeding. *Theriogenology*, 27: 737-749 (1987).
15. Kilian, M. and Biberstein, E.L.: *Haemophilus*. In: *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*. Vol. 1. Edited by: Krieg, N.R., Holt, J.G., 558-569. *Williams and Wilkins*, Baltimore, Maryland, 1984.
16. Kwiecien, J. and Little, P.: *Haemophilus somnus* and reproductive disease in the cow: A review. *Can. vet. J.*, 32: 595-601 (1991).
17. Lamont, H. and Hunt, B.W.: *Haemophilus somnus* and conjunctivitis. *Vet. Rec.*, 111: 21 (1982).
18. Lilienfeld, A.M. y Lilienfeld, D.E.: Fundamentos de Epidemiología. *Sistemas Técnicos de Edición*, México, D.F., 1986.
19. Metz, A.L., Haggard, D.L. and Hakomaki, M.R.: Chronic suppurative orchiepididymitis associated with *Haemophilus somnus* in a calf. *J. Am. vet. med. Ass.*, 184: 1507-1508 (1984).
20. Miller, R.B., Barnum, D.A. and McEntee, K.E.: *Haemophilus somnus* in the reproductive tracts of slaughtered cows: Location and frequency of isolation and lesions. *Vet. Pathol.*, 20: 515-521 (1983).
21. Miller, R.B., Camp van, S.D. and Barnum, D.A.: The effects of intra-amniotic inoculation of *Haemophilus somnus* on the bovine fetus and dam. *Vet. Pathol.*, 20: 574-583 (1983).
22. Miller, R.B., Lein, D.H., McEntee, K.E., Hall, C.E. and Shin, S.: *Haemophilus somnus* infection of reproductive tract of cattle: A review. *J. am. vet. Med. Ass.*, 182: 1390-1392 (1983).
23. Navarro, F.R.: Introducción a la Bioestadística. *McGraw-Hill*, México, D.F., 1988.
24. Saunders, J.R., Thiessen, W.A. and Jansen, E.D.: *Haemophilus somnus* infection. I. A ten year (1969-1978) retrospective study of losses in cattle herds in western Canada. *Can. vet. J.*, 21: 119-123 (1980).
25. Slee, K.J. and Stephens, L.R.: Selective medium for isolation of *Haemophilus somnus* from cattle and sheep. *Vet. Rec.*, 116: 215-217 (1985).
26. Stephens, L.R., Wilkie, B.N. and Barnum, D.A.: Infectious thromboembolic meningoencephalitis in cattle: A review. *J. Am. vet. med. Ass.*, 178: 378-384 (1981).
27. Stephens, L.R., Wilkie, B.N. and Barnum, D.A.: Humoral immunity in experimental thromboembolic meningoencephalitis in cattle caused by *Haemophilus somnus*. *Am. J. vet. Res.*, 42: 468-473 (1981).
28. Sugimoto, C., Mitani, K., Nakazawa, M., Sekizaki, T., Terakado, N. and Isayama, Y.: *In vitro* susceptibility of *Haemophilus somnus* to 33 antimicrobial agents. *Antimicrob. Agents Chemother.*, 23: 163-165 (1983).
29. Thompson, K.G., Vickers, M.C., Stevenson, B.J. and Davidson, G.W.: Thromboembolic meningoencephalitis caused by *Haemophilus somnus* infection in a bull calf, a new disease in New Zealand. *N. Z. vet. J.*, 35: 5-7 (1987).
30. Waldham, D.G., Hall, R.F., Meinershagen, W.A., Card, C.S. and Frank, F.W.: *Haemophilus somnus* infection in the cow as a possible contributing factor to weak calf syndrome: Isolation and animal inoculation studies. *Am. J. vet. Res.*, 35: 1401-1403 (1974).
31. Williams, J.M., Smith, G.L. and Murdock, F.M.: Immunogenicity of a *Haemophilus somnus* bacterin in cattle. *Am. J. vet. Res.*, 39: 1956-1962 (1978).