

## BIOTIPIFICACION DE CEPAS DE *Haemophilus somnus* AISLADAS DE BOVINOS.

*Cipolla, A. y col. (\*)*

### Resumen

En los bovinos *Haemophilus somnus* ha sido asociado a infecciones del tracto respiratorio, septicemias y desórdenes reproductivos. Este microorganismo también ha sido involucrado en infecciones subclínicas. En el presente trabajo se biotipificaron 10 cepas de *Haemophilus somnus* aisladas de mucus cérvico-vaginal de vacas con historia de infertilidad y/o abortos (n=8) y pulmón (n=2) de bovinos con signos de neumonía. Las cepas fueron identificadas como *H. somnus* en base a morfología colonial, actividad hemolítica y una batería de 24 pruebas bioquímicas, incluyendo fermentación de 14 hidratos de carbono. Se detectaron los biovares 1 y 2 de *H. somnus*, de acuerdo a la producción de ornitina-decarboxilasa y  $\alpha$ -glucosidasa y la fermentación de xilosa y sorbitol. La identificación de biovares y la caracterización antigénica de los mismos tiene fundamental importancia en la selección de cepas vacunales (132).

### Introducción.

*Haemophilus somnus* ha sido implicado en diferentes trastornos clínico-patológicos en bovinos tales como: encefalitis tromboembólica, neumonías, abortos, septicemias, metritis, artritis y miocarditis (1,6,7,10,12). En Argentina, cepas aisladas de casos de encefalitis, abortos y complejo vaginitis-cervicitis-metritis (2,3,4), han sido clasificadas como *H. somnus*, sin diferenciación de los biovares actuantes. La biotipificación de aislamientos de *H. somnus* es necesaria no sólo para la detección de dichos biovares con el fin de ser utilizados en la elaboración de inmunógenos, sino también para estudios epidemiológicos y de especificidad de huésped, ya que actualmente cepas aisladas a partir de material de bovinos son agrupadas como *H. somnus* o *H. somnus* "like" y en ovinos, reclasificadas como *H. somnus* (ex-grupo *Haemophilus-Histophilus*). El presente trabajo tiene como objetivo biotipificar cepas identificadas como *H. somnus* aisladas de bovinos, mediante el empleo de pruebas bioquímicas específicas.

### Materiales y Métodos.

**Aislamiento:** Muestras procedentes de: a) mucus cérvico vaginal (MCV) de bovinos con antecedentes de aborto o infertilidad, con cultivos negativos a

*Trichomonas foetus*, *Campylobacter fetus* y agentes virales (Diarrea Viral Bovina y Herpes Virus Bovino-1) (n=8) y, b) pulmón de bovinos jóvenes con signos clínicos e histopatológicos de bronconeumonía (n=2), fueron sembradas sobre agar Columbia con sangre bovina al 7%, previa inoculación en medio de transporte Amies en el caso de a) y por siembra directa del espécimen en caso de b), incubados en atmósfera microaerófila y aeróbica a 37°C durante 72 hs. Colonias con características morfológicas y bacterioscopia acorde con *H. somnus*, fueron clonadas sobre agar Columbia con sangre y luego de 48hs, criopreservadas en nitrógeno líquido, hasta efectuar la biotipificación.

**Biotipificación:** En todas las cepas se registró la actividad hemolítica sobre agar sangre bovina y ovina. Las pruebas bioquímicas efectuadas fueron: oxidasa, catalasa, reducción del nitrato, producción de indol, ureasa, dependencia de CO<sub>2</sub>, citrato de Simmons, crecimiento en agar McConkey, ornitina decarboxilasa, movilidad en caldo cerebro-corazón más el agregado de agar (0,4%) y cloruro de 2,35 trifeniltetrazolium (TTC) y fermentación de los siguientes hidratos de carbono: trehalosa, glucosa, xilosa, sorbitol, sacarosa, celobiosa, manitol, maltosa, manosa, rafinosa, salicina, lactosa, fructosa, arabinosa. El medio base utilizado para cada prueba bioquímica fue suplementado con monofosfato de tiamina a razón de 1µg/ml de medio (11).

### Resultados y Discusión.

Todas las cepas crecieron en agar Columbia con sangre bovina y ovina bajo atmósfera de 10% de CO<sub>2</sub>, con morfología y color de colonia, (variable entre blanco-amarillento y amarillo), similar a la de *H. somnus*. Ward y col. (13) detectaron crecimiento de *H. somnus* en medios con sangre de ambas especies animales. En el 60% de las cepas se observó beta hemólisis en agar sangre bovina, mientras que en el 40% restante la hemólisis evidenciada fue de tipo alfa. Cuando se analizó la actividad hemolítica en el agar sangre ovina, el 90% de las cepas mostró hemólisis y ésta siempre fue de tipo alfa. Keister (9) informó que las cepas de *H. somnus* presentan hemólisis de tipo alfa, mientras que Humphrey y col. (8) clasificaron las cepas de acuerdo con la hemólisis presentada, en tres tipos, estableciendo un criterio de cepas medianamente hemolíticas, marcadamente hemolíticas y no hemolíticas, correspondiendo esta última clasificación a la del tipo alfa de otros autores, incluyendo nuestro trabajo. Ward y col. (13) determinaron que 3/4 aislamientos bovinos virulentos de *H. somnus*

hemolíticos en sangre bovina, estaban correlacionados con el estado de portador vaginal. La importancia de la diferencia de actividad hemolítica, características bioquímicas y patogenicidad, radica en la existencia de diferentes biotipos de *H.somnus*. En el presente trabajo, todas las cepas fueron negativas a las siguientes pruebas: catalasa, ureasa, citrato, agar McConkey y movilidad. Sin embargo, en el medio utilizado para evaluar movilidad, se detectó variación entre las cepas con respecto a la reducción del TTC con producción de formazán. En 6 de las cepas se observó una reacción positiva a dicha reducción, mientras que en las otras 4 la reacción fue negativa. De estas últimas, 2 procedían de muestras de pulmón. Se desconoce la existencia de bibliografía referida a dicha reacción para cepas de *H.somnus*.

Un total de 8/10 cepas fueron positivas a la prueba de reducción de los nitratos, siendo las 2 cepas restantes, aisladas de MCV, negativas. La prueba del indol resultó positiva en 4/10 cepas, siendo las 6 restantes negativas. Esto demuestra, como en otros trabajos, que existe variabilidad entre las cepas bovinas con respecto a la producción de indol (5,11). Todas las cepas fueron positivas a la prueba de la oxidasa,  $\alpha$ -glucosidasa y ornitina decarboxilasa. La dependencia del CO<sub>2</sub> fue evidenciada tanto en el primoaislamiento como en los subcultivos.

La totalidad de las cepas fermentaron los siguientes azúcares: xilosa, glucosa, fructosa y mannososa, pero no fermentaron la cellobiosa, salicina, sacarosa y trehalosa. Los resultados positivos y negativos a los azúcares descritos, encontrados en la totalidad de las cepas aisladas por nosotros, coinciden con los hallazgos de Ward y col. (13) para la tipificación de biovares aislados de bovinos. El resto de los azúcares mostró, como en otros trabajos (5) resultados variables.

La fermentación de los azúcares sorbitol y xilosa junto con la producción de ornitina decarboxilasa y  $\alpha$ -glucosidasa, permitió clasificar las cepas de *H.somnus* aquí estudiadas como biovares 1 y 2 según la clasificación de Ward y col. (13).

---

### Conclusiones

---

- 1.- De acuerdo con las pruebas bioquímicas efectuadas en este estudio, en Argentina existen los biovares 1 y 2 de *H.somnus* aislados de bovinos.
- 2.- La biotipificación de *H.somnus* no sólo es necesaria para identificar los aislamientos y biovares como posible agente etiológico de problemas reproductivos, respiratorios y de sistema nervioso, sino también para incluir dichos biovares en la elaboración de vacunas con cepas autóctonas.
- 3.- Los estudios de biotipificación realizados en este trabajo, están actualmente siendo complementados con el análisis molecular, para caracterizar los antígenos actuantes en la patogenicidad de las cepas aisladas.

---

### Summary

---

In bovinus *Haemophilus somnus* (*H. somnus*) has been associated with infections of the respiratory tract, septicemia and reproductive disorders. This microorganism has also been involved in subclinical

infections. In the present work 10 *H.somnus* strains isolated from cervico-vaginal mucus (n=8) of cows with history of intertality and/or abortion, and lung (n=2) of bovines with pneumonia signs, were biotyped. The identification of the *H.somnus* strains was based on the morphology of the colonies, hemolytic activity and reactions in a battery of 24 biochemical tests, including fermentation of 14 carbohydrates. Biovariants 1 and 2 of *H.somnus* were detected, according to the production of ornithine decarboxylase and  $\alpha$ -glucosidase, and sorbitol. The identification and antigenic characterization of the biovariants has importance in the vaccinal strains selection.

---

### Bibliografía.

---

1. Andrews, J.J., Anderson, T.D., Slife, L.N. and Stevenson, G.W. 1985. *Vet. Pathol.*, 22: 131-136.
2. Campero, C., Conosciuto, G., Odriozola, E., Moreira, A., Lodeiro, R., García Bouissou, R. y Hernaiz, R. 1992. *Rev. Med. Vet.*, 73: 264-272.
3. Campero, C., Moreira, A., Daguerre, S., Bartolomé, J., Odriozola, E. 1993. *Vet. Arg.*, 10: 404-408.
4. Carrillo, B., Bardón, J., Combessies, G., Nosedá, R., Delhon, G., Rodríguez, M., Lager, I. y Schudel, A. 1993. *Rev. Med. Vet.*, 74: 282-287.
5. García Delgado, G.A., Little, P.B. and Barnum, D.A. 1976. *Can. J. Comp. Med.*, 41: 380-388.
6. Guichon, P.T., Pritchard, J. and Jim, K.G. 1988. *Can. Vet. J.*, 29: 1012-1013.
7. Harris, F.W. and Jansen, E.D. 1989. *Can. Vet. J.*, 30: 816-832.
8. Humphrey, J.D., Little, P.B., Stephens, L.R., Barnum, D.A., Doig, P.A. and Thorsen, J. 1982. *Am. J. Vet. Res.*, 43: 791-795.
9. Keister, M. 1981. *Comp. Cont. Educ.*, 3: 260-267.
10. Miller, R.B., Barnum, D.A. and McEntee, K.E. 1983. *Vet. Pathol.*, 20: 515-521.
11. Stephens, L.R., Humphrey, J.D., Little, P.B. and Barnum, D.A. 1983. *J. Clin. Microbiol.*, 17: 728-737.
12. Van Dremel, A.A. and Kierstead, M. 1975. *Can. Vet. J.*, 16: 367-370.
13. Ward, A.C., Jaworski, M.D., Eddow, J.M. and Corbeil, L.B. 1995. *Can. J. Vet. Res.*, 59: 173-178.