



# Prevalencia de anticuerpos contra *Histophilus somni* y factores de riesgo en ganado para carne en Yucatán, México

## Prevalence of antibodies against *Histophilus somni* and risk factors in beef cattle in Yucatan, Mexico

José Jesús Solís-Calderón\*    José Candelario Segura-Correa\*\*  
Francisco Aguilar-Romero\*\*\*    Víctor Manuel Segura-Correa\*

---

### Abstract

The purpose of this study was to estimate the seroprevalence of *H. somni* infection and to determine some risk factors associated with the seropositivity in beef cattle in the livestock region of Yucatan, Mexico. Furthermore, the intraherd correlation coefficient ( $r_c$ ) and the design effect (D) were estimated. The animals were selected using a two-stage random sampling. Blood samples were collected from 490 animals from 35 herds, and sera were tested for the detection of antibodies against *H. somni*, using the double agar gel immunodiffusion test. Information about each herd and animal sampled was recorded by a questionnaire personally applied in the farm. Data were analyzed by chi-square tests. Ten herds had zero seropositive animals, 19 had one and six had two seropositive animals. Thirty one out of 490 animals were seropositive. The animal seroprevalence adjusted to herd size was 5.5% (95% confidence interval = 3.5%, 7.5%). Animal seroprevalence in the six municipalities ranged from 3.6% to 9.5%, but no significant differences ( $P = 0.89$ ) were found. The  $r_c$  and D values for *H. somni* seroprevalence were 0 (SE = 0.01) and 1 (SE = 0.19), respectively. The chi-square test did not show association ( $P > 0.10$ ) between the presence of antibodies against *H. somni* and the risk factors investigated.

**Key words:** HISTOPHILUS SOMNI, BEEF CATTLE, SEROPREVALENCE, MEXICO

### Resumen

El propósito de este estudio fue investigar la seroprevalencia de la infección por *H. somni* y determinar algunos factores de riesgo asociados con su seropositividad en ganado para carne en la región ganadera de Yucatán, México. Asimismo, se estimó el coeficiente de correlación dentro de hatos ( $r_c$ ) y el efecto de diseño (D). Los animales se seleccionaron usando un muestreo aleatorio en dos etapas. Las muestras de sangre se recolectaron de 490 animales en 35 hatos, y los sueros se sometieron a análisis para detectar anticuerpos contra *H. somni*, mediante la prueba de inmunodifusión doble en agar. La información acerca del hato y de cada animal muestreado se obtuvo mediante una encuesta aplicada personalmente en el rancho. Los datos se analizaron mediante pruebas de Ji-cuadrada. Diez hatos tuvieron cero animales seropositivos, 19 tuvieron uno, y seis tuvieron dos animales seropositivos. Treinta y uno de los 490 animales fueron seropositivos. La prevalencia animal ajustada por el tamaño del hato fue 5.5% (intervalo de confianza al 95% = 3.5%, 7.5%). La seroprevalencia de los animales en los seis municipios varió de 3.6% a 9.5%, pero no se encontraron diferencias significativas ( $P = 0.89$ ). Los valores de  $r_c$  y D para la seroprevalencia de *H. somni* fueron 0 (EE = 0.01) y 1 (EE = 0.19), respectivamente. Las pruebas de Ji-cuadrada no mostraron asociación ( $P > 0.10$ ) entre la presencia de anticuerpos contra *H. somni* y los factores de riesgo investigados.

**Palabras clave:** HISTOPHILUS SOMNI, BOVINOS, SEROPREVALENCIA, MÉXICO.

---

Recibido el 8 de septiembre de 2006 y aceptado el 9 de noviembre de 2007.

\*Centro de Investigación Regional del Sureste, Instituto Nacional de Investigaciones Forestales, Agrícolas y Pecuarias, Km 25, carretera Mérida-Motul, 97454, Mocochoá, Yucatán, México.

\*\*Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia, Universidad Autónoma de Yucatán, Km 15.5, carretera Mérida-Xmatkuil, A. P. 4-116, Itzimná, Mérida, Yucatán, México.

\*\*\*Centro Nacional de Investigación Disciplinaria en Microbiología Veterinaria, Instituto Nacional de Investigaciones Forestales, Agrícolas y Pecuarias, Carretera libre México-Toluca, Km 15.5, Col. Palo Alto, 05110, México, D. F.

## Introduction

**B**ovine livestock production is one of the main agricultural activities in Yucatan, Mexico. In this area, 75% of the farms are located in the livestock region. Eighty-one percent of the bovine-livestock farms, regardless the production system, are dedicated to beef production and only 17 % and 2 % to the dual-purpose and milk productions.<sup>1</sup> Tropical weather, management, nutrition and disease presence reduce farm profitability. There are several diseases affecting bovines; however, the bovine respiratory complex (BRC) causes great economical losses in the livestock industry, reducing productive parameters of the bovine specialized in dairy, beef and dual-purpose productions. Among diseases affecting bovine, 40% to 80% are respiratory, showing agitated breathing, nasal discharge, cough, conjunctivitis, fever, anorexia and weight loss. The main losses due to BRC are: medical costs from sick animals, maintenance of animals in recovery, decrease in daily-weight-gain, decrease in beef and milk productions and livestock death.<sup>2</sup>

BRC is a multifactorial disease involving several virus, such as bovine infectious rhinotracheitis, bovine viral diarrhea, parainfluenza virus type 3 and bovine syncytial respiratory virus. All this pathogens damage the respiratory tract and predispose animals to bacterial infections. In this sense, another factors such as transport, overcrowding conditions, improper feeding and hostile environmental conditions also influence animal health.<sup>2</sup> Once optimal conditions for bacterial proliferation are created, these affect the animal. Some of the pathogens involved include *Mannheimia haemolytica* type A 1 and its leucotoxin, *Pasteurella multocida* and *Histophilus somni*. These bacteria are usually identified in the respiratory tract as the final cause of pneumonia and death in bovine.

*Histophilus somni* (previously known as *Haemophilus somnus*) is a gram-negative bacterium, associated to septicemia and thromboembolic meningoencephalitis in cattle.<sup>3,4</sup> Nervous problems, pneumonia and arthritis are the most important clinical manifestations seen during *H. somni* infection. This bacterium has been involved in some cases of the weak calf syndrome,<sup>5</sup> mastitis,<sup>6</sup> conjunctivitis,<sup>7</sup> vaginitis and cervicitis,<sup>8</sup> abortion<sup>3</sup> and infertility.<sup>9</sup>

*H. somni* has a worldwide distribution. Correa *et al.*<sup>10</sup> carried out the first study on *H. somni* in four states of Mexico and detected antibodies in sera from cattle with previous history of reproductive and respiratory problems. In a study done in different regions in Mexico, prevalence varied from 2% to 9.2%.<sup>11-15</sup> Livestock farmers from Chiapas, Mexico, have bought farms at the livestock region in Yucatan, Mexico. In some of these cases, animals from Chiapas have been

## Introducción

**L**a producción de ganado bovino es una de las principales actividades agropecuarias en Yucatán, México; 75% de los ranchos se localizan en la región ganadera. De los diferentes sistemas de producción bovina identificados en el estado, 81% de los ranchos se dedican a la producción de carne y sólo 17% y 2% al sistema de doble propósito y producción de leche especializada.<sup>1</sup> El clima tropical, así como el manejo, nutrición y presencia de enfermedades reducen la rentabilidad de los ranchos. Existe una variedad de enfermedades que afectan a los bovinos; sin embargo, el complejo respiratorio bovino (CRB) ocasiona mayores pérdidas económicas a la industria ganadera, reduciendo los parámetros productivos de los bovinos especializados en la producción de leche, carne y doble propósito. De las enfermedades que padece el bovino, entre 40% y 80% son de tipo respiratorio, manifestando respiración agitada, descarga nasal, tos, conjuntivitis, fiebre, falta de apetito y enflaquecimiento de los animales. Las principales pérdidas que ocasiona el CRB son: gastos por medicación de animales enfermos, mantenimiento de bovinos en recuperación, disminución en la ganancia diaria de peso, disminución en la producción de carne y leche y muerte de los bovinos.<sup>2</sup>

El CRB es una enfermedad multifactorial en la que participan diversos virus, como los de rinotraqueítis infecciosa bovina, diarrea viral bovina, parainfluenza 3 y virus respiratorio sincital bovino, que dañan al aparato respiratorio y predisponen a las infecciones bacterianas. Asimismo, influyen factores de estrés como el transporte, hacinamiento, mala alimentación y condiciones ambientales adversas.<sup>2</sup> Una vez creadas las condiciones óptimas para la proliferación bacteriana, éstas ejercen su acción dañina, en la que participan *Mannheimia haemolytica* Tipo A 1 y su leucotoxina, *Pasteurella multocida* e *Histophilus somni*. Agentes que normalmente se identifican en el tracto respiratorio como causa final de la neumonía y muerte de los bovinos.

*Histophilus somni* (previamente conocido como *Haemophilus somnus*) es una bacteria gramnegativa asociada con septicemia y meningoencefalitis tromboembólica del ganado.<sup>3,4</sup> Las principales manifestaciones clínicas observadas en una infección por *H. somni* son problemas nerviosos, neumonía y artritis. Este organismo ha estado implicado en algunos casos del síndrome del becerro débil,<sup>5</sup> mastitis,<sup>6</sup> conjuntivitis,<sup>7</sup> vaginitis y cervicitis,<sup>8</sup> abortos<sup>3</sup> e infertilidad.<sup>9</sup>

*H. somni* es un organismo distribuido en todo el mundo. Correa *et al.*<sup>10</sup> realizaron el primer estudio sobre *H. somni* en cuatro estados de México y detectaron anticuerpos en suero de ganado con historia

introduced to Yucatan, which may imply the presence of in *H. somni* in the region. Despite the existence of a broad documentation on livestock respiratory diseases in Mexico, there is few information on this pathology regarding breeding production systems and risk factors associated with this infection. A better knowledge on the factors associated with livestock infections, yields useful data for planning further studies and facilitates the elaboration of prevention and control programs.

The aim of this study was to investigate the prevalence of *H. somni* infection and to determine some of the risk factors associated to seropositivity of beef livestock in Yucatan, Mexico.

## Material and methods

### Experimental design

Most of the cattle in Yucatan are Zebu and its crosses with European breeds. Livestock are kept in a semi-intensive grazing system with improved pasture, such as Guinea grass (*Panicum maximum*) and Naivasha star grass (*Cynodon plectostachyus*). Supplementary feeding is given during the dry season. Animals are mainly vaccinated against bovine paralytic rabies, pasteurellosis and blackleg disease. Only animals  $\geq 2$  years old of the beef producing farms were included in the study (250 750 animals). *H. somni* seroprevalence in Mexico is 6.6 %, according to previous studies.<sup>14</sup> Using this seroprevalence, a random sampling of 490 animals was obtained with a 99% confidence, 5% accuracy and random design effect of 3.<sup>16</sup> For the sample size assessment, the following equation was used:

$$EEp = \sqrt{D \left( \frac{pq}{n} \right)} \text{ and confidence interval} = p \pm tEEp$$

where:

- $D = 3$  is the design effect;
- $t = 2.58$  is the Student's t value for a 99% confidence level;
- $p = 0.066$  is the expected prevalence;
- $q = (1 - p)$ ;
- $e = 0.05$  is the expected precision.

Fourteen animals were selected per herd in the study ( $n = 35$  herds). This number was randomly chosen from the total number of herds officially recorded ( $n = 2\ 125$  herds). A table of random numbers was used for the herd and animal selections. For this, a cross-section study was done with a two-stage design and a constant number of animals, from January 2005 to March 2006.

clínica de problemas reproductivos y respiratorios. En un estudio realizado en diferentes regiones del país, las prevalencias variaron de 2% a 9.2%.<sup>11-15</sup> Ganaderos de Chiapas, México, han comprado ranchos en la zona ganadera de Yucatán, México; en algunos de éstos han introducido animales de Chiapas, por ello existe la posibilidad de la presencia de *H. somni* en Yucatán. Aunque existe amplia documentación de la participación de los agentes arriba mencionados en enfermedades respiratorias del ganado en México, existe poca información sobre esta patología en sistemas de producción de pie de cría, y también sobre los factores de riesgo asociados con esta infección. Un mejor conocimiento de los factores asociados con la presencia de las infecciones en el ganado, proporciona datos para la planeación de estudios futuros y facilita la elaboración de programas de prevención y control.

El propósito de este estudio fue investigar la prevalencia de la infección por *H. somni* y determinar algunos factores de riesgo asociados con la seropositivity en ganado para carne en Yucatán, México.

## Material y métodos

### Diseño del estudio

La mayor población de ganado en Yucatán pertenece a la raza Cebú y sus cruces con europeo, que pastorea de manera semiintensiva en pasturas mejoradas; por ejemplo, pasto Guinea (*Panicum maximum*) y Estrella de África (*Cynodon plectostachyus*), con alimentación complementaria durante la época de sequía, y vacunados principalmente contra la rabia paralítica bovina, pasteurellosis y carbón sintomático. Sólo se incluyeron en el estudio, animales de  $\geq 2$  años de edad de ranchos productores de carne (250 750 cabezas). De acuerdo con estudios previos en México, la seroprevalencia de *H. somni* es de 6.6%.<sup>14</sup> El uso de esa seroprevalencia, con un nivel de confianza de 99%, 5% de precisión y efecto de diseño arbitrario de 3, arrojó una muestra aleatoria de 490 animales.<sup>16</sup> La fórmula utilizada para el cálculo del tamaño de muestra fue:

$$EEp = \sqrt{D \left( \frac{pq}{n} \right)} \text{ e intervalo de confianza} = p \pm tEEp$$

donde:

- $D = 3$  es el efecto de diseño;
- $t = 2.58$  es el valor de t de Student para un nivel de confianza de 99%;
- $p = 0.066$  es la prevalencia esperada;
- $q = (1 - p)$ ;
- $e = 0.05$  es la precisión deseada.

Se seleccionaron 14 animales de cada uno de los hatos en estudio ( $n = 35$  hatos). El número de hatos se selec-

### **Serological test**

Blood samples (10 mL) were taken from the coccygeal vein from each animal, using disposable needles (21 × 1.5 mm) and Vacutainer tubes taken to the laboratory. Samples were centrifuged at 800 g per 10 minutes, serum was recovered and stored at -20°C in identified vials. Antibodies against *H. somni* were diagnosed by the double agar gel immunodiffusion test,<sup>14</sup> at the National Center for Microbiology Disciplinary Research, from the National Institute for Forestry, Agricultural and Animal Production Research, in Mexico City. This test has been referred as one with high specificity (100%) and less sensitivity (96.4%) detecting antibodies against microorganisms as *Brucella ovis*.<sup>17</sup> Even though this test has been used in several studies in Mexico, as well as in other countries, there is no previous data on these values for *H. somni*.<sup>18-20</sup>

### **Reference sera**

Detection of antibodies against *Histophilus somni* in bovine serum was done by the double agar gel immunodiffusion test (AGID), using a sonic antigen produced by a positive control strain from the American Type Culture Collection (ATCC). In addition, a hyperimmune positive control serum produced in rabbit with the type strain, was used. The sonic antigen was made with the reference strain ATCC, cultured in chocolate agar and incubated at 37°C for 24 and 48 h in a 10% CO<sub>2</sub> partial atmosphere. Bacteria were cultured in phosphate buffer solution (PBS), obtaining a bacterial suspension. In order to destroy the cells, the suspension was subjected to sonic vibration\* for ten minutes at maximum power. Later, the suspension was centrifuged at 3 000 g for 10 minutes; the supernatant was recovered and adjusted to an optical density of 1 to 550 nm. The supernatant constituted the antigen. Three female rabbits, 2 kg body weight, were inoculated three times with 1 mL of a *H. somni* suspension at a 1 × 10<sup>8</sup> CFU/mL concentration at eight-day-intervals for the preparation of hyperimmune sera. The initial bleeding was done on day 0 and total bleeding was done on day 30<sup>th</sup>. Serum collected before immunization (day 0) was the negative control and serum collected at the end (day 30<sup>th</sup>) was the hyperimmune positive control.

### **Agar gel immunodiffusion test**

For this, 0.8% agarose was placed in Petri dishes, prepared with PBS, pH 7.2. When it was solid, agar was pierced in groups of seven wells (six peripheral and one in the center) using the conventional rosette pat-

cionó aleatoriamente del total de hatos registrados oficialmente (n = 2 125 hatos). Se utilizó una tabla de números aleatorios para la selección de hatos y animales; por lo que se realizó un estudio sección-cruzada con un diseño en dos etapas y un número constante de animales, de enero de 2005 a marzo de 2006.

### **Prueba serológica**

Las muestras de sangre (10 mL) se tomaron de la vena coccígea de cada animal, usando agujas desechables (21 × 1.5 mm) y tubos Vacutainer, y se transportaron en hielo al laboratorio. Las muestras se centrifugaron a 800 g por 10 min, para obtener el suero, que se almacenó a -20°C en viales identificados. Los anticuerpos contra *H. somni* se diagnosticaron mediante la prueba serológica de inmunodifusión doble en agar,<sup>14</sup> en el Centro Nacional de Investigación Disciplinaria en Microbiología, del Instituto Nacional de Investigaciones Forestales, Agrícolas y Pecuarias, en la Ciudad de México. Ésta es una prueba que ha sido referida como de alta especificidad (100%) y menor sensibilidad (96.4%) en detección de anticuerpos contra microorganismos como *Brucella ovis*.<sup>17</sup> En el caso específico de *H. somni* no existe estudio al respecto, por lo que no hay información disponible, aunque esta técnica se ha utilizado en diversos estudios, tanto en México<sup>11-13,15</sup> como en otras partes del mundo.<sup>18-20</sup>

### **Sueros de referencia**

Para la detección de anticuerpos contra *Histophilus somni* en suero de bovino, se procedió a realizar la prueba de inmunodifusión doble en agar (IDA), empleando un antígeno sonicado producido por una cepa testigo positivo obtenida de la American Type Culture Collection (ATCC), además de usar un suero hiperinmune testigo positivo producido en conejo con la cepa tipo. El antígeno sonicado se produjo con la cepa de referencia ATCC sembrada en agar chocolate e incubada a 37°C durante 24 y 48 horas en una atmósfera parcial de 10% de CO<sub>2</sub>. Las bacterias se cosecharon en solución amortiguada de fosfatos (PBS), de la que se obtuvo una suspensión bacteriana que fue sometida a un sonicador\* durante diez minutos a máxima potencia, con el fin de que las células fueran destruidas por las ondas sonoras producidas por el sonicador. Luego, la suspensión se centrifugó a 3 000 g durante 10 minutos y el sobrenadante obtenido se ajustó a una densidad óptica de 1 a 550 nm. El sobrenadante constituyó el antígeno. Para obtener el suero hiperinmune se inoculó, vía subcutánea, a tres conejos hembras de 2 kg aproximadamente, con 1

\*SME Sonicator OH Johns Scientific Co., Canadá.



tern. The problem sera were deposited in four of the peripheral wells in each rosette, the fifth and sixth wells contained the negative and positive controls, respectively. Antigen was deposited in the central well. Dishes were incubated at 37°C for 24 h in a plastic recipient with a "cotton bed", previously imbibed in distilled water, and with hermetic cap in order to avoid dehydration. Lecture was done at 24 h; a second lecture was done at 48 h to obtain a higher certainty. After this, dishes were discharged. Sera were considered as positive when a precipitation line was observed between the problem well and the antigen well at the same distance than the line observed with the positive control well.

### **Risk factors**

Data of the potential risk factors were obtained throughout a questionnaire applied to the owners or people in charge of the farms on the same day that blood samples were obtained. The explanatory variables were: herd size (< 62, 63-115, >115 animals), population density ( $\leq 0.63$ , 0.64-1.02, >1.02 animals/ha), use of supplementary feeding, animal introduction to the farm herd, source of the livestock (bought, born in the farm), presence of sheep in the farm, presence of dogs in the farm, genetic group of the animal (Zebu, Charolais  $\times$  Zebu, Holstein  $\times$  Zebu and Brown Swiss  $\times$  Zebu) and age group of the animal (3-4, 5-6, 7-8 and > 9 years old).

### **Data analysis**

Descriptive statistics were used to assess frequency of positive herds with antibodies against *H. somni*. Results of the serum samples were also used to determine prevalence adjusted to herd-size, because of the sample size was a constant number ( $n = 14$ ) of animals per herd. The following equation was used to assess the prevalence adjusted to herd-size:

$$p = \frac{\sum N_i p_i}{N}$$

where:

$N_i$  = size of the  $i$ -th herd;

$p_i$  = seroprevalence of  $i$ -th herd;

$N = \sum N_i$ , number of animals in the sampled herds.

Standard error (SE) and 95% confidence interval were calculated with the following equation:

$$EEp = \sqrt{D \left( \frac{pq}{n} \right)} \text{ and confidence interval} = p \pm tEEp$$

mL de una suspensión de *H. somni* a concentración de  $1 \times 10^8$  UFC/mL durante tres ocasiones con intervalos de ocho días. Se realizó sangrado inicial al día 0 y posteriormente se sangraron en blanco al día 30. El suero recolectado antes de la inmunización (día 0) constituyó el testigo negativo, y el suero obtenido al final (día 30) representó el suero hiperinmune testigo positivo.

### **Prueba de inmunodifusión en agar**

Se utilizaron cajas de Petri en las que se colocó agarosa al 0.8%, preparado en PBS con pH 7.2; una vez que se solidificó, se procedió a perforar grupos de siete pozos (seis periféricos y uno en el centro) con el molde convencional de roseta. En cada roseta se colocaron los sueros problema en cuatro pozos periféricos, y en el quinto y sexto se colocaron los sueros testigo negativo y positivo, respectivamente. El antígeno se colocó en el pozo central. Las cajas se incubaron a 37°C durante 24 horas en un recipiente de plástico con una "cama de algodón" previamente humedecida con agua destilada y con tapa hermética para evitar la desecación. La lectura se efectuó a las 24 horas y para mayor certeza se realizó una segunda lectura a las 48 horas, para luego desechar las cajas. Cuando se presentó una línea de precipitación entre el pozo que contenía el suero problema y el antígeno a la misma distancia de la línea observada en el testigo positivo, se dio como un suero positivo.

### **Factores de riesgo**

Los datos sobre los potenciales factores de riesgo se obtuvieron mediante un cuestionario administrado al propietario o encargado del rancho, el día que se obtuvieron las muestras de sangre. Las variables explicativas fueron: tamaño del hato (< 62, 63-115, > 115 animales), densidad de población ( $\leq 0.63$ , 0.64-1.02, > 1.02 animales/ha), uso de complemento alimenticio, introducción de ganado al rancho, origen del ganado (comprado, nacido en el rancho), presencia de ovinos en el rancho, presencia de perros en el rancho, grupo genético del animal (Cebú, Charolais  $\times$  Cebú, Holstein  $\times$  Cebú y Suizo Pardo  $\times$  Cebú) y grupo de edad del animal (3-4, 5-6, 7-8 y > 9 años de edad).

### **Análisis de los datos**

Las estadísticas descriptivas se usaron para determinar la frecuencia de hatos positivos con anticuerpos contra *H. somni*. Los resultados de las muestras de suero fueron también utilizadas para estimar la prevalencia ajustada por tamaño del hato, debido a que se muestreó un número constante ( $n = 14$ ) de animales

where:

- $p$  = prevalence;
- $q = 1-p$ ;
- $n$  = total number of sampled animals;
- $D$  = design effect;
- $t$  = critical value of the Student's t test distribution at 95%;

D was calculated as  $D = 1 + (k-1) r_e$ ,

where:

- $k$  = average number of sampled animals per herd ( $k = 14$ )
- $r_e$  = correlation coefficient within herds.

Estimated from the variance components of a one way variance analysis, that included the random effect of the herd.

Approximated standard error for  $r_e$  and D was obtained according to Turner and Young<sup>21</sup> and Solís-Calderon *et al.*<sup>22</sup>

Chi-square tests were applied in order to assess the differences among seroprevalence from the five municipalities and identify the explanatory variables associated with *H. somni*.<sup>23</sup>

## Results

### **Prevalence of antibodies against *H. somni***

Ten herds had zero positive animals, 19 had one, and six herds had two seropositive animals. A total of 31 out of 490 animals were seropositive. Animal prevalence adjusted to herd size was 5.5% (95% confidence interval = 3.5%, 7.5%). Prevalence varied from 3.6% to 9.5% (Table 1) in the six municipalities. However, no significant differences were observed ( $P = 0.89$ ). Seroprevalence for the explanatory variables are depicted in Table 2.

### **Correlation between herd and design effect**

The  $r_e$  and D values for *H. somni* seroprevalence were 0 (SE = 0.01) and 1 (SE = 0.19), respectively.

### **Risks factors**

Chi-square tests showed no association ( $P > 0.10$ ) between the presence of antibodies against *H. somni* and the risk factors investigated (Table 2). Therefore, multiple logistic regression analyses were not done.

## Discussion

### **Seroprevalence**

This study confirms the presence of antibodies against

por hato. La fórmula usada para estimar la prevalencia ajustada por tamaño de hato fue:

$$p = \frac{\sum N_i p_i}{N}$$

donde:

- $N_i$  = tamaño del  $i$ -ésimo hato;
- $p_i$  = seroprevalencia en el  $i$ -ésimo hato;
- $N = \sum N_i$ , número total de animales en los hatos muestreados.

El error estándar (EEp) y el intervalo de confianza a 95% se calcularon de acuerdo con la siguiente fórmula:

$$EEp = \sqrt{D \left( \frac{pq}{n} \right)} \text{ e intervalo de confianza} = p \pm tEEp$$

donde:

- $p$  = prevalencia;
- $q = 1-p$ ;
- $n$  = número total de animales muestreados;
- $D$  = efecto de diseño;
- $t$  = valor crítico de la distribución de t de Student a 95%;
- $D$  se calculó como  $D = 1 + (k-1) r_e$ ,

donde:

- $k$  = número promedio de animales muestreados por hato ( $k = 14$ );
- $r_e$  = coeficiente de correlación dentro de hatos

Estimado a partir de los componentes de varianza de un análisis de varianza de una vía, que incluyó el efecto aleatorio del hato.

El error estándar aproximado para  $r_e$  y D se obtuvo de acuerdo con Turner y Young<sup>21</sup> y Solís-Calderón *et al.*<sup>22</sup>

Para determinar las diferencias entre las seroprevalencias de los cinco municipios e identificar las variables explicativas asociadas con *H. somni*, se realizaron pruebas de Ji-cuadrada.<sup>23</sup>

## Resultados

### **Prevalencia de anticuerpos contra *H. somni***

Diez hatos tuvieron cero animales seropositivos, 19 tuvieron uno, y seis tuvieron dos animales seropositivos. Treinta y uno de los 490 animales fueron seropositivos. La prevalencia animal ajustada por tamaño de hato fue de 5.5% (intervalo de confianza al 95% = 3.5%, 7.5%). La prevalencia de los animales en los seis municipios varió de 3.6% a 9.5% (Cuadro 1), pero no se encontraron diferencias significativas ( $P = 0.89$ ). Las seroprevalencias para las variables explicativas se muestran en el Cuadro 2.

**Cuadro 1**  
**SEROPREVALENCIA DE *Histophilus somni* EN SEIS MUNICIPIOS**  
**DEL ESTADO DE YUCATÁN, MÉXICO (2005)**  
*Histophilus somni* SEROPREVALENCE IN SIX MUNICIPALITIES  
 OF THE STATE OF YUCATAN, MEXICO (2005)

Municipality	N	<i>H. somni</i>	
		n+	%
Buctzotz	70	4	5.7
Cenotillo	56	4	7.1
Panaba	70	4	5.7
San Felipe	28	1	3.6
Sucila	42	4	9.5
Tizimin	224	14	6.3
Total	490	31	6.3

N = Number of sampled animals; n+ = Number of seropositive animals; % = Prevalence.

*H. somni* in beef producing herds in the livestock region of Yucatan, Mexico. Furthermore, it yields new data on its distribution. In this study the ratio of herds with at least one seropositive animal was high (25/35 = 71.4%), suggesting a uniform distribution of this infection in the municipalities and in the region. Even though there are no reports about clinical cases in the area, the existence of antibodies suggests that animals have been exposed to the bacterium, which may favor respiratory problems related to the bovine respiratory complex. The animal prevalence found in this study is similar to the one reported in Chiapas (6.6%).<sup>14</sup> However, it is higher than the one found in Oaxaca, which was 2%.<sup>12</sup> Differences in antibody prevalence values against *H. somni* among regions or countries, might be caused by differences in production systems and environmental conditions. Antibody prevalence against infection diseases is usually higher in intensive production systems than in extensive production systems.

Risk factors that have been associated with antibody prevalence against *H. somni*, but not identified in this study include: geographical region, sex of the animal<sup>14</sup> and introduction of replacement animals.<sup>24</sup>

#### **Intraclass correlation and design effects**

When the correlation coefficient within herds is 0, it means that *H. somni* prevalence is homogeneous among herds. The values for  $r_e$  and  $D = 1$  assessed in this study are the first reported in literature. Branscum *et al.*<sup>25</sup> pointed out that  $r_e$  magnitude might provide information about the biology of an infectious agent. They mention that  $r_e$  values close to 1 suggest

#### **Correlación dentro del hato y efecto de diseño**

Los valores de  $r_e$  y  $D$  para la seroprevalencia de *H. somni* fueron 0 (EE = 0.01) y 1 (EE = 0.19), respectivamente.

#### **Factores de riesgo**

Las pruebas de Ji-cuadrada no mostraron asociación ( $P > 0.10$ ) entre la presencia de anticuerpos contra *H. somni* y los factores de riesgo investigados (Cuadro 2); por lo tanto, no se realizaron análisis de regresión logística múltiple.

#### **Discusión**

##### **Seroprevalencia**

El presente estudio confirma la presencia de anticuerpos contra *H. somni* en el ganado productor de carne de la región ganadera de Yucatán, México, y proporciona nuevos datos sobre su distribución. La proporción de hatos con al menos un animal seropositivo, encontrada en este estudio, fue alta (25/35 = 71.4%), ello sugiere una distribución uniforme de la infección en los municipios y en la región. Aunque no existen informes de casos clínicos en la región, la existencia de anticuerpos sugiere que los animales están siendo expuestos a la bacteria, lo que podría favorecer problemas respiratorios relacionados con el complejo respiratorio bovino. La prevalencia animal aquí encontrada es similar a la notificada en Chiapas (6.6%).<sup>14</sup> Sin embargo, es más alta que la encontrada en Oaxaca, que fue de 2%.<sup>12</sup> Las diferencias en los

Cuadro 2

FACTORES DE RIESGO INVESTIGADOS EN UN ESTUDIO SECCIÓN-CRUZADA SOBRE *Histophilus somni* EN HATOS DE GANADO DE CARNE EN LA REGIÓN GANADERA DE YUCATÁN, MÉXICO (2005)  
RISK FACTORS INVESTIGATED IN A CROSS-SECTION STUDY ON *Histophilus somni* IN BEEF CATTLE HERDS IN THE LIVESTOCK REGION OF YUCATAN, MEXICO (2005)

<i>Risk factor</i>	<i>Categories</i>	<i>Number of animals</i>	<i>Seropositive (%)</i>	<i>Chi-square value</i>
Herd size	≤ 62	182(13)*	7.7	0.485
	63-115	98(7)	4.1	
	> 115	210(15)	6.2	
Population density	≤ 0.63	126(9)	5.6	0.676
	0.64-1.02	140(10)	7.9	
	> 1.02	224(16)	5.8	
Livestock introduction	No	280(20)	5.7	0.521
	Yes	210(15)	7.1	
Feeding supplement	No	140(10)	4.6	0.337
	Yes	350(25)	6.9	
Breed group	Zebu	260	6.5	0.534
	Charolais × Zebu	50	10.0	
	Brown Swiss × Zebu	141	5.7	
	Holstein × Zebu	39	2.6	
Sheep in the farm	No	335(24)	6.0	0.634
	Yes	155(11)	7.1	
Dogs in the farm	No	200(15)	7.5	0.376
	Yes	290(20)	5.5	
Age group (years)	3-4	44	6.8	0.487
	5-6	159	6.9	
	7-8	185	4.3	
	9-12	102	8.8	
Source of the cattle	Bought	228	7.5	0.338
	Born in the farm	262	5.3	

\*Number of farms between parenthesis.

that the infection is quickly spread within a herd, while values of 0 mean that the agent has a low infection rate and a homogeneous risk of infection. Based on this, results suggest that *H. somni* has a low infection rate and a homogeneous risk of infection in the region and under the conditions of this study.

### **Risk factors**

No risk factors were found for the prevalence of antibodies against *H. somni*. This situation may be caused by the sample size and the low prevalence of this

valores de prevalencia de anticuerpos contra *H. somni* entre regiones, estados o países, pueden deberse a diferencias en los sistemas de producción y de las condiciones ambientales. Normalmente, la prevalencia de anticuerpos contra las enfermedades infecciosas es mayor en sistemas de producción intensivos que en los sistemas extensivos de producción.

Los factores de riesgo que han sido asociados con la prevalencia de anticuerpos contra *H. somni*, pero no identificados en este estudio, son: la región geográfica, el sexo del animal<sup>14</sup> y la introducción de animales de reemplazo.<sup>24</sup>



infection in the studied region. However, other studies<sup>14</sup> report significant differences among prevalence of antibodies against *H. somni* per region in Chiapas. The aforementioned authors also found a higher prevalence in herds in intensive production systems (7.1%) than in those in extensive production systems (5.9%) and for males (23.7%) compared to females (5.2%). Other studies<sup>24</sup> report that animal introduction to the herd is an important risk factor.

The present study shows that *H. somni* is circulating within Yucatan livestock with a relatively low prevalence. More information is needed in order to determine the animal and herd risk factors that favor *H. somni* transmission among herds under the weather and ecological conditions of the cattle in the Yucatan livestock region, Mexico. Knowledge on the distribution of this microorganism would allow the establishment of prevention and control programs.

## Referencias

1. Anderson S, Santos J, Boden R, Wadsworth J. Characterization of cattle production systems in the state of Yucatan. In: Anderson S, Wadsworth J (eds). Dual Purpose Cattle Production Research. Proceedings of the IFS/UADYFMVZ International Workshop, 23-27 March 1992, Merida (Yucatan) Mexico. Stockholm (Sweden): International Foundation for Science, 1992: 150-161.
2. Richey EJ. Bovine respiratory syncytial virus (BRSV) and parainfluenza-3 (PI-3). Florida Cooperative Extension Service, Institute of Food and Agricultural Sciences, University of Florida. 2002. <http://edis.ifats.ufl.edu> Revised 25/03/2004.
3. Van Dreumel AA, Kierstead MA. Abortion associated with *Haemophilus somnus* in a bovine fetus. *Can Vet J* 1975;16:367-370.
4. Aguilar RF, Trigo TF, Suárez GF, Pijoan AP. Análisis antigénico de cepas de *Haemophilus somnus* aisladas de neumonías, metritis y lavados prepuciales. Memorias XXXVI Reunión Nacional de Investigación Pecuaria; 2000 noviembre 22-24; Hermosillo (Sonora) México. México (DF): INIFAP, 2000:149.
5. Waldham DG, Hall RF, Meinershagen WA, Card CS, Frank FW. *Haemophilus somnus* infection in the cow as a possible contributing factor to weak calf syndrome. Isolation and animal inoculation studies. *Am J Vet Res* 1974;35:1401-1403.
6. Hazlett MJ, Little PB, Barnum DA. Experimental production of mastitis with *Haemophilus somnus* in the lactating bovine mammary gland. *Can Vet J* 1983;24:135-136.
7. Lamont HH, Hunt BW. *Haemophilus somnus* and conjunctivitis. *Vet Rec* 1982;111:21-26.
8. Paterson RM, Hill JF, Humprey JD. Isolation of *Haemophilus somnus* from vaginitis and cervicitis in dairy cattle. *Austr Vet J* 1984;601:301-302.
9. Harris F, Janzen E. The *Haemophilus somnus* dis-

## Correlación dentro de conglomerados y efecto de diseño

El coeficiente de correlación dentro de los hatos con valor de 0 indica que la prevalencia de *H. somni* es homogénea entre hatos. Los valores de  $r_c$  y  $D = 1$  estimados en este estudio son los primeros notificados en la literatura. Branscum *et al.*<sup>25</sup> señalan que la magnitud de  $r_c$  podría proporcionar información acerca de la biología de un agente infeccioso. Mencionan que los valores de  $r_c$  cercanos a 1 sugieren que la infección se disemina rápidamente dentro de un hato, mientras que un valor de 0 indica que el agente tiene una baja tasa de infección y un riesgo más homogéneo de infección; con base en ello, bajo las condiciones de este estudio, los resultados obtenidos sugieren que *H. somni* tiene una baja tasa de infección y que el riesgo de infección es homogéneo en la región.

## Factores de riesgo

No se encontraron factores de riesgo para la prevalencia de anticuerpos contra *H. somni*. Esto podría deberse al tamaño de muestra y a la baja prevalencia de esta infección en la región estudiada. Sin embargo, otros estudios<sup>14</sup> notifican diferencias significativas entre prevalencias de anticuerpos contra *H. somni* por región en Chiapas. Dichos autores también encontraron mayor seroprevalencia en hatos con sistemas de manejo intensivos (7.1%), en comparación con hatos en sistemas extensivos (5.9%), y para machos (23.7%), comparados con hembras (5.2%). Otros estudios<sup>24</sup> informan que la introducción de animales al hato es un factor de riesgo importante.

Este estudio muestra que *H. somni* está circulando entre el ganado de Yucatán con prevalencia relativamente baja. Se requiere mayor información para determinar los factores de riesgo del animal y del hato que favorecen la transmisión de *H. somni* entre hatos bajo las condiciones climáticas y ecológicas de la ganadería en la región ganadera de Yucatán, México. El conocimiento de la distribución de este microorganismo permitiría el establecimiento de programas de prevención y control.

---

ease complex (Haemophilosis): A review. *Can Vet J* 1989;30:816-822.

10. 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. *Tec Pecu Méx* 1975;29:26-33.
11. Aguilar RF, Jaramillo ML, Trigo TF. *Haemophilus somnus*: Aislamiento en neumonías de becerros y estudio seroepidemiológico. Memorias VI Congreso Lati-

- noamericano de Buiatría. 1987 Julio 28-31; México (DF). México (DF): Asociación Mexicana de Médicos Veterinarios Especialistas en Bovinos y Pequeños Ruminantes, 1987:296-301.
12. Rodríguez AM, Martínez MJJ, Aguilar RF, Salas TE. Detección de anticuerpos contra *Haemophilus somnus* en bovinos del municipio de Tuxtepec, Oaxaca, México. *Vet Méx* 1993;4:303-305.
  13. González ME, Santiago SB, Hernández AL, Aguilar RF, Díaz AE, Alvarado IA *et al.* Análisis del diagnóstico serológico de IBR, Brucelosis, Leptospirosis y *Haemophilus somnus* en un establo con problemas reproductivos. Memorias XXXII Reunión Nacional de Investigación Pecuaria; 1996 diciembre 2-4. Cuernavaca (Morelos). México (DF): INIFAP, 1996:14.
  14. Guiris-Andrade M, Rosales ME, Bárcenas-Morales G, Lara-Sagahon V, Montaraz-Crespo JA. Prevalencia de anticuerpos contra *Haemophilus somnus* en el ganado bovino del estado de Chiapas, México. *Vet Méx* 2001;32: 213-219.
  15. Córdova-López D, Urrutia-Velázquez RM, Zacarías-Méndez ML, Rosado-Ruiz MI, Guzmán-Ruiz CC, López-Méndez J *et al.* Epidemiología y factores de riesgo asociados a algunas enfermedades causantes de aborto bovino (Leptospirosis, Diarrea viral, Rinotraqueítis infecciosa, Leucosis bovina, Neosporosis y Haemophilosis en el estado de Guanajuato). Memorias III Congreso Internacional de Epidemiología, 2003 octubre 16-18 Oaxaca (Oaxaca) México. México (DF): Asociación Mexicana de Epidemiología Veterinaria, AC, 2003: 219-228.
  16. Segura JC, Honhold N. Métodos de Muestreo para la Producción y Salud Animal. Mérida, (Yucatán) México: Universidad Autónoma de Yucatán, 2000.
  17. Blasco MJM. Epidemiología, Patogenia y Cuadro Clínico. Brucelosis ovina. *Ovis* 8. 25-32:1990.
  18. Stephens LR, Little PB, Wilkie BN, Barnum DA. Humoral immunity in experimental thromboembolic meningoencephalitis in cattle caused by *Haemophilus somnus*. *Am J Vet Res* 1981;42 (3):468-73.
  19. Humprey JD, Little PB, Stephens LR, Barnum DA, Doig PA. Prevalence and distribution of *Haemophilus somnus* in the male bovine reproductive tract. *Am J Vet Res* 1982; 43(5):791-795.
  20. Stephens LR, Little PB, Humprey JD, Wilkie BN, Barnum DA. Vaccination of cattle against experimentally induced thromboembolic meningoencephalitis with a *Haemophilus somnus* bacterin. *Am J Vet Res* 1982; 43(8):1339-1342.
  21. Turner HN, Young SSY. Quantitative Genetics in Sheep Breeding. Ithaca, Nueva York, USA: Cornell University Press, 1969.
  22. Solis-Calderon JJ, Segura-Correa VM, Segura-Correa JC, Alvarado-Islas A. Seroprevalence of and risk factors for infectious bovine rhinotracheitis in beef cattle herds of Yucatan, Mexico. *Prev Vet Med* 2003;57:199-208.
  23. SAS. SAS/STAT user's Guide (Versión 8) Cary NC, USA: SAS Inst. Inc, 1999.
  24. Lees VW, Meek AH, Rusendal S. Epidemiology of *H. somnus* in young rams. *Can J Vet Res* 1990;54:331-336.
  25. Branscum AJ, Gardner IA, Wagner BA, McInturff PS, Salman MD. Effect of diagnostic testing error on intraclass correlation coefficient estimation. *Prev Vet Med* 2005;69:63-75.