



101674
11

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

División de Estudios de Posgrado e Investigación
Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia

SEROTIPIFICACION DE AISLAMIENTOS DE *Haemophilus*
paragallinarum BAJO UN ESQUEMA DE HEMOAGLUTININAS

T E S I S

Para obtener el Grado de
MAESTRO EN CIENCIAS DE LA PRODUCCION
Y DE LA SALUD ANIMAL

P r e s e n t a

MVZ EDGARDO SORIANO VARGAS



Tutor: Ph. D. GUILLERMO TELLEZ ISAIAS
Comité Tutorial: D. en C. ABEL CIPRIAN CARRASCO
D. en C. VICTOR R. TENORIO GUTIERREZ

México, D. F.

283479
Octubre 2000

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN



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.

FINANCIAMIENTO

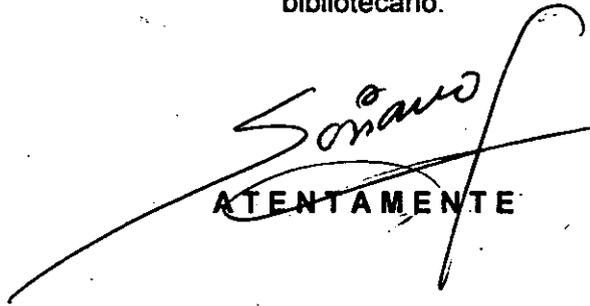
El presente trabajo de investigación forma parte del proyecto CONACYT, referencia 25318-B, concerniente con aspectos de antigenicidad, patogenicidad e inmunogenicidad de *Haemophilus paragallinarum*.

Responsable: Dr. Pomposo Fernández Rosas

Centro de Investigación y Estudios Avanzados en Salud Animal, Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia, Universidad Autónoma del Estado de México

DECLARACION

Doy mi consentimiento a la División de Estudios de Posgrado e Investigación de la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia, Universidad Nacional Autónoma de México, para que esta tesis sea disponible para cualquier tipo de reproducción e intercambio bibliotecario.



ATENTAMENTE

MVZ Edgardo Soriano Vargas

AGRADECIMIENTOS

Al Departamento de Producción Animal: Aves, Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia, Universidad Nacional Autónoma de México, por abrirme las puertas y permitirme desarrollar profesionalmente.

Al Centro de Investigaciones y Estudios Avanzados en Salud Animal, Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia, Universidad Autónoma del Estado de México, por brindarme las facilidades para la realización de este trabajo de investigación.

A Biosíntesis Laboratorios SA de CV por el apoyo brindado.

Al Dr. Pomposo Fernández Rosas, Centro de Investigación y Estudios Avanzados en Salud Animal, Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia, Universidad Autónoma del Estado de México. Gracias Doctor por creer en mi y por participar en este gran proyecto, nuestra amada bacteria: *Haemophilus paragallinarum*.

Al Dr. Guillermo Téllez Isaías, Departamento de Producción Animal: Aves, Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia, Universidad Nacional Autónoma de México, por brindarme la oportunidad de colaborar a su lado.

To Dr. Patrick J. Blackall, Animal Research Institute, Queensland Department of Primary Industries, Australia. Thanks for your unconditional support and friendship.

To Dr. Mady S. Dabo, Department of Veterinary Pathology, College of Veterinary Medicine, Oklahoma State University, Stillwater. Thanks for your scientific tips and friendship.

To Dr. Richard Yamamoto, Department of Population Health and Reproduction, School of Veterinary Medicine, University of California, Davis. Thanks for providing Page strains and to show great interest in our work.

A mi comité tutorial: Dr. Abel Ciprian Carrasco, Dr Víctor Tenorio Gutiérrez, Dra. Guadalupe Mireya de la Garza, Dr. Francisco Suárez Güemes, por su tiempo y observaciones puntuales.

A la Houghton Trust, filial de la World Veterinary Poultry Association, por el apoyo económico otorgado para la estancia en los laboratorios del Dr. Patrick J. Blackall, Animal Research Institute, Queensland Department of Primary Industries, Australia. Así como a estos laboratorios por las facilidades brindadas.

A mi grupo de investigación en el Centro de Investigación y Estudios Avanzados en Salud Animal, Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia, Universidad Autónoma del Estado de México, por colaborar activamente en la realización de este proyecto.

DEDICATORIA

La presente tesis de Maestría es el resultado de varios años de labor, perseverancia y desvelos. Sin embargo, no es comparable al esfuerzo sostenido de mis padres por alcanzar sus sueños: sus hijos.

A cada instante, las muestras de grandeza y bondad del Señor se manifiestan de forma sublime: Celene.

Sirva la presente como una pequeña muestra de mi amor por la vida.

Edgardo Soriano Vargas

CONTENIDO

Capítulo	Página
Contenido	ii
Cuadros	iv
Abreviaturas	iv
Resumen	v
Summary	vi
1. Introducción	1
1.1 Antecedentes	1
1.1.1. Estructura antigénica de <i>H. paragallinarum</i>	1
1.1.2. Esquemas de serotipificación de <i>H. paragallinarum</i>	3
1.1.3. Importancia del esquema de serotipificación de aislamientos de <i>H. paragallinarum</i>	4
1.1.4. Productos biológicos contra la coriza infecciosa	5
1.1.5. Situación de la coriza infecciosa en la República Mexicana	6
1.2 Justificación	8
1.3 Objetivo general	9
1.3.1. Objetivos específicos	9
1.4 Hipótesis	9
2. Material y Métodos	10
2.1 Lugar	10
2.2. Bacterias	10
2.3 Medios de cultivo	11
2.4 Cultivo de las cepas de referencia	11
2.5 Elaboración de antisueros	11
2.6. Preparación de eritrocitos de pollo fijados con glutaraldehído	12
2.7. Elaboración de antígenos hemoaglutinantes (hemoaglutininas)	13
2.8. Prueba de hemoaglutinación	13
2.9. Eliminación de hemoaglutininas inespecíficas de los antisueros	13
2.10 Absorción de antisueros	14

2.11. Asignación de hemoaglutininas de los aislamientos a los serogrupos de Kume	14
2.12. Asignación de hemoaglutininas de los aislamientos a los serovares de Kume	15
3. Resultados	16
3.1. Actividad hemoaglutinante de las hemoaglutininas	16
3.2. Asignación de hemoaglutininas de los aislamientos a los serogrupos de Kume	16
3.3. Asignación de hemoaglutininas de los aislamientos a los serovares de Kume	16
3.4. Frecuencia de diferentes serovares de <i>H. paragallinarum</i> en el esquema de Kume procedentes de varios estados de la República Mexicana	17
4. Discusión y conclusiones	19
4.1 Discusión	18
4.2. Conclusiones	22
5. Referencias	23

CUADROS

Cuadro 1.

Frecuencia de los diferentes serovares de *Haemophilus paragallinarum* en el esquema de Kume procedentes de varios estados de la República Mexicana, p 17.

Cuadro 2.

Procedencia, origen aviar, serogrupo y serovar de los aislamientos de *Haemophilus paragallinarum* estudiados, obtenidos de casos clínicos de coriza infecciosa o remitidos al C.I.E.A.S.A, F.M.V.Z., U.A.E.M., p 18.

ABREVIATURAS

CI	coriza infecciosa
HA	antígeno hemoaglutinante, hemoaglutinina
IH	inhibidor de la hemoaglutinación
NAD	dinucleótido de adenina nicotinamida, por sus siglas en inglés: nicotinamide adenine dinucleotide.
P	ponedoras comerciales
PBS	solución buffer de fosfatos
PE	pollo de engorda
RP	reproductores pesados
RS	reproductores semipesados
TMA	agar medio de prueba
TM/SN	medio de prueba suplementado con suero de pollo y NAD
UH	unidades hemoaglutinantes

RESUMEN

SORIANO VARGAS EDGARDO: Serotipificación de aislamientos de *Haemophilus paragallinarum* bajo un esquema de hemoaglutininas. (Bajo la tutoría de: Ph.D. Guillermo Téllez Isaías, D. en C. Abel Ciprian Carrasco, D. en C. Víctor R. Tenorio Gutiérrez).

La bacteria *Haemophilus paragallinarum* es el agente causal de la coriza infecciosa, una enfermedad del tracto respiratorio superior de pollos y gallinas (*Gallus gallus*), que se caracteriza por producir estornudo, descarga nasal e inflamación facial. La enfermedad es de importancia económica en la avicultura mundial, principalmente en zonas avícolas densamente pobladas. En el presente trabajo de investigación, se clasificaron 42 aislamientos de *H. paragallinarum* bajo un esquema de hemoaglutininas, el cual permite una caracterización antigénica más detallada de los aislamientos. El propósito del presente trabajo surgió de la necesidad de conocer los serovares hemoaglutinantes del esquema de Kume en aislamientos de *H. paragallinarum*, lo cual podría explicar los brotes de campo observados en parvadas inmunizadas con productos biológicos bivalentes (serovares A-1 y C-2) o trivalentes (A-1, B-1 y C-2). Los resultados mostraron la prevalencia de los serovares A-1, A-2, B-1 y C-2 de *H. paragallinarum* del esquema de Kume en los aislamientos estudiados. 6 aislamientos no pudieron ser clasificados en algún serogrupo o serovar en el esquema de Kume. Estos resultados sugieren que bacterinas contra la coriza infecciosa deberían incluir estos serovares para cubrir todos los posibles serovares de *H. paragallinarum* causantes de enfermedad.

SUMMARY

SORIANO VARGAS EDGARDO. Serotyping of isolates of *Haemophilus paragallinarum* by a hemagglutinin scheme. (Advised by: Ph.D. Guillermo Téllez Isaías, Dr.C. Abel Ciprian Carrasco, Dr.C. Víctor R. Tenorio Gutiérrez).

Infectious coryza is a respiratory disease of chickens (*Gallus gallus*) caused by the bacterium *Haemophilus paragallinarum*, it characterized by the production of sneeze, nasal discharge, and facial swelling. The disease is of economic importance in the world wide poultry, mainly in density populated poultry zones. In the present research work, 42 isolates of *H. paragallinarum* from several Mexican states were serotyped by a hemagglutinin schem, which allowed a detailed antigenic classification of isoaltes. The purpose of the present research work arise from the need of to know the hemagglutinin Kume serovars in Mexican *H. paragallinarum* studied isolates. It could explain the infectiuos coryza outbreaks observed in vaccinated flocks using either bivalent (A and C) or trivalent (A, B, and C) bacterins. Results showed the prevalence of A-1, A-2, B-1 and C-2 *H. paragallinarum* serovars. 6 isolates could not be assigned to any serogroup or serovar in the Kume scheme. This results suggest that a bacterin against infectiuos coryza should it contain all these serovars for to cover all possible *H. paragallinarum* serovars causing of disease.

1. INTRODUCCIÓN

1.1. Antecedentes

La bacteria *Haemophilus paragallinarum* es el agente causal de la coriza infecciosa (CI), una enfermedad del tracto respiratorio superior de pollos y gallinas (*Gallus gallus*), que se caracteriza por producir estornudo, descarga nasal e inflamación facial. La importancia económica de la infección por este agente radica en las pérdidas que ocasiona a la avicultura debido a retraso del crecimiento, pérdida de peso, aumento del número de aves desechadas y, en gallinas de postura, una reducción en la producción de huevo de hasta 40% (Blackall *et al.*, 1997).

En 1931, De Blicck aisló al agente etiológico de la CI, y lo nombró *Bacillus haemoglobinophylus coryzae gallinarum* (citado por Blackall *et al.*, 1997). Posteriormente fue clasificado como *Haemophilus gallinarum* con base en los requerimientos de los factores de crecimiento X (hemina) y V (NAD) (Blackall, 1989). Biberstein y White (1969) propusieron renombrar al agente como *Haemophilus paragallinarum* debido al hallazgo de cepas independientes del factor X. Desde 1992 en Sudáfrica, se han reportado aislamientos independientes de ambos factores de crecimiento (Horner *et al.*, 1992; Mouahid *et al.*, 1992). De forma tal que el agente causal de la CI es considerado como *H. paragallinarum*, un microorganismo que puede ser tanto dependiente de NAD, como independiente de éste (Blackall, 1999).

1.1.1. Estructura antigénica de *H. paragallinarum*

Hinz (1973) describió un antígeno termolábil de tipo específico y un antígeno termoestable de tipo común entre cepas de los serovares A y B. Sawata *et al.* (1979) identificaron dos antígenos de tipo específico, termolábiles y sensibles a la tripsina, designados como L1 y L2. Asimismo, identificaron tres antígenos comunes para los dos serovares: L3, termolábil y sensible a la tripsina; HL, termolábil y resistente a la tripsina; y HS, termoestable y resistente a la tripsina. Varios estudios mostraron una correlación entre la especificidad de los serovares aglutinantes y el inmunotipo de las cepas (Kume *et al.*, 1980a; Kume *et al.*, 1980c; Kume *et al.*, 1983a).

Kato (1965) describió por primera vez la capacidad hemoaglutinante de algunos aislamientos de *H. paragallinarum* (citado por Yamaguchi *et al.*, 1989). Las cepas de los serovares A, B y C poseen determinantes antigénicos con capacidad de hemoaglutinar eritrocitos de varias especies animales, aún distantes filogenéticamente (Iritani y Miyajima, 1979). Sin embargo, suspensiones bacterianas del serovar A hemoaglutinaron eritrocitos frescos de varios animales, mientras que tanto eritrocitos como la suspensión bacteriana de los serovares B y C fueron tratados por medios físicos o químicos, o ambos, para expresar actividad hemoaglutinante (Iritani, 1979; Iritani *et al.*, 1978; Iritani y Hidaka, 1976). Recientemente, Blackall *et al.* (1990) y Soriano *et al.* (1998) reportaron actividad hemoaglutinante en cepas de los tres serovares sin tratamiento alguno.

Dos tipos de hemoaglutininas (HA) se identificaron en la cepa 221 serovar A. La HA tipo 1 presentó propiedades biológicas e inmunológicas similares al antígeno aglutinante L1 específico de serovar. La HA tipo 2 presentó características similares al antígeno aglutinante HL común entre serovares (Yamaguchi e Iritani, 1980; Yamaguchi *et al.*, 1980a, 1980b). Posteriormente, se determinó que la HA tipo 1 era específica del serovar A, y que la HA tipo 2 era un antígeno formado por los tres serovares (Iritani *et al.*, 1981b). De forma similar, Sawata *et al.* (1984a) describieron tres tipos de HA localizadas en la membrana externa de cepas pertenecientes al serovar A. Los antígenos fueron nombrados como HA-L1, HA-HL y HA-HS debido que a sus propiedades biológicas e inmunológicas fueron similares a las observadas en los antígenos aglutinantes L, HL y HS, respectivamente. Se encontró que los antígenos HA-L1 y HA-HL correspondieron a las HA tipo 1 y 2 descubiertas por Yamaguchi e Iritani (1980). De forma similar al antígeno aglutinante L1, el antígeno HA-L1 indujo inmunidad específica de serovar en pollos inmunizados (Kume *et al.*, 1983a; Kume y Sawata, 1984).

Iritani *et al.* (1981a) extrajeron un antígeno polisacárido, termolábil, de una cepa serovar 2 que presentó propiedades similares al antígeno L2 específico del serovar C. De forma inversa a la HA tipo 1 del serovar A, este antígeno no mostró actividad hemoaglutinante. Asimismo, extrajeron un antígeno lipopolisacárido capaz de inhibir la hemoaglutinación de la HA tipo 1 de *H. paragallinarum* (Iritani *et al.*, 1981c).

1.1.2. Esquemas de serotipificación de *H. paragallinarum*

Page (1962) en los Estados Unidos de América, mediante la prueba de aglutinación en placa, clasificó aislamientos de *H. paragallinarum* en los serovares A, B y C. En el mismo año, Kato y Tsubahara, en estudios antigénicos con aislamientos del Japón, reportaron los serovares I, II y III mediante la misma prueba. Sawata *et al.* (1978) extendieron los estudios de Kato y Tsubahara, e indicaron que los serovares II y III eran variantes del serovar I, proponiendo los serovares 1 y 2. Posteriormente, se encontró que los serovares 1 y 2 correspondían a los serovares A y C del esquema de Page (Kume *et al.*, 1980b; Sawata *et al.*, 1980).

Kume *et al.* (1983) propusieron una clasificación de cepas de *H. paragallinarum* utilizando bacterias sonicadas y tratadas con tiocianato de potasio en una prueba de inhibición de la hemoaglutinación. El sistema se basó en hemoaglutininas específicas y comunes de serovar. En esencia, los serovares A, B y C de Page (1962) correspondieron con los serogrupos I, III y II, respectivamente, y siete serovares hemoaglutinantes (HA-1 a HA-7) fueron reconocidos. Asimismo, se observó que los antígenos HA-L formados por los serovares hemoaglutinantes indujeron inmunidad específica de serogrupo. Eaves *et al.* (1989) encontraron que muchos aislamientos que no fueron tipificados por el esquema de aglutinación de Page (1962), lo fueron por el procedimiento de inhibición de la hemoaglutinación de Kume (1983). Adicionalmente, identificaron una octava hemoaglutinina en aislamientos estudiados procedentes de Australia. Blackall *et al.* (1990) identificaron una novena hemoaglutinina, y a la vez propusieron alterar la nomenclatura del esquema de Kume (1983). Combinaron el esquema de serotipificación anterior y el esquema de Page (1962), quedando de la siguiente manera: A-1 a A-4, B-1, y de C-1 a C-4, lo que permite la inclusión de nuevas hemoaglutininas conforme se vayan descubriendo.

Con base en el esquema de serotipificación de Page (1962), a la fecha se han identificado los serovares A, B y C en Estados Unidos de América (Page, 1962), España (Pagés y Costa, 1986), Argentina (Terzolo *et al.*, 1993), Filipinas (Nagaoka *et al.*, 1994), Brasil (Blackall *et al.*, 1994) y México (Fernández *et al.*, 2000a). Los serovares A y B en Alemania (Hinz, 1973). Los serovares A y C en Japón (Sawata *et al.*, 1980), Australia y

Sudáfrica (Blackall y Eaves, 1988) e Indonesia (Takagi *et al.*, 1991). Únicamente el serovar A en Malasia (Zaini e Iritani, 1992) y China (Chen *et al.*, 1993), y el serovar C en Taiwan (Lin *et al.*, 1995).

Con base en el esquema de serotipificación de Kume, se han identificado los serovares A-1, B-1 y C-2 en Estados Unidos de América (Kume *et al.*, 1983b; Eaves *et al.*, 1989). Los serovares A-4, C-2 y C-4 en Australia (Eaves *et al.*, 1989; Blackall *et al.*, 1990a); A-1, B-1, C-2 y C-3 en Sudáfrica (Kume *et al.*, 1983b; Eaves *et al.*, 1989); A-1 y C-1 en Japón (Kume *et al.*, 1983b); A-1, A-2, B-1 y C-2 en Alemania (Kume *et al.*, 1983b; Eaves *et al.*, 1989), mientras que en aislamientos procedentes de Brasil únicamente se ha identificado el serovar A-3 (Kume *et al.*, 1983b). En México no se tiene información de los serovares presentes.

Sawata *et al.* (1984b) describieron una prueba de serotipificación de *H. paragallinarum* utilizando suero bactericida, la cual clasificó aislamientos en los serovares aglutinantes 1 y 2, y en las HA-1 y HA-4 de Kume, respectivamente. Asimismo, se han utilizado anticuerpos monoclonales dirigidos contra ciertas hemoaglutininas de *H. paragallinarum* en la serotipificación de aislamientos, así como en estudios epizootiológicos en varios países (Blackall *et al.*, 1990b; Blackall *et al.*, 1991; Bragg *et al.*, 1993; Bragg *et al.*, 1997; Yamaguchi *et al.*, 1990b, 1990c, 1990d).

1.1.3. Importancia del esquema de serotipificación de aislamientos de *H. paragallinarum*

La importancia del esquema de serotipificación de Page radica en que se ha observado una relación entre los serovares de Page y la especificidad del inmunotipo de *H. paragallinarum* (Blackall y Reid, 1987; Kume *et al.*, 1980c; Rimler *et al.*, 1977a, 1977b). Aves inmunizadas con una bacterina preparada a partir de un serovar estuvieron protegidas sólo contra el desafío homólogo. Otro estudio ha mostrado que existe protección cruzada parcial contra el serovar B de Page en aves inmunizadas de forma bivalente (Yamaguchi *et al.*, 1990a; Yamaguchi *et al.*, 1991).

La evaluación de la relevancia del esquema de Kume con base en la literatura es difícil, ya que no ha sido usado ampliamente en la serotipificación de aislamientos. Sin embargo, existe evidencia de cambios dramáticos en la incidencia de los serovares de *H. paragallinarum* en Sudáfrica. Bragg *et al.* (1996) mencionan que el serovar C-3 ha emergido como el serovar dominante en los últimos años. La incidencia del serovar C-3 se ha incrementado del 30% en 1970, a más del 70% en los últimos años. Esta emergencia del serovar C-3 de Kume ha ocurrido a la par con el aumento de casos de CI, a pesar del uso extensivo e intensivo de bacterinas contra esta enfermedad. Bragg *et al.* (1996) han sugerido que la aparente falla de las bacterinas comerciales de uso en Sudáfrica (de las cuales ninguna contiene el serovar C-3), ha ocurrido debido a que el serovar dominante en el campo es el C-3. Además, han especulado que los aislamientos serovar C-3 son distintos antigénicamente a las cepas del serogrupo C de Kume (C-1 y C-2) incluidos en las bacterinas comerciales, por lo que es limitada la protección cruzada. En este sentido, se considera que entre los serogrupos de Kume A, B o C no hay protección cruzada, mientras que dentro de un mismo serogrupo existe protección cruzada parcial (Blackall, 1995). La evidencia específica a la fecha es que, en primera, entre los serovares de Kume C-1 y C-2 y, C-2 y C-4, existe protección cruzada. En segunda, que entre los serovares de Kume A-1 y C-1; A-1 y C-2; A-4 y C-2; y A-4 y C-4 no existe protección cruzada (Blackall, 1991; Blackall, 1995; Blackall y Reid, 1987; Kume *et al.*, 1980c).

1.1.4. Productos biológicos contra la coriza infecciosa

Existen en el mercado productos biológicos que contienen cepas de los serovares A y C (bivalentes) y A, B y C (trivalentes) de *H. paragallinarum*. Principalmente, se encuentran bacterinas elaboradas en caldo y adsorbidas en hidróxido de aluminio, o en emulsión, adsorbidas en aceite mineral. Asimismo, se encuentran productos biológicos que contienen únicamente *H. paragallinarum*, o en combinación con otros inmunógenos, tales como: *Pasteurella multocida*, *Escherichia coli* o los virus de la enfermedad de Newcastle, bronquitis infecciosa o influenza aviar (Blackall, 1995).

Sin embargo, la principal consideración radica en el conocimiento de los serovares de *H. paragallinarum* contenidos en dichos productos biológicos. En México, generalmente se emplean las cepas de referencia 221 (A-1), 0083 (A-1), 0222 (B-1),

Spross (serovar B), H-18 (C-1) y Modesto (C-2), principalmente en las combinaciones 221 (A-1) y H-18 (C-1), ó 0083 (A-1), 0222 (B-1) y Modesto (C-2) (Jacobs *et al.*, 1992).

Terzolo *et al.* (1993) y Blackall *et al.* (1994), con base en la identificación de serovares en aislamientos de campo antigénicamente distintos a los incluidos en bacterinas comerciales empleadas en Brasil y Argentina respectivamente, sugieren la elaboración y uso de bacterinas que incluyan aislamientos autóctonos.

1.1.5. Situación de la coriza infecciosa en la República Mexicana

En la República Mexicana se ha informado de la prevalencia de los serovares A, B y C de Page (Fernández *et al.*, 2000a; Sánchez *et al.*, 1994; Soto *et al.*, 1993). Sin embargo, se desconoce la prevalencia de los serovares de Kume. También se ha informado que gran parte de los aislamientos incluidos en estos estudios, han sido obtenidos a partir de brotes de campo provenientes de parvadas inmunizadas contra la CI (Fernández *et al.*, 2000a).

Se han reportado estudios que evalúan la protección conferida por bacterinas comerciales contra el desafío homólogo y heterólogo en pollos de engorda o gallinas de postura inmunizados con estos productos (Díaz *et al.*, 1992; Páez *et al.*, 1991; Varona y Calvo, 1994).

Chípuli *et al.* (1996) y Soriano *et al.* (1998) reportaron la utilización de una prueba de inhibición de la hemoaglutinación para la evaluación serológica de aves inmunizadas con bacterinas comerciales contra la CI.

Soriano *et al.* (2000) encontraron que gallinas de postura inmunizadas en campo con bacterinas bivalentes o trivalentes mostraron títulos de anticuerpos inhibidores de la hemoaglutinación, los cuales se relacionaron con la protección contra signos respiratorios conferida por las bacterinas. Mencionan que aves inmunizadas con la bacterina bivalente mostraron anticuerpos inhibidores de la hemoaglutinación contra el serovar B, así como protección al desafío con un aislamiento perteneciente a este serovar. Asimismo, mencionan que aves inmunizadas con la bacterina trivalente mostraron títulos de

anticuerpos inhibidores de la hemoaglutinación contra los tres serovares. Sin embargo, se observó menor protección al desafío contra un aislamiento serovar A, sugiriendo que podría existir variación antigénica entre la cepa serovar A incluida en la bacterina y el aislamiento de desafío serovar A utilizado.

Los trabajos encontrados en la literatura revelan que es incierta la situación de la CI en la República Mexicana, debido a que se carece de trabajos epizootiológicos o inmunológicos detallados al respecto.

1.2. Justificación

La bacteria *Haemophilus paragallinarum*, agente causal de la CI, se encuentra ampliamente distribuida en la avicultura de la República Mexicana, principalmente en zonas avícolas densamente pobladas. Es en estas áreas donde se perciben más claramente las pérdidas económicas debidas a la infección por esta bacteria, las cuales radican en retraso del crecimiento, pérdida de peso, aumento del número de aves desechadas y, en gallinas de postura, una reducción en la producción de huevo de hasta 40%.

A la fecha se utilizan dos esquemas de serotipificación de aislamientos de *H. paragallinarum*. El esquema de Page permite la clasificación de aislamientos en tres serovares, denominados A, B y C, mientras que el esquema de Kume permite la clasificación de aislamientos en nueve serovares distribuidos en tres serogrupos (A-1 a A-4; B-1; C-1 a C-4). Se ha observado una relación entre la estructura antigénica y la inmunogenicidad de los serovares.

La bacterinización de las parvadas es la práctica más eficaz en la prevención de la infección causada por *H. paragallinarum*. Con base en la identificación de los serovares de Page en la República Mexicana, existen productos biológicos que contienen cepas de los serovares A y C (bivalentes), o A, B y C (trivalentes). No obstante, se presentan brotes de enfermedad en parvadas inmunizadas contra la CI. En este sentido, el presente trabajo de investigación surge de la necesidad de conocer los serovares hemoaglutinantes de *H. paragallinarum* en el esquema de Kume, presentes en aislamientos obtenidos a partir de brotes de campo o remitidos al laboratorio.

1.3. Objetivo general

Clasificar serológicamente aislamientos de *Haemophilus paragallinarum* bajo el esquema de hemoaglutininas de Kume.

1.3.1. Objetivos específicos

- Identificar los serovares hemoaglutinantes presentes en los aislamientos serotipificados.
- Determinar la frecuencia de los serovares hemoaglutinantes entre los aislamientos de *H. paragallinarum* procedentes de casos de CI, o remitidos al laboratorio, de varios estados de la República Mexicana.
- Determinar la presencia o ausencia de los diferentes serovares hemoaglutinantes de *H. paragallinarum* entre los aislamientos serotipificados.

1.4. Hipótesis

Existen aislamientos de *Haemophilus paragallinarum* procedentes de varios estados de la república Mexicana, que difieren en el serovar hemoaglutinante con relación a las cepas de referencia incluidas en las bacterinas comerciales, lo cual podría explicar la baja protección contra signos respiratorios de CI como actualmente sucede.

2. MATERIAL Y MÉTODOS

2.1. Lugar

El presente trabajo de investigación se realizó en los laboratorios del Centro de Investigaciones y Estudios Avanzados en Salud Animal (C.I.E.A.S.A.), de la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia, Universidad Autónoma del Estado de México, ubicado en el km 15.5 de la carretera Toluca-Atlacomulco. Con la siguiente dirección postal: El Cerrillo, Piedras Blancas, Toluca, México 50090.

2.2. Bacterias

Se utilizaron las cepas de referencia 221, 2403, E-3C, HP14; 2671; H-18, Modesto, SA-3 y HP60, correspondientes a los serovares A-1, A-2, A-3, A-4; B-1; C-1, C-2, C-3 y C-4 de *H. paragallinarum*, respectivamente. Las cepas de referencia fueron facilitadas por el Dr. Patrick J. Blackall, Animal Research Institute, Queensland Department of Primary Industries, Yeerongpilly, Australia.

Asimismo, se utilizaron 42 aislamientos de *H. paragallinarum* procedentes de varios estados de la República Mexicana. Los aislamientos fueron obtenidos a partir de parvadas (pollo de engorda, gallinas de postura, reproductoras pesadas y reproductoras semipesadas) con brotes de la enfermedad o remitidos al C.I.E.A.S.A. durante el periodo 1991-1999, los cuales fueron identificados individualmente y previamente serotipificados mediante el esquema de Page (Fernández *et al.*, 2000a).

Para incrementar el número de aislamientos a estudiar, se remitieron solicitudes de aislamientos de *H. paragallinarum* a los principales laboratorios de diagnóstico ubicados en las principales zonas avícolas de la República Mexicana.

2.3. Medios de cultivo

Se empleó el medio TM/SN, el cual contiene cloruro de sodio (NaCl, SIGMA®), 1% (peso/vol); levadura (SIGMA®), 0.01% (peso/vol); glucosa (SIGMA®), 0.05% (peso/vol); agar noble (DIFCO®), 1.5% (peso/vol); y fue suplementado con 5% (vol/vol) de un complejo albúmina-ácido oleico (SIGMA®), 1% de suero de pollo filtrado (BIOCEL®) e inactivado a 56° C por 30 minutos, y 0.00025% (peso/vol) de NAD (SIGMA®). La versión en caldo, referida como TMA, contiene todas las sustancias anteriores, excepto agar noble (Blackall *et al.*, 1990a).

Para el control de pureza de los cultivos se empleó agar sangre de ovino con una estría de *Staphylococcus epidermidis* como colonia nodriza (Blackall *et al.*, 1990a).

2.4. Cultivo de las cepas de referencia

Todas las cepas de referencia de *H. paragallinarum* fueron recibidas en liofilizados en ampollitas. Los liofilizados fueron reconstituidos en solución salina o TMA. La suspensión fue inoculada en agar sangre de ovino con una estría de *S. epidermidis* como colonia nodriza, y en los medios en TM/SN y TMA. Asimismo, la suspensión fue inoculada en embriones de pollo ALPES 1 (libres de patógenos específicos), de 5 a 7 días de edad. Las placas de agar sangre y TM/SN fueron incubadas a 37° C en microaerobiosis, mientras que el caldo TMA y los embriones de pollo fueron incubados en aerobiosis por 24 h, a 37° y 38° C, respectivamente (Blackall *et al.*, 1990a).

Posteriormente, los líquidos embrionarios fueron cosechados y congelados a 196° C en nitrógeno líquido (Blackall *et al.*, 1990a).

2.5. Elaboración de antisueros

Se produjeron antisueros de conejo para cada una de las cepas de referencia (A-1 a C-4), mediante la inoculación de antígenos elaborados en el medio TM/SN. Los cultivos en placas TM/SN de 18 h de incubación, fueron cosechados en PBS (pH 7.2) y centrifugados (5'000 × g por 15 minutos). El paquete bacteriano fue resuspendido en PBS

con timerosal (SIGMA®), 0.01% (peso/vol). Los antígenos fueron ajustados a una densidad óptica de 1.6 a 650 nm, equivalente a 1×10^{10} bacterias/ml (Blackall *et al.*, 1990a).

Para la elaboración de los antisueros de cada cepa de referencia se empleó el esquema de inmunización reportado por Blackall *et al.* (1990). Brevemente, se mezclaron 0.5 ml de antígeno con 0.5 ml de adyuvante completo de Freund (SIGMA®), y se inocularon volúmenes iguales en dos conejos (raza Nueva Zelanda, 3 meses de edad), vía subcutánea. La inoculación se repitió tres días después.

Inoculaciones intravenosas se realizaron en seis ocasiones, incrementando la dosis de 0.5 ml a 4 ml a intervalos de tres días (Blackall *et al.*, 1990a).

Una semana después de la última inyección, los conejos fueron exsanguinados y el suero obtenido y mantenido en congelación a -20° C (Blackall *et al.*, 1990a).

2.6. Preparación de eritrocitos de pollo fijados con glutaraldehído

Se colectó sangre de pollo en solución Alsever (D-dextrosa [SIGMA®], 20.5 g/l; citrato de sodio [SIGMA®], 12 g/l; ácido cítrico [SIGMA®], 0.55 g/l; y NaCl, 4.2 g/l). Los eritrocitos fueron cosechados por centrifugación y lavados tres veces con solución de NaCl, 0.15 M. El paquete celular fue resuspendido en una solución de glutaraldehído (glutaraldehído [SIGMA®], 1% (vol/vol); fosfato de sodio [NaPO₄, SIGMA®], 0.01 M [pH 8.2]; NaCl, 0.01 M), durante 30 minutos a 4° C. Los eritrocitos fijados fueron colectados por centrifugación, lavados cinco veces con NaCl (0.15 M) y cinco veces con agua destilada. Los eritrocitos fueron resuspendidos al 30% en agua destilada con timerosal (0.01%, peso/vol), empleándose como suspensión madre. La suspensión de trabajo de eritrocitos fijados se obtuvo al 1% (vol/vol) en PBS con timerosal (0.01%, peso/vol), albúmina sérica bovina (0.01%, peso/vol) y gelatina bacteriológica (0.001%, peso/vol) (Blackall *et al.*, 1990a).

2.7. Elaboración de las hemoaglutininas

Cultivos de 24 h en TM/SN de cada cepa de referencia y aislamiento de *H. paragallinarum*, fueron cosechados en PBS, lavados una vez y suspendidos en una solución de tiocianato de potasio (KSCN, SIGMA®), 0.5 M, y NaCl, 0.425 M (pH 6.3). La suspensión fue ajustada a una densidad óptica de 1.6 a 650 nm, equivalente a 1×10^{10} bacterias/ml, y sonicada por 30 segundos (60% de pulsos de salida) (Brandson Sonifier, Mod. 250). El paquete bacteriano fue lavado tres veces con PBS y resuspendido a una densidad óptica de 1.6 a 650 nm (Blackall *et al.*, 1990a).

2.8. Prueba de hemoaglutinación

La actividad hemoaglutinante de las suspensiones de hemoaglutinina de cada cepa de referencia y aislamiento de *H. paragallinarum* se determinó mediante diluciones dobles seriadas de 50 μ l en PBS, en microplacas de fondo redondeado (96 pozos, NUNCLON®). Se adicionaron volúmenes iguales de la suspensión de eritrocitos al 1% fijados con glutaraldehído. Posterior a una incubación por 30 minutos a temperatura de laboratorio, el título de unidades hemoaglutinantes (UH) fue leído como el recíproco de la máxima dilución mostrando completa hemoaglutinación (Blackall *et al.*, 1990a).

2.9. Eliminación de hemoaglutininas inespecíficas de los antisueros

Todos los antisueros fueron adsorbidos con una suspensión al 10% de eritrocitos fijados con glutaraldehído. Se mezclaron volúmenes iguales de la suspensión de eritrocitos y antisueros, obteniendo una dilución 1:2. Posteriormente se mantuvieron durante 2 h a temperatura de laboratorio y durante 12 h a 4° C. La mezcla fue centrifugada y el antisuero sobrenadante conservado en congelación a -20° C (Blackall *et al.*, 1990a).

2.10. Absorción de antisueros

Los antisueros de las cepas de referencia de *H. paragallinarum* fueron diluidos 1:40 en PBS con 0.01% (peso/vol) de albúmina sérica bovina y 0.001% (peso/vol) de gelatina bacteriológica. La hemoaglutinina empleada es ajustada a 64 UH, y el volumen fue cinco veces el del suero a absorber. La hemoaglutinina ajustada es centrifugada y eliminado el sobrenadante. El paquete bacteriano de hemoaglutinina fue resuspendido en el antisuero a absorber. La suspensión fue mantenida a temperatura de laboratorio por 2 h, y posteriormente, a 4° C durante 12 h. La suspensión fue centrifugada y el sobrenadante (antisuero absorbido) conservado en congelación. Dependiendo del antisuero, una serie de absorciones fueron necesarias para reducir las respuestas cruzadas, de acuerdo a lo reportado (Eaves *et al.*, 1989):

Antisuero	Hemoaglutinina		
	1ª absorción	2ª absorción	3ª absorción
A-1 (221)	2403	2403	-
A-2 (2403)	221	E3C	-
A-3 (E-3C)	221	-	-
A-4 (HP14)	E3C	E3C	E3C
B-1 (2671)	-	-	-
C-1 (H-18)	Modesto	-	-
C-2 (Modesto)	H-18	H-18	-
C-3 (SA-3)	-	-	-
C-4 (HP60)	H-18	Modesto	-

2.11. Asignación de hemoaglutininas de los aislamientos a los serogrupos de Kume

Cada antisuero sin absorber fue diluido 1:40 en PBS con 0.01% (peso/vol) de albúmina sérica bovina y 0.001% (peso/vol) de gelatina bacteriológica. Posteriormente, se realizaron diluciones dobles seriadas de 50 µl de cada antisuero en PBS, en microplacas de fondo redondeado, de acuerdo al número de antígenos a serotipificar. Cada fila o

columna fue identificada con su correspondiente antisuero, y se incluyeron dos filas o columnas para el control de antígeno y eritrocitos fijados. Se adicionaron a todos los pozos 50 μ l de la hemoaglutinina a probar, previamente ajustada a 4 UH. Posterior a un periodo de incubación de 10 minutos, se adicionaron 100 μ l de una suspensión al 0.75% de eritrocitos fijados con glutaraldehído, y se mantuvieron las microplacas a temperatura de laboratorio por 20 minutos. Los títulos de anticuerpos inhibidores de la hemoaglutinación (IH) fueron leídos como la máxima dilución mostrando completa IH (formación de un botón de eritrocitos sedimentados en el pozo). La asignación de la hemoaglutinina a su correspondiente serogrupo, fue realizada considerando el título más alto de anticuerpos IH mostrado en las columnas o filas de los antisueros pertenecientes a los serogrupos A, B o C (Blackall *et al.*, 1990a).

2.12. Asignación de hemoaglutininas de los aislamientos a los serovares de Kume

Para la asignación de las hemoaglutininas de los aislamientos a los correspondientes serovares de Kume, se realizó el procedimiento anterior. **(2.11. Asignación de hemoaglutininas a los serogrupos de Kume)** con los antisueros absorbidos (Blackall *et al.*, 1990a).

La asignación de la hemoaglutinina de un aislamiento a su correspondiente serovar, fue realizada considerando el título más alto de anticuerpos IH mostrado en las columnas o filas del antisuero absorbido (Blackall *et al.*, 1990a).

3. RESULTADOS

3.1. Actividad hemoaglutinante de las hemoaglutininas

Todas las hemoaglutininas de las cepas de referencia y aislamientos de *H. paragallinarum* mostraron actividad hemoaglutinante posterior al tratamiento químico (KSCN-NaCl) y físico (sonicación). Ninguna de las hemoaglutininas mostró actividad hemoaglutinante previo a los tratamientos químico y físico.

Los títulos obtenidos posteriores al tratamiento químico y físico de las cepas de referencia y aislamientos de *H. paragallinarum* se encontraron entre 16 y 64 UH.

3.2. Asignación de hemoaglutininas de los aislamientos a los serogrupos de Kume

Entre los aislamientos de *H. paragallinarum* estudiados, se identificaron los serogrupos A (18 aislamientos), B (4 aislamientos) y C (14 aislamientos). Los 6 aislamientos restantes no pudieron ser clasificados en ningún serogrupo de Kume (Cuadros 1 y 2).

3.3. Asignación de hemoaglutininas de los aislamientos a los serovares de Kume

Entre los aislamientos de *H. paragallinarum* estudiados pertenecientes al serogrupo A, 11 aislamientos pertenecieron al serovar A-1 y 7 aislamientos al serovar A-2. En el serovar B-1 se reconocieron 4 aislamientos. Los 14 aislamientos agrupados en el serogrupo C pertenecieron al serovar C-2.

No se identificaron aislamientos pertenecientes a los serovares A-3, A-4, C-1, C-3 y C-4.

Los aislamientos de *H. paragallinarum* pertenecientes al serovar A-1 (11) representaron el 26.2% del total de aislamientos estudiados. Los aislamientos serovar A-2 (7) representaron el 16.6%, mientras que los aislamientos serovar B-1 (4) y C-2 (14) representaron el 9.5% y 33.3% respectivamente.

Los 6 aislamientos que no pudieron ser clasificados en algún serovar representaron el 14.2% de los aislamientos estudiados.

3.4. Frecuencia de los diferentes serovares de *H. paragallinarum* en el esquema de Kume procedentes de varios estados de la República Mexicana

La frecuencia de los diferentes serovares de *H. paragallinarum* se muestra en el siguiente cuadro (Cuadro 1):

Estado	Serovar de Kume				
	A-1	A-2	B-1	C-2	NS
Jalisco	2	2	1	4	
México	3	3			2
Michoacán		2			
Morelos	6			8	4
Puebla			2	2	
Sonora			1		
Total	11	7	4	14	6

NS, no serotificables.

Cuadro 2. Procedencia, origen aviar, serogrupo y serovar de los aislamientos de *Haemophilus paragallinarum* estudiados, obtenidos de casos clínicos de coriza infecciosa o remitidos al C.I.E.A.S.A., F.M.V.Z., U.A.E.M.

No. de Aislamiento	Nombre del Aislamiento	Origen Aviar	Procedencia (Estado)	Serogrupo de Kume	Serovar de Kume
1	PFR-1	P	Jalisco	A	A-1
2	PFR-2	P	Jalisco	A	A-1
3	PFR-3	PE	México	A	A-1
4	PFR-4	PE	México	A	A-1
5	PFR-5	PE	México	A	A-1
6	PFR-6	RP	Morelos	A	A-1
7	PFR-7	RP	Morelos	A	A-1
8	PFR-8	RP	Morelos	A	A-1
9	PFR-9	RP	Morelos	A	A-1
10	PFR-10	RP	Morelos	A	A-1
11	PFR-11	RP	Morelos	A	A-1
12	PFR-12	P	Jalisco	A	A-2
13	PFR-13	P	Jalisco	A	A-2
14	PFR-14	PE	México	A	A-2
15	PFR-15	PE	México	A	A-2
16	PFR-16	PE	México	A	A-2
17	PFR-17	PE	Michoacán	A	A-2
18	PFR-18	PE	Michoacán	A	A-2
19	PFR-19	P	Jalisco	B	B-1
20	PFR-20	RP	Puebla	B	B-1
21	PFR-21	P	Puebla	B	B-1
22	PFR-22	P	Sonora	B	B-1
23	PFR-23	RP	Puebla	C	C-2
24	PFR-24	RP	Puebla	C	C-2
25	PFR-25	P	Jalisco	C	C-2
26	PFR-26	P	Jalisco	C	C-2
27	PFR-27	P	Jalisco	C	C-2
28	PFR-28	P	Jalisco	C	C-2
29	PFR-29	RS	Morelos	C	C-2
30	PFR-30	RS	Morelos	C	C-2
31	PFR-31	PE	Morelos	C	C-2
32	PFR-32	PE	Morelos	C	C-2
33	PFR-33	RP	Morelos	C	C-2
34	PFR-34	RP	Morelos	C	C-2
35	PFR-35	RP	Morelos	C	C-2
36	PFR-36	RP	Morelos	C	C-2
37	PFR-37	PE	México	NS	NS
38	PFR-38	PE	México	NS	NS
39	PFR-39	PE	Morelos	NS	NS
40	PFR-40	RP	Morelos	NS	NS
41	PFR-41	RP	Morelos	NS	NS
42	PFR-42	RP	Morelos	NS	NS

P, gallina de postura; RP, reproductores pesados; RS, reproductores semipesados; PE, pollo de engorda. NS, no serotificable.

4. DISCUSIÓN Y CONCLUSIONES

4.1. Discusión

Un estudio previo de clasificación serológica de aislamientos de *H. paragallinarum* de la República Mexicana identificó los serovares A, B y C del esquema de Page entre 40 aislamientos estudiados (Fernández *et al.*, 2000a). Los resultados del anterior estudio mostraron la prevalencia del serovar A en 21 aislamientos, del serovar B en 5 aislamientos y del serovar C en 14 aislamientos, lo cual significó una frecuencia del 52.5%, 12.5% y 35%, respectivamente. En el presente trabajo, se identificaron los tres serogrupos (A, B y C) del esquema de Kume, con las siguientes frecuencias: 11 aislamientos (26.2%) fueron serovar A-1; 7 aislamientos (16.6%) serovar A-2; 5 aislamientos (9.5%) serovar B-1 y 14 aislamientos (33.3%) serovar C-2. De los 42 aislamientos, 6 (14.2%) no pudieron ser clasificados. De los 21 aislamientos previamente identificados como serovar A de Page, 18 fueron clasificados en el serogrupo A de Kume, mientras que 3 aislamientos previamente identificados como serovar A de Page, no pudieron ser clasificados en el esquema de Kume. De la misma forma, de los 5 aislamientos previamente identificados como serovar B de Page, 1 no pudo ser clasificado en el esquema de Kume. Dos aislamientos obtenidos recientemente (1999) no pudieron ser clasificados en ningún serovar del esquema de Kume. Los resultados obtenidos muestran una estrecha relación entre la frecuencia de los serovares de los esquemas de Page y Kume. No obstante, en el estudio anterior, se emplearon las cepas de referencia 0083 (serovar A de Page), 0222 (serovar B) y Modesto (serovar C), las cuales se corresponden con los serovares A-1, B-1 y C-2 del esquema de Kume, respectivamente. Estos resultados sugieren que el empleo de un tipo de hemoaglutinina de cierto serovar puede ser determinante en la clasificación de aislamientos en los correspondientes serovares. En este sentido, el esquema de Kume a diferencia del esquema de Page, permite una clasificación antigénica más detallada de los aislamientos estudiados (Blackall, 1999).

En un estudio similar mediante la utilización de la metodología para la clasificación de aislamientos en el esquema de Kume, Blackall *et al.* (1990) informaron que un aislamiento no pudo ser clasificado debido a la falta de actividad hemoaglutinante. En el

presente trabajo, todos los aislamientos mostraron actividad hemoaglutinante. Sin embargo, 6 aislamientos no pudieron ser clasificados en ninguno de los serovares de Kume. Blackall *et al.* (1990) sugieren que puede deberse a fallas en la remoción de inhibidores en la superficie bacteriana o a la ausencia de una hemoaglutinina. Estudios previos de caracterización bioquímica y fenotípica confirmaron que todos los aislamientos incluidos en el presente trabajo son *H. paragallinarum*, por lo que los aislamientos que no pudieron ser clasificados puedan representar nuevas hemoaglutininas no identificadas por los antisueros producidos para los nueve serovares de referencia actualmente reconocidos. Estudios antigénicos detallados de estos aislamientos serán desarrollados en trabajos de investigación futuros.

En el presente trabajo, los resultados de serotipificación de aislamientos en el esquema de Kume coinciden con los serovares identificados en aislamientos de *H. paragallinarum* de Alemania: A-1, A-2, B-1 y C-2 (Kume *et al.*, 1983b; Eaves *et al.*, 1989). Estos resultados sugieren una coincidencia más que una relación entre los serovares identificados, debido a diferencias geográficas. Sin embargo, se han identificado los serovares A-1, B-1 y C-2 en aislamientos de Estados Unidos de América (Kume *et al.*, 1983b; Eaves *et al.*, 1989). A parte de los trabajos de Kume *et al.* (1983b), Eaves *et al.* (1989) y Blackall *et al.* (1990a), a la fecha no se ha informado de la serotipificación de aislamientos de *H. paragallinarum* bajo el esquema de Kume. Blackall (1999) menciona que puede deberse a que este es un sistema complejo que requiere de equipo y técnicas especiales. En este sentido, el presente trabajo de investigación es el único en su tipo, tanto en la República Mexicana como recientemente al nivel mundial.

En nuestro país, generalmente para la producción de bacterinas de *H. paragallinarum*, se emplean las cepas de referencia 221 (A-1), 0083 (A-1), 0222 (B-1), Spross (serovar B), H-18 (C-1) y Modesto (C-2), principalmente en las combinaciones 221 (A-1) y H-18 (C-1), ó 0083 (A-1), 0222 (B-1) y Modesto (C-2) (Jacobs *et al.*, 1992). Con base en la identificación de los serovares A-1, A-2, B-1 y C-2 en aislamientos de esta bacteria procedentes de varios estados de la República Mexicana, los brotes de CI en parvadas inmunizadas contra esta enfermedad, pudieran ser ocasionados por aislamientos antigénicamente diferentes a los contenidos en estos productos biológicos. De tal forma que parvadas inmunizadas con bacterinas bivalentes que contengan cepas

de los serovares A-1 y C-2, podrían presentar brote de CI con aislamientos de campo de los serovares A-2 ó B-1. Asimismo, parvadas inmunizadas con bacterinas trivalentes que contengan cepas de los serovares A-1, B-1 y C-2, podrían presentar brote de CI con aislamientos de campo del serovar A-2. Aves inmunizadas con una bacterina trivalente podrían presentar la enfermedad causada por una cepa A-2, ya que se ha sugerido que existe cierta protección cruzada dentro de un mismo serogrupo de Kume y que no existe protección cruzada entre diferentes serogrupos o serovares de Kume (Blackall, 1991; Blackall, 1995; Blackall y Reid, 1987; Kume *et al.*, 1980c). Blackall (1999) menciona que son necesarios estudios que determinen el nivel de protección cruzada entre los serogrupos y serovares de Kume.

Como lo señalan Terzolo *et al.* (1993) y Blackall *et al.* (1994), con base en las diferencias antigénicas observadas entre los aislamientos estudiados y cepas de referencia, las cuales podrían significar diferencias inmunogénicas, los productos biológicos contra la CI empleados en un determinado país, deberían incluir cepas autóctonas de los tres serovares de Page, necesarios para conferir protección cruzada contra todos los posibles serovares presentes en dicho país. En este sentido, y a falta de estudios de protección cruzada entre los serovares de Kume, en nuestro país sería necesaria la utilización de bacterinas que contengan cepas de los serovares A-1, A-2, B-1 y C-2.

Yamaguchi *et al.* (1993) informaron que una cepa mutante de *H. paragallinarum* serovar C carente de la hemoaglutinina específica de este serovar, no mostró actividad hemoaglutinante y no fue patógena ni inmunogénica en pollos inmunizados y desafiados, a diferencia de la cepa isogénica de la cual procedía. Recientemente, Fernández *et al.* (1996), bajo la consideración de que la adherencia bacteriana es el primer paso en el proceso de infección de las mucosas, realizaron pruebas de adherencia *in vitro* de *H. paragallinarum* a células epiteliales traqueales de pollo. Los autores concluyeron que las hemoaglutininas de esta bacteria son los principales mecanismos de patogenicidad. Asimismo, informaron que la adherencia bacteriana fue neutralizada por anticuerpos inhibidores de la hemoaglutinación obtenidos a partir de suero y de lavados traqueales de aves inmunizadas, concluyendo que estos anticuerpos inhibidores de la hemoaglutinación conferidos por inmunógenos, son importantes en la protección contra la infección por *H.*

paragallinarum (Fernández *et al.*, 2000b). Lo anterior sugiere que bacterinas que contengan los serovares A-1, A-2, B-1 y C-2 son necesarias para conferir mejor protección contra la CI en parvadas inmunizadas.

En el presente estudio, con base en la frecuencia de los serovares de Kume en los aislamientos procedentes de varios estados de la República Mexicana, se puede observar una relación aparente entre los serovares y el origen geográfico de los mismos, v. gr.: de 14 aislamientos estudiados procedentes del estado de Morelos, 6 pertenecen al serovar A-1 y 8 al serovar C-2, no identificándose los serovares A-2 ó B-1. Sin embargo, no se puede inferir en este sentido debido a la desproporción en el número de aislamientos estudiados. No obstante, los resultados obtenidos pueden servir como base para estudios espizootiológicos futuros bajo el esquema de serotipificación de Kume.

4.2. Conclusiones

Por lo anterior, podemos concluir lo siguiente:

Los serogrupos A, B y C, así como los serovares A-1, A-2, B-1 y C-2 del esquema de Kume se encuentran presentes en aislamientos de *H. paragallinarum* procedentes de varios estados de la República Mexicana.

Los brotes de CI observados en parvadas inmunizadas de forma bivalente o trivalente contra esta enfermedad, pueden ser ocasionados por aislamientos de *H. paragallinarum* de los serovares B-1 ó A-2, respectivamente.

Los aislamientos que no pudieron ser clasificados dentro de un serovar pueden representar nuevos serovares. Sin embargo, estudios antigénicos e inmunológicos son necesarios para determinar su papel en los brotes de CI en parvadas inmunizadas.

Con base en la identificación de los serovares A-1, A-2, B-1 y C-2 en el presente estudio, bacterinas que incluyan estos serovares podrían brindar mayor protección contra brotes de CI en parvadas susceptibles.

5. REFERENCIAS

- Andrade LF. Estructura antigénica y clasificación serológica del agente causal de la coriza infecciosa aviar. Prevención y control. Memorias XV Convención Anual ANECA; 1990 marzo 4-7; Cancún (Quintana Roo) México. México (DF): Asociación Nacional de Especialistas en Ciencias Avícolas AC, 1990: 9-23.
- Biberstein EL, White DC. A proposal for the establishment of two new *Haemophilus* species. J Med Microbiol 1969; 2:75-78.
- Blackall PJ. An evaluation of the cross-protection afforded by inactivated infectious coryza vaccines. Aust Vet J 1991; 68:266-267.
- Blackall PJ. Infectious coryza: overview of the disease and new diagnostic options. Clin Microbiol Reviews 1999; 12:627-632.
- Blackall PJ. Vaccines against infectious coryza. World's Poult Sci J 1995; 51:17-26.
- Blackall PJ, Eaves LE. Serological classification of Australian and South African isolates of *Haemophilus paragallinarum*. Aust Vet J 1988; 65:362-363.
- Blackall PJ, Eaves LE, Morrow CJ. Comparison of *Haemophilus paragallinarum* isolates by restriction endonuclease analysis of chromosomal DNA. Vet Microbiol 1991; 27:39-47.
- Blackall PJ, Eaves LE, Rogers DG. Proposal of a new serovar and altered nomenclature for *Haemophilus paragallinarum* in the Kume hemagglutinin scheme. J Clin Microbiol 1990a; 28:1185-1187.
- Blackall PJ, Matsumoto M, Yamamoto R. Infectious Coryza. In: Calnek BW, Barnes HJ, Beard CW, McDougald CR, Saif YM (Eds). Diseases of Poultry, 10th ed. Iowa State University Press:Ames, 1997:179-190.

- Blackall PJ, Reid GG. Further efficacy studies on inactivated, aluminum-hydroxide-adsorbed vaccines against infectious coryza. *Avian Dis* 1987; 31:527-532.
- Blackall PJ, Silva EN, Yamaguchi T, Iritani Y. Characterization of isolates of avian *Haemophilus* from Brazil. *Avian Dis* 1994; 38:269-274.
- Blackall PJ, Yamaguchi T, Iritani Y, Rogers DG. Evaluation of two monoclonal antibodies for serotyping of *Haemophilus paragallinarum*. *Avian Dis* 1990b; 34:861-864.
- Blackall PJ, Zheng Z, Yamaguchi T, Iritani Y, Rogers DG. Evaluation of a panel of monoclonal antibodies in the subtyping of *Haemophilus paragallinarum*. *Avian Dis* 1991; 35:955-959.
- Bragg RR, Coetzee L, Verschoor JA. Changes in the incidences of the different serovars of *Haemophilus paragallinarum* in South Africa: a possible explanation for vaccination failures. *Onderst J Vet Res* 1996; 63:217-226.
- Bragg RR, Coetzee L, Verschoor JA. Monoclonal antibody characterization of South African field isolates of *Haemophilus paragallinarum*. *Onderst J Vet Res* 1993; 60:181-187.
- Bragg RR, Coetzee L, Verschoor JA. Plasmid-encoded NAD independence in some South African isolates of *Haemophilus paragallinarum*. *Onderst J Vet Res* 1993; 60:147-152.
- Bragg RR, Gunter NJ, Coetzee L, Verschoor JA. Monoclonal antibody characterization of reference isolates of different serogroups of *Haemophilus paragallinarum*. *Avian Pathol* 1997; 26:749-754.
- Chen X, Mifflin JK, Zhang Z, Blackall PJ. Development and application of DNA probes and PCR tests for *Haemophilus paragallinarum*. *Avian Dis* 1996; 40:398-407.

- Chen X, Zhang P, Blackall PJ, Feng W. Characterization of *Haemophilus paragallinarum* isolates from China. *Avian Dis* 1993; 37:574-576.
- Chípuli BL, Varona BJA, Cenicerros RMA. Evaluación inmunológica de un calendario de bacterinización contra la coriza infecciosa. Memorias de la XXI Convención Anual ANECA; 1996 1-5 de mayo; Cancún (Quintana Roo) México. México (D.F.): Asociación Nacional de Especialistas en Ciencias Avícolas, 1996:341-342.
- Díaz EI, Fernández RP, de la Colina AE, Holguín GF. Estudio de cuatro aislamientos de *Haemophilus paragallinarum* y comparación de su comportamiento al desafío con las cepas de referencia 0083, 0222 y Modesto (pertenecientes a los serotipos A, B y C respectivamente de Page) de los estados de Morelos y Puebla. Memorias III Jornada Médico Avícola. Cd. Universitaria (D.F.) México, 1992:54-58.
- Eaves LE, Rogers DG, Blackall PJ. Comparison of hamagglutinin and agglutinin schemes for the serological classification of *Haemophilus paragallinarum* and proposal of a new hemagglutinin serovar. *J Clin Microbiol* 1989; 27:1510-1513.
- Fernández RP, García-Delgado GA, Ochoa GP, Soriano VE. Adherence of *Haemophilus paragallinarum* to chicken tracheal epithelial cells. *Proceedings Haemophilus, Actinobacillus and Pasteurella International Conference*. Acapulco, México. 1996:51.
- Fernández RP, García-Delgado GA, Ochoa GP, Soriano VE. Characterisation of *Haemophilus paragallinarum* isolates from Mexico. *Avian Pathol* 2000a; 29 (5): *in press*.
- Fernández RP, Soriano VE, Longinos GM, Navarrete GP. *In vitro* adherence neutralization of *Haemophilus paragallinarum* to chicken tracheal epithelial cells by hemagglutination-inhibition antibodies. *Proceedings of the 49th Western Poultry Disease Conference*; 2000 march 5-7; Sacramento (California) U.S.A., U.S.A. (Kenneth Square): American Association of Avian Pathologists, 2000b:52.

- Hinz KH. Differentiation of *Haemophilus* strains isolated from chickens. II. Serologic studies on the plate agglutination test. *Avian Pathol* 1973; 2:211-229.
- Horner FR, Bishop GC, Haw C. An upper respiratory disease of commercial chickens resembling infectious coryza, but caused by a V factor-independent bacterium. *Avian Pathol* 1992; 21:421-427.
- Iritani Y. Separation with trypsin of hemagglutinin of *Haemophilus paragallinarum*. *Jpn J Vet Sci* 1979; 41:60-71.
- Iritani Y, Hidaka S. Enhancement of hemagglutinating activity of *Haemophilus gallinarum* by trypsin. *Avian Dis* 1976; 20:614-616.
- Iritani Y, Iwaki S, Yamaguchi T. Biological activities of crude polysaccharide extracted from two different immunotype strains of *Haemophilus gallinarum* in chickens. *Avian Dis* 1981a; 25:29-37.
- Iritani Y, Iwaki S, Yamaguchi T, Sueshi T. Determination of types 1 and 2 hemagglutinins in serotypes of *Haemophilus paragallinarum*. *Avian Dis* 1981b; 25:479-483.
- Iritani Y, Katagiri K, Tsuji K. Slide-agglutination test of *Haemophilus gallinarum* antigen treated by trypsin to inhibit spontaneous agglutination. *Avian Dis* 1978; 22:793-797.
- Iritani Y, Miyajima M. Difference of chicken red blood cells in susceptibility to *Haemophilus paragallinarum* hemagglutinin. *Jpn J Vet Sci* 1979; 41:401-403.
- Iritani Y, Sugimori G, Katagiri K. Serologic response to *Haemophilus gallinarum* in artificially infected and vaccinated chickens. *Avian Dis* 1977; 21:1-8.
- Iritani Y, Yamaguchi T, Katagiri K, Arita H. Hemagglutination inhibition of *Haemophilus paragallinarum* type 1 hemagglutinin by lipopolysaccharide. *Am J Vet Res* 1981c; 42:689-690.

- Jacobs AAC, Cuenen W, Storm PK. Efficacy of a trivalent *Haemophilus paragallinarum* vaccine compared to bivalent vaccines. *Vet Microbiol* 1992; 32:43-49.
- Kume K, Sawata A. Immunologic properties of variants dissociated from serotype 1 *Haemophilus paragallinarum* strains. *Jpn J Vet Sci* 1984; 46:49-56.
- Kume K, Sawata A, Nakai T. Serologic and immunologic studies on the three types of hemagglutinin of *Haemophilus paragallinarum* serotype 1 organisms. *Jpn J Vet Sci* 1983a; 45:783-792.
- Kume K, Sawata A, Nakai T, Matsumoto M. Serological classification of *Haemophilus paragallinarum* with a hemagglutinin system. *J Clin Microbiol* 1983b; 17:958-964.
- Kume K, Sawata A, Nakase Y. *Haemophilus* infection in chickens. 3. Immunogenicity of serotypes 1 and 2 strains of *Haemophilus paragallinarum*. *Jpn J Vet Sci* 1980a; 42:673-680.
- Kume K, Sawata A, Nakase Y. Immunologic relationship between Page's and Sawata's strains of *Haemophilus paragallinarum*. *Am J Vet Res* 1980b; 41:757-760.
- Kume K, Sawata A, Nakase Y. Relationship between protective activity and antigenic structure of *Haemophilus paragallinarum* serotypes 1 and 2. *Am J Vet Res* 1980c; 41:97-100.
- Lin JA, Shyu C, Yamaguchi T, Takagi M. Characterization and pathogenicity of *Haemophilus paragallinarum* serotype C in local chickens to Taiwan. *J Vet Med Sci* 1995; 58:1007-1009.
- Nagaoka K, De Mayo A, Takagi M, Ohta S. Characterization of *Haemophilus paragallinarum* isolated in the Philippines. *J Vet Med Sci* 1994; 1017-1019.

Pález GLA, Martínez CJC, Lozano DB. Estudio comparativo de la protección conferida por siete bacterinas contra la coriza infecciosa. Memorias XVI Convención Anual ANECA; Acapulco (Guerrero) México, México (D.F.): Asociación Nacional de Especialistas en Ciencias Avícolas AC, 1991:210-211.

Page LA. *Haemophilus* infections in chickens. I. Characteristics of 12 *Haemophilus* isolates recovered from diseased chickens. Am J Vet Res 1962; 23:85-95.

Pagés MA, Costa QLL. Eficacia de una oleovacuna inactivada polivalente contra el coriza aviar. Med Vet 1986; 3:27-36.

Rimler RB, Davis RB. Infectious coryza: *In vivo* growth of *Haemophilus gallinarum* as a determinant for cross protection. Am J Vet Res 1977a; 38:1591-1593.

Rimler RB, Davis RB, Page LA. Infectious coryza: Cross-protection studies, using seven strains of *Haemophilus gallinarum*. Am J Vet Res 1977b; 38:1587-1589.

Sánchez GR, López LMF, Lucio DE. Serotipificación de aislamientos de *Haemophilus paragallinarum* en México. Memorias XIX Convención Anual ANECA, mayo 4-7 1994; Asociación de Nacional de Especialistas en Ciencias Avícolas (D.F.), Puerto Vallarta (Jalisco) México, 1994:263-269.

Sawata A, Kume K, Nakai T. Hemagglutinins of *Haemophilus paragallinarum* serotype 1 organisms. Jpn J Vet Sci 1984a; 46:21-29.

Sawata A, Kume K, Nakai T. Serologic typing of *Haemophilus paragallinarum* based on serum bactericidal reactions. Jpn J Vet Sci 1984b; 46:909-912.

Sawata A, Kume K, Nakase Y. Antigenic structure and relationship between serotypes 1 and 2 of *Haemophilus paragallinarum*. Am J Vet Res 1979; 40:1450-1453.

- Sawata A, Kume K, Nakase Y. Biologic and serologic relationship between Page's and Sawata's serotypes of *Haemophilus paragallinarum*. Am J Vet Res 1980; 41:1901-1904.
- Sawata A, Kume K, Nakase Y. *Haemophilus* infections in chickens. 2. Types of *Haemophilus paragallinarum* isolates from chickens with infectious coryza, in relation to *Haemophilus gallinarum* strain No. 221. Jpn J Vet Sci 1978; 39:645-652.
- Soriano VE, Fernández RP. Estandarización de una prueba de inhibición de la hemoaglutinación para la coriza infecciosa como prueba serológica de monitoreo. Memorias XXXIII Reunión Nacional de Investigación Pecuaria; 1998 septiembre 4-5; Veracruz (Veracruz) México. México (D.F.) Instituto Nacional de Investigaciones Pecuarias y Forestales, 1998:246.
- Soriano VE, Fernández RP, García-Delgado GA, Ochoa GP. Relación de títulos séricos de anticuerpos inhibidores de la hemoaglutinación contra *Haemophilus paragallinarum* con la protección conferida en gallinas desafiadas. Vet Méx 2000; 31: in press.
- Soto PE, Barrón FL, Lucio DE, Lozano DB, Sarfati MD, Hermoso AS, González J. Aislamiento y detección del serotipo B de *Haemophilus paragallinarum* en México. Memorias XVIII Concención Anual ANECA, Cancún (Quintana Roo) México, México (D.F.): Asociación Nacional de Especialistas en Ciencias Avícolas AC, 1993:302-305.
- Takagi M, Takahashi T, Hirayama N, Mariana S, Ohta S. Survey on infectious coryza of chickens in Indonesia. J Vet Med Sci 1991; 53:637-642.
- Terzolo HR, Paolicchi FA, Sandoval VE, Blackall PJ, Yamaguchi T, Iritani Y. Characterization of isolates of *Haemophilus paragallinarum* from Argentina. Avian Dis 1993; 37:310-314.

- Varona BJA, Calvo AN. Comportamiento en el campo de una bacterina de coriza infecciosa bivalente contra el desafío con los serotipos A, B y C de Page. Memorias XIX Convención Anual ANECA, mayo 4-7 1994; Puerto Vallarta (Jalisco) México, México (D.F.): Asociación Nacional de Especialistas en Ciencias Avícolas, 1994:367-369.
- Yamaguchi T, Blackall PJ, Takigami S, Iritani Y, Hayashi Y. Immunogenicity of *Haemophilus paragallinarum* serovar B strains. Avian Dis 1991; 35:965-968.
- Yamaguchi T, Blackall PJ, Takigami S, Iritani Y, Hayashi Y. Pathogenicity and serovar-specific hemagglutinating antigens of *Haemophilus paragallinarum* serovar B strains. Avian Dis 1990a; 34:964-968.
- Yamaguchi T, Iritani Y. Occurrence of two hemagglutinins on *Haemophilus paragallinarum* strain 221 and comparison on their properties. Jpn J Vet Sci 1980a; 42:709-711.
- Yamaguchi T, Iritani Y, Hayashi Y. Hamagglutinating activity and immunological properties of *Haemophilus paragallinarum* field isolates in Japan. Avian Dis 1989; 33:511-515.
- Yamaguchi T, Iwaki S, Iritani Y. Serological and immunological differences between two hemagglutinins of *Haemophilus paragallinarum* strain 221. Jpn J Vet Sci 1980b; 42:713-715.
- Yamaguchi T, Kato K, Takigami S, Iritani Y, Hayashi Y. Serological classification of Japanese isolates of *Haemophilus paragallinarum* using two serovar-specific monoclonal antibodies. Avian Dis 1990b; 34:364-368.
- Yamaguchi T, Kobayashi M, Masaki S, Iritani Y. Isolation and characterization of a *Haemophilus paragallinarum* mutant that lacks a hemagglutinating antigen. Avian Dis 1993; 37:970-976.

Yamaguchi T, Takigami S, Iritani Y, Hayashi Y. Characterization and use of monoclonal antibodies to identify *Haemophilus paragallinarum* serovars. Avian Dis 1990c; 34:52-57.

Yamaguchi T, Takigami S, Iritani Y, Hayashi Y. Characterization of two new monoclonal antibodies against *Haemophilus paragallinarum* serovar C hemagglutinating antigen. Avian Dis 1990d; 34:922-927.

Zaini BT, Zai M, Iritani Y. Serotyping of *Haemophilus paragallinarum* isolated in Malaysia. J Vet Med Sci 1992; 54:363-365.