

01694



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

---

DOCTORADO EN CIENCIAS DE LA PRODUCCIÓN Y  
DE LA SALUD ANIMAL

**Caracterización genómica e inmunogénica de**  
***Haemophilus paragallinarum***

**TESIS**

**PARA OBTENER EL GRADO DE**  
**DOCTOR EN CIENCIAS**

**PRESENTA**

**EDGARDO SORIANO VARGAS**

**TUTOR:**

**DR. GUILLERMO TÉLLEZ ISAÍAS**

**COMITÉ TUTORAL:**

**DR. FRANCISCO SUÁREZ GÜEMES**

**DR. ABEL CIPRIÁN CARRASCO**

**MÉXICO, D.F.**

**2004**



Universidad Nacional  
Autónoma de México



**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.

## **Dedicatoria**

A Celene.

Por hacer realidad nuestros sueños de la manera más sublime y hermosa, te amo.

## **Agradecimientos**

Comité tutorial: Dr. Guillermo Téllez I., Dr. Abel Ciprián C. y Dr. Francisco Suárez Güemes.

Revisores: Dra. Cristina Escalante O., Dr. Francisco Trigo T., Dr. Ariel Ortíz M. y Dr. Víctor Tenorio G.

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

John Kirkpatrick Skeeles Poultry Health Research Laboratory, Center of Excellence in Poultry Science, Division of Agriculture, University of Arkansas.

Departamento de Producción Animal: Aves, Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia, Universidad Nacional Autónoma de México.

Dr. Patrick J. Blackall, Agency for Food and Fibre Science, Department of Primary Industries and Fisheries Queensland, Animal Research Institute, Australia.

Dr. Richard Yamamoto, Department of Population Health and Reproduction, School of Veterinary Medicine, University of California, USA.

Dr. Raúl Terzolo, Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria, Argentina.

Dr. Mady S. Dabo, Department of Pathobiology, College of Veterinary Medicine, Oklahoma State University.

A quienes he omitido, pero que no he de olvidar su valiosa colaboración en la realización de este trabajo.

## **Declaración**

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.

A handwritten signature in black ink, appearing to read "Soriano", with a horizontal line underneath it. The signature is written in a cursive style.

**M. en C. Edgardo Soriano Vargas**

## **Contenido**

<b>Resumen</b>	3
<b>Summary</b>	4
<b>Capítulo I</b>	
Introducción General	5
<b>Capítulo II</b>	
<i>Haemophilus paragallinarum</i> : etiología de la coriza infecciosa	10
<b>Capítulo III</b>	
Epizootiología, prevención y control de la coriza infecciosa	35
<b>Capítulo IV</b>	
Estudio de protección cruzada de las nueve serovariedades de <i>H. paragallinarum</i>	68
<b>Capítulo V</b>	
Virulencia de las nueve cepas de referencia de <i>Haemophilus paragallinarum</i>	85
<b>Capítulo VI</b>	
Tipificación genómica de cepas de <i>H. paragallinarum</i> mediante ERIC-PCR	96
<b>Capítulo VII</b>	
Discusión General	110
<b>Referencias</b>	116

## Resumen

En la presente tesis, se realizó la caracterización genómica, inmunogénica y de virulencia de *Haemophilus paragallinarum*. La protección entre las cepas de referencia que representan las nueve serovariedades actualmente reconocidas en el esquema de Blackall fue evaluada mediante la inmunización y desafío de aves susceptibles. Los resultados confirmaron la existencia de tres inmunovariedades relacionadas con los serogrupos A, B y C de este esquema. Hallazgos interesantes en la protección cruzada entre serovariedades fueron observados, por ejemplo: aves inmunizadas con la serovariedad C-4 estuvieron protegidas al desafío con B-1. Sin embargo, se puede concluir que existe protección cruzada entre algunas serovariedades de un mismo serogrupo, pero no entre serovariedades de diferente serogrupo. También se encontraron diferencias en la virulencia de las cepas de referencia. La serovariedad C-1 mostró la más alta virulencia mientras que la serovariedad C-4 mostró la más baja virulencia. La virulencia de *H. paragallinarum* debe ser considerada al evaluar la protección conferida por bacterinas de este microorganismo. La caracterización genómica se realizó mediante la técnica de ERIC-PCR. Los resultados indican que existe diversidad genómica entre las cepas y un número de aislamientos mexicanos estudiados de esta bacteria. Sin embargo, se observó que algunos aislamientos de la misma serovariedad y procedentes del mismo estado, compartieron el patrón ERIC, lo cual llevó a sugerir que estos aislamientos representan clones. La inclusión de las serovariedades presentes en un área geográfica determinada pueden conferir la mejor protección contra la infección por *H. paragallinarum*. También, la caracterización de aislamientos de esta bacteria mediante las pruebas de ERIC-PCR y de virulencia, pueden ser herramientas de gran valor en estudios epizootiológicos de este microorganismo. En conclusión, los resultados obtenidos en la presente tesis permitirán establecer y guiar estrategias más eficaces de prevención y control de la enfermedad ocasionada por esta bacteria.

## Summary

In the present thesis, the genomic, immunogenic and virulence characteristics of *Haemophilus paragallinarum* were investigated. Protection among the reference strains that represent the nine currently recognized serovars in the Blackall scheme by immunization/challenge trials was evaluated. The results confirmed the existence of three immunovars that correlated with A, B and C serogroups of the scheme. Some unusual findings in the cross-protection between serovars of different serogroups were observed. For example, serovar C-4 vaccinated chickens were protected against serovar B-1 challenge. However, the overall results confirmed that cross-protection between some serovars of the same serogroup may exist, but not between serovars of different serogroups. Differences in the virulence of the reference strains were observed. The serovar C-1 strain showed the highest virulence while the serovar C-4 strain showed the lowest virulence. This finding suggests that when evaluating the protection afforded by *H. paragallinarum* vaccines, the virulence of the strain used as a challenge may have to be considered. The genomic characterization was performed by the ERIC-PCR technique. The results indicate that genomic diversity exists among the reference strains and a number of Mexican isolates included in the study. However, some isolates of same serovar and from the same State, shared an ERIC pattern, meaning that these isolates represent a clone. Vaccines that include serovars present in the geographic area where the vaccine is to be used could give better protection against *H. paragallinarum* challenge. Furthermore, ERIC-PCR and virulence characterization of isolates may be tools of great value for epidemiological studies of this microorganism. In conclusion, the results obtained in the present thesis will allow the establishment and on-going guidance of more efficacious strategies for the prevention and control of the disease, infectious coryza, caused by this bacterium.



# **Capítulo I**

## **Introducción General**

## Introducción General

La bacteria *H. paragallinarum* es el agente causal de la coriza infecciosa, una enfermedad que afecta el tracto respiratorio superior de pollos y gallinas. El cuadro clínico se caracteriza por estornudo, descarga nasal e inflamación de senos infraorbitarios (Figura 1). En machos es evidente de manera particular la inflamación de las barbillas (Blackall y Matsumoto, 2003).

En avicultura, el impacto debido a la infección por este microorganismo radica en la disminución significativa de la producción de huevo en gallinas de postura con incremento en el número de aves desechadas. En pollos de engorda, se registra pérdida de peso y retraso del crecimiento (Blackall y Matsumoto, 2003).

En el presente trabajo, se realiza una revisión amplia y exhaustiva de la literatura publicada concerniente a la coriza infecciosa y el agente etiológico de esta enfermedad. En el Capítulo II se revisan los aspectos estrechamente relacionados con *H. paragallinarum*. Esta información permite diferenciar a esta bacteria de otros microorganismos potencialmente patógenos para las aves y la ubican dentro de la familia *Pasteurellaceae*. La epizootiología de la enfermedad es revisada en el Capítulo III. En este Capítulo también son incluidas y discutidas las principales estrategias de prevención y control de la enfermedad.

Actualmente, con base en la caracterización serológica de hemoaglutininas de *H. paragallinarum*, se reconocen nueve serovariedades distribuidas en tres serogrupos (Blackall y Matsumoto, 2003). Originalmente, el esquema de Page, basado en pruebas de aglutinación en placa, reconoció tres serovariedades designadas: A, B y C (Page, 1962). Posteriormente, Kume *et al.* (1983) realizaron la caracterización serológica de 17 aislamientos procedentes de varias partes del mundo, mediante pruebas de inhibición de la hemoaglutinación. En el estudio fueron identificadas siete serovariedades hemoaglutinantes distribuidas en tres serogrupos de la siguiente manera: I, HA-1 a HA-3; II, HA-4 a HA-6; y III, HA-7. Eaves *et al.* (1989) identificaron la hemoaglutinina HA-8 y Blackall *et al.* la hemoaglutinina HA-9, ambas en aislamientos de Australia. Debido a que las serovariedades de Page y los serogrupos de Kume están estrechamente relacionados, Blackall *et al.* (1990)

propusieron combinar la nomenclatura de ambos esquemas, quedando de la siguiente manera: serogrupo A, A-1 a A-4; serogrupo B, B-1; y serogrupo C, C-1 a C-4. Este esquema permite la adición de nuevas serovariedades hemoaglutinantes conforme se vayan identificando. Las serovariedades A, B y C del esquema de Page son representadas por las cepas de referencia 0083, 0222 y Modesto, respectivamente (Page, 1962). Las cepas 0083 y Modesto fueron incluidas en el estudio de Kume *et al.* (1983) y fueron clasificadas como HA-1 y HA-5, respectivamente. Con base en el esquema propuesto por Blackall *et al.* (1990), la cepa 0083 corresponde al serovar A-1 y la cepa Modesto al serovar C-2. En un estudio de caracterización serológica de aislamientos de México, en el cual fueron incluidas las cepas originales del esquema de Page, se confirmó que la cepa 0083 corresponde a la serovariedad A-1 y la cepa Modesto a la serovariedad C-2. La cepa 0222 (B), que no había sido caracterizada con base en este esquema, correspondió a la serovariedad B-1 (Soriano *et al.*, 2001a). Con base en estos resultados y en el cambio de la nomenclatura de las serovariedades de Kume por parte de Blackall *et al.* (1990), se ha propuesto que este sistema de clasificación serológica de hemoaglutininas de *H. paragallinarum* sea renombrado como esquema de Blackall. Esta propuesta ha sido expuesta en diversos foros, incluyendo la reunión reciente de la Sociedad Internacional *Pasteurellaceae* (Soriano *et al.*, 2002a, 2002b). El uso del esquema de Blackall permite un criterio unificado en estudios y prácticas epizootiológicas de *H. paragallinarum*. En la presente tesis, se hace referencia de manera indistinta entre el esquema de Kume y el esquema de Blackall, debido a que al momento no se ha publicado la propuesta formal en una revista indizada de tipo especializado.

Varios estudios han mostrado que los serogrupos de Blackall representan, también, tres inmunovariedades diferentes (Blackall, 1999). Estas inmunovariedades fueron determinadas mediante ensayos de protección en aves inmunizadas y desafiadas con cepas de los tres serogrupos (Rimler *et al.*, 1977a, 1977b). Con relación a la protección cruzada entre las serovariedades de Blackall, se tiene evidencia que existe protección cruzada entre las serovariedades C-1 y C-2 y C-2 y C-4, pero no entre las serovariedades A-1 y C-1, A-1 y C-2, A-4 y C-2 y A-4 y C-4 (Kume *et al.*, 1980; Blackall y Reid, 1987; Blackall, 1991). En el presente estudio, se investigó la protección cruzada entre las nueve serovariedades de

*H. paragallinarum* actualmente reconocidas en el esquema de Blackall. Fueron empleadas las nueve cepas de referencia de esta bacteria, las cuales proceden originalmente de Japón (A-1 y C-1), Alemania (A-2 y B-1), Brasil (A-3), Estados Unidos (C-2), Sudáfrica (C-3) y Australia (A-4 y C-4). También se investigó la inmunogenicidad de estas cepas mediante la detección de anticuerpos séricos inhibidores de la hemoaglutinación, los cuales se encuentran estrechamente relacionados con la protección en aves inmunizadas contra la coriza infecciosa (Kume *et al.*, 1984; Yamaguchi *et al.*, 1993). Los resultados obtenidos son presentados en el Capítulo IV. Estos resultados confirman la existencia de tres inmunovarietades en *H. paragallinarum*. También confirman la protección cruzada entre las serovarietades previamente estudiadas por otros autores. Hallazgos interesantes en la protección cruzada entre otras serovarietades también fueron encontrados. Como parte de las conclusiones de este estudio, hago mención que los resultados obtenidos permitan guiar de manera más eficaz las estrategias de inmunización contra esta enfermedad en varias partes del mundo, incluido nuestro país.

De manera similar, en el Capítulo V, la virulencia de las serovarietades incluidas en el estudio antes mencionado fue investigada. La virulencia fue evaluada mediante una escala de valores asignados a los signos típicos de coriza infecciosa (Figura 1). Los resultados obtenidos indican que existen diferencias en la virulencia de las cepas de referencia de *H. paragallinarum*, que representan las nueve serovarietades actualmente reconocidas.

Como sucede con otros microorganismos, las diferencias antigénicas entre las cepas de referencia de *H. paragallinarum*, así como en la inmunogenicidad y virulencia de las mismas, tienen una base genética (Schmidt y Hensel, 2004). En el Capítulo VI, se presentan los resultados de la caracterización genómica de cepas de referencia de esta bacteria. También fueron incluidos un total de 29 aislamientos procedentes de varios estados de la República Mexicana. La caracterización genómica de las cepas se realizó mediante el empleo de una prueba de reacción en cadena de la polimerasa basada en el consenso intergénico repetitivo de enterobacterias (ERIC-PCR, por sus siglas en inglés). La técnica no es específica para *H. paragallinarum*; sin embargo, permite la discriminación entre bacterias de una misma especie o cepa (Versalovic *et al.*, 1991). Las nueve cepas de

referencia mostraron patrones ERIC diferentes, lo cual llevó a la conclusión de que existe diversidad genómica en esta bacteria. De forma similar, se obtuvieron un número de patrones diferentes entre los aislamientos de México. Sin embargo, algunos aislamientos de una determinada serovariedad y procedentes de un mismo estado, principalmente, mostraron patrones ERIC similares, lo cual sugiere que estos aislamientos representan clones. Esta prueba puede ser empleada, de manera adicional o complementaria, en estudios epizootiológicos de *H. paragallinarum* obtenidos de brotes de coriza infecciosa. Estudios detallados que incluyan la serotipificación de hemoaglutininas y la técnica de ERIC-PCR en aislamientos obtenidos de brotes en una misma área, permitirán guiar en la prevención y control de dichos brotes de enfermedad.

En el Capítulo VII se discuten de manera integral los resultados obtenidos en los trabajos de investigación aquí descritos.



**Figura 1.** Pollo infectado artificialmente con *Haemophilus paragallinarum*. Se observa exudado nasal e inflamación facial.

## Capítulo II

***Haemophilus paragallinarum*: etiología de la coriza infecciosa**

**Soriano VE y HR Terzolo**

***Veterinaria México, 35(3):in press. 2004***

### *Haemophilus paragallinarum*: Etiología de la coriza infecciosa

Edgardo Soriano Vargas\*

Horacio Raúl Terzolo\*\*

#### Abstract

The bacterium *Haemophilus paragallinarum* is the etiological agent of infectious coryza, an upper respiratory disease of chickens. The economic impact of the disease caused by this bacterium is considerable, particularly in multi-age farms. The bacteriological characteristics of this etiological agent are described in a manner that allocates it within the *Pasteurellaceae* family, and also shows its relationship to other potentially pathogenic agents in poultry. Particular emphasis is made concerning the more recent knowledge of the antigenic structure and the serological classification of *H. paragallinarum*.

**Key words:** *HAEMOPHILUS PARAGALLINARUM*, **INFECTIOUS CORYZA, POULTRY DISEASES, CHICKENS.**

---

Recibido el 28 de febrero de 2003 y aceptado

\* Programa de Doctorado en Ciencias de la Producción y de la Salud Animal, Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia, Universidad Nacional Autónoma de México, 04510, México, D. F.

Dirección actual: Centro de Investigación y Estudios Avanzados en Salud Animal, Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia, Universidad Autónoma del Estado de México, 50000, Toluca, Estado de México, México. E-mail: soriano@uaemex.mx

\*\* Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria, CC 276, 7620, Balcarce, Argentina. E-mail: hterzolo@balcarce.inta.gov.ar

## **Resumen**

La bacteria *Haemophilus paragallinarum* es el agente causal de la coriza infecciosa, enfermedad que afecta el tracto respiratorio superior de los pollos. Ésta tiene impacto considerable en la avicultura, principalmente en granjas con edades múltiples. En este trabajo, se revisan las características bacteriológicas que ubican a esta bacteria dentro de la familia *Pasteurellaceae* y la relacionan con otros agentes potencialmente patógenos para las aves. Se da énfasis al conocimiento más reciente en cuanto a la estructura antigénica y la clasificación serológica de *H. paragallinarum*.

**Palabras clave:** *HAEMOPHILUS PARAGALLINARUM*, **CORIZA INFECCIOSA, ENFERMEDADES DE LAS AVES, POLLOS.**

## **Introducción**

La bacteria *Haemophilus paragallinarum* es el agente causal de la coriza infecciosa, enfermedad del tracto respiratorio superior de pollos y gallinas (*Gallus gallus*); se caracteriza por producir descarga nasal, estornudo e inflamación facial. El impacto económico de la infección por esta bacteria radica en las pérdidas que ocasiona a la avicultura, debido a retraso del crecimiento, pérdida de peso, incremento en el número de aves eliminadas y predisposición a la enfermedad respiratoria crónica complicada. En gallinas de postura, la producción de huevo puede reducirse hasta 40%; lo más común es el desencadenamiento de la enfermedad cuando las aves alcanzan el pico de postura.<sup>1</sup> Cuando la coriza cursa sin otras enfermedades asociadas, se caracteriza por ser enfermedad aguda de curso corto (dos semanas) y curación espontánea. Sin embargo, es común la asociación con otros agentes bacterianos o virales. En estos casos, la duración del curso de la enfermedad se prolonga (siete semanas) y el cuadro se denomina coriza infecciosa complicada.<sup>2</sup> Las aves con cuadro complicado no se curan fácilmente y suelen quedar secuelas diversas, siendo común el descarte de un número importante de aves. Como ha sucedido con otros agentes infecciosos, se tiene evidencia de cepas variantes de *H. paragallinarum* y la infección que esta bacteria ocasiona.<sup>3</sup> En algunos casos las bacterinas



existentes no han prevenido la infección de estas cepas variantes.<sup>4,5</sup> En el presente trabajo de actualización se revisa la información disponible sobre el agente etiológico de esta enfermedad, dando particular énfasis al conocimiento más reciente.

### ***Historia***

En 1932 De Blicke<sup>6</sup> propuso el nombre *Bacillus haemoglobinophilus coryza gallinarum* para el agente causal del “catarro contagioso” de los pollos. Con base en estudios bacteriológicos y en los criterios del sistema de nomenclatura binomial, de manera independiente, en 1934, Eliot y Lewis<sup>7</sup> y Delaplane *et al.*<sup>8</sup> propusieron el nombre *Haemophilus gallinarum* para el agente causal de la coriza infecciosa. Varios estudios mostraron el requerimiento de los factores de crecimiento X (hemina) y V (NAD, dinucleótido de adenina nicotinamida) para el cultivo *in vitro* de *H. gallinarum*.<sup>9-12</sup> Sin embargo, McGaughey<sup>13</sup> y Page<sup>14</sup> señalaron la independencia del factor X de crecimiento en un número de aislamientos estudiados. Basados en estos estudios, Biberstein y White<sup>15</sup> propusieron la especie *H. paragallinarum* para los microorganismos causantes de coriza infecciosa, dependientes del factor V pero independientes del factor X de crecimiento. A partir de entonces, con excepción de un informe,<sup>16</sup> los nuevos aislamientos en brotes de coriza infecciosa se clasifican como *H. paragallinarum*. Hoy se acepta que *H. gallinarum* nunca existió y que la confusión se debió a la descripción errónea de los aislamientos estudiados a causa de limitaciones en las técnicas de laboratorio empleadas.<sup>17,18</sup>

### ***Distribución***

Se ha informado la presencia de *H. paragallinarum*, o de la coriza infecciosa, en Argentina,<sup>19</sup> Australia,<sup>20</sup> Bulgaria,<sup>21</sup> Canadá,<sup>22</sup> Egipto,<sup>23</sup> Gran Bretaña,<sup>24</sup> Guatemala,<sup>25</sup> Holanda,<sup>6</sup> India,<sup>26</sup> Indonesia,<sup>27</sup> Iraq<sup>28</sup> y Suiza,<sup>29</sup> entre otros países. Estos informes indican distribución amplia de *H. paragallinarum* en el mundo, principalmente en países con industria avícola intensiva.

En Estados Unidos de América se han informado brotes de coriza infecciosa en California,<sup>30-33</sup> Alabama<sup>34</sup> y Oregon.<sup>35</sup> En México, en Sonora,<sup>36</sup> Jalisco, México, Michoacán, Morelos, Puebla y Yucatán.<sup>37</sup>

La coriza infecciosa es una enfermedad cosmopolita, existe en todas partes donde se crían gallinas. Sin embargo, se considera exótica en Nueva Zelanda, único país que parece estar libre de *H. paragallinarum*. Cabe resaltar que esa nación está, además, libre de tifoidea aviar (*Salmonella gallinarum*), ornitobacteriosis (*Ornithobacterium rhinotracheale*) y coriza de los pavos (*Bordetella avium*).<sup>38</sup>

## ***Etiología***

### ***Clasificación***

La bacteria *H. paragallinarum* pertenece a la familia *Pasteurellaceae*.<sup>39</sup> Aun cuando se reconoce que es independiente del factor X, se le considera especie bacteriana integrante del género *Haemophilus*.<sup>18</sup> A partir de 1992 se ha informado el aislamiento de *H. paragallinarum* independientes del factor V a partir de aves con coriza infecciosa en Sudáfrica<sup>40-42</sup> y recientemente en México.<sup>43</sup> La identificación de estas cepas independientes de ambos factores de crecimiento ponen en duda la actual nomenclatura de este microorganismo. Sin embargo, la clasificación taxonómica actual permanece así: superreino, *Procaryotae*; reino, *Eubacteria*; división, *Gracilicutes*; clase, *Protobacteria*; familia, *Pasteurellaceae*; género, *Haemophilus* y especie, *H. paragallinarum*.<sup>39</sup>

Hollander y Mannheim,<sup>44</sup> mediante la caracterización de quinonas respiratorias, y Piechulla *et al.*,<sup>45</sup> mediante estudios de caracterización genética y fenotípica, sugirieron que *H. paragallinarum* fuera asignado al género *Actinobacillus*. Aunque no se han desarrollado estudios definitivos, es probable que pronto esta bacteria sea considerada miembro de otro género en la familia *Pasteurellaceae*.<sup>46</sup>

### ***Morfología y tinción***

*H. paragallinarum* es una bacteria gramnegativa no esporulada. En cultivos en agar, es pleomórfica y presenta morfología cocobacilar con tendencia a la formación de cadenas cortas y algunos filamentos. En cultivos en caldo, es frecuente observar formas muy pleomórficas e inclusive bacterias degradadas que aparecen como si fueran manchas de los colorantes empleados (Terzolo, datos no publicados). En frotis directos de mucus nasal es

común observar formas bacilares más largas con presencia de gránulos metacromáticos en su interior, que se visualizan con azul de metileno.<sup>47</sup> El microorganismo mide de 1 a 3 µm de longitud por 0.4 a 0.8 µm.<sup>48</sup> A la fecha esta bacteria se considera inmóvil. Sin embargo, en un estudio reciente basado en pruebas bioquímicas e inmunológicas, se observó motilidad en *H. paragallinarum* bajo ciertas condiciones de cultivo.<sup>49</sup>

### *Requerimientos de crecimiento y medios de cultivo*

La forma reducida de NAD (NADH) (1.56 a 25 µg/ml de medio),<sup>50</sup> o la forma oxidada (20 a 100 µg/ml),<sup>51</sup> son necesarias para el cultivo *in vitro* de *H. paragallinarum*. Las excepciones son los aislamientos independientes de NAD descritos en Sudáfrica y México.<sup>40-43</sup> También el agregado de 1.0%-1.5% de cloruro de sodio (NaCl) es esencial.<sup>50</sup> Algunas cepas tienen mejor crecimiento cuando se agrega 0.1%-0.5% de suero inactivado de pollo o de caballo al medio de cultivo.<sup>52</sup> El NAD puede ser adicionado a los medios de cultivo o aportado por una bacteria nodriza (*Staphylococcus* spp.) cultivada como una estría alimentadora transversal al cultivo de *H. paragallinarum*.

La mayoría de las cepas de *H. paragallinarum* se desarrollan en condiciones de microaerobiosis o anaerobiosis, con incremento en la tensión de CO<sub>2</sub> (5%-10%) en la atmósfera.<sup>53</sup> También son adecuadas las atmósferas producidas con el tradicional método del frasco con vela o el agregado de 5%-10% de CO<sub>2</sub> y también las destinadas al crecimiento de las bacterias del género *Campylobacter*, que pueden generarse mediante el empleo de sobres comerciales o mezclas gaseosas.<sup>2</sup> El periodo de incubación en base de agar con 10% de sangre desfibrinada de bovino u ovino es de 16 a 24 h, luego de incubar a 37°C. Para el cultivo de *H. paragallinarum* se han empleado los siguientes medios con diversos suplementos: Infusión cerebro-corazón, infusión de carne de pollo, medio de mantenimiento (HMM),<sup>48</sup> agar de Casman,<sup>53</sup> base de agar para gonococos,<sup>54</sup> agar medio de prueba (TMA)<sup>55</sup> o agar Columbia.<sup>4</sup> El caldo de Casman modificado se utilizó libre de suero para la producción de bacterinas.<sup>56</sup> Asimismo, el TMA complementado con suero de pollo y NADH se conoce como TM/SN.<sup>57</sup>

Otra opción muy conveniente es el uso de sangre equina hemolizada, que se prepara manteniéndola en baño María a 56°C durante 40 minutos con agitación periódica.<sup>2</sup> A

diferencia de la sangre no hemolizada, que siempre requiere la adición de NAD, o bien el cultivo de una cepa nodriza, la hemólisis libera NAD de los eritrocitos y entonces se prescinde de su adición al medio. Además, en este agar las colonias adquieren más del doble de tamaño que en la sangre no hemolizada con la estría de la bacteria nodriza (Figura 1). Se recomienda el uso de la sangre equina, ya que en esta especie animal los nutrientes son muy adecuados y recomendables para el desarrollo de microorganismos muy exigentes. Otra de las ventajas es que esta sangre, una vez hemolizada, puede conservarse por tiempo prolongado en congelación. La combinación de la base de agar Columbia con 5%-7% de sangre equina hemolizada en atmósfera microaerófila es un medio muy adecuado y puede usarse como medio selectivo cuando se le adicionan antibióticos como: Bacitracina, 5 UI/ml; cloxacilina, 5 µg/ml y vancomicina, 20 µg/ml.<sup>2,4</sup>

La combinación de discos con el factor X de crecimiento en agar TM/S (sin NAD) puede ser empleada para probar el requerimiento de ambos factores. Sin embargo, el uso de discos comerciales puede producir un alto porcentaje de cultivos que falsamente pueden parecer dependientes de ambos factores, X y V. Como ya se mencionó, éste fue uno de los motivos por los cuales se describió erróneamente a la especie *H. gallinarum* como dependiente del factor X. Por ello, tanto la marca comercial del disco como la del medio de cultivo a emplear, deben ser cuidadosamente controlados, para seleccionar el producto más adecuado.<sup>58</sup> Resulta mucho más seguro realizar la prueba de la porfirina para determinar la dependencia del factor X.<sup>2,39</sup> En lugar de los discos, también puede usarse la estría nodriza de *S. aureus* en agar con sangre no hemolizada, para demostrar el crecimiento satelital de las colonias que presentan dependencia de NAD; éste es un procedimiento muy práctico y económico que está al alcance de cualquier laboratorio de bacteriología.

### *Morfología de las colonias y propiedades relacionadas*

Después del cultivo en base de agar sangre sin hemolizar durante 24-48 h, los aislamientos de *H. paragallinarum* dependientes del factor V producen colonias pequeñas, en forma de gotas de rocío de 0.3 mm de diámetro, adyacentes a la colonia nodriza. Las colonias son circulares, convexas, de superficie lisa, no pigmentadas o hemolíticas. Las colonias se tornan más pequeñas a medida que se encuentran más alejadas de la colonia nodriza. Para

que el crecimiento satelital sea obvio, los cultivos deben ser examinados de 24 a 48 h después de la inoculación. Los aislamientos de *H. paragallinarum* independientes de NAD, producen colonias de 1-2 mm que no muestran crecimiento satelital.<sup>48</sup>

Cuando se emplea agar Columbia con sangre equina hemolizada, las colonias son mucho más grandes, alcanzan de 3 a 5 mm de diámetro en el mismo periodo de incubación. En este agar las colonias aisladas son las más grandes, mientras que se vuelven más pequeñas cuando crecen cercanas entre sí, ya que compiten por los nutrimentos del medio (Figura 1). La adición de los antibióticos antes mencionados al agar Columbia no interfiere con el crecimiento ni reduce el tamaño de las colonias. El empleo de medios de cultivo envejecidos o deshidratados conduce a una disminución del tamaño de las colonias.<sup>2</sup> Es interesante destacar que en este agar, el aislamiento primario de casos de coriza infecciosa aguda produce el aislamiento de colonias grandes y mucoides, mientras que el cultivo de cepas no patógenas, que generalmente han sufrido muchos subcultivos *in vitro*, produce el desarrollo de colonias mucho más pequeñas (Terzolo, datos no publicados).

### *Propiedades fisiológicas*

*H. paragallinarum* tiene un metabolismo quimiorganotrófico mesofílico y contiene ubiquinona y dismetilmenaquinona como componentes en la cadena respiratoria. Además, se mostró una tendencia en la reducción de ubiquinona en favor de la dismetilmenaquinona cuando se cultivó en presencia de fumarato.<sup>44</sup>

En *H. paragallinarum* se han identificado receptores de transferrina bacterianos, proteínas de membrana externa homólogas a la Tbp1 y Tbp2 de otros agentes patógenos, que se unen a terminaciones específicas de la ovotransferrina, y permiten la utilización del hierro para su crecimiento.<sup>59,60</sup>

### *Propiedades bioquímicas*

Bioquímicamente, *H. paragallinarum* puede ser diferenciado de otros bacilos gram-negativos potencialmente patógenos para las aves (Cuadro 1). Se han evaluado varios métodos para detectar la fermentación de carbohidratos en *H. paragallinarum*. Sin embargo, mediante el método en placa se obtienen los resultados más repetibles.<sup>61</sup> Usando

el método en placa con rojo de fenol, se estudiaron 92 aislamientos de *H. paragallinarum* procedentes de varias partes del mundo y 40 aislamientos de México.<sup>62,63</sup> En ambos estudios, todos los aislamientos produjeron ácido a partir de glucosa y manosa, pero no de arabinosa, celobiosa, dulcitol, galactosa, inositol, lactosa, melezitosa, melibiosa, rafinosa, ramnosa, ribosa, trehalosa y xilosa. Se observó variación en la producción de ácido a partir de manitol, maltosa y sucrosa, y se reconocieron cinco biovariantes bioquímicos. En México, únicamente se han reconocido las biovariantes I a IV.<sup>63</sup>

La capacidad de reducir nitratos a nitritos, la fermentación de glucosa sin la producción de gas, y la actividad negativa de la oxidasa, así como la presencia de la enzima fosfatasa alcalina y la falla de producir indol o hidrolizar urea o gelatina, parecen ser características uniformes en *H. paragallinarum*.<sup>48</sup> Esta bacteria se puede diferenciar de la mayoría de las bacterias gramnegativas de otros géneros, por su incapacidad para producir formazán a partir del clorhidrato de 3,3,5-trifenil-tetrazolio (TTC).<sup>4</sup> Si bien esta característica todavía no tiene un uso difundido, es un método muy práctico, por lo que es recomendable incluirla en el diagnóstico de esta especie bacteriana.

### *Susceptibilidad a antimicrobianos*

Los estudios iniciales de la susceptibilidad antimicrobiana de *H. paragallinarum* se han realizado mediante el método de Kirby-Bauer.<sup>55,64</sup> Empleado este método se estudió la susceptibilidad antimicrobiana de aislamientos de India.<sup>65,66</sup> También se ha empleado la técnica de microdilución en caldo en el estudio de la susceptibilidad antimicrobiana de esta bacteria, que parece ser más precisa y repetible.<sup>67</sup> Un total de 92 aislamientos procedentes de varias partes del mundo, fueron sensibles a la ampicilina, eritromicina y penicilina, y mostraron susceptibilidad variable a la neomicina, estreptomina y tetraciclina, lo cual permitió el reconocimiento de cinco biovariantes de susceptibilidad en los aislamientos estudiados.<sup>62</sup> De forma similar, en un estudio que incluyó 40 aislamientos de México<sup>63</sup> se identificaron los cinco biovariantes de susceptibilidad descritos por Blackall *et al.*<sup>62</sup> Recientemente, en un estudio similar que incluyó 22 aislamientos de México y nueve cepas de referencia de *H. paragallinarum*, 96.8% de los microorganismos estudiados fueron

sensibles a la enrofloxacin, y mostraron susceptibilidad variable a la oxitetraciclina, gentamicina, fosfomicina, amoxicilina y trimetoprima, entre otros antimicrobianos.<sup>68</sup>

### *Serotipificación*

Inicialmente, mediante pruebas de aglutinación en placa, Page<sup>14</sup> identificó tres serovariedades en aislamientos de *H. paragallinarum*, designadas como A, B y C. Posteriormente, Kume *et al.*,<sup>69</sup> mediante pruebas de inhibición de la hemoaglutinación, identificaron siete hemoaglutininas (HA-1 a HA-7) distribuidas en tres serogrupos (I, II y III). Estudios previos mostraron una relación entre las serovariedades identificadas mediante ambos métodos.<sup>70,71</sup> Con base en lo anterior y en la identificación de dos hemoaglutininas adicionales,<sup>72</sup> Blackall *et al.*<sup>73</sup> combinaron estos métodos y modificaron la nomenclatura para reconocer nueve serovariedades distribuidas en tres serogrupos así: A-1, A-2, A-3, A-4, B-1, C-1, C-2, C-3 y C-4. Éste es un método de caracterización más detallado que permite la inclusión de serovariedades conforme se vayan identificando. Sin embargo, a la fecha existe confusión en el empleo y nomenclatura de estos esquemas de serotipificación. Soriano *et al.*<sup>74</sup> han propuesto la utilización del esquema de Blackall para la clasificación serológica de hemoaglutininas de *H. paragallinarum*, que permite un criterio unificado para estudios y prácticas epizootiológicas.

En el esquema de Page se han reconocido las serovariedades A, B y C en Argentina,<sup>4</sup> Brasil,<sup>75</sup> Egipto,<sup>23</sup> España,<sup>76</sup> Estados Unidos de América,<sup>14</sup> Filipinas,<sup>77</sup> Indonesia,<sup>78</sup> México<sup>63</sup> y Sudáfrica.<sup>79</sup> Las serovariedades A y B en Alemania<sup>80</sup> y China.<sup>81,82</sup> Las serovariedades A y C en Japón,<sup>83</sup> Malasia,<sup>84</sup> Australia<sup>85</sup> e India,<sup>86</sup> y únicamente la serovariedad C en Taiwán.<sup>87</sup>

Con base en el esquema de Blackall, se han identificado las serovariedades A-1, B-1 y C-2 en Estados Unidos de América,<sup>69,72</sup> A-4, C-2 y C-4 en Australia,<sup>72,73</sup> A-1, B-1, C-2 y C-3 en Sudáfrica,<sup>69,72</sup> A-1 y C-1 en Japón,<sup>69,72</sup> A-3 en Brasil,<sup>69</sup> C-3 en Zimbabwe<sup>88</sup> y A-1, A-2, B-1 y C-2 en Alemania<sup>69,72</sup> y México.<sup>37</sup> Aquí la distribución de las serovariedades de Blackall es la siguiente: A-1, A-2, B-1 y C-2 en Jalisco, A-1 y A-2 en el Estado de México, B-1 y C-2 en Puebla, A-2 en Michoacán, C-2 en Morelos y B-1 en Sonora y Yucatán.<sup>37</sup>

### *Estructura antigénica*

Hinz<sup>80</sup> describió un antígeno termolábil de tipo específico y un antígeno termoestable de tipo común en cepas de las serovariedades A y B. Sawata *et al.*<sup>89</sup> identificaron dos antígenos de tipo específico, termolábiles y sensibles a la tripsina, designados como L1 y L2. Asimismo, identificaron tres antígenos comunes para las dos serovariedades: L3, termolábil y sensible a la tripsina; HL, termolábil y resistente a la tripsina; y HS, termoestable y resistente a la tripsina. Otros estudios han mostrado correlación entre la especificidad de las serovariedades aglutinantes y la inmunovariedad de *H. paragallinarum*.<sup>90-92</sup>

Kato *et al.*<sup>93</sup> describieron por primera vez la capacidad hemoaglutinante en aislamientos de *H. paragallinarum*. La patogenicidad e inmunogenicidad de las cepas están directamente correlacionadas con la capacidad hemoaglutinante.<sup>18</sup> Es por ello que las cepas usadas en las bacterinas deben hemoaglutinar para ser protectoras y es muy importante usar la prueba de hemoaglutinación para clasificar a las cepas vacunales, puesto que estos antígenos son cruciales en la protección, y sus tipos y variantes deben estar muy bien representados en la formulación antigénica que se emplee para las bacterinas. Si bien es posible aislar cepas de campo de *H. paragallinarum* totalmente apatógenas de aves portadoras que no tienen enfermedad, o encontrar mutantes espontáneas en el laboratorio, todas ellas carecen de poder protector por no inducir la producción de anticuerpos hemoaglutinantes y, por tanto, tampoco podrían ser usadas como vacunas atenuadas.

Las cepas patógenas de las serovariedades A, B y C poseen determinantes antigénicos con capacidad hemoaglutinante de eritrocitos de varias especies animales, aun distantes filogenéticamente.<sup>94</sup> Sin embargo, suspensiones bacterianas de la serovariedad A hemoaglutinan eritrocitos frescos de varias especies animales, mientras que tanto eritrocitos como la suspensión bacteriana de cepas de las serovariedades B y C deben ser tratadas por medios físicos o químicos, o ambos, para expresar actividad hemoaglutinante.<sup>95-97</sup> También es posible realizar suspensiones con las cepas que no hemoaglutinan, inactivarlas con timerosal y conservarlas de siete a diez días en refrigeración, para comprobar luego que por envejecimiento algunas de ellas se pueden tornar hemoaglutinantes (Blackall y Terzolo, datos no publicados). Estas cepas que luego del tratamiento o del envejecimiento adquieren



capacidad hemoaglutinante, en realidad han tenido estos antígenos ocultos por otros más superficiales o capsulares, como el ácido hialurónico, que al degradarse exterioriza a las hemoaglutininas. En otros casos, cepas de la serovariedad B o C aglutinan sin tratamiento alguno, como lo informaron Soriano<sup>52</sup> y Eaves *et al.*,<sup>72</sup> quienes detectaron actividad hemoaglutinante en cepas de las tres serovariedades.

Dos tipos de hemoaglutininas (HA) se han identificado en la cepa 221 (A-1) de *H. paragallinarum*. La HA tipo 1 presentó propiedades biológicas e inmunológicas similares al antígeno aglutinante L1 específico de serovariedad. La HA tipo 2 presentó características similares al antígeno aglutinante HL, común entre serovariedades.<sup>98,99</sup> Posteriormente se determinó que la HA tipo 1 era específica de la serovariedad A, y que la HA tipo 2 era un antígeno formado por las tres serovariedades.<sup>100</sup> De forma similar, Sawata *et al.*<sup>101</sup> describieron tres tipos de HA localizados en la membrana externa de cepas pertenecientes a la serovariedad A. Los antígenos fueron nombrados como HA-L1, HA-HL y HA-HS debido a que 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 correspondían a las HA tipo 1 y 2 descubiertas por Yamaguchi e Iritani.<sup>98</sup> De forma similar al antígeno aglutinante L1, el antígeno HA-L1 indujo inmunidad específica de serovariedad en pollos inmunizados.<sup>92,102</sup>

Iritani *et al.*<sup>103</sup> extrajeron un antígeno polisacárido, termolábil, a partir de una cepa de la serovariedad 2, que presentó propiedades similares al antígeno L2 específico de la serovariedad C. De forma inversa a la HA tipo 1 de la serovariedad 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*.<sup>104</sup> De forma similar, Bragg *et al.*<sup>105</sup> mediante un panel de tres anticuerpos monoclonales, mostraron que los antígenos de tipo lipopolisacárido y proteínico son estructuras antigénicas importantes.

### *Caracterización celular*

Mouahid *et al.*<sup>106</sup> caracterizaron la composición de carbohidratos, ácidos grasos y fosfolípidos de *H. paragallinarum*. Los principales carbohidratos identificados fueron ribosa, glucosa, galactosa y glucosamina, glucoheptosa, mientras que un número menor de

cepas exhibieron también 2-keto-3-desoxioctano y *n*-ácido glicolilneuramínico. El ácido tetradecanoico (14:0), un ácido hexanoico monoinsaturado (16:1 *cis*) y *n*-hexadecanoato (16:0), representaron 90% de los ácidos grasos totales identificados. Los principales fosfolípidos identificados fueron fosfatidil-etanolamina (80%), lisofosfatidil-etanolamina (10%) y fosfatidil-glicerina (10%).

Blackall *et al.*<sup>107</sup> caracterizaron las proteínas de membrana externa (OMP, por sus siglas en inglés, *outer membrane protein*) de las cepas de referencia 0083 (serovariedad A-1), 0222 (B-1) y Modesto (C-2), incluyendo el aislamiento australiano HP31 (C-2). Las principales OMP fueron designadas de A a H. El rango de pesos estimado fue de 26 500 (G) hasta 87 000 kDa (A). La OMP H (31 500 kDa) estuvo presente únicamente en el aislamiento HP31.

### **Conclusión**

La bacteria *H. paragallinarum* posee características fenotípicas que permiten identificarla y diferenciarla de otras bacterias patógenas para los pollos. Con base en los requerimientos de NAD y otras propiedades relacionadas, es probable que la clasificación taxonómica de este microorganismo cambie en un futuro. Sin embargo, aislamientos de esta bacteria gramnegativa, tanto dependientes como independientes de este factor de crecimiento, identificados únicamente en Sudáfrica y México, son considerados agentes etiológicos de la coriza infecciosa. Asimismo, las hemoaglutininas de *H. paragallinarum* son reconocidas como las estructuras antigénicas principales. A la fecha, la clasificación serológica de estos antígenos en el esquema de Blackall, reconoce nueve serovariedades distribuidas en tres serogrupos. El papel de estas estructuras en la patogenia e inmunogenicidad de esta bacteria, así como la prevención y control de la coriza infecciosa serán discutidos en otro trabajo de revisión en esta revista.

### **Referencias**

1. Blackall PJ, Matsumoto M. Infectious Coryza. In: Saif YM, Barnes HJ, Glisson JR, Fadly AM, McDougald LR, Swayne DE, editors. Diseases of Poultry, Ames: Iowa State Press, 2003:691-703.

2. Terzolo HR. Revisión sobre coriza infecciosa: propuestas de investigación para su diagnóstico y control. *Rev Med Vet* 2000; 81:262-269.
3. Blackall PJ. Infectious coryza: overview of the disease and new diagnostic options. *Clin Microbiol Rev* 1999; 12:627-632.
4. 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.
5. Terzolo HR, Sandoval VE, Pondal FG. Evaluation of inactivated infectious coryza vaccines in chickens challenged by serovar B strains of *Haemophilus paragallinarum*. *Avian Pathol* 1997; 26:365-376.
6. De Blicck L. A haemoglobinophilic bacterium as the cause of contagious catarrh of the fowl (*coryza infectiosa gallinarum*). *Vet J* 1932; 88:9-13.
7. Elliot CP, Lewis MR. A hemophilic bacterium as a cause of infectious coryza in the fowl. *J Am Vet Med Assoc* 1934; 84:878-888.
8. Delaplane JP, Erwin LE, Stuart HO. A hemophilic bacillus as the cause of an infectious rhinitis (coryza) of fowls. *Bull Agric Exp Stn R I Coll* 1934; 244:1-12.
9. Nelson JB. Studies on an uncomplicated coryza of the domestic fowl. 1. The isolation of a bacillus which produces a nasal discharge. *J Exp Med* 1933; 58:689-692.
10. Schalm OW, Beach JR. The etiology of a respiratory disease of chickens. *Science* 1934; 79:416-417.
11. Schalm OW, Beach JR. Cultural requirements of the fowl-coryza bacillus. *J Bacteriol* 1936; 31:161-169.
12. Delaplane JP, Erwin LE, Stuart HO. The effect of the X-factor, of sodium chloride, and of the composition of the nutrient media upon the growth of the fowl coryza bacillus, *Haemophilus gallinarum*. *J Agric Res* 1938; 56:919-926.
13. McGaughey CA. Organisms of the *B. influenzae* group in fowls. *J Comp Pathol* 1932; 45:58-66.
14. Page LA. *Haemophilus* infections in chickens. I. Characteristics of 12 *Haemophilus* isolates recovered from diseased chickens. *Am J Vet Res* 1962; 23:85-95.

15. Biberstein EL, White DC. A proposal for the establishment of two new *Haemophilus* species. J Med Microbiol 1969; 2:75-78.
16. Malkinson M, Machany S, Aronovici A, Davidov K, Weisman Y. Mixed infection with *Chlamydia psittaci*, fowlpox virus and *Haemophilus gallinarum* in broiler breeder chicks. Vet Rec 1987; 120:461-462.
17. Blackall PJ. The avian haemofili. Clin Microbiol Rev 1989; 2:270-277.
18. Blackall PJ, Yamamoto R. *Haemophilus gallinarum* – a re-examination. J Gen Microbiol 1989; 135:469-474.
19. Linzitto OR, Abeiro HD, Benítez R, Menéndez NA. Estudios bacteriológicos y clínicos de coriza infecciosa. Rev Med Vet 1988; 69:98-101.
20. Arzey GG. The effects of infectious coryza on the egg production of a layer flock. Aust Vet J 1987; 64:124-126.
21. Giurov B. Clinical cases of infectious coryza and properties of isolated *Haemophilus* strains. Vet Med Nauki 1984; 21:22-30.
22. Kerr E, Hammarlund MA. Coryza – plain or complicated. Proceedings of 31st Western Poultry Disease Conference & 16th Poultry Health Symposium; 1982 february 24 – march 3; Davis (California) USA. California (Davis): University of California, 1982:5-6.
23. Aly M. Characteristics and pathogenicity of *Haemophilus paragallinarum* isolates from upper Egypt. Assiut Vet Med J 2000; 43:319-338.
24. Roberts DH, Hanson BS, Timms L. Observations in the incidence and significance of *Haemophilus gallinarum* in outbreaks of respiratory disease among poultry in Great Britain. Vet Res 1964; 76:1512-1516.
25. Matzer N. Summary of studies of infectious coryza in Guatemala. Proceedings of 23rd Western Poultry Disease Conference & 8th Poultry Health Symposium; 1974 march 19-21; Davis (California) USA. California (Davis): University of California, 1974:48-49.
26. Sobti DK, Dhaneswar NS, Chaturvedi VK, Mehra KN. Isolation and characterisation of *Haemophilus paragallinarum* and morphoculturally related organisms from cases of infectious coryza in Mahakaushal belt. Indian Vet J 2001; 78:987-989.

27. 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.
28. Rashid RA, Poeiecha JZ. Epidemiological study of an outbreak of infectious coryza on a poultry farm in Iraq. *Avian Dis* 1984; 28:235-237.
29. Baumann P. Presence and incidence of *Haemophilus paragallinarum* in Swiss poultry stocks. *Schweiz Arch Tierheilkd* 1982; 124:189-201.
30. Rooney WF. Infectious coryza – the disease and current control measurements in California. Proceedings of 28th Western Poultry Disease Conference and 13th Poultry Health Symposium; 1979 march 19-22; Davis (California) USA. California (Davis): University of California, 1979:11-14.
31. Cutler GJ. Living with infectious coryza. Proceedings of 29th Western Poultry Disease Conference, 5th ANECA & 14th Poultry Health Symposium; 1980 april 22-25; Acapulco (Guerrero) México. California (Davis): University of California, 1980:79-80.
32. Droual R, Bickford AA, Charlton BC, Cooper GL. Outbreak of infectious coryza in Northern California. Proceedings of 39th Western Poultry Disease Conference; 1990 march 4-6; Sacramento (California) USA. California (Davis): University of California, 1990:12.
33. Droual R, Bickford AA, Charlton BR, Cooper GL, Channig SE. Infectious coryza in meat chickens in the San Joaquin Valley of California. *Avian Dis* 1990; 34:1009-1016.
34. Hoerr FJ, Putnam M, Rowe-Rossmanith S, Cowart W, Martin J. Case report: infectious coryza in broiler chickens in Alabama. Proceedings of 43rd Western Poultry Disease Conference; 1994 february 27 - march 1; Sacramento (California) USA. California (Davis): University of California, 1994:62-63.
35. Matsumoto M. Persistence of *Haemophilus paragallinarum*: field observations and laboratory findings. Proceedings of 48th Western Poultry Disease Conference; 1999 april 24-27; Vancouver (British Columbia) Canada. California (Davis): University of California, 1999:81-82.

36. Guzmán LM, Fabela RM, Garrido CM. Experiences with bacterins in the control of infectious coryza in Sonora. Proceedings of 29th Western Poultry Disease Conference, 5th ANECA & 14th Poultry Health Symposium; 1980 april 22-25; Acapulco (Guerrero) Mexico. California (Davis): University of California, 1980:76-78.
37. Soriano VE, Blackall PJ, Dabo SM, Téllez GI, García-Delgado GA, Fernández RP. Serotyping of *Haemophilus paragallinarum* isolates from Mexico by the Kume hemagglutinin scheme. Avian Dis 2001; 45:680-683.
38. Black A. Bacterial and parasitic diseases of New Zealand poultry. Surveillance 1997; 24:3-5.
39. Kilian M, Biberstein EL. *Haemophilus*. In: Krieg NR, Holt JG, editors. Bergey's Manual of Systematic Bacteriology, Baltimore: Williams & Wilkins, 1984:568-569.
40. 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.
41. Horner FR, Bishop GC, Jarvis CJ, Coetzee HT. NAD (V-factor)-independent and typical *Haemophilus paragallinarum* infection in commercial chickens: a five year field study. Avian Pathol 1995; 24:453-463.
42. Mouahid M, Bisgaard M, Morley AJ, Mutters R, Mannheim W. Occurrence of V-factor (NAD) independent strains of *Haemophilus paragallinarum*. Vet Microbiol 1992; 31:363-368.
43. García FA, Blackall PJ, Angulo E. Presencia de *Haemophilus paragallinarum* NAD independiente en México. Memorias de la XXVII Convención Anual ANECA & 51st Western Poultry Disease Conference; 2002 mayo 1-4; Puerto Vallarta (Jalisco) México. México (DF): Asociación Nacional de Especialistas en Ciencias Avícolas, AC, 2002:59.
44. Hollander R, Mannheim W. Characterization of haemophilic and related bacteria by their respiratory quinones and cytochromes. Int J Syst Bacteriol 1975; 25:102-107.
45. Piechulla K, Hinz KH, Mannheim W. Genetic and phenotypic comparison of three new avian *Haemophilus*-like taxa and of *Haemophilus paragallinarum* Biberstein and

- White 1969 with other members of the family *Pasteurellaceae* Pohl 1981. *Avian Dis* 1985; 29:601-612.
46. Blackall PJ. Haemophili at Thermophylae? A review of the avian haemophili. Proceedings of 37th Western Poultry Disease Conference; 1988 february 29 – march 2; Davis (California) USA. California (Davis): University of California, 1988:161-162.
  47. Yamamoto R. Infectious coryza. In: Calnek BW, Barnes HJ, Beard CW, Reid WH, Yoder HW Jr, editors. *Diseases of Poultry*. 9th ed. Ames: Iowa State University Press, 1991:186-195.
  48. Blackall PJ, Yamamoto R. Infectious coryza. In: Swayne DE, Glisson JR, Jackwood MW, Pearson JE, Reed WM, editors. *A Laboratory Manual for the Isolation and Identification of Avian Pathogens*, 4th ed. Kenneth Square: American Association of Avian Pathologists, 1998:29-34.
  49. Negrete-Abascal E, Vaca S, García-González OP, Tavares F, Andrade A, García RM, *et al.* Isolation of a putative *fliC* sequence in *Haemophilus paragallinarum* and *Pasteurella multocida*. Proceedings of the International Pasteurellaceae Society Conference; 2002 may 5-10; Banff (Alberta) Canada. Canada (Guelph): International Pasteurellaceae Society, 2002:37.
  50. Rimler RB, Shotts EB, Brown J, Davis RB. The effect of sodium chloride and NADH on the growth of six strains of *Haemophilus* species pathogenic to chickens. *J Gen Microbiol* 1977; 98:349-354.
  51. Sato S, Shifrine M. Application of the agar gel precipitation test to serologic studies of chickens inoculated with *Haemophilus gallinarum*. *Avian Dis* 1965; 9:591-598.
  52. Soriano VE. Serotipificación de aislamientos de *Haemophilus paragallinarum* bajo un esquema de hemoaglutininas (tesis de maestría). México (D.F.) México: Universidad Nacional Autónoma de México, 2000.
  53. Rimler RB, Shotts EB, Brown J, Davis RB. The effect of atmospheric conditions on the growth of *Haemophilus gallinarum* in a defined medium. *J Gen Microbiol* 1976; 92:405-409.

54. Sueishi T, Hayashi Y, Iritani Y. Use of gonococcal agar medium for preparation of antigen of *Haemophilus paragallinarum* hemagglutinin. Avian Dis 1982; 26:186-190.
55. Rimler RB. Studies of the pathogenic avian haemophili. Avian Dis 1979; 24:1006-1018.
56. Rimler RB, Shotts EB, Davis RB. A growth medium for the production of a bacterin for immunization against infectious coryza. Avian Dis 1975; 19:318:322.
57. Reid GG, Blackall PJ. Comparison of adjuvants for an inactivated infectious coryza vaccine. Avian Dis 1987; 31:59-63.
58. Blackall PJ, Farrah JG. An evaluation of commercial discs for the determination of the growth factor requirements of avian haemophili. Vet Microbiol 1985; 10:125-131.
59. Alcantara J, Schyvers AB. Transferrin binding protein two interacts with both the N-lobe and C-lobe of ovotransferrin. Microbiol Pathol 1996; 20:73-85.
60. Ogunnariwo J A, Schryvers AB. Correlation between the ability of *Haemophilus paragallinarum* to acquire ovotransferrin-bound iron and the expression of ovotransferrin-specific receptors. Avian Dis 1992; 36:655-663.
61. Blackall PJ. An evaluation of methods for the detection of carbohydrate fermentation in avian *Haemophilus* species. J Microbiol Methods 1983; 1:275-280.
62. Blackall PJ, Eaves LE, Rogers DG. Biotyping of *Haemophilus paragallinarum* isolates using hemagglutinin serotyping, carbohydrate fermentation patterns, and antimicrobial drugs resistance patterns. Avian Dis 1989; 33:491-496.
63. Fernández RP, García-Delgado GA, Ochoa P, Soriano VE. Characterization of *Haemophilus paragallinarum* isolates from Mexico. Avian Pathol 2000; 29:473-476.
64. Reece RL, Coloe PJ. The resistance to antimicrobial agents of bacterial isolated from pathological conditions of birds in Victoria, 1978 to 1983. Aust Vet J 1985; 62:379-381.
65. Prabhakar TG, Dorairajan N, Swaminathan R, Sivakumar S. Antibiotic sensitivity pattern of *Haemophilus* species from infectious coryza in Namakkal. Indian J Anim Sci 1998; 68:888-889.



66. Prasad V, Murthy KK, Murthy PR. Antibiotic sensitivity studies on *Haemophilus paragallinarum* isolated from chickens. Indian Vet J 1999; 76:253-254.
67. Blackall PJ. Antimicrobial drug resistance and the occurrence of plasmids in *Haemophilus paragallinarum*. Avian Dis 1988; 32:742-747.
68. Soriano VE, Velásquez QE, Vera NA, Salado CR, Fernández RP. Susceptibilidad *in vitro* de *Haemophilus paragallinarum* a varios antimicrobianos. Memorias XVII Congreso Latinoamericano de Avicultura, 2001 octubre 9-12; Ciudad de Guatemala (Guatemala) Guatemala. Guatemala (Ciudad de Guatemala): Asociación Nacional de Avicultores, AC, 2001:524-528.
69. Kume K, Sawata A, Nakai T, Matsumoto M. Serological classification of *Haemophilus paragallinarum* with a hemagglutinin system. J Clin Microbiol 1983; 17:958-964.
70. Kume K, Sawata A, Nakase Y. Immunologic relationship between Page's and Sawata's strains of *Haemophilus paragallinarum*. Am J Vet Res 1980; 41:757-760.
71. 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.
72. Eaves LE, Rogers DG, Blackall PJ. Comparison of hemagglutinin and agglutinin schemes for the serological classification of *Haemophilus paragallinarum* and proposal of a new hemagglutinin serovar. J Clin Microbiol 1989; 27:1510-1513.
73. 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 1990; 28:1185-1187.
74. Soriano VE, Téllez G, Fernández RP. Proposal of the Blackall scheme for hemagglutinin serotyping of *Haemophilus paragallinarum*. Poult Sci 2002; 80(Suppl. 1):86.
75. Blackall PJ, Silva EN, Yamaguchi T, Iritani Y. Characterization of isolates of avian haemophili from Brazil. Avian Dis 1994; 38:269-274.
76. Pagés MA, Costa QLL. Eficacia de una oleovacuna inactivada polivalente contra el coriza aviar. Med Vet 1986; 3:27-36.

77. Nagaoka K, De Mayo A, Takagi M, Ohta S. Characterization of *Haemophilus paragallinarum* isolated in the Philippines. *J Vet Med Sci* 1994; 1017-1019.
78. Poernomo S, Sutarma, Rafiee M, Blackall PJ. Characterization of isolates of *Haemophilus paragallinarum* from Indonesia. *Aust Vet J* 2000; 78:759-762.
79. Blackall PJ, Eaves LE. Serological classification of Australian and South African isolates of *Haemophilus paragallinarum*. *Aust Vet J* 1988; 65:362-363.
80. Hinz KH. Differentiation of *Haemophilus* strains isolated from chickens. II. Serologic studies on the plate agglutination test. *Avian Pathol* 1973; 2:211-229.
81. Chen X, Zhang P, Blackall PJ, Feng W. Characterization of *Haemophilus paragallinarum* isolates from China. *Avian Dis* 1993; 37:574-576.
82. Zhang PJ, Miao M, Sun H, Gong Y, Blackall PJ. Infectious coryza due to *Haemophilus paragallinarum* serovar B in China. *Aust Vet J* 2003; 81:96-97.
83. Kume K, Sawata A, Nakase Y. *Haemophilus* infection in chickens. 1. Characterization of *Haemophilus paragallinarum* isolated from chickens affected with coryza. *Jpn J Vet Sci* 1978; 40:65-73.
84. Zaini BT, Zai M, Iritani Y. Serotyping of *Haemophilus paragallinarum* isolated in Malaysia. *J Vet Med Sci* 1992; 54:363-365.
85. Thornton AM, Blackall PJ. Serological classification of Australian isolates of *Haemophilus paragallinarum*. *Aust Vet J* 1984; 61:251-253.
86. Tongaonkar S, Deshmunkh SG, Blackall PJ. Characterization of Indian isolates of *Haemophilus paragallinarum*. *Proceedings of XXVII Convención Annual ANECA & 51st Western Poultry Disease Conference; 2002 may 1-4; Puerto Vallarta (Jalisco) México. México (D.F.): Asociación Nacional de Especialistas en Ciencias Avícolas, AC, 2002:58-59.*
87. 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.
88. Bragg RR. Isolation of serovar C-3 *Haemophilus paragallinarum* from Zimbabwe: a further indication of the need for the production of vaccines against infectious coryza

- containing local isolates of *Haemophilus paragallinarum*. Onderstepoort J Vet Res 2002; 69:129-132.
89. 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.
  90. 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 1980; 42:673-680.
  91. Kume K, Sawata A, Nakase Y. Relationship between protective activity and antigenic structure of *Haemophilus paragallinarum* serotypes 1 and 2. Am J Vet Res 1980; 41:97-100.
  92. 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 1983; 45:783-792.
  93. Kato K, Tsubahara H, Okuma S. Infectious coryza of chickens. VI. Hemagglutinating properties of *Haemophilus gallinarum*. Jpn J Vet Sci 1965; 27:457.
  94. Iritani Y, Miyajima M. Difference of chicken red blood cells in susceptibility to *Haemophilus paragallinarum* hemagglutinin. Jpn J Vet Sci 1979; 41:401-403.
  95. Iritani Y. Separation with trypsin of hemagglutinin of *Haemophilus paragallinarum*. Jpn J Vet Sci 1979; 41:60-71.
  96. Iritani Y, Hidaka S. Enhancement of hemagglutinating activity of *Haemophilus gallinarum* by trypsin. Avian Dis 1976; 20:614-616.
  97. 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.
  98. Yamaguchi T, Iritani Y. Occurrence of two hemagglutinins on *Haemophilus paragallinarum* strain 221 and comparison on their properties. Jpn J Vet Sci 1980; 42:709-711.

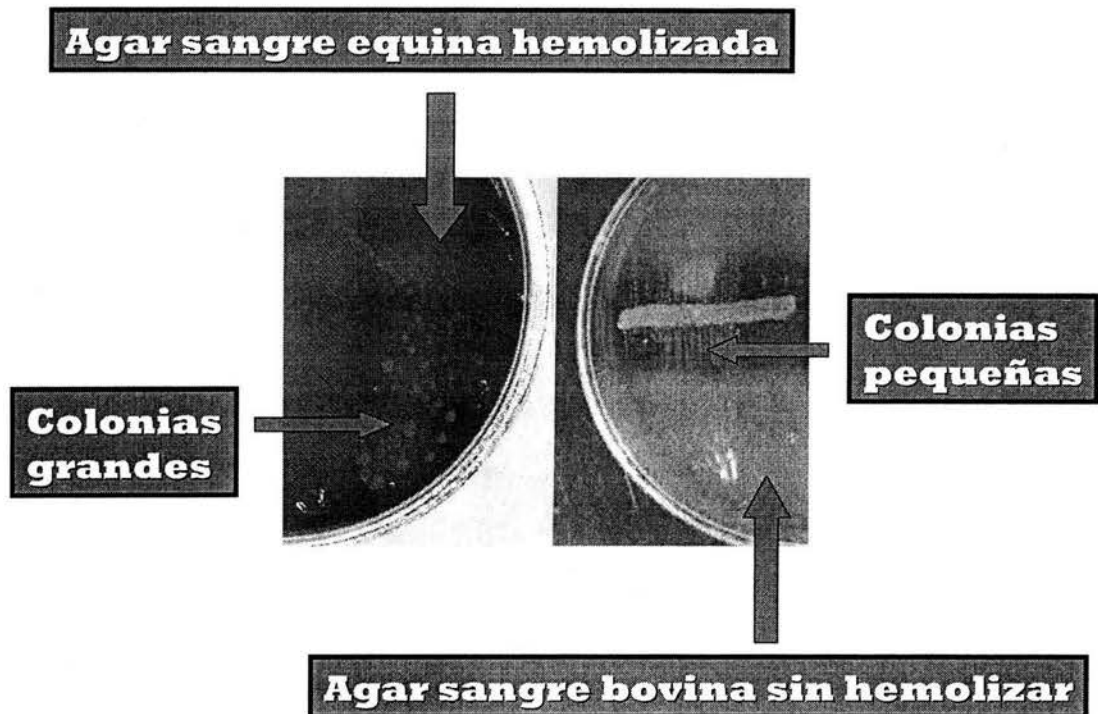
99. Yamaguchi T, Iwaki S, Iritani Y. Serological and immunological differences between two hemagglutinins of *Haemophilus paragallinarum* strain 221. *Jpn J Vet Sci* 1980; 42:713-715.
100. Iritani Y, Iwaki S, Yamaguchi T, Sueshi T. Determination of types 1 and 2 hemagglutinins in serotypes of *Haemophilus paragallinarum*. *Avian Dis* 1981; 25:479-483.
101. Sawata A, Kume K, Nakai T. Hemagglutinins of *Haemophilus paragallinarum* serotype 1 organisms. *Jpn J Vet Sci* 1984; 46:21-29.
102. Kume K, Sawata A. Immunologic properties of variants dissociated from serotype 1 *Haemophilus paragallinarum* strains. *Jpn J Vet Sci* 1984; 46:49-56.
103. Iritani Y, Iwaki S, Yamaguchi T. Biological activities of crude polysaccharide extracted from two different immunotype strains of *Haemophilus gallinarum* in chickens. *Avian Dis* 1981; 25:29-37.
104. Iritani Y, Yamaguchi T, Katagiri K, Arita H. Hemagglutination inhibition of *Haemophilus paragallinarum* type 1 hemagglutinin by lipopolysaccharide. *Am J Vet Res* 1981; 42:689-690.
105. Bragg RR, Coetzee L, Verschoor JA. Effects of growth conditions and incubation times on the expression of antigen of *Haemophilus paragallinarum* which are detected by monoclonal antibodies. *Onderstepoort J Vet Res* 1997; 64:57-63.
106. Mouahid M, Hinz KH, Engelgard E, Mutters R, Mannheim W. Characterization of *Haemophilus paragallinarum* by analysis of whole cell carbohydrates, fatty acids and phospholipids. *Avian Pathol* 1992; 21:127-136.
107. Blackall PJ, Rogers DG, Yamamoto R. Outer-membrane proteins of *Haemophilus paragallinarum*. *Avian Dis* 1990; 34:871-877.
108. Soriano VE, Fernández RP, Téllez G. *Ornithobacterium rhinotracheale*: un agente patógeno emergente en avicultura. *Vet Méx* 2000; 31:245-253.

**Cuadro 1**

PROPIEDADES BIOQUÍMICAS DE *Haemophilus paragallinarum* Y OTRAS BACTERIAS GRAM-NEGATIVAS PATÓGENAS PARA LAS AVES

Reacción	Agente				
	<i>Haemophilus paragallinarum</i>	<i>Pasteurella multocida</i>	<i>Riemerella anatipestifer</i>	<i>Pasteurella gallinarum</i>	<i>Ornithobacterium rhinotracheale</i>
Reducción de nitratos	+	+	-	+	-
Catalasa	-	+	+	+	-
Oxidasa	-	+	+	+	+
Ureasa	-	-	+	-	+/-
Indol	-	+	-	-	-
B-galactosidasa	+	+/-	-	+/-	+
Descarboxilasa de lisina	-	-		-	-
Descarboxilasa de ornitina	-	-		-	-

Tomado de Soriano *et al.*<sup>108</sup>



**Figura 1.** Comparación de dos cultivos en agar Columbia sin NAD al tercer día de incubación en atmósfera microaerófila. Aislamiento regional (Argentina) de *Haemophilus paragallinarum*. A la izquierda: Con 7% de sangre equina hemolizada. Colonias grandes que no requieren la estría alimentadora de la cepa nodriza. A la derecha: Con 7% de sangre bovina sin hemolizar. Colonias muy pequeñas que sólo crecen en satelitismo de la estría alimentadora de la cepa nodriza (*Staphylococcus aureus*).

## **Capítulo III**

### **Epizootiología, prevención y control de la coriza infecciosa**

**Soriano VE y HR Terzolo**

***Veterinaria México, 35(3):in press. 2004***

### Epizootiología, prevención y control de la coriza infecciosa

Edgardo Soriano Vargas \*

Horacio Raúl Terzolo \*\*

#### Abstract

In the present paper, the epizootiology of infectious coryza, an upper respiratory tract disease of chickens is reviewed. The disease is characterized by sneezing, nasal discharge and facial swelling. However, very virulent strains of *Haemophilus paragallinarum*, the etiologic agent, have also been described as causing lesions of pneumonia, airsacculitis and arthritis. Pathogenic mechanisms and virulence factors of this bacterium identified at the date are described. Furthermore, particular emphasis is made concerning the diagnosis of the disease and identification of the causal agent. Also, prevention and control strategies of the disease are reviewed.

**Key words: INFECTIOUS CORYZA, HAEMOPHILUS PARAGALLINARUM, POULTRY DISEASES, CHICKENS.**

---

Recibido el 28 de febrero de 2003 y aceptado

\* Programa de Doctorado en Ciencias de la Producción y de la Salud Animal, Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia, Universidad Nacional Autónoma de México, 04510, México, D. F.

Dirección actual: Centro de Investigación y Estudios Avanzados en Salud Animal, Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia, Universidad Autónoma del Estado de México, 50000, Toluca, Estado de México, México. E-mail: soriano@uaemex.mx

\*\* Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria, CC 276, 7620, Balcarce, Argentina. E-mail: hterzolo@balcarce.inta.gov.ar



## **Resumen**

En el presente artículo, se revisa la epizootiología de la coriza infecciosa. Comúnmente la enfermedad sólo afecta el tracto respiratorio superior de los pollos, en todas las edades, y se caracteriza por estornudo, descarga nasal e inflamación facial. Sin embargo, debido a la reciente aparición de cepas muy virulentas de *Haemophilus paragallinarum*, el agente etiológico de esta enfermedad, se informa que también es capaz de causar lesiones de neumonía, aerosaculitis y artritis. También, se describen los mecanismos de patogenicidad y virulencia de esta bacteria. Se enfatiza en el diagnóstico de la enfermedad e identificación del agente causal. Además, se revisan las estrategias actuales de prevención y control de la enfermedad.

**Palabras clave:** CORIZA INFECCIOSA, *HAEMOPHILUS PARAGALLINARUM*, ENFERMEDADES DE LAS AVES, POLLOS.

## ***Introducción***

La coriza infecciosa es una enfermedad del tracto respiratorio superior de los pollos, se caracteriza por producir descarga nasal, estornudo e inflamación facial. El agente etiológico de esta enfermedad es la bacteria *Haemophilus paragallinarum*. El impacto económico de esta enfermedad radica en las pérdidas que ocasiona a la avicultura, debido a retraso del crecimiento, pérdida de peso, incremento en el número de aves eliminadas y predisposición a la enfermedad respiratoria crónica complicada. En gallinas de postura, la producción de huevo puede reducirse considerablemente.<sup>1</sup>

## ***Epizootiología***

### ***Hospederos naturales y experimentales***

Los pollos y gallinas (*Gallus gallus*) son hospederos naturales de *H. paragallinarum*, susceptibles en todas las edades.<sup>1</sup> No obstante, existen informes del aislamiento de esta bacteria en codornices<sup>2,3</sup> y psitácidos.<sup>4,5</sup> Tres pavos mostraron signos de coriza y sinusitis

similares a los observados en pollos desafiados experimentalmente con el mismo cultivo.<sup>6</sup> Sin embargo, no se han efectuado estudios bacteriológicos definitivos que evidencien presencia y susceptibilidad de otras especies aviares a *H. paragallinarum*. Los conejos, cobayos, ratones, gorriones, patos<sup>7</sup> y palomas<sup>6</sup> son refractarios a la infección experimental.

### *Transmisión, portadores y vectores*

Los principales reservorios de infección son aves con infección crónica y portadores sin signos.<sup>8</sup> Los brotes de coriza infecciosa ocurren frecuentemente en otoño e invierno.<sup>9</sup> No se ha demostrado que los gorriones silvestres (*Paser passer*) estén implicados como vectores; sin embargo, estudios epidemiológicos sugieren que este microorganismo puede ser introducido en granjas aisladas por vía aérea.<sup>10</sup>

### *Periodo de incubación*

El periodo de incubación de la coriza infecciosa es de 24 a 48 h después de la inoculación de aves con cultivo vivo o exudado infeccioso. De manera experimental, el periodo de incubación puede ser variable de acuerdo con ciertas condiciones de exposición: 24 h, inoculación intrasinal; 48 h, instilación nasal; 72 h, aves en jaula; cuatro días, contacto con agua infectada y seis a 14 días por transmisión aérea.<sup>11</sup>

### *Signos*

Los signos característicos de la coriza infecciosa incluyen exudado nasal seroso o mucoso, estornudo, inflamación de senos infraorbitarios, edema facial y conjuntivitis.<sup>1</sup> La inflamación de barbillas puede ser particularmente evidente en machos (Figura 1). También se puede escuchar estertor traqueal cuando las aves tienen afectado el tracto respiratorio inferior.

Se ha observado un cuadro respiratorio más severo en casos donde se asocia *H. paragallinarum* con otros agentes: *Mycoplasma sinoviae*,<sup>12</sup> *M. gallisepticum*,<sup>13</sup> *Ornithobacterium rhinotracheale*,<sup>14,15</sup> *Escherichia coli*, *Salmonella* spp, *Pasteurella* spp y virus de la bronquitis infecciosa,<sup>16,17</sup> entre otros. Malkinson *et al.*<sup>18</sup> informaron la

asociación de *H. gallinarum* con *Chlamydia psittaci* y el virus de la viruela aviar en reproductores pesados. Sin embargo, parece muy común la asociación con *Pasteurella gallinarum*, bacteria que puede aparecer luego de la fase aguda de la coriza infecciosa y causa panoftalmía purulenta y contenido de masas caseosas en los senos paranasales.<sup>17</sup>

Las aves pueden tener diarrea y el consumo de agua y alimento generalmente se reduce. En aves en crecimiento se registra mala utilidad de la parvada; en gallinas de postura la reducción en la producción de huevo puede llegar a 58.7%.<sup>19</sup>

### *Morbilidad y mortalidad*

La coriza infecciosa clásica está generalmente caracterizada por alta morbilidad y baja mortalidad.<sup>1</sup> Sin embargo, se ha informado de cuadros clínicos atípicos donde *H. paragallinarum per se* ha causado mortalidad. En parvadas de pollos de engorda y gallinas de postura, las pérdidas debidas a mortalidad persistente y eliminación de aves fue de 2%-5%.<sup>17</sup> En estos casos, *H. paragallinarum* fue aislado a partir de hígado, riñón y especialmente de la articulación del tarso y globos oculares, lo cual indica septicemia. Droual *et al.*<sup>20</sup> describieron descartes en matadero de pollos de engorda por lesiones de celulitis fibrinopurulenta de la cabeza y barbillas y aerosaculitis.

Bland *et al.*<sup>21</sup> informaron que en un complejo de gallinas de postura en California, durante un periodo de 13 semanas, la mortalidad varió del 8% al 64% y la producción de huevo cayó de un promedio de 77% a tan sólo 15%, en el brote de coriza infecciosa más severo registrado a la fecha en esta área.

### *Hallazgos macroscópicos y microscópicos*

En pollos infectados con *H. paragallinarum*, la cavidad nasal y senos infraorbitarios presentan exudado seroso o mucoso.<sup>22</sup> Las membranas mucosas de estos sitios se observan congestionados con inflamación hidrópica o edematosa (inflamación catarral aguda). También se observa edema en el tejido subcutáneo de la región periorbital y de las barbillas (Figura 3).<sup>23</sup> Los cambios microscópicos se limitan principalmente a la mucosa de los pasajes nasales y senos infraorbitarios. La lesión básica observada es un infiltrado inflamatorio de la mucosa respiratoria con indicación de un efecto citotóxico en el epitelio

y marcada estimulación de las glándulas mucosas intraepiteliales.<sup>24</sup> También se observa infiltración marcada de mastocitos en la lámina propia de las membranas mucosas de la cavidad nasal. Los productos de los mastocitos, heterófilos y macrófagos pueden ser responsables de los cambios vasculares severos y el daño celular que conduce a coriza.<sup>23</sup> Sin embargo, aún no se comprende bien la patogenia de *H. paragallinarum* en la coriza infecciosa.

### *Epizootiología molecular*

De forma adicional a pruebas de serotipificación y biotipificación, Blackall *et al.*<sup>8</sup> incluyeron endonucleasas de restricción en el estudio epidemiológico de 16 casos de coriza infecciosa en el norte de New South Wales, Australia. El perfil obtenido permitió reconocer tres grupos de brotes relacionados. Los resultados indicaron que las granjas pueden tener infección crónica causada por una sola cepa de *H. paragallinarum* que reaparece a intervalos. Este estudio también mostró la primera evidencia detallada de que las aves de reemplazo son la mayor fuente de coriza infecciosa.

De forma similar, Mifflin *et al.*<sup>25</sup> caracterizaron 15 aislamientos de *H. paragallinarum* independientes de NAD obtenidos a partir de 1989 en Sudáfrica, mediante serotipificación, biotipificación, análisis con endonucleasas de restricción y ribotipificación. Todos los aislamientos fueron serovariedad A y mostraron un único patrón en el análisis con endonucleasas de restricción y ribotipificación, que fue diferente a los patrones de aislamientos dependientes de NAD obtenidos antes de 1989. Basados en lo anterior, los autores sugirieron que los aislamientos independientes de NAD corresponden a clones de las cepas clásicas. En un estudio similar, mediante perfiles de ribotipificación se estableció la epidemiología molecular de 12 aislamientos (serovariedad A) de *H. paragallinarum* obtenidos en cinco brotes de coriza infecciosa en Hebei, China.<sup>26</sup> Los resultados obtenidos mostraron cuatro perfiles de ribotipificación, los cuales se correspondieron con la historia epidemiológica de los aislamientos, confirmando que existe diversidad genética en la población de *H. paragallinarum* de ese país.

En México, Soriano y Blackall,<sup>27</sup> mediante la prueba de ERIC-PCR estudiaron 15 aislamientos de *H. paragallinarum* de las serovariedades de Blackall. Los resultados

mostraron dos perfiles ERIC en los aislamientos serovariedad A-1, uno para el aislamiento A-2, tres para los aislamientos B-1 y dos para los aislamientos C-2. Con base en el origen de los aislamientos, los autores establecieron una relación entre la serovariedad y el perfil ERIC obtenido, concluyeron que esta prueba puede ser una herramienta de laboratorio rápida en la caracterización epidemiológica de *H. paragallinarum*.

### ***Patogenicidad y virulencia***

Como se mencionó previamente, los antígenos hemoaglutinantes, o hemoaglutininas son las estructuras principalmente relacionadas con la antigenicidad, patogenicidad e inmunogenicidad de *H. paragallinarum*. Así, una cepa variante que no hemoaglutina, aun después de tratamientos o envejecimiento, tampoco produce coriza cuando se instila o inocula en aves susceptibles.<sup>28,29</sup> Takagi *et al.*<sup>30</sup> purificaron esta hemoaglutina mediante el uso de cromatografía de afinidad y anticuerpos monoclonales y demostraron su importancia crucial en la inmunogenicidad al inocular con la hemoaglutinina purificada aves susceptibles por vía intramuscular. De este modo se logró protección frente a desafíos con una cepa patógena. Es más, esta protección activa depende totalmente de la presencia de anticuerpos humorales inhibidores de la hemoaglutinación en el suero sanguíneo. Además, Takagi *et al.*<sup>31,32</sup> demostraron que se puede conferir una sólida protección frente al desafío con la misma cepa, administrando por vía intraperitoneal anticuerpos monoclonales de ratón, específicamente dirigidos contra las hemoaglutininas; esta vez, mediante un mecanismo de inmunidad pasiva. Si bien estos últimos estudios se realizaron con la cepa 221 (A-1), estos resultados son, con certeza, generales y por extensión pueden ser aplicados a las hemoaglutininas de la mayoría de las cepas de *H. paragallinarum*.

Se considera que la adherencia bacteriana a las células epiteliales es el primer paso en el proceso de infección de las superficies mucosas. Las adhesinas son las estructuras bacterianas que median la adherencia a estructuras celulares complementarias, los receptores.<sup>33</sup> Con base en lo anterior, se ha mostrado adherencia *in vivo* e *in vitro* de *H. paragallinarum* a células epiteliales traqueales de pollo.<sup>34,35</sup> De forma similar, se ha mostrado que bacterias de *H. paragallinarum*, adsorbidas de manera homóloga o heteróloga con antisueros de conejo o pollo y lavados traqueales de aves inmunizadas,

perdieron la actividad hemoaglutinante y capacidad de adherencia a las células epiteliales.<sup>36</sup> Los resultados obtenidos en este estudio indican que los antígenos hemoaglutinantes son las adhesinas de *H. paragallinarum* y que los anticuerpos inhibidores de la hemoaglutinación presentes en los lavados traqueales actúan también como anticuerpos neutralizantes (Figura 2). Este hecho indica que seguramente los receptores específicos para las hemoaglutininas de los eritrocitos y las células epiteliales del tracto respiratorio son los mismos, o muy similares, lo cual una vez más confirma la importancia de las pruebas de hemoaglutinación, las cuales, indirectamente, detectan la capacidad de una determinada cepa para adherirse a las células blanco sobre las que *H. paragallinarum* específicamente dirige su acción patógena. Siguiendo esta metodología, también se mostró que el receptor celular puede ser principalmente del tipo D-manosa.<sup>37</sup> Se ha comprobado que este carbohidrato es también el receptor celular para algunos miembros de la familia *Pasteurellaceae*.<sup>31</sup>

Recientemente, Terry *et al.*<sup>38</sup> informaron de la producción de hemocina, una bacteriocina, por parte de *H. paragallinarum*. Adicionalmente identificaron el gen cromosómico que codifica para esta hemocina, así como un plásmido que porta este gen un aislamiento de Australia. Los autores mencionan que la hemocina producida por *H. paragallinarum* puede ser importante en la colonización de los senos respiratorios de los pollos, ya que encontraron que aislamientos de *Pasteurella avium*, *P. volantium* y *P. especie A*, todos ellos considerados bacterias gramnegativas no patógenas y que se encuentran en el tracto respiratorio superior de pollos que sufren enfermedad respiratoria debida a otros agentes, fueron sensibles a esta hemocina.

Se considera que *H. paragallinarum* es un agente patógeno primario en aves susceptibles.<sup>1</sup> Sin embargo, de manera específica han existido discrepancias en cuanto a la patogenicidad de la cepa 0222 (serovariedad B-1). Sawata *et al.*<sup>39</sup> informaron que esta cepa carecía de antígenos aglutinantes y que no era patógena en pollos desafiados. Sin embargo, Rimler *et al.*<sup>40,41</sup> mostraron que las cepas 0222 y Spross (B-1) fueron patógenas en pollos desafiados y que representaba una de las tres inmunovariedades relacionadas con las serovariedades identificadas por pruebas de aglutinación en placa. De forma similar, Thornton y Blackall<sup>42</sup> encontraron que la cepa 0222 había producido anticuerpos aglutinantes específicos de serovariedad. Yamaguchi *et al.*<sup>43</sup> investigaron la patogenicidad

de cinco cepas serovariedad B, las cuales incluyeron las cepas 0222 y Spross. A diferencia de las otras tres cepas, la cepa 0222 no produjo signos clínicos de coriza infecciosa. Sin embargo, se observaron lesiones (engrosamiento de membranas mucosas y exudado amarillento) en senos infraorbitarios y aislamiento del microorganismo de desafío. Estos resultados evidencian que la cepa 0222 es capaz de producir infección e indican, probablemente, que es una cepa de baja virulencia. Sin embargo, no se han conducido los estudios definitivos al respecto.

Bragg *et al.*<sup>44</sup> registraron diferentes grados de virulencia en pollos desafiados con aislamientos sudafricanos de las serovariedades A-1, B-1, C-2 y C-3. El aislamiento serovariedad C-3 produjo los signos más graves en las aves desafiadas. De forma similar, Soriano *et al.*<sup>45</sup> desafiaron grupos de pollos de manera independiente con las nueve cepas de referencia del esquema de Blackall, e informaron que los signos más graves de coriza infecciosa se observaron en aves desafiadas con la cepa de la serovariedad C-1.

Sandoval y Terzolo<sup>29</sup> estudiaron diferentes cepas regionales de las serovariedades A, B y C de Argentina, mediante el desarrollo de modelos de reproducción de la enfermedad para evaluar su patogenicidad, difusión horizontal e invasividad. Se demostró que las cepas B fueron consistentemente patógenas y causan lesiones de coriza muy aguda, siempre con alto grado de contagio e invasividad. En cambio las cepas A y C mostraron distinto comportamiento: algunas fueron muy virulentas, difusoras e invasivas; otras fueron patógenas, pero sólo difundían muy lentamente, y otras fueron poco patógenas e inclusive se encontraron unas pocas cepas de campo que mostraron ser totalmente apatógenas.

Horner *et al.*<sup>46</sup> sugirieron que los aislamientos independientes de NAD pueden causar aerosaculitis de manera más frecuente que los *H. paragallinarum* típicos. Además, se especula que los aislamientos independientes de NAD pueden ser diferentes como para producir fallas de las bacterinas actualmente empleadas.<sup>47</sup>

La virulencia de aislamientos de *H. paragallinarum* independientes de NAD también ha sido investigada. Bragg<sup>48</sup> desafió grupos de aves con aislamientos independientes de NAD en los cuales su patogenicidad fue evidente. Sin embargo, los signos de coriza infecciosa fueron menores que los observados en aves desafiadas con cepas dependientes de NAD. Es importante destacar que Bragg *et al.*<sup>49</sup> han demostrado que

la independencia de NAD puede ser adquirida por transformación mediante la adquisición de un plásmido. De forma similar, Taole *et al.*<sup>50</sup> transformaron una cepa serovariedad C-3 dependiente de NAD en independiente de este factor, mediante la técnica de electroporación. Los signos de coriza infecciosa fueron menos graves en las aves que fueron desafiadas con la cepa transformada. No se pudo explicar el mecanismo por el cual la virulencia es afectada por este proceso. Lo interesante de esta transformación es su posible aplicación práctica, ya que sería factible reducir el costo de producción de las bacterinas al usar cepas que no requieren de la adición de NAD en los cultivos industriales. De hecho, Bragg *et al.*<sup>51</sup> demostraron que estas cepas transformadas mantienen inalterables su capacidad de producir hemoaglutininas, antígenos fundamentales para lograr una buena protección en la bacterinización. Sin embargo, la posible introducción de este tipo de plásmidos en países carentes de cepas independientes de NAD, plantea muy serios problemas de bioseguridad, sobre todo si se toma en cuenta que en Sudáfrica, por ejemplo, además de *H. paragallinarum*, también existen cepas NAD independientes de *P. avium*, *P. volantium* y "*Pasteurella* especie A" en las aves,<sup>47</sup> e inclusive de *H. parainfluenzae* en seres humanos,<sup>52</sup> lo que indica que podría existir la posible transferencia de este plásmido.<sup>53</sup>

Se ha informado que la cápsula de *H. paragallinarum* está implicada en la patogenicidad y virulencia de esta bacteria.<sup>54-57</sup> Sin embargo, no se han efectuado estudios definitivos que muestren la importancia de la cápsula en la patogenia de *H. paragallinarum*.

Un estudio reciente mostró que pollos infectados de manera experimental con *H. paragallinarum*, incrementaron la expresión de gallinacina-3, una  $\beta$ -defensina epitelial que contribuye a la inmunidad innata mediante propiedades antimicrobianas propias de las células epiteliales y secreciones traqueales.<sup>58</sup> Los autores mencionan que es probable que éste sea un factor limitante de la distribución tisular de *H. paragallinarum* en el proceso de infección y colonización del tracto respiratorio de los pollos.



## ***Diagnóstico***

### *Aislamiento e identificación del agente*

Para el aislamiento bacteriológico se recomienda el estudio de tres o cinco aves con signos agudos de coriza. El procedimiento de toma de muestras se debe efectuar con estricta esterilidad. Para ello, una vez sacrificada el ave, se cauteriza la piel de la región infraorbital y se practica una incisión sobre el seno infraorbitario correspondiente, se separa la piel en la incisión y se introduce un hisopo estéril humedecido en un caldo nutritivo o solución tamponada de fosfatos a pH neutro (Figura 3). Lo más recomendable es el cultivo antes de las 5 h debido a la reducida viabilidad de *H. paragallinarum*. Para la siembra de los hisopos pueden utilizarse placas en base de agar, o agar Columbia con 7% de sangre de bovino u ovino con el agregado de cepas nodriza de *Staphylococcus* spp, las cuales eliminan el factor V, o bien usar agar chocolate o agar con sangre hemolizada, en vez de las cepas nodriza. Como se refirió anteriormente, con este último procedimiento se obtienen colonias mucho más grandes. El uso de medios de cultivo selectivos con antibióticos e incubados a 37°C durante 48 h en una atmósfera microaerofílica, es un procedimiento que permite diferenciar y aislar a *H. paragallinarum* en cultivo puro, aun cuando la flora bacteriana sea compleja. La atmósfera microaerofílica puede obtenerse mediante el clásico método de incubación de las placas en un recipiente con vela, la cual se apaga al consumirse parte del oxígeno contenido en un recipiente herméticamente cerrado, o bien usando las distintas productos comerciales disponibles, tanto para generar CO<sub>2</sub> como para las atmósferas destinadas al género *Campylobacter*.<sup>53</sup> La identificación de *H. paragallinarum* debe efectuarse mediante pruebas bioquímicas y enzimáticas diferenciales. La dependencia o independencia de NAD no permite inferir si se trata de *H. paragallinarum* o de otros microorganismos del género *Pasteurella*, sobre todo en los lugares donde existen cepas independientes de NAD.<sup>59</sup> A la fecha, únicamente se ha informado el aislamiento de *H. paragallinarum* independientes de NAD en Sudáfrica (serovariedades A-1 y C-3)<sup>60,61</sup> y México (serovariedades B-1 y C-2).<sup>62</sup>

### *Identificación serológica*

Se han descrito varias pruebas serológicas para la detección de anticuerpos contra *H. paragallinarum* en los pollos: precipitación en gel,<sup>63</sup> aglutinación en placa,<sup>64</sup> aglutinación en látex<sup>65</sup> y ELISA.<sup>66-68</sup> Sin embargo, la prueba de inhibición de la hemoaglutinación es la más usada.<sup>69</sup>

Se han producido un número de paneles de anticuerpos monoclonales que han sido empleados para identificar *H. paragallinarum*, principalmente mediante pruebas de inhibición de la hemoaglutinación y ELISA.<sup>70-74</sup> En Argentina, cuatro de diez aislamientos de la serovariedad A<sup>75</sup> y en Brasil seis de 14 aislamientos de esta misma serovariedad<sup>76</sup> no reaccionaron con los anticuerpos monoclonales específicos que reconocieron a 49 aislamientos japoneses de la serovariedad A<sup>77</sup> y más de 20 aislamientos de la serovariedad A de varias partes del mundo;<sup>71,72</sup> en estas cepas de Latinoamérica se observaron ciertas diferencias antigénicas.

### *Identificación molecular*

Chen *et al.*<sup>78</sup> desarrollaron una prueba de reacción en cadena de la polimerasa (PCR, por sus siglas en inglés, *polymerase chain reaction*), específica para *H. paragallinarum*. Esta prueba es rápida y los resultados se obtienen aproximadamente en 6 h. Asimismo, identifica aislamientos tanto dependientes como independientes de NAD.<sup>79</sup> Esta prueba es llamada HP-2 PCR y utiliza los siguientes iniciadores: N1, 5' TGA GGG TAG TCT TGC ACG CGA AT 3' y R1, 5' CAA GGT ATC GAT CGT CTC TCT ACT 3', que amplifican un fragmento de 0.5 kb.<sup>78</sup> Esta prueba fue desarrollada en Australia y ha sido transferida con éxito a Sudáfrica,<sup>79</sup> China<sup>80</sup> y México.<sup>81</sup> Estudios posteriores han mostrado excelentes resultados cuando las muestras incluidas en la prueba son tomadas directamente de senos infraorbitarios de aves infectadas de manera experimental.<sup>78</sup> De forma similar, se obtienen resultados positivos en muestras mantenidas a 4° o -20° durante 180 días.<sup>82</sup>

### *Caracterización molecular*

Blackall *et al.*<sup>83</sup> evaluaron las endonucleasas de restricción *Bam*HI, *Eco*RI *Hind*III y *Sma*I en la caracterización de ADN cromosómico de *H. paragallinarum*. La enzima *Hind*III produjo el mayor número de fragmentos y mostró un mayor grado de discriminación entre los aislamientos estudiados.

La creación de una genoteca de la cepa Modesto (serovariedad C-2) sentó las bases del desarrollo de la prueba de PCR.<sup>78</sup> El estudio de esta genoteca identificó cuatro sondas que reaccionaron de manera específica con *H. paragallinarum*. Ninguna de las sondas reaccionó con bacterias de los géneros *Pasteurella* y *Actinobacillus*, o *M. gallisepticum* y *M. synoviae*. Se obtuvo la secuencia de la sonda más pequeña (P601, 1.8 kb) que permitió el diseño de los iniciadores para la prueba de PCR. Basada en el empleo de esta técnica para el consenso intergénico repetitivo de enterobacterias (ERIC-PCR, por sus siglas en inglés, *enterobacterial repetitive intergenic consensus*), Khan *et al.*<sup>84</sup> identificaron 18 patrones ERIC en 39 aislamientos y cepas de referencia de *H. paragallinarum*. Mencionan que todas las cepas de referencia mostraron un patrón ERIC único, excepto las cepas HP14 (A-4) y HP60 (C-4), procedentes de Australia. Sin embargo, en un estudio similar, Soriano y Blackall<sup>27</sup> encontraron diferencias en los patrones ERIC obtenidos para estas cepas.

Recientemente, Hobb *et al.*<sup>85</sup> aislaron, identificaron y obtuvieron la secuencia del gen *HagA* que codifica para una hemoaglutinina de *H. paragallinarum*. La secuencia de 11 cepas de referencia reveló un pequeño grado de variación entre las cepas. Como la hemoaglutinina es el principal antígeno de serotipificación, se esperaba encontrar variaciones en la secuencia de aminoácidos. Sin embargo, ninguna de las variaciones se correlacionó con los grupos serológicos de las cepas. Como se hará mención posteriormente, es probable que el gen *HagA* codifique para una hemoaglutinina común identificada en cepas de *H. paragallinarum*.

### *Diagnóstico diferencial*

En años recientes se han identificado nuevas bacterias o variantes en las aves, lo que hace más difícil el diagnóstico confiable de coriza infecciosa. Uno de estos microorganismos es la bacteria *O. rhinotracheale*, que ha sido identificada en México y otros países.<sup>14,15</sup> Esta

bacteria gramnegativa produce un cuadro corizoide caracterizado por retraso del crecimiento, incremento en la mortalidad y disminución considerable de la producción de huevo. Las lesiones principalmente observadas son aerosaculitis y neumonía. La diferenciación entre *O. rhinotracheale* y *H. paragallinarum* no es difícil en la mayoría de los países. Sin embargo, en Sudáfrica<sup>40,60,61</sup> y México,<sup>62</sup> donde están presentes *H. paragallinarum* independientes de NAD, se requieren pruebas bioquímicas y patrones de fermentación de carbohidratos para establecer el agente causal en cuadros corizoides. Otros microorganismos implicados en pollos con enfermedad sugestiva de coriza infecciosa son: *P. volantium*, tanto dependiente como independiente de NAD, *P. avium*, tanto dependiente como independiente de NAD y *Pasteurella* sp taxon A, tanto dependiente como independiente de NAD.<sup>47</sup> En pollos de engorda la coriza debería ser diferenciada del síndrome de cabeza hinchada por virus de la rinotraqueítis infecciosa del pavo (TRT). También se cita que la hipovitaminosis A y la viruela, en ocasiones, pueden producir signos clínicos similares a coriza infecciosa.<sup>7</sup>

La artritis del tarso por *H. paragallinarum* es poco frecuente, pero su descripción señala la necesidad de un diagnóstico diferencial con otros agentes bacterianos o víricos.<sup>86</sup>

## ***Prevención y control***

### ***Inmunidad e inmunógenos***

La bacterinización de parvadas susceptibles es la estrategia más eficaz en la prevención de la coriza infecciosa. Se han desarrollado modelos experimentales con aves para evaluar la protección cruzada entre distintas serovariedades, o bien el grado de protección conferido por diferentes bacterinas experimentales o comerciales combinadas en planes de bacterinización. Estas pruebas consisten en inmunizar a las aves con las bacterinas comerciales a probar o bien con las bacterinas monovalentes elaboradas con las cepas a estudiar y transcurrido un periodo necesario para que las aves desarrollen inmunidad activa, éstas se desafían por vía intrasinal o por instilación nasal. Al segundo o tercer días posdesafío se evalúa el grado de protección como el porcentaje de aves que no se enferman según un criterio establecido. Un criterio estricto es considerar que un ave está enferma cuando presenta signos clínicos de coriza infecciosa, mucus en uno o ambos senos

paranasales y aislamiento de *H. paragallinarum* de uno o ambos senos paranasales.<sup>87,88</sup> Además, los signos de coriza se pueden clasificar en cuatro grados; estrictamente se consideran con coriza (positivas) los grados 2, 3 y 4 (Figuras 4 y 5).

Es ampliamente reconocido que los tres serogrupos de Blackall representan tres inmunovarietades diferentes.<sup>89</sup> En general, el dogma aceptado es que no existe protección cruzada entre las serovarietades de estos serogrupos. Recientemente, Soriano *et al.*<sup>45</sup> evaluaron la protección cruzada en aves inmunizadas y desafiadas con las cepas de referencia de *H. paragallinarum* en el esquema de Blackall. Los resultados obtenidos en este trabajo confirmaron que las tres inmunovarietades son diferentes. Sin embargo, se observó cierta protección cruzada entre las serovarietades de los tres serogrupos. Estos resultados permitirán guiar estrategias en la prevención de la coriza infecciosa, ya que en la actualidad se emplean bacterinas comerciales bivalentes (serovarietades A-1 y C-1) y trivalentes (A-1, B-1 y C-2) contra esta enfermedad en todo el mundo. En este sentido, hasta la fecha existían discrepancias en cuanto a la protección conferida por bacterinas bivalentes contra aislamientos serovariedad B.<sup>69,90</sup> Sin embargo, varios trabajos confirman la necesidad de usar bacterinas trivalentes en todas las áreas donde se han diagnosticado cepas regionales de la serovariedad B. Por ejemplo, en un estudio reciente en el cual se emplearon cepas de referencia, se informó que una bacterina bivalente no confirió protección en aves desafiadas con un aislamiento serovariedad B-1 de México.<sup>91</sup> En Argentina, de manera similar pero empleando cepas regionales, Terzolo *et al.*<sup>88</sup> mostraron que bacterinas comerciales bivalentes no protegieron a pollos desafiados con un aislamiento de la serovariedad B. En otros ensayos, Yamaguchi *et al.*<sup>92</sup> informaron que las bacterinas bivalentes proporcionaron protección contra la cepa Spross (B), pero fallaron contra otras dos cepas B sudafricanas. De forma análoga, Terzolo *et al.*<sup>88</sup> demostraron que una bacterina trivalente elaborada con una cepa B de referencia falló en pollos inmunizados y posteriormente desafiados con una cepa regional de la serovariedad B. Bowles *et al.*,<sup>93</sup> en un estudio comparativo muy amplio, determinaron la diversidad genética y las relaciones entre 118 cepas provenientes de seis continentes, mediante movilidad electroforética de ocho enzimas metabólicas codificadas por genes cromosomales. Es interesante destacar que en este trabajo, las cepas de *H. paragallinarum*

estudiadas se clasificaron en dos grupos heterogéneos, mientras que nueve cepas regionales de la serovariedad B de Argentina, ocuparon un grupo diferente, lo que demuestra que éstas están genéticamente distantes de las otras cepas estudiadas, independientemente de la serovariedad a la cual pertenecen. Es decir que las cepas B de Argentina fueron incluso diferentes a otras cepas B de diversas regiones del mundo. Recientemente Jacobs *et al.*<sup>94</sup> informaron que pollos inmunizados con una bacterina comercial trivalente mostraron protección al desafío con un aislamiento de Ecuador serovariedad C, pero no cuando fueron desafiados con aislamientos B procedentes de varios países (Ecuador, Argentina, Estados Unidos de América y Zimbabwe). Los aislamientos fueron reconocidos por antisueros elaborados para las cepas Spross (B) y H-18 (C). La protección contra estos aislamientos B se incrementó cuando un aislamiento B de Ecuador fue incluido en la bacterina trivalente. Con base en estos hallazgos, los autores consideran que estos aislamientos B (“variantes”) representan una nueva inmunovariedad, designando al inmunógeno que incluye este aislamiento como bacterina tetravalente. El criterio utilizado por estos autores en su investigación no es suficiente para proponer la existencia de una nueva inmunovariedad. Es muy probable que estos aislamientos constituyan una nueva, o nuevas, serovariedades dentro del serogrupo B, de forma similar a los serogrupos A o C que incluyen cuatro serovariedades cada uno. Los resultados obtenidos señalan la necesidad de realizar estudios de caracterización de hemoaglutininas, ya que evidencian que existen notables diferencias inmunológicas entre diferentes cepas de la serovariedad B. Es necesario incluir cepas regionales de la serovariedad B en la formulación de bacterinas locales.

### *Tratamiento y desinfección*

En el tratamiento de la coriza infecciosa se han empleado varios quimioterapéuticos y antibióticos como: estreptomina,<sup>95</sup> espectinomicina, la combinación estreptomina-espectinomicina<sup>96</sup> o las combinaciones sulfacloropiridazina-trimetoprim<sup>97</sup> y sulfadimetoxina-trimetoprim,<sup>98</sup> entre otras. Las quinolonas nicotinato de norfloxacin<sup>99</sup> y enrofloxacin<sup>100</sup> han dado excelentes resultados en el tratamiento de esta enfermedad. Se informó del tratamiento de pollos de engorda con coriza infecciosa, de manera experimental, empleando enrofloxacin y clorhidrato de bromhexina.<sup>80</sup> Los resultados

obtenidos mostraron que los pollos que recibieron la combinación redujeron el tiempo de signos clínicos, a diferencia de los que recibieron únicamente enrofloxacin. Además, la diferencia en peso del grupo de aves que recibió la combinación estuvo 194 g por arriba del grupo testigo.

Bragg<sup>101</sup> informó del uso de cloruro de didecildimetilamonio en programas de desinfección continuos en granjas de gallinas de postura y pollos de engorda, reduciendo el impacto de la coriza infecciosa. Menciona que pollos inmunizados y no inmunizados contra la coriza infecciosa, y desafiados con *H. paragallinarum* de las serovariedades A-1, B-1, C-2 y C-3, mostraron signos menos severos y un curso más corto de la enfermedad. Se desconoce el efecto de otros desinfectantes en el control de la coriza infecciosa.

Se debe considerar que *H. paragallinarum* puede generar resistencia a los antibióticos y quimioterapéuticos empleados actualmente. Por ello es necesario realizar pruebas de sensibilidad para seleccionar el antimicrobiano más adecuado para tratar a la cepa actuante en un determinado brote.<sup>102</sup> También debe considerarse que luego del tratamiento, en las granjas afectadas por la enfermedad, la infección puede controlarse pero nunca se elimina totalmente, siendo importantes los programas de desinfección. Como las aves actúan como portadoras, en casos de brotes en granjas con edades múltiples, lo más recomendable es tratar en primera instancia y además indicar la inmunización de todas las nuevas aves que ingresen al establecimiento afectado.

## **Conclusión**

Brotes de coriza infecciosa pueden ser ocasionados por *H. paragallinarum* tanto dependientes como independientes de NAD. Se puede registrar morbilidad alta con incremento en la mortalidad de aves afectadas. La producción de huevo en gallinas de postura es afectada considerablemente. La bacterinización de parvadas susceptibles con inmunógenos “trivalentes” que incluyan las serovariedades A-1, B-1 y C-2 es la estrategia principal en la prevención de la coriza infecciosa. La inclusión de aislamientos locales en estos productos puede incrementar la protección, particularmente de brotes ocasionados por “variantes” de la serovariedad B. Sin embargo, la caracterización serológica de aislamientos de *H. paragallinarum* con base en el esquema Blackall es importante para el

establecimiento de estudios y prácticas epizootiológicas de la coriza infecciosa tanto en México como en muchas partes del mundo.

### **Referencias**

1. Blackall PJ, Matsumoto M. Infectious Coryza. In: Saif YM, Barnes HJ, Glisson JR, Fadly AM, McDougald LR, Swayne DE, editors. Diseases of Poultry, 11th ed. Ames: Iowa State Press, 2003:691-703.
2. Cundy KR. Susceptibility of Japanese quail (*Coturnix coturnix japonica*) to experimental infection with *Haemophilus gallinarum*. Avian Dis 1965; 10:272-283.
3. Reece RL, Barr DA, Owen AC. The isolation of *Haemophilus paragallinarum* from Japanese quail. Aust Vet J 1981; 57:350-351.
4. Dolphin RE, Olsen DE. Bacteriology of companion birds. Vet Med Small Anim Clin 1978; 73:359-361.
5. Devriese LA, Viaene N, Uyttebroek E, Froyman R, Hemmez J. Three cases of infection *Haemophilus*-like bacteria in psittacines. Avian Pathol 1988; 17:741-744.
6. Beach JR, Schalm OW. Studies of the clinical manifestations and transmissibility of infectious coryza of chickens. Poult Sci 1936; 15:466-472.
7. Yamamoto R. Infectious coryza. In: Calnek BW, Barnes HJ, Beard CW, Reid WH, Yoder HW, editors. Diseases of Poultry, Ames: Iowa State University Press, 1991:186-195.
8. Blackall PJ, Morrow CJ, McInnes A, Eaves LE, Rogers DG. Epidemiologic studies on infectious coryza outbreaks in Northern New South Wales, Australia, using serotyping, biotyping and chromosomal DNA restriction endonuclease analysis. Avian Dis 1990; 34:267-276.
9. Blackall PJ, Matsumoto M, Yamamoto R. Infectious Coryza. In: Calnek BW, Barnes HJ, Beard CW, McDougald LR, Saif YM, editors. Diseases of Poultry, 10th ed. Ames: Iowa State University Press, 1997:179-190.
10. Yamamoto R, Clark GT. Intra- and interflock transmission of *Haemophilus gallinarum*. Am J Vet Res 1966; 27:1419-1425.



11. Yamamoto R. Progress report on infectious coryza research at the University of California. Proceedings of 16th Western Poultry Disease Conference and 1st Poultry Health Symposium; 1967 march 20-21; Davis (California) USA. California (Davis): University of California, 1967:23-24.
12. Butterweck J, Kerr E. Egg drop from coryza superimposed on M. S. Proceedings of 29th Western Poultry Disease Conference, 5th ANECA & 14th Poultry Health Symposium; 1980 april 22-25; Acapulco (Guerrero) México. California (Davis): University of California, 1980:80.
13. Matsuo K, Kuniyasu C, Yamada S, Susumi S, Yamamoto S. Suppression of immunoresponses to *Haemophilus gallinarum* with *Mycoplasma gallisepticum* in chickens. Avian Dis 1978; 22:552-561.
14. Soriano VE, Fernández RP, Téllez G. *Ornithobacterium rhinotracheale*: un agente patógeno emergente en avicultura. Vet Méx 2000; 31:245-253.
15. Soriano VE, Longinos MG, Navarrete PG, Fernández RP. Identification and characterization of *Ornithobacterium rhinotracheale* isolates from Mexico. Avian Dis 2002; 46:686-690.
16. Raggi L, Young DC, Sharma JM. Synergism between avian infectious bronchitis virus and *Haemophilus gallinarum*. Avian Dis 1967; 2:309-321.
17. Sandoval VE, Terzolo HR, Blackall PJ. Complicated infectious coryza in Argentina. Avian Dis 1994; 38:672-678.
18. Malkinson M, Nachany S, Aronovici A, Davidov K, Weisman Y. Mixed infection with *Chlamydia psittaci*, fowlpox virus and *Haemophilus gallinarum* in broiler breeder chicks. Vet Rec 1987; 120:461-462.
19. Bell D, Ortíz F, Cutler G. The dynamics of an infectious coryza outbreak. Proceedings of 44th Western Poultry Diseases Conference; 1995 march 5-7; Sacramento (California) USA. California (Davis): University of California, 1995:98-99.
20. Droual R, Bickford AA, Charlton BR, Cooper GL, Channig SE. Infectious coryza in meat chickens in the San Joaquin Valley of California. Avian Dis 1990; 34:1009-1016.

21. Bland MC, Bickford AA, Charlton BR, Cooper GL, Sommer F, Cutler G. Case report: a severe infectious coryza infection in a multiple age layer complex in Central California. Proceedings of XXVII Convención Anual ANECA & 51st Western Poultry Disease Conference; 2002 may 1-4; Puerto Vallarta (Jalisco) México. México (DF): Asociación Nacional de Especialistas en Ciencias Avícolas, AC, 2002:56-57.
22. Adler HE, Page LA. *Haemophilus* infection in chickens. II. The pathology of the respiratory tract. Avian Dis 1962; 6:1-6.
23. Sawata A, Nakai T, Kume K, Yoshikawa H, Yoshikawa T. Intranasal inoculation of chickens with encapsulated or nonencapsulated variants of *Haemophilus paragallinarum*: Electron microscopic evaluation of the nasal mucosa. Am J Vet Res 1985; 46:2346-2353.
24. Bickford AA, Yamamoto R, Glick-Smith J, Oluwadiya M. Histopatologic characterization of experimental infectious coryza in single comb white leghorns chickens. Proceedings of 30th Western Poultry Disease Conference & 15th Poultry Health Symposia; 1981 march 9-13; Davis (California) USA. California (Davis): University of California, 1981:18-21.
25. Mifflin JK, Horner RF, Blackall PJ, Chen X, Bishop GC, Morrow CJ, *et al.* Phenotypic and molecular characterization of V-factor (NAD)-independent *Haemophilus paragallinarum*. Avian Dis 1995; 39:304-308.
26. Mifflin JK, Chen X, Blackall PJ. Molecular characterization of isolates of *Haemophilus paragallinarum* from China by ribotyping. Avian Pathol 1997; 26:119-127.
27. Soriano VE, Blackall PJ. ERIC-PCR: alternativa en la caracterización genómica de *Haemophilus paragallinarum*. Memorias XVII Congreso Latinoamericano de Avicultura, 2001 octubre 9-12; Ciudad de Guatemala (Guatemala) Guatemala. Guatemala (Ciudad de Guatemala): Asociación Latinoamericana de Avicultores, AC, 2001:529-532.
28. 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.

29. Sandoval VE, Terzolo HR. Coriza infecciosa. Segunda parte: reproducción experimental y patogenicidad de las bacterias. *Avicult Profes* 1997; 15:29-32.
30. Takagi M, Hirayama N, Simazaki T, Taguchi K, Yamaoka R, Ohta S. Purification of hemagglutinin from *Haemophilus paragallinarum* using monoclonal antibody. *Vet Microbiol* 1993; 34:191-197.
31. Takagi M, Hirayama N, Makie H, Ohta S. Production, characterization and protective effect of monoclonal antibodies to *Haemophilus paragallinarum* serotype A. *Vet Microbiol* 1991; 27:327-338.
32. Takagi M, Ohmae K, Hirayama N, Ohta S. Expression of hemagglutinin of *Haemophilus paragallinarum* serotype A in *Escherichia coli*. *J Vet Med Sci* 1991; 53:917-920.
33. Jacques M, Paradis SE. Adhesin-receptor interactions in *Pasteurellaceae*. *FEMS Microbiol Rev* 1998; 22:45-59.
34. Ueda S, Nagasawa Y, Suzuki T, Tajima M. Adhesion of *Haemophilus paragallinarum* to cultured chickens cells. *Microbiol Immunol* 1982; 26:1007-1016.
35. Fernández RP, García-Delgado GA, Ochoa GP, Soriano VE. Adherence of *Haemophilus paragallinarum* to chicken tracheal epithelial cells. Proceedings of 48th Western Poultry Disease Conference; 1999 april 24-27; Vancouver (British Columbia) Canada. California (Davis): University of California, 1999:111-112.
36. 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 49th Western Poultry Disease Conference; 2000 march 5-7; Sacramento (California) USA. California (Davis): University of California, 2000:52.
37. Fernández RP, Sánchez SA, Soriano VE. Carbohydrate cell receptors for adhesins of *Haemophilus paragallinarum*. Proceedings of 50th Western Poultry Disease Conference; 2001 march 24-26; Davis (California) USA. California (Davis): University of California, 2001:130-131.

38. Terry TD, Zalucki YM, Walsh SL, Blackall PJ, Jennings MP. Genetic analysis of a plasmid encoding haemocin production in *Haemophilus paragallinarum*. *Microbiology* 2003; 149:3177-3184.
39. 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.
40. Rimler RB, Davis RB. Infectious coryza: *In vivo* growth of *Haemophilus gallinarum* as a determinant for cross protection. *Am J Vet Res* 1977; 38:1591-1593.
41. Rimler RB, Davis RB, Page LA. Infectious coryza: Cross-protection studies, using seven strains of *Haemophilus gallinarum*. *Am J Vet Res* 1977; 38:1587-1589.
42. Thornton AM, Blackall PJ. Serological classification of Australian isolates of *Haemophilus paragallinarum*. *Aust Vet J* 1984; 61:251-253.
43. Yamaguchi T, Blackall PJ, Takigami S, Iritani Y, Hayashi Y. Pathogenicity and serovar-specific hemagglutinating antigens of *Haemophilus paragallinarum* serovar B strains. *Avian Dis* 1990; 34:964-968.
44. Bragg RR. Virulence of South African isolates of *Haemophilus paragallinarum*. Part 1: NAD-dependent field isolates. *Onderstepoort J Vet Res* 2002; 69:163-169.
45. Soriano VE, Longinos GM, Fernández RP, Téllez G, Suárez GF, Blackall PJ. Cross-protection studies among nine serovars of *Haemophilus paragallinarum* in the Blackall scheme. *Proceedings of XIII Congress of the World Veterinary Poultry Association*; 2003 July 19-23; Denver (Colorado) USA. United Kingdom (Compton): World Veterinary Poultry Association, 2003:121.
46. Horner FR, Bishop GC, Jarvis CJ, Coetzee HT. NAD (V-factor)-independent and typical *Haemophilus paragallinarum* infection in commercial chickens: a five year field study. *Avian Pathol* 1995; 24:453-463.
47. Bragg RR, Greyling JM, Verschoor JA. Isolation and identification of NAD-independent bacteria from chickens with symptoms of infectious coryza. *Avian Pathol* 1997; 26:595-606.

48. Bragg RR. Virulence of South African isolates of *Haemophilus paragallinarum*. Part 2: Naturally occurring NAD-independent field isolates. *Onderstepoort J Vet Res* 2002; 69:171-175.
49. Bragg RR, Coetzee L, Verschoor JA. Plasmid-encoded NAD independence in some South African isolates of *Haemophilus paragallinarum*. *Onderstepoort J Vet Res* 1993; 60:147-152.
50. Taole M, Albertyn J, Van Heerden E, Bragg RR. Virulence of South African isolates of *Haemophilus paragallinarum*. Part 3: experimental produced NAD-independent isolate. *Onderstepoort J Vet Res* 2002; 69:189-196.
51. Bragg RR, Purdan G, Coetzee L, Verschoor JA. Effects of transformation on the hemagglutinins of *Haemophilus paragallinarum*. *Onderstepoort J Vet Res* 1995; 62:261-270.
52. Gromkova R, Koornhof H. Naturally occurring NAD-independent *Haemophilus parainfluenzae*. *J Gen Microbiol* 1990; 136:1031-1035.
53. Terzolo HR. Revisión sobre coriza infecciosa: propuestas de investigación para su diagnóstico y control. *Rev Med Vet* 2000; 81:262-269.
54. Kume K, Sawata A. Factors of *Haemophilus paragallinarum* for infection and protection in chickens. Proceedings of 39th Western Poultry Disease Conference; 1990 march 4-6; Sacramento (California) USA. California (Davis): University of California, 1990:53-60.
55. Sawata A, Kume K. Relationship between virulence and morphological or serological properties of variants dissociated from serotype 1 *Haemophilus paragallinarum* strains. *J Clin Microbiol* 1983; 18:49-55.
56. Sawata A, Kume K, Nakai T. Relationship between anticapsular antibody and protective activity of a capsular antigen of *Haemophilus paragallinarum*. *Jpn J Vet Sci* 1984; 46:475-486.
57. Sawata A, Nakai T, Kume K, Yoshikawa H, Yoshikawa T. Lesions induced in the respiratory tract of chickens by encapsulated or nonencapsulated variants of *Haemophilus paragallinarum*. *Am J Vet Res* 1985; 46:1185-1191.

58. Zhao C, Nguyen T, Liu L, Sacco RE, Brogden KA, Lehrer RI. Gallinacin-3, an inducible epithelial  $\beta$ -defensin in the chicken. *Infect Immun* 2001; 69:2684-2691.
59. Blackall PJ, Terzolo HR. Coriza infecciosa: revisión de métodos de diagnóstico y vacunas. *Rev Asoc Argent Microbiol* 1995; 27:156-174.
60. 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.
61. Mouahid M, Bisgaard M, Morley AJ, Mutters R, Mannheim W. Occurrence of V-factor (NAD) independent strains of *Haemophilus paragallinarum*. *Vet Microbiol* 1992; 31:363-368.
62. García FA, Blackall PJ, Angulo E. Presencia de *Haemophilus paragallinarum* NAD independiente en México. *Memorias de la XXVII Convención Anual ANECA & 51st Western Poultry Disease Conference*; 2002 mayo 1-4; Puerto Vallarta (Jalisco) México. México (D.F.): Asociación Nacional de Especialistas en Ciencias Avícolas, AC, 2002:59.
63. Sato S, Shifrine M. Application of the agar gel precipitation test to serologic studies of chickens inoculated with *Haemophilus gallinarum*. *Avian Dis* 1965; 9:591-598.
64. 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.
65. Yamaguchi T, Iwaki S, Iritani Y. Latex agglutination test for measurement of type-specific antibody to *Haemophilus paragallinarum* in chickens. *Avian Dis* 1981; 25:988-995.
66. Raie N, Hietala SK, Barton JT, Read DH. Preliminary development of an ELISA for infectious coryza (*Haemophilus paragallinarum* infection) in chickens. *Proceedings of 41st Western Poultry Disease Conference*; 1992 march 1-3; Sacramento (California) USA. California (Davis): University of California, 1992:23.
67. Zhang P, Blackall PJ, Yamaguchi T, Iritani Y. A monoclonal antibody-blocking enzyme-linked immunosorbent assay for the detection of serovar-specific antibodies to *Haemophilus paragallinarum*. *Avian Dis* 1999; 43:75-82.

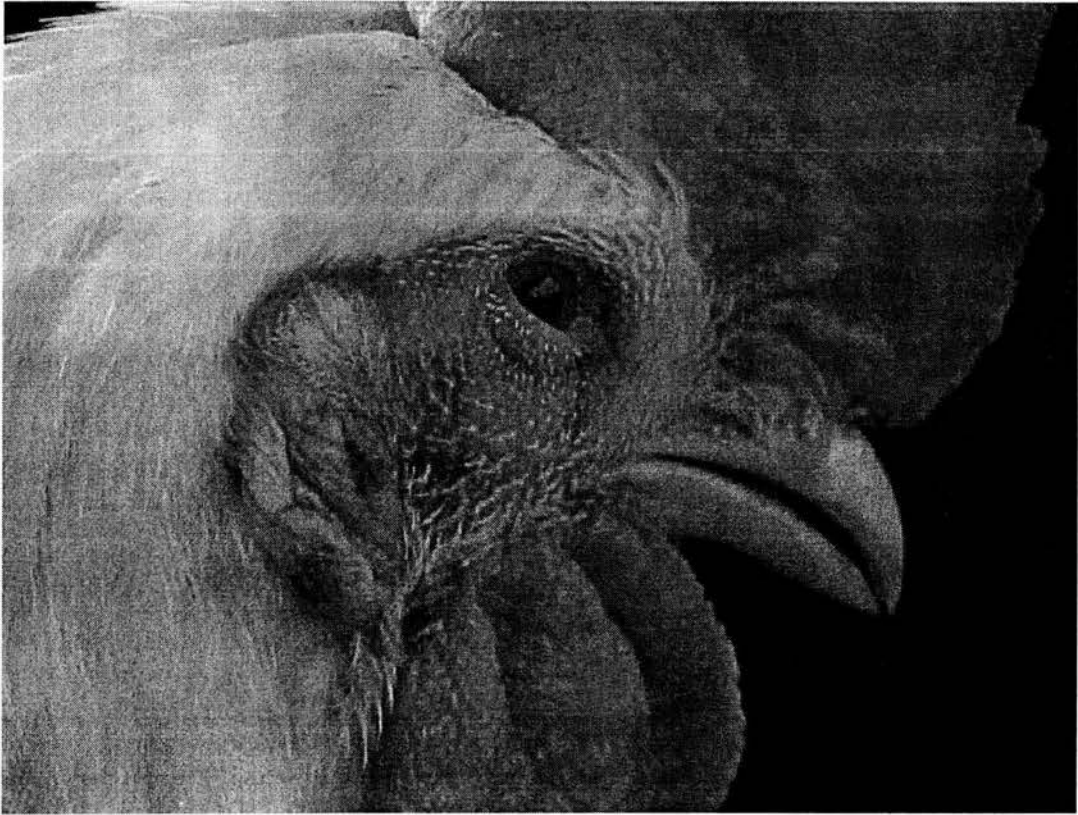
68. Miao D, Zhang P, Gong Y, Yamaguchi T, Iritani Y, Blackall PJ. The development and application of a blocking ELISA kit for the diagnosis of infectious coryza. *Avian Pathol* 2000; 29:219-225.
69. Soriano VE, Fernández RP, García-Delgado GA, Ochoa GP. Evaluación de dos protocolos de bacterinización de gallinas de postura mediante detección de anticuerpos inhibidores de la hemoaglutinación y protección ante un desafío controlado con *Haemophilus paragallinarum*. *Vet Méx* 2001; 32:145-148.
70. Blackall PJ, Yamaguchi T, Iritani Y, Rogers DG. Evaluation of two monoclonal antibodies for serotyping of *Haemophilus paragallinarum*. *Avian Dis* 1990; 34:861-864.
71. 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.
72. Blackall PJ, Zheng Z, Takagi M, Terzolo HR, Sandoval VE, Silva EN. Characterization of two monoclonal antibodies directed against serovar A *Haemophilus paragallinarum*. *Avian Dis* 1994; 38:361-365.
73. Yamaguchi T, Takigami S, Iritani Y, Hayashi Y. Characterization and use of monoclonal antibodies to identify *Haemophilus paragallinarum* serovars. *Avian Dis* 1990; 34:52-57.
74. Yamaguchi T, Takigami S, Iritani Y, Hayashi Y. Characterization of two new monoclonal antibodies against *Haemophilus paragallinarum* serovar C hemagglutinating antigen. *Avian Dis* 1990; 34:922-927.
75. 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.
76. Blackall PJ, Silva EN, Yamaguchi T, Iritani Y. Characterization of isolates of avian haemophili from Brazil. *Avian Dis* 1994; 38:269-274.
77. 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* 1990; 34:364-368.

78. Chen X, Miflin JK, Zhang P, Blackall PJ. Development and application of DNA probes and PCR tests for *Haemophilus paragallinarum*. Avian Dis 1996; 40:398-407.
79. Miflin JK, Chen X, Bragg RR, Welgemoed JM, Greyling JM, Horner RF, *et al.* Confirmation that PCR can be used to identify NAD-dependent and NAD-independent *Haemophilus paragallinarum* isolates. Onderstepoort J Vet Res 1999; 66:55-57.
80. Chen X, Chen Q, Zhang P, Feng W, Blackall PJ. Evaluation of a PCR test for the detection of *Haemophilus paragallinarum* in China. Avian Pathol 1998; 27:296-300.
81. Soriano VE. Coriza infecciosa. Memorias IX Jornadas Médico Avícolas; 2003 febrero 18-20; Cd. Universitaria (DF) México. México (DF): Departamento de Producción Animal: Aves Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia, Universidad Nacional Autónoma de México. 2003:88-92.
82. Chen X, Song C, Gong Y, Blackall PJ. Further studies on the use of a polymerase chain reaction test for the diagnosis of infectious coryza. Avian Pathol 1998; 27:618-624.
83. Blackall PJ, Eaves LE, Morrow CJ. Comparison of *Haemophilus paragallinarum* isolates by restriction endonuclease analysis of chromosomal DNA. Vet Microbiol 1991; 27:39-47.
84. Khan MI, Chen X, Blackall PJ. Differentiation of *Haemophilus paragallinarum* isolates using ERIC-PCR analysis. Proceedings of 47th Western Poultry Disease Conference; 1998 march 8-10; Sacramento (California) USA. California (Davis): University of California, 1998:8-9.
85. Hobb RI, Tseng HJ, Downes JE, Terry TD, Blackall PJ, Takagi M, *et al.* Molecular analysis of a haemagglutinin of *Haemophilus paragallinarum*. Microbiology 2002; 148:2171-2179.
86. Sandoval VE, Terzolo HR. Coriza infecciosa. Primera parte: descripción de la enfermedad, el agente y los brotes de campo. Avicult Profes 1996; 14:29-35.
87. Blackall PJ, Reid GG. Further efficacy studies on inactivated, aluminum-hydroxide-adsorbed vaccines against infectious coryza. Avian Dis 1987; 31:527-532.

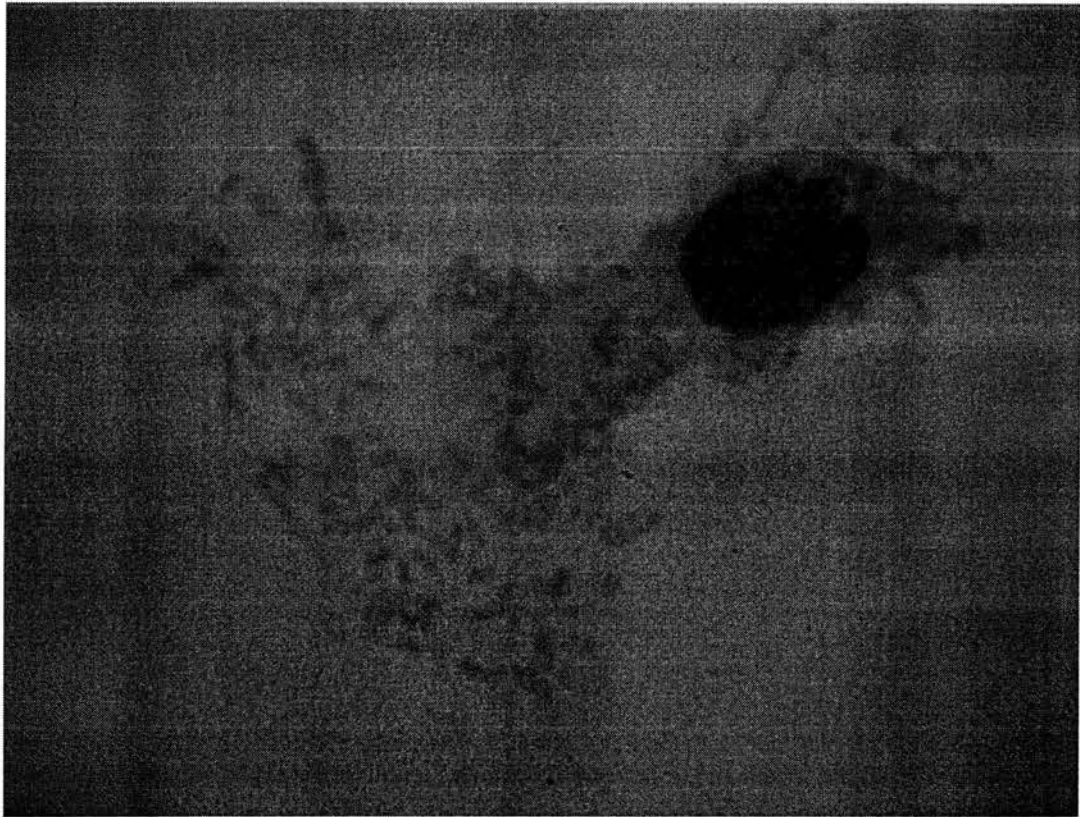


88. Terzolo HR, Sandoval VE, Pondal FG. Evaluation of inactivated infectious coryza vaccines in chickens challenged by serovar B strains of *Haemophilus paragallinarum*. *Avian Pathol* 1997; 26:365-376.
89. Blackall PJ. Infectious coryza: overview of the disease and new diagnostic options. *Clin Microbiol Rev* 1999; 12:627-632.
90. Jacobs AAC, Cuenen W, Storm PK. Efficacy of a trivalent *Haemophilus paragallinarum* vaccine compared to bivalent vaccines. *Vet Microbiol* 1992; 32:43-49.
91. Fernández RP, Colíndres HL, Soriano VE. Protection afforded by bi- and trivalent bacterins of *Haemophilus paragallinarum* against prevalent serovars in Mexico. *Proceedings of 52nd Western Poultry Disease Conference*; 2003 march 8-11; Sacramento (California) USA. California (Davis): University of California, 2003:88.
92. Yamaguchi T, Blackall PJ, Takigami S, Iritani Y, Hayashi Y. Immunogenicity of *Haemophilus paragallinarum* serovar B strains. *Avian Dis* 1991; 35:965-968.
93. Bowles R, Blackall PJ, Terzolo HR, Sandoval VE. An assesment of the genetic diversity of Australian and overseas isolates of *Haemophilus paragallinarum* by multilocus enzyme electrophoresis. *Proceedings of Xth World Veterinary Poultry Association Congress*; 1993 august 16-19; Sydney (Queensland) Australia. United Kingdom (Compton): World Veterinary Poultry Association, 1993:146.
94. Jacobs AAC, van der Berg K, Malo A. Efficacy of a new tetravalent coryza vaccine against emerging variant type B strains. *Avian Pathol* 2003; 32:265-269.
95. Bornstein S, Samberg Y. The therapeutic effect of streptomycin on infectious coryza of chickens caused by *Haemophilus gallinarum*. II. Isolation and culture of *Haemophilus gallinarum*, and some of its biochemical reactions. *Am J Vet Res* 1954; 15:612-616.
96. Hanley JE, Davis RB, Sunka EM. An evaluation and comparison of spectinomycin and spectinomycin-erythromycin combinations for infectious coryza. *Avian Dis* 1968; 12:1-3.

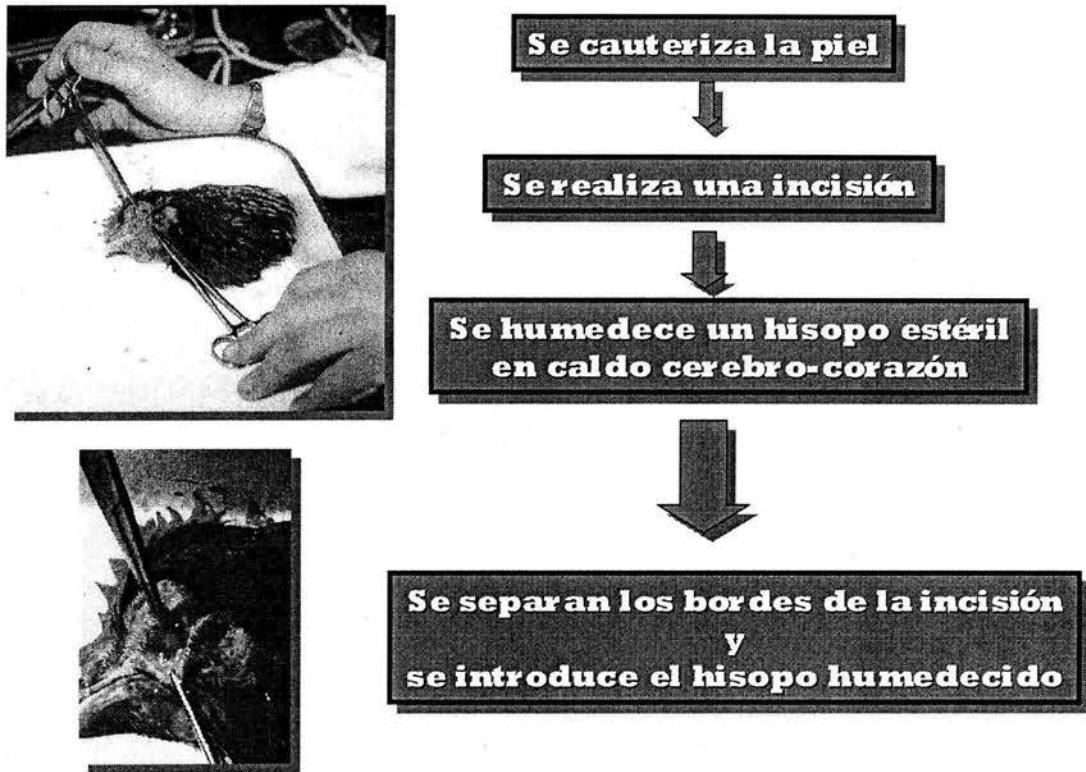
97. Sumano LH, Ocampo CL. Estudio cinético comparativo de tres combinaciones de sulfonamida-trimetoprim en gallinas White Leghorn sanas y enfermas de coriza infecciosa (*Haemophilus gallinarum*). Vet Méx 1987; 18:21-26.
98. Sakai T, Nagao S. Experimental infection of chickens with *Haemophilus paragallinarum* and therapeutic efficacy of TA-068W. Bull Coll Vet Med Nihon Univ 1987; 40:228-235.
99. Lublin A, Mechani S, Malkinson M, Weisman Y. Efficacy of norfloxacin nicotinate treatment of broilers breeders against *Haemophilus paragallinarum*. Avian Dis 1993; 37:673-679.
100. Vázquez R, Vázquez F. Effectiveness of enrofloxacin against *H. paragallinarum* infection under control and field trials in Mexico. Proceedings of 38th Western Poultry Disease Conference; 1989 march 6-9; Tempe (Arizona) USA. California (Davis): University of California, 1989:128-130.
101. Bragg RR. The use of a continual disinfection program for the control of infectious diseases in layers and broilers. Proceedings of XIII Congress of the World Veterinary Poultry Association; 2003 july 19-23; Denver (Colorado) USA. United Kingdom (Compton): World Veterinary Poultry Association, 2003:127-128.
102. Soriano VE, Vera NA, Salado CR, Fernández RP, Blackall PJ. *In vitro* susceptibility of *Ornithobacterium rhinotracheale* to several antimicrobial drugs. Avian Dis 2003; 47:476-480.



**Figura 1.** Pollo infectado artificialmente con *Haemophilus paragallinarum*. Se observa coriza, inflamación de seno infraorbitario y edema de barbilla.



**Figura 2.** Adherencia *in vitro* de *Haemophilus paragallinarum*, principalmente al borde ciliado de una célula epitelial traqueal de pollo. Tinción de Giemsa-May-Grünwald. 200x.



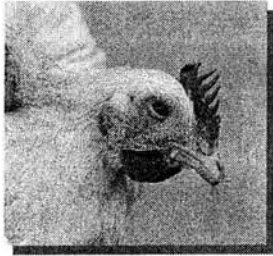
**Figura 3.** Descripción del procedimiento para la obtención de *Haemophilus paragallinarum* a partir de senos infraorbitarios de aves con coriza infecciosa.

## Grados de enfermedad



**Figura 4.** Grados de coriza infecciosa. Interpretación de pruebas de protección al segundo día después del desafío de aves inmunizadas. Grado 0: Aves inoculadas sin síntomas. Considerada negativa. Grado 1: Leve conjuntivitis. Considerada negativa.

## Grados de enfermedad



2



3



4

**Positivos**

**Figura 5.** Grados de coriza infecciosa. Interpretación de pruebas de protección al segundo día después del desafío de aves inmunizadas. Grado 2: Conjuntivitis con el ojo parcialmente cerrado e hinchazón de zona periorbital y senos paranasales. Considerada positiva. Grado 3: Conjuntivitis con el ojo totalmente cerrado, párpados no adheridos e hinchazón notable de zona la periorbital y senos paranasales. Considerada positiva. Grado 4: Conjuntivitis con ojo totalmente cerrado, párpados adheridos e hinchazón muy severa de zona la periorbital y senos paranasales. Considerada positiva.

## **Capítulo IV**

### **Cross-protection study of the nine serovars of *Haemophilus paragallinarum* in the Kume haemagglutinin scheme**

**Soriano VE, Longinos GM, Téllez G, Fernández RP,  
Suárez-Güemes F and PJ Blackall**

***Avian Pathology*, submitted for publication. 2004**



## Full length paper

### Cross-protection study of the nine serovars of *Haemophilus paragallinarum* in the Kume haemagglutinin scheme

V. E. Soriano<sup>1\*</sup>, G. M. Longinos<sup>1</sup>, G. Téllez<sup>2</sup>, R. P. Fernández<sup>1</sup>,  
F. Suárez-Güemes<sup>3</sup> and P. J. Blackall<sup>4</sup>

<sup>1</sup>Centro de Investigación y Estudios Avanzados en Salud Animal, Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia, Universidad Autónoma del Estado de México, Toluca 50000, México. <sup>2</sup>Center of Excellence for Poultry Science, Division of Agriculture, University of Arkansas, Fayetteville 72701, Arkansas. <sup>3</sup>Departamento de Microbiología e Inmunología, Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia, Universidad Nacional Autónoma de México, Cd. Universitaria 04510, México. <sup>4</sup>Agency for Food and Fibre Sciences, Department of Primary Industries Queensland, Animal Research Institute, Yeerongpilly 4105, Australia.

#### Summary

The cross protection and haemagglutination-inhibition (HI) antibodies present in chickens vaccinated with one of the nine currently recognized Kume haemagglutinin serovars of *Haemophilus paragallinarum* were investigated. The results confirmed the widely accepted dogma that serogroups A, B, and C represent three distinct immunovars. Within Kume serogroup A, there was generally good cross-protection amongst all four serovars. However, within Kume serogroup C, there was evidence of a reduced level of cross-protection between some of the four serovars. The HI antibody levels generally showed the same trend as with the cross-protection results. This study suggests that some apparent field failures of infectious coryza vaccines may be due to a lack of cross-protection between the

vaccine strains and the field strains. Our results will help guide the selection of strains for inclusion in infectious coryza vaccines.

## **Introduction**

*Haemophilus paragallinarum* is the causative agent of infectious coryza of chickens. This acute respiratory disease can occur in both growing chickens and layers, causing an increased culling rate in meat chickens and a reduction in egg production (10%-40%) in laying and breeding hens, particularly on multiage farms (Blackall & Matsumoto, 2003).

Two inter-related schemes have been mainly used to serotype *H. paragallinarum*. The Page scheme was originally developed with the use of a slide agglutination test to recognize the three serovars, A, B, and C (Page, 1962). The Kume serotyping scheme was based on a haemagglutination-inhibition test and recognized seven serovars organized into three serogroups termed I, II, and III (Kume *et al.*, 1983). In further studies, Eaves *et al.* (1989) identified a new serovar within Kume serogroup I, and Blackall *et al.* (1990b) identified a further serovar within Kume serogroup II. Hence, Blackall *et al.* (1990b) proposed to alter the Kume scheme nomenclature to emphasis the fact that Kume serogroups I, II, and III corresponded to the Page serovars A, C, and B, respectively. Thus, the nine currently recognized serovars are termed serovars A-1, A-2, A-3, A-4 within Kume serogroup A (with all of the serovars corresponding to Page serovar A), serovar B-1 within Kume serogroup B (which corresponds to Page serovar B), and serovars C-1, C-2, C-3, and C-4 within Kume serogroup C (with all of the serovars corresponding to Page serovar C) (Blackall *et al.*, 1990b).

It is generally accepted that the Page serovars, or Kume serogroups, represent three distinct immunovars (Blackall, 1999). The accepted dogma, with little experimental evidence, is that serovars within a Kume serogroup are cross-protective (Blackall, 1995). Specific evidence to date is that, firstly, Kume serovars C-1 and C-2 and C-2 and C-4 are cross-protective; and, secondly, Kume serovars A-1 and C-1, A-1 and C-2, A-4 and C-2 and A-4 and C-4 are not cross-protective (Kume *et al.*, 1980; Blackall & Reid, 1987;

Blackall, 1991). Cross-protection between the remaining Kume serovars has not been examined and is thus unknown.

The protective antigens of *H. paragallinarum* have not been definitively identified. However, the haemagglutinin antigens have been proposed as the main pathogenic and immunogenic structures (Yamaguchi *et al.*, 1993). Thus, haemagglutination-inhibition antibody levels of both vaccinated and passive-immunized chickens have been closely correlated with protection against clinical signs and nasal clearance of the challenge organism (Kume *et al.*, 1984; Takagi *et al.*, 1991).

The aims of the present study were to determine the cross-protection between all nine recognized Kume serovars of *H. paragallinarum* in vaccination-challenge trials in chickens and to also examine the level of HI antibodies in the chickens.

## **Materials and Methods**

### *Bacteria and growth conditions*

The nine reference strains of the Kume scheme used were 221 (A-1), 2403 (A-2), E-3C (A-3), HP14 (A-4), 2671 (B-1), H-18 (C-1), Modesto (C-2), SA-3 (C-3), and HP60 (C-4) (Blackall *et al.*, 1990b). The reference strains were all sourced from the culture collection held at the Animal Research Institute, Department of Primary Industries and Fisheries Queensland, Australia. The origin of strains is shown in Table 1. Both brain-heart infusion broth and agar plates, supplemented with 1% sodium chloride, 0.0025% (w/v) reduced nicotinamide adenine dinucleotide, and 1% (v/v) filter-sterilized, heat-inactivated horse serum, were used for propagation and maintenance of bacterial cultures. Also, 10% sheep blood agar with *Staphylococcus epidermidis* as feeder colony was used.

### *Vaccination/Challenge trials*

A total of 900, one-day-old, *Mycoplasma gallisepticum* and *M. synoviae* free, clinically healthy, ALPES Leghorn chickens were used in the study. All chickens were individually identified. Vaccines for each reference strain of *H. paragallinarum* were produced. Briefly, bacteria were grown overnight in brain-heart infusion broth, supplemented with 1% sodium

chloride, 0.0025% (w/v) reduced nicotinamide adenine dinucleotide, and 1% (v/v) filter-sterilized, heat-inactivated horse serum. A viable count was performed and the culture inactivated with 0.01% (w/v) thiomersal as reported by Blackall (1991). Once the viable count results were available the cells suspensions were adjusted to  $5 \times 10^8$  colony forming units (CFU)/ml and aluminium hydroxide added to a final concentration of 10%. Groups of 90 chickens, were inoculated subcutaneously at 6, and 9 weeks of age with 1 ml of the relevant vaccine. Three weeks after the second vaccination, all chickens were bled, relocated into 9 groups containing 10 vaccinated plus 10 unvaccinated control chickens and challenged by nasal instillation of 0.2 ml of an overnight broth culture of the relevant *H. paragallinarum* strain containing  $5 \times 10^8$  CFU/ml as reported by Blackall (1991). Clinical signs of infectious coryza were recorded from second to seventh days post-challenge. All chickens were then humanly euthanized and both infraorbital sinuses cultured onto blood agar with a *Staphylococcus epidermidis* nurse colony. Protection was defined as the absence of clinical signs of infectious coryza and a failure to reisolate *H. paragallinarum*. A number of reisolated bacteria were serotyped as previously reported (Soriano *et al.*, 2001). Protection rates were compared by chi-square tests and considered significant at a probability of  $P < 0.01$ . Furthermore, the sera of 30 chickens from each of the nine serovar vaccinated groups were examined in a HI tests using the haemagglutinins of the nine reference strains. The serum HI antibody titres were expressed as the reciprocal of the highest dilution of serum sample that showed complete inhibition of the haemagglutinating activity. The serum HI antibody titres were transformed to base 10 logarithms to remove any skewness in the data. The HI titres of the various groups were compared by an analysis of variance and differences were tested for significance by the Tukey test. Results were considered significant at a probability of  $P < 0.01$ .

## Results

The results of the cross-protection trials are presented in Table 2. As noted earlier, a protected chicken was defined as one that did not show clinical signs during the observation period and did not yield any haemophili from the sinus following culture. Within Kume

serogroup A, serovars A-1, A-2 and A-3 were strongly cross-protective. The Kume serovar A-4 vaccine resulted in a significantly lower protection for the serovar A-2 challenge than for the other Kume serogroup A serovars. Within Kume serogroup C, there was a good level of cross-protection for serovars C-1, C-2 and C-3, with some exceptions. The Kume serovar C-1 vaccine provided significantly lower protection against the serovar C-2 challenge than for the other serovars of the group. Similar significant lower levels of protection resulted for the vaccine C-2/challenge C-3 and vaccine C-3/challenge C-2. Within the C-4 vaccine groups, significantly lower levels of protection were present for the challenge from serovars C-1 and C-3. The only instance of a vaccine being able to provide cross-protection that was at the same level at the homologous level was for the serovar C-4 vaccine and the serovar B-1 challenge.

The results of the serological testing are shown in Table 3. As a general rule, the homologous HI titre was significantly higher than any other titre (including within the relevant Kume serogroup). This is shown by Kume serovars A-1, A-4, C-2, C-3 and C-4. A notable exception was the Kume serovar C-1 antigen. This antigen gave HI titres with antisera to serovars C-1, C-2, C-3 and C-4 that were not significantly different. The A-2 and A-3 antigens showed some degree of cross-reactivity within their serogroup (giving equivalent titres with sera from serovars A-1 and A-4 respectively).

An important point is that with a few exceptions, all HI titres for tests across Kume serogroups were significantly lower than any titre within a Kume serogroup. The exceptions were all associated with antigens that gave low cross-titres within their respective serogroup. As an example, the A-4 antigen gave a very low HI titre to sera from the serovar A-2 vaccinated chickens. The titre was so low that the titres to the A-2 sera were not significantly different to the titres detected in the sera from the B-1, C-1, C-2, C-3 and C-4 vaccinated chickens. A similar result was obtained with the C-4 antigen, where the titres to C-1 sera were not significantly different to the titres obtained with the A-1, A-2, A-3, A-4 and B-1 sera.

## Discussion

The present study appears to be first published investigation on the cross-protection within all of the nine currently recognized serovars of *H. paragallinarum* of the Kume scheme. Our study has confirmed the widely accepted dogma that serogroups A, B, and C represent three distinct immunovars. With one exception, there was no significant cross-protection between Kume serogroups. The exception was that a vaccine based on the C-4 reference strain provided cross-protection against the challenge by the B-1 strain at a level that was not statistically different from the homologous protection. As Kume serovar C-4 has only been reported in Australia (Blackall *et al.*, 1990b), this cross-protection is of little practical relevance, particularly as Kume serovar B-1/Page serovar B has never been reported in Australia-based serotyping studies (Thornton & Blackall, 1984; Blackall & Eaves, 1988; Eaves *et al.*, 1989; Blackall *et al.*, 1990a; Blackall *et al.*, 1990b).

In terms of cross-protection within the two Kume serogroups that contain multiple serovars, we found differences between serogroup A and serogroup C. Within Kume serogroup A, serovars A-1, A-2, and A-3 showed a high level of cross-protection. When serovar A-4 is considered, there is a lower level of cross-protection. The vaccines based on A-2 and A-3 gave a protection level against the A-4 challenge that was significantly lower than the respective homologous challenge. Similarly, the vaccine based on A-4 gave a significantly lower protection against a challenge from the A-2 than from the homologous (A-4) challenge. To date, Kume serovar A-4 has only been reported in Australia, and indeed is the only form of Kume serogroup A present in that country (Eaves *et al.*, 1989). Hence, in practical terms, this means that for most of the world, inactivated infectious coryza vaccines need contain only one strain within the Kume serogroup A to provide good levels of protection against the recognized diversity within Kume serogroup A. Within Australia, any entry into the national poultry flock of isolate of *H. paragallinarum* of Kume serovar A-2 may result in lowered vaccine efficacy in the field as all Australian based infectious coryza vaccines are based on Kume serovar A-4.

Within Kume serovars C-1, C-2, C-3 and C-4, there was no vaccine that could give the same level of cross-protection for all four serovars. As an example, the serovar C-1

vaccine gave significantly lower protection against a C-2 challenge as compared with the C-1, C-3 and C-4 challenges. Similarly, while the C-2 based vaccine gave equivalent protection for challenge from serovars C-1, C-2 and C-4, the protection against a C-3 challenge was significantly lower. This means that inactivated infectious coryza vaccines may need more than one Kume serogroup C strain depending upon the range of Kume serovar C types in the field. Our results will help vaccine manufacturers select the best possible combination of strains to be included in infectious coryza vaccines.

A rational selection of vaccine strains is only possible in those areas where there is a good knowledge of the distribution of the various Kume serovars – particularly the serovars within Kume serogroup C. Unfortunately, there have not been many studies performed using the Kume serotyping scheme. Kume serovars A-1, B-1, and C-2 have been recognized in the United States of America (Kume *et al.*, 1983; Eaves *et al.*, 1989), A-1, A-2, B-1, and C-2 in Mexico and Germany (Kume *et al.*, 1983; Eaves *et al.*, 1989; Soriano *et al.*, 2001), A-3 in Brazil (Kume *et al.*, 1983), A-1, B-1, C-2, and C-3 in South Africa (Kume *et al.*, 1983; Eaves *et al.*, 1989), A-1 and C-1 in Japan (Kume *et al.*, 1983; Eaves *et al.*, 1989), C-3 in Zimbabwe (Bragg, 2002a), and A-4, C-2, and C-4 in Australia (Eaves *et al.*, 1989; Blackall *et al.*, 1990b). At the moment, most infectious coryza vaccines contain only a C-1 or C-2 strain and not both (Blackall, 1995). Our results suggest that, depending upon the range of Kume serovars in the field, vaccines with a single serovar C strain may not be optimal. A similar suggestion has been made by Bragg *et al.* (1996) who have suggested that increased prevalence of Kume serovar C-3 in South Africa poultry has occurred despite the extensive use of infectious coryza vaccines as the vaccines do not contain a serovar C-3 strain.

Our results for cross-protection within Kume serogroup C match the previous reports that a C-2 vaccine protects against both a C-1 and a C-4 challenge (Kume *et al.*, 1980; Blackall, 1991). Jacobs and van der Werf (2000) have reported that a commercial vaccine provided protection against challenge from several South African serovar C-3 field isolates. Unfortunately, it is difficult to compare this prior work with our current study as Jacobs and van der Werf (2000) provided no information on the Page serovar C in the vaccine they used.

Our study provides further evidence that Page serovar B/Kume serovar B-1 isolates represent a distinct immunovar, – meaning that vaccines that lack a serovar B component are unlikely to provide protection. This observation of a lack of cross-protection between Page serovars A and C and Page serovar B has been previously reported (Jacobs *et al.*, 1992). We also have previously reported that a bivalent (serovar A-1/serovar C-1) vaccine provided no protection against a Mexican serovar B-1 isolate (Fernández *et al.*, 2003). While the Kume serotyping scheme recognizes only one serovar (B-1) within serogroup B, this should not be regarded as evidence of antigenic homogeneity. Few studies have attempted to examine the antigenic heterogeneity within Page serovar B/Kume serogroup B. The little information that is available tends to suggest that it is likely that further serovars would be recognized in the serogroup B as only partial cross-protection has been reported within three serovar B strains (Yamaguchi *et al.*, 1991). This evidence of antigenic diversity within Page serovar B/Kume serogroup B is further supported by the recent report that a standard commercial A, B, C trivalent infectious coryza vaccine provided a weaker level of protection against so called “variant” Page serovar B field isolates (Jacobs *et al.*, 2003). Indeed, Jacobs *et al.* (2003) reported that the inclusion of one of the “variant” Page serovar B isolates, resulting in a tetravalent vaccine – was necessary to achieve good protection.

We have used a vaccination/challenge format that is commonly used in the evaluation of infectious coryza vaccines (Kume *et al.*, 1980; Blackall and Reid, 1987; Blackall, 1991; Blackall, 1995). This widely accepted format involves the use of vaccines that are adjusted to a live cell count, an observation period for clinical signs that is limited to days 2 or days 2 to 7 post-challenge and a necropsy at 7 days post-challenge. Our use of a live cell count for vaccine standardization means that there is a potential that the total cells per dose (ie live and dead cells) for each vaccine may have varied. Nevertheless, the widely accepted method of standardizing infectious coryza vaccines has been a viable count (Blackall, 1995). A recent study that examined virulence of *H. paragallinarum* has proposed a longer period for the observation of clinical signs (Bragg, 2002b) but there is no evidence that such an extended observation period is of any relevance in vaccination/challenge trials. The nature of the work required that a single adjuvant had to



be selected for use. Aluminium hydroxide is an adjuvant that has been repeatedly shown to be both safe and effective for infectious coryza vaccines (Blackall & Reid, 1987; Blackall, 1995). Alternative adjuvants, such as mineral oil, lack a history of safety and efficacy (Blackall, 1995).

The HI antibodies to *H. paragallinarum* are regarded as the main protective immune response against infectious coryza in chickens (Kume *et al.*, 1984; Takagi *et al.*, 1991). In our study, HI antibody titres were consistently highest when the vaccine strain and the serological antigen were the same Kume serovar (Table 3). Hence, in general, HI antibody titres were correlated with protection levels. There was one notable exception. The C-4 vaccinated chickens showed a level of protection against the B-1 challenge that was not statistically different from the protection conferred by the same vaccine against challenge by Kume serovars C-2 and C-4 (Table 2). However, the C-4 vaccinated chickens contained no detectable HI antibodies to serovar B-1 (Table 3). It is possible that other antigens than haemagglutinins could be involved in protection, for example, the capsule as suggested by others (Sawata *et al.*, 1984).

There are important implications in our work for those laboratories that use HI tests to monitor vaccine efficacy in vaccinated flocks. We found that the use of a C-2 based haemagglutinin gave a very poor level of HI antibodies in C-1 vaccinated birds (Table 3). In contrast, the C-1 haemagglutinin gave titres that were not significantly different in any of the C-1, C-2, C-3 and C-4 vaccinated groups. This means that laboratories must select the serovar C antigen used in HI test to monitor vaccines to match the serovar in the vaccine. As a general rule, our results suggest that a C-1 strain is better overall choice as a haemagglutinin antigen than a C-2 or a C-3 strain. We found no such marked variation in HI detection within Kume serogroup A.

In conclusion, the cross-protection and HI antibody titres of inactivated, aluminium hydroxide adsorbed, infectious coryza vaccines are dependent on the serovars included in the vaccines. Based on our results and a knowledge of the global Kume serovar distribution, most poultry regions of the world would be best served by an inactivated infectious coryza vaccine containing reference strains of serovars A-1, B-1, and C-2 of *H. paragallinarum*. In those regions where Kume serovar C-3 is present, other serovar

combinations may be necessary. The available information on cross-protection within Kume serogroup B indicates that it may be difficult to predict levels of protection.

### **Acknowledgements**

The present research work forms part of the Ph. D. studies of the senior author at the Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM). The technical assistance of MVZ Enrique Velásquez Q., Alberto Guadarrama J., and Germán Guadarrama C., is gratefully acknowledged.

### **References**

- Blackall, P.J. (1991). An evaluation of the cross-protection afforded by inactivated infectious coryza vaccines. *Australian Veterinary Journal*, **68**, 266-267.
- Blackall, P.J. (1995). Vaccines against infectious coryza. *World's Poultry Science Journal*, **51**, 17-26.
- Blackall, P.J. (1999). Infectious coryza: overview of the disease and new diagnostic options. *Clinical Microbiology Reviews*, **12**, 627-632.
- Blackall, P.J. & Eaves, L.E. (1988). Serological classification of Australian and South African isolates of *Haemophilus paragallinarum*. *Australian Veterinary Journal*, **65**, 362-363.
- Blackall, P.J., Eaves, L.E. & Aus, G. (1990a). Serotyping of *Haemophilus paragallinarum* by the Page scheme: comparison of the use of agglutination and hemagglutination-inhibition tests. *Avian Diseases*, **34**, 643-645.
- Blackall, P.J., Eaves, L.E. & Rogers, D.G. (1990b). Proposal of a new serovar and altered nomenclature for *Haemophilus paragallinarum* in the Kume hemagglutinin scheme. *Journal of Clinical Microbiology*, **28**, 1185-1187.

- Blackall, P.J. & Matsumoto, M. (2003). Infectious coryza. In: Y.M. Saif, H.J. Barnes, J.R. Glisson, A.M. Fadly, L.R. McDougald & D.E. Swayne (Eds.), *Diseases of Poultry*, 11th edn (pp. 691-703). Ames, IA: Iowa State Press.
- Blackall, P.J. & Reid, G.G. (1987). Further efficacy studies on inactivated, aluminum-hydroxide-adsorbed vaccines against infectious coryza. *Avian Diseases*, **31**, 527-532.
- Bragg, R.R. (2002a). Isolation of serovar C-3 *Haemophilus paragallinarum* from Zimbabwe: A further indication of the need for the production of vaccines against infectious coryza containing local isolates of *H. paragallinarum*. *Onderstepoort Journal of Veterinary Research*, **69**, 129-132.
- Bragg, R.R. (2002b). Virulence of South African isolates of *Haemophilus paragallinarum*. Part 1: NAD-dependent field isolates. *Onderstepoort Journal of Veterinary Research*, **69**, 163-169.
- Bragg, R.R., Coetzee, L. & Verschoor, J.A. (1996). Changes in the incidences of the different serovars of *Haemophilus paragallinarum* in South Africa: A possible explanation for vaccination failures. *Onderstepoort Journal of Veterinary Research*, **63**, 217-226.
- Eaves, L.E., Rogers, D.G. & Blackall, P.J. (1989). Comparison of hemagglutinin and agglutinin schemes for the serological classification of *Haemophilus paragallinarum* and proposal of a new hemagglutinin serovar. *Journal of Clinical Microbiology*, **27**, 1510-1513.
- Fernández, R.P., Colíndres H.L. & Soriano V.E. (2003). Hemagglutination-inhibition antibodies and protection conferred by bi- or trivalent vaccines of *Haemophilus paragallinarum* against isolates of the prevalent hemagglutinin serovars identified in Mexico. *Proceedings of the 52nd Western Poultry Disease Conference* (pp. 88). Sacramento, California.
- Jacobs, A.A.C., Cuenen, W. & Storm, P.K. (1992). Efficacy of a trivalent *Haemophilus paragallinarum* vaccine compared to bivalent vaccines. *Veterinary Microbiology*, **32**, 43-49.

- Jacobs, A.A.C. & van der Werf, J. (2000). Efficacy of a commercially available coryza vaccine against challenge with recent South African NAD-independent isolates of *Haemophilus paragallinarum*. *Journal of the South-African Veterinary Association*, *71*, 109-110.
- Jacobs, A.A.C, van der Berg, K. & Malo, A. (2003). Efficacy of a new tetravalent coryza vaccine against emerging variant type B strains. *Avian Pathology*, *32*, 265-269.
- Kume, K., Sawata, A. & Nakai, T. (1984). Clearance of the challenge organisms from the upper respiratory tract of chickens injected with an inactivated *Haemophilus paragallinarum* vaccine. *Japan Journal of Veterinary Science*, *46*, 843-850.
- Kume, K., Sawata, A., Nakai, T. & Matsumoto, M. (1983). Serological classification of *Haemophilus paragallinarum* with a hemagglutinin system. *Journal of Clinical Microbiology*, *17*, 958-964.
- Kume, K., Sawata, A. & Nakase, Y. (1980). Immunologic relationship between Page's and Sawata's strains of *Haemophilus paragallinarum*. *American Journal of Veterinary Research*, *41*, 757-760.
- Page, L.A. (1962). *Haemophilus* infections in chickens. I. Characteristics of 12 *Haemophilus* isolates recovered from diseased chickens. *American Journal of Veterinary Research*, *23*, 85-95.
- Sawata, A., Kume, K. & Nakai, T. (1984). Relationship between anticapsular antibody and protective activity of a capsular antigen of *Haemophilus paragallinarum*. *Japan Journal of Veterinary Science*, *46*, 475-486.
- Soriano, V.E., Blackall, P.J., Dabo, S.M., Téllez, G., García-Delgado, G.A. & Fernández, R.P. (2001). Serotyping of *Haemophilus paragallinarum* isolates from Mexico by the Kume hemagglutinin scheme. *Avian Diseases*, *45*, 680-683.
- Takagi, M., Hirayama, N., Makie, H. & Ohta, S. (1991). Production, characterization and protective effect of monoclonal antibodies to *Haemophilus paragallinarum* serotype A. *Veterinary Microbiology*, *27*, 327-338.
- Thornton, A.M. & Blackall, P.J. (1984). Serological classification of Australian isolates of *Haemophilus paragallinarum*. *Australian Veterinary Journal*, *61*, 251-253.

- Yamaguchi, T., Blackall, P.J., Takigami, S., Iritani, Y. & Hayashi, Y. (1991). Immunogenicity of *Haemophilus paragallinarum* serovar B strains. *Avian Diseases*, **35**, 965-968.
- Yamaguchi, T., Kobayashi, M., Masaki, S. & Iritani, Y. (1993). Isolation and characterization of a *Haemophilus paragallinarum* mutant that lacks a hemagglutinating antigen. *Avian Diseases*, **37**, 970-976.

**Table 1.** *Designations, serovars and origins of Haemophilus paragallinarum strains used in the present study.*

Strain	Serovar	Origin	Reference
221	A-1	Japan	Kume <i>et al.</i> (1983)
2403	A-2	Germany	“
E-3C	A-3	Brazil	“
HP14	A-4	Australia	Eaves <i>et al.</i> (1989)
2671	B-1	Germany	Kume <i>et al.</i> (1983)
H-18	C-1	Japan	“
Modesto	C-2	USA	“
SA-3	C-3	South Africa	“
HP60	C-4	Australia	Blackall <i>et al.</i> (1990b)

**Table 2.** Protection in groups of vaccinated and challenged chickens with each serovar of *Haemophilus paragallinarum*.

Vaccine	Protection (%) against challenge with <i>H. paragallinarum</i> of serovar <sup>a</sup>								
	A-1	A-2	A-3	A-4	B-1	C-1	C-2	C-3	C-4
A-1	100 <sup>A</sup>	90 <sup>A</sup>	90 <sup>A</sup>	80 <sup>A</sup>	30 <sup>B</sup>	10 <sup>B</sup>	20 <sup>B</sup>	30 <sup>B</sup>	50 <sup>B</sup>
A-2	90 <sup>A</sup>	90 <sup>A</sup>	90 <sup>A</sup>	30 <sup>B</sup>	11 <sup>B</sup>	20 <sup>B</sup>	50 <sup>B</sup>	0 <sup>B</sup>	60 <sup>B</sup>
A-3	100 <sup>A</sup>	90 <sup>A</sup>	100 <sup>A</sup>	50 <sup>B</sup>	30 <sup>B</sup>	20 <sup>B</sup>	20 <sup>B</sup>	10 <sup>B</sup>	50 <sup>B</sup>
A-4	100 <sup>A</sup>	60 <sup>B</sup>	70 <sup>A</sup>	90 <sup>A</sup>	50 <sup>B</sup>	30 <sup>B</sup>	20 <sup>B</sup>	30 <sup>B</sup>	40 <sup>B</sup>
B-1	10 <sup>B</sup>	50 <sup>B</sup>	30 <sup>B</sup>	10 <sup>B</sup>	100 <sup>A</sup>	20 <sup>B</sup>	60 <sup>B</sup>	0 <sup>B</sup>	50 <sup>B</sup>
C-1	10 <sup>B</sup>	60 <sup>B</sup>	60 <sup>B</sup>	0 <sup>B</sup>	50 <sup>B</sup>	100 <sup>A</sup>	50 <sup>B</sup>	80 <sup>B</sup>	100 <sup>A</sup>
C-2	0 <sup>B</sup>	40 <sup>B</sup>	50 <sup>B</sup>	10 <sup>B</sup>	33 <sup>B</sup>	70 <sup>A</sup>	70 <sup>A</sup>	40 <sup>B</sup>	90 <sup>B</sup>
C-3	30 <sup>B</sup>	50 <sup>B</sup>	40 <sup>B</sup>	11 <sup>B</sup>	20 <sup>B</sup>	100 <sup>A</sup>	40 <sup>B</sup>	90 <sup>A</sup>	80 <sup>B</sup>
C-4	40 <sup>B</sup>	30 <sup>B</sup>	50 <sup>B</sup>	44 <sup>B</sup>	70 <sup>A</sup>	50 <sup>B</sup>	70 <sup>A</sup>	40 <sup>B</sup>	100 <sup>A</sup>
Control	0 <sup>B</sup>	10 <sup>B</sup>	0 <sup>B</sup>	0 <sup>B</sup>	0 <sup>B</sup>	0 <sup>B</sup>	0 <sup>B</sup>	20 <sup>B</sup>	30 <sup>B</sup>

<sup>a</sup> Values within a column followed by different upper case superscripts differ at the 1% level of significance.

**Table 3.** HI antibody titres to all nine Kume serovars of *H. paragallinarum* in vaccinated chickens.

Vaccine	Mean (Log <sub>10</sub> ) of HI antibody titres measured with haemagglutinin of <i>H. paragallinarum</i> of serovar <sup>a</sup>								
	A-1	A-2	A-3	A-4	B-1	C-1	C-2	C-3	C-4
A-1	1.25 <sup>A</sup>	1.00 <sup>A</sup>	1.05 <sup>B</sup>	0.59 <sup>C</sup>	0.00 <sup>B</sup>	0.40 <sup>B</sup>	0.00 <sup>C</sup>	0.10 <sup>E</sup>	0.00 <sup>C</sup>
A-2	0.63 <sup>B</sup>	0.97 <sup>A</sup>	0.86 <sup>C</sup>	0.06 <sup>D</sup>	0.00 <sup>B</sup>	0.73 <sup>B</sup>	0.03 <sup>C</sup>	0.06 <sup>E</sup>	0.00 <sup>C</sup>
A-3	0.48 <sup>B</sup>	0.51 <sup>B</sup>	1.32 <sup>A</sup>	0.90 <sup>B</sup>	0.00 <sup>B</sup>	0.43 <sup>B</sup>	0.00 <sup>C</sup>	0.00 <sup>E</sup>	0.00 <sup>C</sup>
A-4	0.50 <sup>B</sup>	0.53 <sup>B</sup>	1.41 <sup>A</sup>	1.25 <sup>A</sup>	0.00 <sup>B</sup>	0.23 <sup>C</sup>	0.00 <sup>C</sup>	0.24 <sup>D</sup>	0.00 <sup>C</sup>
B-1	0.00 <sup>C</sup>	0.00 <sup>C</sup>	0.03 <sup>E</sup>	0.03 <sup>D</sup>	1.13 <sup>A</sup>	0.64 <sup>B</sup>	0.00 <sup>C</sup>	0.53 <sup>C</sup>	0.00 <sup>C</sup>
C-1	0.00 <sup>C</sup>	0.00 <sup>C</sup>	0.00 <sup>E</sup>	0.00 <sup>D</sup>	0.00 <sup>B</sup>	1.00 <sup>A</sup>	0.11 <sup>C</sup>	0.16 <sup>D</sup>	0.05 <sup>C</sup>
C-2	0.00 <sup>C</sup>	0.13 <sup>C</sup>	0.28 <sup>D</sup>	0.00 <sup>D</sup>	0.00 <sup>B</sup>	1.03 <sup>A</sup>	1.30 <sup>A</sup>	0.80 <sup>B</sup>	0.79 <sup>B</sup>
C-3	0.00 <sup>C</sup>	0.03 <sup>C</sup>	0.00 <sup>E</sup>	0.00 <sup>D</sup>	0.00 <sup>B</sup>	1.32 <sup>A</sup>	0.10 <sup>C</sup>	1.25 <sup>A</sup>	0.04 <sup>C</sup>
C-4	0.00 <sup>C</sup>	0.30 <sup>BC</sup>	0.33 <sup>D</sup>	0.00 <sup>D</sup>	0.00 <sup>B</sup>	0.96 <sup>A</sup>	0.68 <sup>B</sup>	0.41 <sup>C</sup>	1.35 <sup>A</sup>
Control	0.00 <sup>C</sup>	0.00 <sup>C</sup>	0.00 <sup>E</sup>	0.00 <sup>D</sup>	0.00 <sup>B</sup>	0.00 <sup>C</sup>	0.00 <sup>C</sup>	0.00 <sup>E</sup>	0.00 <sup>C</sup>

<sup>a</sup> Mean values within a column followed by different upper case superscripts differ at the 1% level of significance.



## **Capítulo V**

### **Virulence of the nine serovar reference strains of *Haemophilus paragallinarum***

**Soriano VE, Longinos GM, Fernández RP, Velásquez QE,  
Ciprián CA, Salazar-García F and PJ Blackall**

***Avian Diseases*, submitted for publication. 2004**

## RESEARCH NOTE

### Virulence of the nine serovar reference strains of *Haemophilus paragallinarum*

V. E. Soriano,<sup>A</sup> G. M. Longinos,<sup>A</sup> R. P. Fernández,<sup>A</sup> Q. E. Velásquez,<sup>A</sup> C. A. Ciprián,<sup>B</sup>  
F. Salazar-García<sup>A</sup> and P. J. Blackall<sup>C</sup>

<sup>A</sup>Centro de Investigación y Estudios Avanzados en Salud Animal, Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia, Universidad Autónoma del Estado de México, Toluca, 50000, México

<sup>B</sup>Facultad de Estudios Superiores – Cuautitlán, Universidad Nacional Autónoma de México, Cuautitlán Izcalli, 54704, México.

<sup>C</sup>Agency for Food and Fibre Sciences, Department of Primary Industries Queensland, Animal Research Institute, Yeerongpilly, 4105, Australia

#### SUMMARY

The virulence of the reference strains of the nine currently recognized Kume serovars of *Haemophilus paragallinarum* was investigated. The capacity of the *H. paragallinarum* strains to cause the typical clinical signs of upper respiratory disease associated with infectious coryza in unvaccinated, nasal-challenged chickens was assessed. Differences in virulence were assessed by means of a standardized scoring system for clinical signs. All nine strains were pathogenic to chickens, producing typical clinical signs of infectious coryza. The highest clinical signs score was obtained for serovar C-1 (1.725), while the lowest clinical signs score was obtained for serovar C-4 (0.325). Our results indicate that virulence differences exist among the serovars of *H. paragallinarum*.

## RESUMEN

Se investigó la virulencia de las cepas de referencia correspondientes a los nueve serovares de *Haemophilus paragallinarum* en el esquema de Kume actualmente reconocidos. La capacidad de las cepas de *H. paragallinarum* de causar signos clínicos típicos de enfermedad del tracto respiratorio superior asociados con coriza infecciosa en pollos no bacterinizados y desafiados por instilación nasal fue investigada. Las diferencias en la virulencia fueron determinadas por medio de un sistema de valores asignados a los signos clínicos. Las nueve cepas fueron patógenas para los pollos, produciendo signos clínicos típicos de coriza infecciosa. El valor más alto de signos fue observado en pollos inoculados con el serovar C-1 (1.175), mientras que el serovar C-4 mostró el valor más bajo (0.325). Nuestros resultados indican que existen diferencias en la virulencia de los serovares de *H. paragallinarum*.

Key words: *Haemophilus paragallinarum*, infectious coryza, serovars, pathogenicity, virulence.

Abbreviations: NAD = nicotinamide adenine dinucleotide; CFU = colony forming units.

## INTRODUCTION

*Haemophilus paragallinarum* is a NAD-dependent or -independent bacterium of the family *Pasteurellaceae* and is the etiological agent of infectious coryza, an upper respiratory tract infection affecting chickens of all ages. The disease, characterized by sneezing, nasal discharge, and facial swelling, causes major losses to the poultry industry, due to an increased culling rate in meat chickens and a reduction in egg production (10% - 40%) in laying and breeding hens, particularly in multiage farms (1).

To date, nine hemagglutinin serovars of *H. paragallinarum* have been identified worldwide, forming serovars A-1 to A-4, B-1, and C-1 to C-4 of the Kume scheme (2). However, within a geographical region a smaller number of serovars seems to dominate; for example, in Australia A-4, C-2, and C-4 (2,7) and in Mexico serovars A-1, A-2, B-1, and C-2 (14).

There have been few studies on the virulence of the different Kume serovars of *H. paragallinarum*. Bragg (4) investigated the virulence of South African field isolates belonging to serovars A-1, B-1, C-2, and C-3. The aim of the present study was to investigate the virulence of the reference strains for all the nine serovars of *H. paragallinarum*.

## MATERIALS AND METHODS

**Bacterial strains.** Reference strains 221, 2403, E-3C, HP14, 2671, H-18, Modesto, SA-3 and HP60 of *H. paragallinarum* were used (2). These reference strains were all obtained from the culture collection at the Animal Research Institute, Department of Primary Industries and Fisheries Queensland, Australia. The origin and source of strains used are shown in Table 1.

**Media.** Both brain-heart infusion broth and agar plates, supplemented with 1% (v/v) sodium chloride, 0.0025% (w/v) reduced NAD, and 1% (v/v) filter-sterilized, heat-inactivated horse serum were used for propagation and maintenance of bacterial cultures. Also, 10% blood sheep agar plates with *Staphylococcus epidermidis* as colony feeder were used.

**Chickens.** A total of 90, one-day-old, *Mycoplasma gallisepticum* and *M. synoviae* free, clinically healthy, ALPES Leghorn chickens that had not been vaccinated against infectious coryza were used in the study. Antibiotic-free feed and water were provided *ad libitum*. No chicken showed any respiratory sign before the challenge trial. All chickens showed no hemagglutination-inhibition antibodies to *H. paragallinarum* before being challenged (13).

**Challenge methods.** When the birds were 12 weeks of age, the nine control groups comprising ten chickens were challenged by nasal inoculation of 0.2 ml of an overnight broth culture of *H. paragallinarum* containing  $5 \times 10^8$  colony forming units (CFU)/ml of the relevant reference strain. Clinical signs of infectious coryza were recorded from the second to the fifth day post inoculation (p.i.). The presence and degree of any nasal discharge and facial swelling in the challenged chickens was scored according to following scale as previously reported (15): 0, no signs; 1, nasal discharge or slight facial swelling; 2, nasal discharge and moderate facial swelling; 3, abundant nasal discharge and severe facial swelling; and 4, as in 3, but including swelling of wattles. At seven days p.i., the chickens were euthanized and the presence of the challenge organism were investigated by swabbing both infraorbital sinuses with a sterile cotton swab subsequently streaked onto a blood agar plate that was cross-streaked with a nurse colony of *S. epidermidis*.

**Statistics.** The total clinical signs score for each group for each day was calculated as a means of estimating of the virulence of the serovar reference strains of *H. paragallinarum*. The mean daily clinical signs score was calculated by dividing the sum of the daily clinical signs score of all the chickens within a group by the total number of chickens in the group as reported by Bragg (4). Differences in the overall mean clinical signs scores between the nine serovars were analyzed by one-way ANOVA and the means compared by Bonferroni test for ordinal variables (10), considered significant at a probability of  $P < 0.05$ . Differences between the nine serovars in isolation (presence of the challenge strains in either sinus) and morbidity rates (percentage of birds that showed any clinical sign during the five day observation period) were compared by chi-square tests and considered significant at a probability of  $P < 0.05$ .

## RESULTS

Clinical signs of infectious coryza observed in the challenged chickens were easily scored. All nine reference strains promoted signs of infectious coryza. Differences in the clinical signs scores were recorded for each serovar (Table 2). Statistically significant differences were observed in the clinical signs score amongst the nine strains. Strain H-18

(serovar C-1) showed the highest clinical signs score while strain HP60 (serovar C-4) showed the lowest clinical signs score. The remaining strains showed a range of scores (Table 2). No statistically significant differences were observed in isolation or morbidity rates for the nine strains (Table 2).

## DISCUSSION

A pathogenic microorganism is regarded as a microorganism that has the capacity to cause damage in a host, while virulence is regarded as the relative capacity to cause damage in a host (6). Disease is a clinical outcome of host damage that occurs after a threshold amount of damage has occurred (6). For purposes of the present study, the variable amount of host damage caused by *H. paragallinarum* was assessed by the severity of the typical clinical signs of infectious coryza - nasal discharge, and facial and wattle swelling. Our results demonstrate that all nine serovar reference strains of *H. paragallinarum* are pathogenic to chickens (Table 2). Also, our results showed that all of these strains were able to colonize the infraorbital sinuses of chickens after nasal inoculation of the strain.

The clinical sign scores of the nine serovars of *H. paragallinarum* did vary between the serovars. The highest score was obtained for serovar C-1 (1.725), while the lowest score was obtained for serovar C-4 (0.325).

Serovar C-1 showed to be the highest virulent serovar among studied strains. Based on available studies, serovar C-1 is geographically restricted to Japan (9). In this country, commercial bivalent vaccines include serovars A-1 and C-1 are used (8). Specific-serovar protection conferred into vaccinated chickens prevents effects from *H. paragallinarum* infection (1). As there have been no reports of widespread vaccine failures in Japan, the use of the homologous C-1 vaccine appears to be effective in controlling coryza, despite the relative virulence of the serovar.

Serovar C-3 also had a high clinical sign score, 1.300 ( $P < 0.05$ ), which is in accordance with a previous study by Bragg (4), who found that a South African field isolate belonging to serovar C-3 produced the highest score (2.25) compared with field isolates of serovars A-1, B-1, and C-2. Kume serovar C-3 has only ever been reported in South Africa

and nearby Zimbabwe (2, 3, 9). The reference strain for serovar C-3 (SA-3) and the challenge strain used by Bragg (4) were all isolated in South Africa. As both our study and that of Bragg (4) found serovar C-3 to cause a relatively high clinical signs score, it may be possible that virulence is stable feature among isolates of a particular serovar obtained from a restricted geographical area.

In South Africa and Zimbabwe, where the widely used commercial coryza vaccines do not include serovar C-3, the incidence of isolates belonging to serovar C-3 has increased compared with the remaining serovars (3, 4). The finding of the high virulence of this serovar in two different studies using different strains could be an explanation for increased prevalence of this serovar in this geographical area as has been previously suggested by Bragg (4).

Some virulence factors have been identified in *H. paragallinarum*: hemagglutinins (18), capsule (12), haemocin production (17), secreted proteins (11), and NAD independence (5, 16). In the present study, all the bacterial cultures were NAD-dependent and known to have similar hemagglutinin activity (data not shown). Further work is needed to determine the specific effects of the different virulence factors in the pathogenesis of *H. paragallinarum* in chickens.

In conclusion, our results indicate that virulence differences do exist among serovars of *H. paragallinarum*.

## **ACKNOWLEDGEMENTS**

The technical assistance of Alberto Guadarrama and Germán Guadarrama is gratefully acknowledged. The critical review of the manuscript is gratefully acknowledged to Dr. Miki Bojesen, Department of Veterinary Microbiology, The Royal Veterinary and Agricultural University, Denmark.

## REFERENCES

1. Blackall, P. J., and M. Matsumoto. Infectious coryza. In: Diseases of poultry, 11th ed. Y. M. Saif, H. J. Barnes, J. R. Glisson, A. M. Fadly, L. R. McDougald, D. E. Swayne, eds. Iowa State Press, Ames, IA. pp. 691-703. 2003.
2. Blackall, P. J., L. E. Eaves, and D. G. Rogers. Proposal of a new serovar and altered nomenclature for *Haemophilus paragallinarum* in the Kume hemagglutinin scheme. *J. Clin. Microbiol.* 28:1185-1187. 1990.
3. Bragg, R. R. Isolation of serovar C-3 *Haemophilus paragallinarum* from Zimbabwe: a further indication of the need for the production of vaccines against infectious coryza containing local isolates of *H. paragallinarum*. *Onderstepoort J. Vet. Res.* 69:129-132. 2002.
4. Bragg, R. R. Virulence of South African isolates of *Haemophilus paragallinarum*. Part 1: NAD-dependent field isolates. *Onderstepoort J. Vet. Res.* 69:163-169. 2002.
5. Bragg, R. R. Virulence of South African isolates of *Haemophilus paragallinarum*. Part 2: Naturally occurring NAD-independent field isolates. *Onderstepoort J. Vet. Res.* 69:171-175. 2002.
6. Casadevall, A., and L. Pirofski. The damage-response framework of microbial pathogenesis. *Nat. Rev. Microbiol.* 1:17-24. 2003.
7. Eaves, L. E., D. G. Rogers, and P. J. Blackall. Comparison of hemagglutinin and agglutinin schemes for the serological classification of *Haemophilus paragallinarum* and proposal of a new hemagglutinin serovar. *J. Clin. Microbiol.* 27:1510-1513. 1989.
8. Kume, K., and A. Sawata. Factors of *Haemophilus paragallinarum* for infection and protection in chickens. *Proc. Western Poultry Dis. Conf.* pp. 53-60. 1990.
9. Kume, K., A. Sawata, T. Nakai, and M. Matsumoto. Serological classification of *Haemophilus paragallinarum* with a hemagglutinin system. *J. Clin. Microbiol.* 17:958-964. 1983.
10. Ludbrook, J. Multiple comparison procedures updated. *Clin. Exp. Pharmacol. Physiol.* 25:1032-1037. 1998.



11. Mena-Rojas, E., C. C. Cruz, S. P. Vaca, G. O. García, V. M. Pérez-Márquez, A. Pérez-Mendez, J. Ibarra-Caballero, M. de la Garza, E. Zenteno, and E. Negrete-Abascal. FEMS Microbiol. Lett. Antigenic secreted proteins from *Haemophilus paragallinarum*. A 110-kDa putative RTX protein. 232:83-87. 2004.
12. Sawata, A., T. Nakai, K. Kume, H. Yoshikawa, and T. Yoshikawa. Lesions induced in the respiratory tract of chickens by encapsulated or nonencapsulated variants of *Haemophilus paragallinarum*. Am. J. Vet. Res. 46:1185-1191. 1985.
13. Soriano, V.E., G.M. Longinos, G. Téllez, R.P. Fernández, F. Suárez-Güemes, and P.J. Blackall. Cross-protection study of the nine serovars of *Haemophilus paragallinarum* in the Kume hemagglutinin scheme. Avian Pathol. Submitted. 2004.
14. Soriano, V. E., P. J. Blackall, S. M. Dabo, G. Téllez, G. A. García-Delgado, and R. P. Fernández. Serotyping of *Haemophilus paragallinarum* isolates from Mexico by the Kume hemagglutinin scheme. Avian Dis. 45:680-683. 2001.
15. Soriano, V. E., R. P. Fernández, G. A. García-Delgado, G. P. Ochoa. Evaluación de dos protocolos de bacterinización de gallinas de postura, mediante detección de anticuerpos inhibidores de la hemoaglutinación y protección ante un desafío controlado con *Haemophilus paragallinarum*. Vet. Méx. 32:145-148. 2001.
16. Taole, M., J. Albertyn, E. Van Heerden, and R. R. Bragg. Virulence of South African isolates of *Haemophilus paragallinarum*. Part 3: experimentally produced NAD-independent isolate. Onderstepoort J. Vet. Res. 69:189-196. 2002.
17. Terry, T. D., Y. M. Zalucki, S. L. Walsh, P. J. Blackall, and M. P. Jennings. Genetic analysis of a plasmid encoding haemocin production in *Haemophilus paragallinarum*. Microbiol. 149:3177-3184. 2003.
18. Yamaguchi, T., M. Kobayashi, S. Masaki, and Y. Iritani. Isolation and characterization of a *Haemophilus paragallinarum* mutant that lacks a hemagglutinating antigen. Avian Dis. 37:970-976. 1993.

**Table 1.** Designations, serovars and origins of *Haemophilus paragallinarum* strains used in the present study.

Strain	Serovar	Origin	Reference
221	A-1	Japan	9
2403	A-2	Germany	9
E-3C	A-3	Brazil	9
HP14	A-4	Australia	7
2671	B-1	Germany	9
H-18	C-1	Japan	9
Modesto	C-2	USA	9
SA-3	C-3	South Africa	9
HP60	C-4	Australia	2

**Table 2.** Clinical sign scores, morbidity and isolation rates in chickens challenged with nine serovars of *Haemophilus paragallinarum*.

Mean of score at postchallenge day:	Challenge with <i>H. paragallinarum</i> of serovar								
	A-1	A-2	A-3	A-4	B-1	C-1	C-2	C-3	C-4
2	0.8	0.4	1.0	0.9	0.7	0.7	0.9	0.5	0.2
3	0.6	0.2	0.5	0.8	0.4	1.6	0.9	0.8	0.2
4	1.9	0.7	1.1	1.9	0.6	2.2	1.5	1.5	0.4
5	2.4	0.6	1.0	1.9	1.6	2.4	1.6	2.4	0.5
Total mean	1.42 <sup>ab</sup>	0.47 <sup>cd</sup>	0.90 <sup>bcd</sup>	1.37 <sup>ab</sup>	0.82 <sup>bcd</sup>	1.72 <sup>a</sup>	1.22 <sup>abc</sup>	1.30 <sup>ab</sup>	0.32 <sup>d</sup>
±	±	±	±	±	±	±	±	±	±
standard deviation <sup>A</sup>	1.43	0.75	0.95	1.08	1.17	1.54	0.99	1.42	0.52
Morbidity (%) <sup>A</sup>	100 <sup>a</sup>	70 <sup>a</sup>	100 <sup>a</sup>	100 <sup>a</sup>	80 <sup>a</sup>	100 <sup>a</sup>	100 <sup>a</sup>	80 <sup>a</sup>	70 <sup>a</sup>
Isolation (%) <sup>A</sup>	100 <sup>a</sup>	80 <sup>a</sup>	90 <sup>a</sup>	90 <sup>a</sup>	80 <sup>a</sup>	90 <sup>a</sup>	80 <sup>a</sup>	80 <sup>a</sup>	70 <sup>a</sup>

<sup>A</sup>Groups with different superscript in the same row are significantly different ( $P > 0.05$ ).

## **Capítulo VI**

### **Typing of *Haemophilus paragallinarum* strains by using enterobacterial repetitive intergenic consensus-based polymerase chain reaction**

**Soriano VE, Téllez G, Hargis BM, Newberry L,  
Salgado-Miranda C and JC Vázquez**

***Avian Diseases*, submitted for publication. 2004**

## RESEARCH NOTE

# Typing of *Haemophilus paragallinarum* strains by using enterobacterial repetitive intergenic consensus-based polymerase chain reaction

V. E. Soriano,<sup>A</sup> G. Téllez,<sup>B</sup> B. M. Hargis,<sup>B</sup> L. Newberry,<sup>B</sup> C. Salgado-Miranda,<sup>A</sup>  
and J. C. Vázquez,<sup>A</sup>

<sup>A</sup>Centro de Investigación y Estudios Avanzados en Salud Animal, Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia, Universidad Autónoma del Estado de México, Toluca, 50000, México

<sup>B</sup>John Kirkpatrick Skeeles Poultry Health Research Laboratory, The Center of Excellence in Poultry Science, Division of Agriculture, University of Arkansas, Fayetteville, 72701, Arkansas

## SUMMARY

The enterobacterial repetitive intergenic consensus polymerase chain reaction (ERIC-PCR) technique was used for fingerprinting of reference strains and Mexican isolates of *Haemophilus paragallinarum*. A total of nine ERIC patterns were given by the nine serovar reference strains of this bacteria. Two Modesto (C-2) reference strains from different sources showed the same ERIC pattern. A total of 17 ERIC patterns were obtained among 29 Mexican isolates included in the study, belonging to serovars prevalent in Mexico (A-1, A-2, B-1, and C-2). Obtained results indicate that ERIC-PCR technique could be used as a molecular laboratory tool for subtyping of *H. paragallinarum*.

## RESUMEN

Tipificación de cepas de *Haemophilus paragallinarum* mediante reacción en cadena de la polimerasa del consenso intergénico repetitivo de entrobacterias.

La reacción en cadena por la polimerasa del consenso intergénico repetitivo de entrobacterias fue empleada para la tipificación de cepas de referencia y aislamientos de *Haemophilus paragallinarum* de México. Un total de nueve patrones ERIC fueron obtenidos de las nueve cepas de referencia de serovar de esta bacteria. Dos cepas Modesto (C-2) procedentes de diferente fuente mostraron el mismo patrón ERIC. Un total de 17 patrones ERIC fueron obtenidos en 29 aislamientos incluidos en el estudio, pertenecientes a los serovares prevalentes en México (A-1, A-2, B-1, C-2). Los resultados obtenidos indican que el ERIC-PCR puede ser una herramienta molecular de laboratorio para la tipificación de *H. paragallinarum*.

Key words: *Haemophilus paragallinarum*, ERIC-PCR, fingerprinting, typing.

## INTRODUCTION

*Haemophilus paragallinarum* is the causative agent of infectious coryza of chickens (3). The greatest economic losses result from poor growth performance in growing and marked reduction (10-40%) in egg production. The disease can have significant impact in meat chickens (3).

Serology has, so far, been the main typing method for *H. paragallinarum* (2). The Page scheme (12) was initially developed by using either a plate or a slide agglutination test to recognize the three serovars A, B, and C. An alternative serologic subtyping scheme – the Kume scheme –, is based on hemagglutination-inhibition tests, recognizes nine serovars termed A-1, A-2, A-3, A-4, B-1, C-1, C-2, C-3, and C-4 (6).

DNA typing methods offer an alternative approach. DNA fingerprinting of *H. paragallinarum* has been carried out by restriction endonuclease analysis (4, 5), ribotyping

(10), and multilocus enzyme electrophoresis (7). Also, enterobacterial repetitive intergenic consensus polymerase chain reaction (ERIC-PCR) technique, has been shown to be useful for typing *H. paragallinarum* strains (9). ERIC sequences are highly conserved, but their chromosomal locations differ between species or strains, being successfully used for molecular typing purposes of other members of the genus *Haemophilus* as *H. somnus* (1), *H. influenzae* (8), and *H. parasuis* (11, 13).

The present study was undertaken for the fingerprinting of reference strains and Mexican isolates of *H. paragallinarum* by using ERIC-PCR.

## MATERIALS AND METHODS

**Bacterial strains.** The nine reference serovar strains of *H. paragallinarum* of the modified Kume scheme (6) used were 221 (A-1), 2403 (A-2), E-3C (A-3), HP14 (A-4), 2671 (B-1), H-18 (C-1), Modesto (C-2), SA-3 (C-3), and HP60 (C-4). These reference strains were all sourced from the culture collection held at the Animal Research Institute. Furthermore, Page reference strains 0083 (A-1), 0222 (B-1), and Modesto (C-2), kindly provided by Dr. Richard Yamamoto, Department of Population Health and Reproduction, School of Veterinary Medicine, University of California, Davis, CA 95616, were included. A total of 29 Mexican field isolates of *H. paragallinarum* were included. All the Mexican field isolates were sourced from the culture collection held at the Centro de Investigación y Estudios Avanzados en Salud Animal, FMVZ-UAEM. Details of the clinical history of isolates are unknown. The designation and origin of strains used are shown in Table 1. All of these field isolates had been serotyped by the Kume scheme as previously reported (15).

**Media.** Bacteria were cultivated on 10% sheep blood agar at 37 C in a microaerobic atmosphere. Brain-heart infusion broth supplemented with 25 µg/ml of nicotinamide adenine dinucleotide (NAD, SIGMA) and 1% (v/v) filter-sterilized, heat-inactivated horse serum was used for propagation and maintenance of bacterial cultures.

**DNA preparation.** A modification of a previously described crude colony preparation method (13) was used to prepare DNA for examination by ERIC-PCR. Briefly, bacteria grown in supplemented brain-heart infusion broth overnight were adjusted to 5 ×

10<sup>8</sup> colony-forming units/ml. Bacteria were collected by centrifugation and washed twice with phosphate buffered saline (pH 7.2). Three cycles of heating at 98 C (for 5 minutes) and cooling on ice (for 2 minutes) of a 0.5 ml volume of bacterial suspension were performed. A thermocycler was used for heating of samples at 98 C. The samples were centrifuged for 5 minutes at 12,000 g and immediately placed on ice. The supernant was used as source of template DNA for PCR (13).

**ERIC-PCR amplification.** The primers used were ERIC-1R (5'-ATGTAAGCTCCTGGGGATTAC-3') and ERIC-2 (5'-AAGTAAGTGACTGGGGTGAGCG-3') (16). The reaction mixture (50 µl) contained 10 mM Tris-HCl (pH 8.4), 50 mM KCl, 3 mM MgCl<sub>2</sub>, 0.2 mM of each deoxynucleoside triphosphate, 0.5 U of *Taq* DNA polymerase (Invitrogen, USA), and 4 µl of DNA sample. The PCR was initiated with a 5 minutes denaturation period at 94 C, followed by 35 cycles of denaturation (1 minute at 94 C), annealing (1 minute at 52 C), and enzymatic chain extension (6 minutes at 74 C) with a final extension at 74 C for 6 minutes. The amplified products were electrophoresed in 1% agarose gel at 80 V for 1 h in Tris-Borate-EDTA buffer containing ethidium bromide (0.5 µg/ml), and the amplimers were visualized and photographed under UV light. Whenever a distinct ERIC profile, in terms of the number and position of the clearly visible bands was observed, the corresponding strain was given a unique number designation (13).

## RESULTS

All 11 serovar reference strains of *H. paragallinarum* gave a unique ERIC fingerprint (Figure 1). The fingerprints were reproducible and stable on repeated tests. The two Modesto (C-2) reference strains which had been obtained from the two different sources gave the identical ERIC fingerprint.

A total of 17 distinguishable ERIC patterns were produced for the 29 isolates of *H. paragallinarum*: six by ten isolates serovar A-1 and one isolate A-2 (Figure 2), eight by thirteen isolates serovar B-1 (Figure 3), and three by five isolates serovar C-2 (Figure 4). Some isolates showed share the same pattern and were given the same designation number.



## DISCUSSION

ERIC-PCR produced clear and reproducible fingerprint patterns for all the *H. paragallinarum* isolates and reference strains we examine. Similar reports of reproducibility and clarity have been reported in the earlier studies of ERIC-PCR patterns of *H. paragallinarum* (9, 14). A difference between our results and the earlier study of Khan *et al.* (9) is that when examining the nine Kume serovar reference strains of this bacterium, Khan *et al.* (9) found that the two Australian reference strains HP14 and HP60 shared the same pattern. In contrast, we found that a minor, but reproducible, difference in banding patterns distinguished the two Australian Kume serovar reference strains (lanes E and J of figure 1). It is possible that the small differences we have detected were not visible under the conditions used by Khan *et al.* (9).

ERIC patterns shared by some isolates sourced from the same state of Mexico can be regarded as a clonal relationship. However, same ERIC patterns from isolates of different state were obtained. Further studies including a greater number of isolates from different poultry areas will be carried out to clarify this situation. It appear to be first molecular study of *H. paragallinarum* isolates from Mexico.

ERIC-PCR-based fingerprinting is simple and rapid and can be performed with very small quantities of bacterial cultures. Reproducibility was excellent, although some day-to-day variation in the intensity of amplified fragments was observed, particularly the minor bands.

In conclusion, ERIC-PCR technique could be used for further subtyping of *H. paragallinarum*. This technique will be used in future epidemiologic studies of both related and unrelated outbreaks of infectious coryza in Mexico.

## ACKNOWLEDGEMENTS

The present research work forms part of Ph. D. studies of senior author at the Universidad Nacional Autónoma de México. The technical assistance of Stacy Higgins

(JKS Poultry Health Research Laboratory, University of Arkansas) is gratefully acknowledged. The assistance of Dr. Blackall (Animal Research Institute, Yeerongpilly, Australia) in providing the Kume serovar reference strains and for a critical review of this manuscript is also gratefully acknowledged.

## REFERENCES

1. Appuhamy, S., R. Parton, J. G. Coote, and H. A. Gibbs. Genomic fingerprinting of *Haemophilus somnus* by a combination of PCR methods. *J. Clin. Microbiol.* 35:288-291. 1997.
2. Blackall, P. J. Infectious coryza: overview of the disease and new diagnostic options. *Clin. Microbiol. Rev.* 12:627-632. 1999
3. Blackall, P. J., and M. Matsumoto. Infectious coryza. In: *Diseases of poultry*, 11th ed. Y. M. Saif, H. J. Barnes, J. R. Glisson, A. M. Fadly, L. R. McDougald, D. E. Swayne, eds. Iowa State Press, Ames, IA. pp. 691-703. 2003.
4. Blackall, P. J., C. J. Morrow, A. McInnes, L. E. Eaves, and D. G. Rogers. Epidemiologic studies on infectious coryza outbreaks in northern New South Wales, Australia, using serotyping, biotyping, and chromosomal DNA restriction endonuclease analysis. *Avian Dis.* 34:267-276. 1990.
5. Blackall, P. J., L. E. Eaves, and C. J. Morrow. Comparison of *Haemophilus paragallinarum* isolates by restriction endonuclease analysis of chromosomal DNA. *Vet. Microbiol.* 27:39-47. 1991.
6. Blackall, P. J., L. E. Eaves, and D. G. Rogers. Proposal of a new serovar and altered nomenclature for *Haemophilus paragallinarum* in the Kume hemagglutinin scheme. *J. Clin. Microbiol.* 28:1185-1187. 1990.
7. Bowles, R., P. J. Blackall, H. R. Terzolo, and V. E. Sandoval. An assessment of the genetic diversity of Australian and overseas isolates of *Haemophilus paragallinarum* by multilocus enzyme electrophoresis. *Proc. Xth World Vet. Poult. Assoc. Congress.* p. 148. 1993.

8. Gomez-de-Leon, P., J. J. Santos, J. Caballero, D. Gomez, L. E. Espinoza, I. Moreno, D. Piñero, and A. Cravioto. Genomic variability of *Haemophilus influenzae* isolated from Mexican children determined by using enterobacterial repetitive intergenic consensus sequences and PCR. *J. Clin. Microbiol.* 38:2504-2511. 2000.
9. Khan, M., X. Chen, and P. J. Blackall. Differentiation of *Haemophilus paragallinarum* isolates using ERIC-PCR analysis. *Proc. 47th Western Poultry Dis. Conf.* pp.8-9. 1998.
10. Miflin, J. K., X. Chen, and P. J. Blackall. Molecular characterization of isolates of *Haemophilus paragallinarum* from China by ribotyping. *Avian Pathol.* 27:119-127. 1997.
11. Oliveira, S., P. J. Blackall, and C. Pijoan. Characterization of the diversity of *Haemophilus parasuis* field isolates by use of serotyping and genotyping. *Am. J. Vet. Res.* 64:435-442. 2003.
12. Page, L. A. *Haemophilus* infections in chickens. I. Characteristics of 12 *Haemophilus* isolates recovered from diseased chickens. *Am. J. Vet. Res.* 23:85-95. 1962.
13. Rafiee, M., M. Bara, C. P. Stephens, and P. J. Blackall. Application of ERIC-PCR for the comparison of isolates of *Haemophilus parasuis*. *Aust. Vet. J.* 78:846-849. 2000.
14. Soriano, V. E., G. M. Longinos, and R. P. Fernández. Aislamiento y caracterización de *Ornithobacterium rhinotracheale* obtenido de pavos con enfermedad respiratoria. *Vet. Méx.* 34:283-288. 2003.
15. Soriano, V. E., P. J. Blackall, S. M. Dabo, G. Téllez, G. A. García-Delgado, and R. P. Fernández. Serotyping of *Haemophilus paragallinarum* isolates from Mexico by the Kume hemagglutinin scheme. *Avian Dis.* 45:680-683. 2001.
16. Versalovic, J., T. Koeuth, and J. R. Lupski. Distribution of repetitive DNA sequences in eubacteria and application to fingerprinting of bacterial genomes. *Nucleic Acids Res.* 19:6823-6831. 1991.

**Table 1.** Designations, origins, serovars and ERIC patterns of *Haemophilus paragallinarum* strains used in the present study.

<b>Strain</b>	<b>Origin</b>	<b>Serovar</b>	<b>ERIC pattern</b>
221	Japan	A-1	1
2403	Germany	A-2	2
E-3C	Brazil	A-3	3
HP14	Australia	A-4	4
B-1	Germany	B-1	5
H-18	Japan	C-1	6
Modesto	United States	C-2	7
SA-3	South Africa	C-3	8
HP60	Australia	C-4	9
0083	United States	A-1	10
0222	United States	B-1	11
Modesto	United States	C-2	7
HPG18	Jalisco	A-1	12
HPG25	Jalisco	A-1	13
HPG26	Mexico	A-1	14
HPG28	Mexico	A-1	14
HPG34	Mexico	A-1	12
HPG56	Morelos	A-1	14
HPG57	Morelos	A-1	15
HPG59	Morelos	A-1	14
HPG76	Morelos	A-1	16
HPG77	Morelos	A-1	17
HPG14	Michoacan	A-2	12
HPG6	Jalisco	B-1	18
HPG7	Jalisco	B-1	19

---

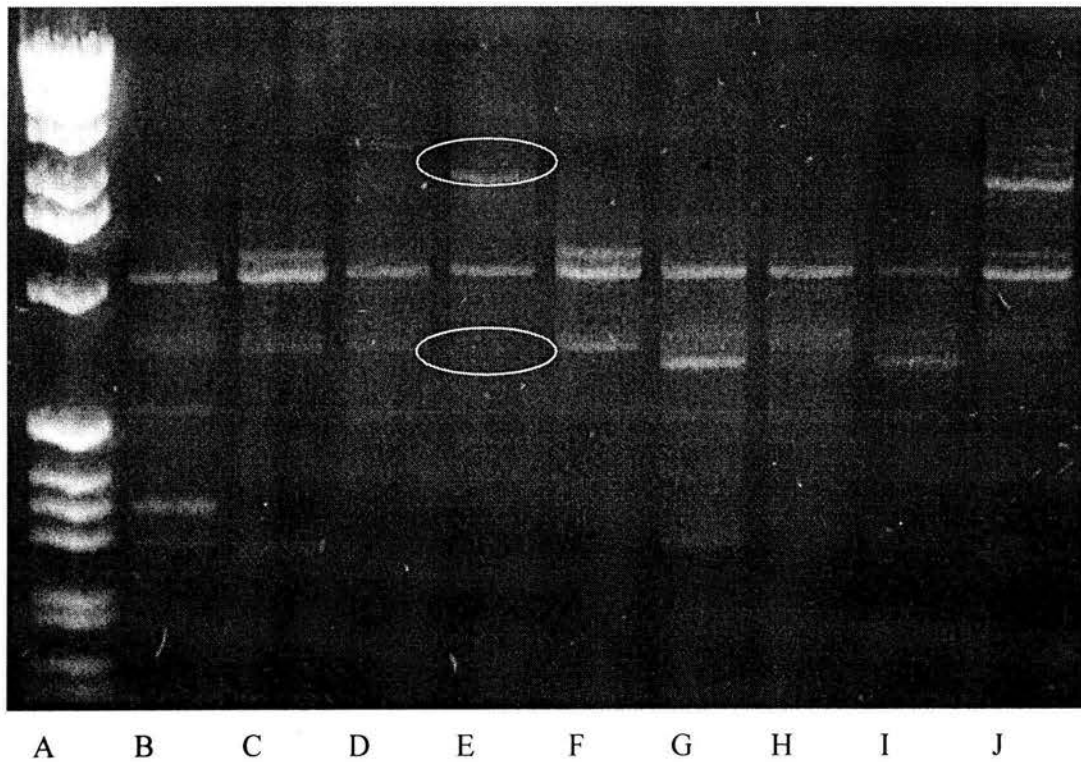
Continued...

---

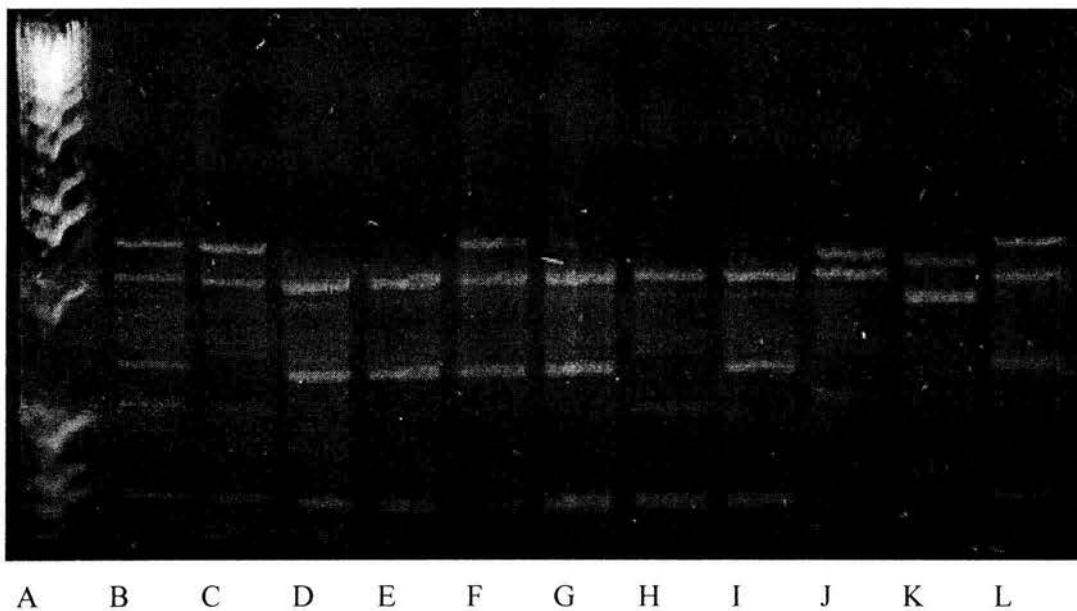
HPG9	Jalisco	B-1	20
HPG10	Jalisco	B-1	21
HPG11	Jalisco	B-1	22
HPG17	Puebla	B-1	23
HPG23	Puebla	B-1	19
HPG32	Puebla	B-1	19
HPG33	Puebla	B-1	19
HPG46	Sonora	B-1	24
HPG50	Sonora	B-1	20
HPG70	Yucatan	B-1	25
HPG71	Yucatan	B-1	25
HPG29	Jalisco	C-2	26
HPG30	Jalisco	C-2	26
HPG35	Jalisco	C-2	27
HPG36	Puebla	C-2	26
HPG42	Morelos	C-2	28

---

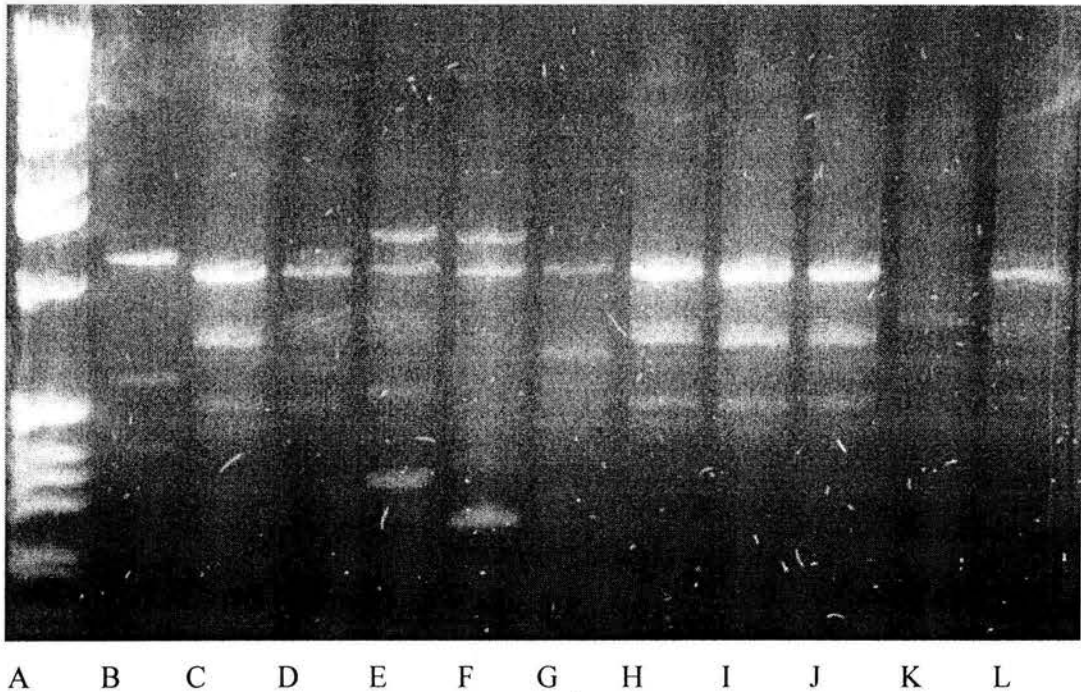
**Figure 1.** ERIC-PCR fingerprints of the nine Kume serovar reference strains of *Haemophilus paragallinarum* included in the study. Lane A – 1 kb ladder. Lane B – 221 (serovar A-1), lane C – 2403 (serovar A-2), lane D – E-3C (serovar A-3), lane E – HP14 (serovar A-4), lane F – 2671 (serovar B-1), lane G – H-18 (serovar C-1), lane H – Modesto (serovar C-2), lane I – SA-3 (serovar C-3), and lane J – HP60 (serovar C-4).



**Figure 2.** ERIC-PCR fingerprints of *Haemophilus paragallinarum* isolates of serovars A-1 and A-2 included in the study. All isolates were Kume serovar A-1 except HPG14 which was Kume serovar A-2. Lane A – 1 kb ladder. Lane B – HPG18 (pattern 12), lane C – HPG25 (pattern 13), lane D – HPG26 (pattern 14), lane E – HPG28 (pattern 14), lane F – HPG34 (pattern 12), lane G – HPG56 (pattern 14), lane H – HPG57 (pattern 15), lane I – HPG59 (pattern 14), lane J – HPG76 (pattern 16), lane K – HPG77 (pattern 17), and lane L – HPG14 (pattern 12).

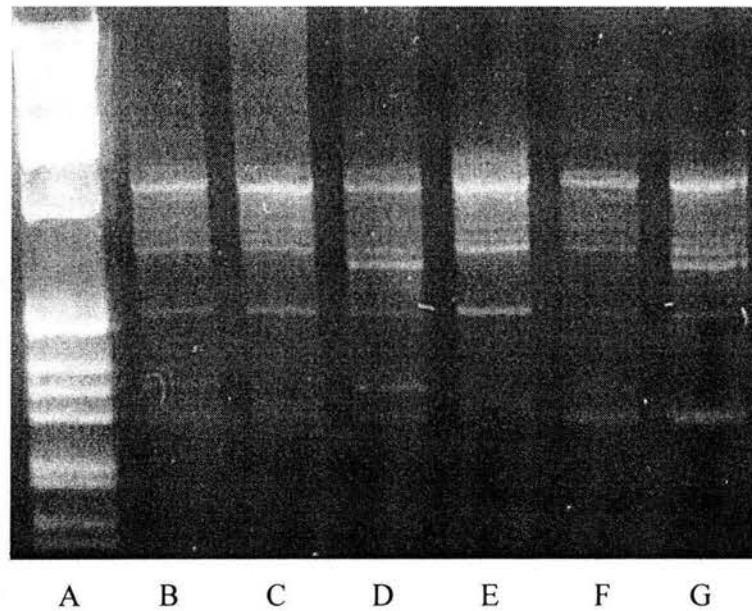


**Figure 3.** ERIC-PCR fingerprints of *Haemophilus paragallinarum* isolates of serovar B-1 included in the study. Lane A – 1 kb ladder. Lane B – HPG6 (pattern 18), lane C – HPG7 (pattern 19), lane D – HPG9 (pattern 20), lane E – HPG10 (pattern 21), lane F – HPG11 (pattern 22), lane G – HPG17 (pattern 23), lane H – HPG23 (pattern 19), lane I – HPG32 (pattern 19), lane J – HPG33 (pattern 19), lane K – HPG46 (pattern 24), and lane L – HPG50 (pattern 20).





**Figure 4.** ERIC-PCR fingerprints of *Haemophilus paragallinarum* reference strain and isolates of serovar C-2 included in the study. Lane A – 1 kb ladder. Lane B – HPG29 (pattern 26), lane C – HPG30 (pattern 26), lane D – HPG35 (pattern 27), lane E – HPG36 (pattern 26), lane F – HPG42 (pattern 28), and lane G – Modesto (pattern 7).



## **Capítulo VII**

### **Discusión General**

## Discusión General

Las cepas de *H. paragallinarum*, tanto dependientes como independientes de NAD, son consideradas agentes causales de coriza infecciosa (Blackall y Matsumoto, 2003). En el presente trabajo de investigación, las cepas de referencia y aislamientos de esta bacteria incluidos en los estudios antes descritos, mostraron dependencia de este factor de crecimiento. Aunque existen reportes en México del aislamiento de cepas de *H. paragallinarum* independientes de NAD (García *et al.*, 1998; 2002), no han sido identificadas cepas de este tipo en el CIESA-FMVZ-UAEM.

La caracterización serológica de aislamientos de *H. paragallinarum* con base en el esquema de Blackall es importante para determinar las serovariedades presentes en un área geográfica determinada, principalmente en zonas avícolas densamente pobladas (Blackall y Matsumoto, 2003). La identificación de las serovariedades presentes en estas áreas puede explicar, en cierta medida, los brotes de coriza infecciosa observados en parvadas inmunizadas contra esta enfermedad, como es el caso de Sudáfrica, donde se ha observado un incremento en la frecuencia de aislamiento de *H. paragallinarum* de la serovariedad C-3, la cual no es incluida en las bacterinas comerciales empleadas para prevenir esta enfermedad en ese país (Bragg *et al.*, 1996). En aislamientos de Zimbabwe fue identificada la serovariedad C-3, siendo el informe más reciente de serotipificación de *H. paragallinarum* (Bragg, 2002a). Sin embargo, la clasificación de estos aislamientos se llevó a cabo mediante el uso de un antisuero producido a partir de un aislamiento Sudafricano previamente serotipificado como C-3. En México, han sido identificadas las serovariedades A-1, A-2, B-1 y C-2. Al parecer, el CIESA-FMVZ-UAEM, es la única institución al nivel mundial que realiza la serotipificación de *H. paragallinarum* con base en el esquema completo de Blackall (Soriano *et al.*, 2001a).

Los resultados obtenidos de la caracterización inmunogénica de *H. paragallinarum* confirmaron la existencia de tres inmunovariedades (Blackall, 1999). De forma similar a los trabajos originales de Rimler *et al.* (1977a; 1977b), los estudios del presente trabajo de investigación fueron basados en la inmunización y desafío de pollos. Sin embargo, los estudios serológicos de estas aves, por medio de la prueba de inhibición de la

hemoaglutinación, también confirmaron la existencia de las tres inmunovarietades de esta bacteria. Actualmente considera que no existe protección cruzada entre los serogrupos de Blackall, pero sí entre las serovarietades de un serogrupo en particular (Blackall, 1999). De acuerdo con los resultados obtenidos en la caracterización inmunogénica realizada en este estudio, esta afirmación debe ser reconsiderada. Los únicos casos donde se observa protección cruzada en aves inmunizadas y desafiadas con una serovarietad, es en las aves inmunizadas con las serovarietades A-1, A-2, A-3 o A-4 y desafiadas con las serovarietades A-1 y A-3. Por otra parte, aves inmunizadas con la serovarietad C-4 estuvieron protegidas al desafío con la serovarietad B-1. Así, aún cuando se reconocen tres inmunovarietades, será de gran importancia establecer la protección cruzada en *H. paragallinarum* tomando en cuenta las serovarietades de interés.

Blackall y Matsumoto (2003) mencionan que las bacterinas inactivadas contra la coriza infecciosa confieren protección únicamente contra la serovarietad de Page incluida en estos productos, por lo que enfatizan que es vital que estas bacterinas contengan la serovarietad de Page presente en una determinada población. Con base en los resultados obtenidos en el presente estudio, es posible que una bacterina elaborada a partir de las serovarietades de Blackall presentes en una determinada región confieran mejor protección contra brotes de coriza infecciosa ocasionados por estas serovarietades. En este sentido, los resultados del presente estudio sugieren que una bacterina bivalente, que incluye las serovarietades A-1 y C-1, no confiere protección contra cepas de la serovarietad B-1. Las bacterinas comerciales de este tipo son de origen japonés (Kume y Sawata, 1990), debido a que son las serovarietades identificadas en ese país. Sin embargo, estas bacterinas son empleadas en muchas partes del mundo donde la serovarietad B-1 está presente, como es el caso de México (Soriano *et al.*, 2001b). Jacobs *et al.* (1992) mostraron que una bacterina bivalente en comparación con una bacterina trivalente, no confirió protección en pollos inmunizados y desafiados con una cepa de la serovarietad B de Page. Recientemente, evaluamos la protección conferida por una bacterina bivalente y otra trivalente, las cuales incluyeron las cepas de referencia de las serovarietades A-1 y C-1 y A-1, B-1 y C-2, respectivamente (Fernández *et al.*, 2003). El desafío de las aves inmunizadas con estas bacterinas se llevó a cabo con aislamientos de México de las serovarietades presentes: A-1,

A-2, B-1 y C-2. Los resultados mostraron que las aves inmunizadas con la bacterina bivalente no estuvieron protegidas contra el aislamiento B-1 (30%), ni mostraron títulos de anticuerpos inhibidores de la hemoaglutinación contra esta serovariedad.

Debido a que las empresas transnacionales elaboran lotes de bacterina contra la coriza infecciosa, los cuales posteriormente son distribuidos a muchas partes del mundo, el incluir las serovariedades presentes en una región puede resultar poco práctico. Con base en los resultados obtenidos en el presente estudio y considerando la distribución global de las serovariedades de Blackall, es posible que una bacterina comercial elaborada a partir de las serovariedades A-1, B-1 y C-2 confiera protección contra la coriza infecciosa en la mayoría de las regiones avícolas. En el caso de la región de Sudáfrica, es necesaria la inclusión de la serovariedad C-3, como lo menciona también Bragg (2002a). Sin embargo, también es posible que la mejor protección contra la coriza infecciosa en una determinada zona avícola, sea conferida por bacterinas que incluyan aislamientos de las serovariedades enzoóticas, como lo sugieren también Terzolo *et al.* (1997) y Bragg (2002a). Por ejemplo, en México la distribución de las serovariedades de Blackall es la siguiente: Jalisco, A-1, A-2, B-1 y C-2; México, A-1 y A-2; Michoacán, A-2; Morelos, A-1 y C-2; Puebla, B-1 y C-2; y Sonora y Yucatán, B-1 (Soriano *et al.*, 2001a). Tomando en cuenta esta distribución, en algunos estados podrían ser empleadas bacterinas bivalentes, mientras que en otros podrían ser empleadas trivalentes. Se requieren estudios de serotipificación que incluyan un mayor número de aislamientos procedentes de estos estados. Por el momento, el uso de bacterinas trivalentes en todo el territorio nacional, podrían proteger contra brotes de coriza infecciosa ocasionados por las serovariedades presentes.

Los resultados obtenidos en el presente trabajo de investigación, mostraron que existen diferencias en la virulencia entre las serovariedades de *H. paragallinarum*. De forma similar, Bragg (2002b) estudió la virulencia de aislamientos de las serovariedades A-1, B-1, C-2 y C-3 obtenidos en Sudáfrica. Los resultados mostraron que el aislamiento C-3 fue el más virulento, seguido por los aislamientos C-2, A-1 y B-1. El autor menciona que el incremento en la frecuencia de aislamiento de la serovariedad C-3, se debe, además de que no es incluida en las bacterinas usadas en ese país, a la alta virulencia de esta serovariedad. En el presente estudio, la virulencia más alta en las cepas de referencia se registró para las

serovariedades C-1, A-1, A-4, C-3 y C-2. Cabe mencionar que la cepa de referencia SA-3 (C-3) procede originalmente de Sudáfrica (Kume *et al.*, 1983). Por otra parte, la cepa HP60 (C-4) mostró la virulencia más baja. Blackall (1991) evaluó bacterinas monovalentes elaboradas a partir de las serovariedades C-2 y C-4. El autor registró el porcentaje de morbilidad pero no valoró el grado de virulencia. No obstante, sugiere que el aislamiento C-2 fue más virulento que el aislamiento C-4. Se desconoce si la virulencia es una característica relacionada con la serovariedad. Sin embargo, con base en los resultados de los estudios de Blackall (1991) y Bragg (2002b), los autores sugieren que las fallas en la protección registradas en aves inmunizadas y desafiadas de manera homóloga y heteróloga, puedan ser debidas a la alta virulencia de los microorganismos empleados en el desafío. En el presente estudio, la baja protección cruzada registrada entre las serovariedades, principalmente del serogrupo C, es probable que esté influenciada por la virulencia de las serovariedades C-1, C-2 y C-3, principalmente. Estudios similares que evalúen la virulencia de aislamientos seleccionados procedentes de una determinada zona avícola e incluidos en pruebas de desafío de bacterinas empleadas en la misma zona son requeridos.

La caracterización genómica de cepas de referencia y aislamientos de *H. paragallinarum* mediante la técnica de ERIC-PCR, indican que existe diversidad genómica en esta bacteria. Cada una de las cepas de referencia mostró un patrón ERIC. La cepa Modesto de la serovariedad C de Page (facilitada por el Dr. Rick Yamamoto, UC-Davis, E.U.A.) y la cepa Modesto de la serovariedad C-2 de Blackall, mostraron el mismo patrón ERIC. Esto indica que se trata del mismo microorganismo, independientemente de la procedencia. Resultados similares fueron obtenidos por Khan *et al.* (1998), quienes incluyeron cepas de referencia y aislamientos procedentes de varias partes del mundo. A diferencia del presente estudio, mencionan que las cepas australianas de las serovariedades A-4 y C-4 mostraron el mismo patrón ERIC. Se desconoce la razón de estas diferencias en los resultados obtenidos en ambos estudios. En el presente trabajo, fueron identificados un total de 17 patrones ERIC entre los aislamientos de *H. paragallinarum* procedentes de varios estados de la República Mexicana. En algunos casos, aislamientos procedentes de un mismo estado y de la misma serovariedad, mostraron el mismo patrón ERIC. Estos resultados sugieren que estos aislamientos puedan representar clones. Sin embargo, se

requieren otros estudios moleculares para confirmar esta hipótesis. Por otra parte, en la mayoría de los casos, no se cuenta con la historia clínica de los aislamientos incluidos en este estudio. No obstante, las características de esta técnica basada en el PCR, como son rapidez y uso práctico, junto con el empleo de los iniciadores ERIC, que permiten discriminar entre aislamientos de una misma especie, hacen que sea de gran valor en la caracterización genómica de éste y otros microorganismos que afectan el tracto respiratorio de las aves, por ejemplo: *Ornithobacterium rhinotracheale* (Soriano *et al.*, 2003). Estudios epizootiológicos de la coriza infecciosa, que incluyan historia clínica y serotipificación de aislamientos con base en el esquema de Blackall, además de la técnica de ERIC-PCR, permitirán establecer estrategias más eficaces de prevención y control de esta enfermedad.

Del trabajo en la presente tesis se puede concluir lo siguiente:

- El esquema de Blackall, actualmente reconoce en *H. paragallinarum* tres serogrupos A, B y C, que incluyen nueve serovariedades distribuidas de la siguiente manera: A-1, A-2, A-3, A-4; B-1; C-1, C-2, C-3 y C-4.
- Los serogrupos del esquema de Blackall representan tres inmunovariedades (A, B y C).
- No existe protección cruzada entre serovariedades de diferente serogrupo (excepto aves inmunizadas con C-4 y desafiadas con B-1).
- La protección cruzada en *H. paragallinarum* debe ser considerada en función de las serovariedades de interés.
- Existen diferencias en la virulencia de las cepas de referencia que representan las nueve serovariedades de *H. paragallinarum*.
- Existe diversidad genómica en *H. paragallinarum*.
- Pueden ser clones algunos aislamientos de *H. paragallinarum* procedentes de un mismo estado y de una misma serovariedad.
- Estudios de brotes de coriza infecciosa que incluyan historia clínica, clasificación serológica de aislamientos con base en el esquema de Blackall y la técnica de ERIC-PCR, permitirán establecer estrategias más eficaces para la prevención y control de esta enfermedad.

## Referencias

- 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 Rev* 1999; 12:627-632
- 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* 1990; 28:1185-1187.
- Blackall PJ, Matsumoto M. Infectious Coryza. In: Saif YM, Barnes HJ, Glisson JR, Fadly AM, McDougald LR, Swayne DE, editors. *Diseases of Poultry*, 11th ed. Ames: Iowa State Press, 2003:691-703.
- Blackall PJ, Reid GG. Further efficacy studies on inactivated, aluminum-hydroxide-adsorbed vaccines against infectious coryza. *Avian Dis* 1987; 31:527-532.
- Bragg RR. Isolation of serovar C-3 *Haemophilus paragallinarum* from Zimbabwe: a further indication of the need for the production of vaccines against infectious coryza containing local isolates of *Haemophilus paragallinarum*. *Onderstepoort J Vet Res* 2002a; 69:129-132.
- Bragg RR. Virulence of South African isolates of *Haemophilus paragallinarum*. Part 1: NAD-dependent field isolates. *Onderstepoort J Vet Res* 2002b; 69:163-169.
- Bragg RR, Greyling JM, Beer TC, Verschoor JA. Changes in the incidences of the different serovars of *Haemophilus paragallinarum* in South Africa: A possible explanation for vaccination failures. *Onderstepoort J Vet Res* 1996; 62:261-270.
- Eaves LE, Rogers DG, Blackall PJ. Comparison of hemagglutinin 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, Colíndres HL, Soriano VE. Protection afforded by bi- and trivalent bacterins of *Haemophilus paragallinarum* against prevalent serovars in Mexico. *Proceedings of 52nd Western Poultry Disease Conference*; 2003 march 8-11; Sacramento (California) USA. California (Davis): University of California, 2003:88.



- García FA, Blackall PJ, Angulo E. Presencia de *Haemophilus paragallinarum* NAD independiente en México. Memorias de la XXVII Convención Anual ANECA & 51st Western Poultry Disease Conference; 2002 mayo 1-4; Puerto Vallarta (Jalisco) México. México (DF): Asoc. Nac. de Esp. en Ciencias Avícolas, AC, 2002:59.
- García FA, Rodríguez Y, Blackall PJ, Jonson GH. Aislamiento e identificación de bacterias NAD-independiente a partir de aves con signos de coriza infecciosa. Memorias XXIII Convención Anual ANECA; 1998 mayo 6-9; Puerto Vallarta (Jalisco) México. México (DF): Asociación Nacional de Especialistas en Ciencias Avícolas, AC, 1998:70-72.
- Jacobs AAC, Cuenen W, Storm PK. Efficacy of a trivalent *Haemophilus paragallinarum* vaccine compared to bivalent vaccines. Vet Microbiol 1992; 32:43-49.
- Khan MI, Chen X, Blackall PJ. Differentiation of *Haemophilus paragallinarum* isolates using ERIC-PCR analysis. Proceedings of 47th Western Poultry Disease Conference; 1998 march 8-10; Sacramento (California) USA. California (Davis): University of California, 1998:8-9.
- Kume K, Sawata A. Factors of *Haemophilus paragallinarum* for infection and protection in chickens. Proceedings of 39th Western Poultry Disease Conference; 1990 march 4-6; Sacramento (California) USA. California (Davis): University of California, 1990:53-60.
- Kume K, Sawata A, Nakai T. Clearance of the challenge organisms from the upper respiratory tract of chickens injected with an inactivated *Haemophilus paragallinarum* vaccine. Jpn J Vet Sci 1984; 46:843-850.
- Kume K, Sawata A, Nakai T, Matsumoto M. Serological classification of *Haemophilus paragallinarum* with a hemagglutinin system. J Clin Microbiol 1983; 17:958-964.
- Kume K, Sawata A, Nakase Y. Immunologic relationship between Page's and Sawata's strains of *Haemophilus paragallinarum*. Am J Vet Res 1980; 41:757-760.
- Page LA. *Haemophilus* infections in chickens. I. Characteristics of 12 *Haemophilus* isolates recovered from diseased chickens. Am J Vet Res 1962; 23:85-95.
- 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
- Schmidt H, Hensel M. Pathogenicity islands in bacterial pathogenicity. Clin Microbiol Rev 2004; 17:14-56.
- Soriano VE, Blackall PJ, Dabo SM, Téllez GI, García-Delgado GA, Fernández RP. Serotyping of *Haemophilus paragallinarum* isolates from Mexico by the Kume hemagglutinin scheme. Avian Dis 2001a; 45:680-683.
- Soriano VE, Longinos GM, Fernández RP. Aislamiento y caracterización de *Ornithobacterium rhinotracheale* obtenido de pavos con enfermedad respiratoria. Vet Méx 2003; 34:283-288.
- Soriano VE, Fernández RP, García-Delgado GA, Ochoa GP. Evaluación de dos protocolos de bacterinización de gallinas de postura mediante detección de anticuerpos inhibidores de la hemoaglutinación y protección ante un desafío controlado con *Haemophilus paragallinarum*. Vet Méx 2001b; 32:145-148.
- Soriano VE, Téllez G, Fernández RP. Proposal of the Blackall scheme for hemagglutinin serotyping of *Haemophilus paragallinarum*. Poult Sci 2002a; 80(Suppl. 1):86.
- Soriano VE, Téllez G, Fernández RP. Proposal of the Blackall scheme for hemagglutinin serotyping of *Haemophilus paragallinarum*. Proceedings of the International Pasteurellaceae Society Conference; 2002 may 5-10; Banff (Alberta) Canada. Canada (Guelph): International Pasteurellaceae Society, 2002b:30.
- Terzolo HR, Sandoval VE, Pondal FG. Evaluation of inactivated infectious coryza vaccines in chickens challenged by serovar B strains of *Haemophilus paragallinarum*. Avian Pathol 1997; 26:365-376.
- Versalovic J, Koeuth T, Lupski JR. Distribution of repetitive DNA sequences in eubacteria and application to fingerprinting of bacterial genomes. Nucleic Acids Res 1991, 19:6823-6831.
- 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.