



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL ESTADO DE MÉXICO

**DOCTORADO EN CIENCIAS AGROPECUARIAS
Y RECURSOS NATURALES**

***Avibacterium paragallinarum*: protección,
tipificación y filogenia de aislamientos de América.**

TESIS

QUE PARA OBTENER EL GRADO DE DOCTOR EN
CIENCIAS AGROPECUARIAS Y RECURSOS NATURALES

P R E S E N T A:

M. en C. VLADIMIR MORALES ERASTO

El Cerrillo Piedras Blancas, Toluca, Estado de México. Diciembre, 2015



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL ESTADO DE MÉXICO

DOCTORADO EN CIENCIAS AGROPECUARIAS Y RECURSOS NATURALES

***Avibacterium paragallinarum*: protección,
tipificación y filogenia de aislamientos de América.**

TESIS

Que para obtener el grado de Doctor en
Ciencias Agropecuarias y Recursos Naturales

PRESENTA:

M. en C. VLADIMIR MORALES ERASTO

Tutor Académico

Dr. Edgardo Soriano Vargas

Tutores Adjuntos

Dr. Patrick J. Blackall

Dr. Martín Talavera Rojas

El Cerrillo Piedras Blancas, Toluca, Estado de México. Diciembre 2015

RESUMEN

Avibacterium paragallinarum es el agente causal de la coriza infecciosa, una enfermedad del tracto respiratorio superior que afecta a pollos y gallinas. *Av. paragallinarum* se clasifica serológicamente en nueve serovariedades (A-1, A-2, A-3, A-4, B-1, C-1, C-2, C-3 y C-4) distribuidas en 3 serogrupos (A, B y C). La distribución de estas serovariedades en el mundo es muy diversa. En México, hasta el año 2002, se habían identificado aislamientos de las serovariedades A-1, A-2, B-1 y C-2. Recientemente, en el año 2011, se identificó la serovariedad C-1 de *Av. paragallinarum* en este país. Todos los aislamientos obtenidos procedían de parvadas inmunizadas contra coriza infecciosa. Con base en lo anterior, se evaluó la protección conferida por bacterinas comerciales frente a un aislamiento de la serovariedad C-1. Se registraron diferencias significativas en la protección conferida por las bacterinas evaluadas, de 25% a 83%, lo cual explicó en parte los brotes observados en campo. Actualmente, la técnica para la tipificación serológica de aislamientos de *Av. paragallinarum* es la inhibición de la hemoaglutinación (IH). PCR múltiple En el presente trabajo se tipificaron 12 cepas de referencia y 69 aislamientos de diferentes serovariedades provenientes de Ecuador, México, Panamá y Perú, serológicamente y mediante una PCR múltiple (mPCR). Tres de 6 (50%) cepas de referencia del serogrupo A, 2 (100%) del serogrupo B y 1 de 4 (25%) de las cepas de referencia del serogrupo C fueron correctamente tipificadas por la mPCR. De manera similar, 16 de 17 aislamientos del serogrupo A, 10 de 12 aislamientos del serogrupo B y 18 de 37 aislamientos del serogrupo C fueron correctamente tipificados mediante la mPCR. Basados en estos resultados, se puede concluir que la mPCR no es recomendada para reemplazar a la prueba de IH para la tipificación de aislamientos de *Av. paragallinarum*. Adicionalmente, en el presente trabajo, se amplificaron y secuenciaron los genes *hagA* y 16S rRNA de aislamientos de *Av. paragallinarum* de diferentes serovariedades permitiendo establecer la relación filogenética entre aislamientos de Bolivia, Ecuador, México, Panamá y Perú. El análisis filogenético, confirmó que algunos aislamientos de *Av. paragallinarum* de estos países están

relacionados con cepas de referencia previamente informadas. Sin embargo, de manera particular el análisis basado en el gen 16S rRNA permitió la identificación de un genogrupo de aislamientos del continente Americano. En conclusión, el presente estudio muestra la necesidad de seguimiento de brotes de coriza infecciosa para determinar la posible prevalencia o emergencia de serovariedades de *Av. paragallinarum*. Asimismo, es necesaria la evaluación frecuente de las bacterinas disponibles en un país para explicar los brotes. Es necesario el análisis de más aislamientos de otros países del continente Americano para confirmar el genogrupo identificado.

Palabras clave: *Avibacterium paragallinarum*, coriza infecciosa, serovariedad C-1, protección, tipificación.

SUMMARY

Avibacterium paragallinarum is the causative agent of the infectious coryza, a disease of the upper tract of chickens. *Avibacterium paragallinarum* is classified serologically in nine serovars (A-1, A-2, A-3, A-4, B-1, C-1, C-2, C-3 and C-4) distributed in three serogroups (A, B and C). The distribution of these serovars in the world is very diverse. In México, until 2002, isolates of the serovars A-1, A-2, B-1 and C-2 were identified. Recently, in 2011, isolates of the serovar C-1 were identified from coryza-vaccinated flocks. In the current study, the protection conferred by commercially available infectious coryza bacterins challenged with a serovar C-1 isolate, significant differences were observed between the evaluated vaccines, the protection percentages ranged between 83% and 25%. Actually, the technique for the serological typing of *Av. paragallinarum* isolates is the Inhibition of Hemoagglutination (IH), however, a recently PCR-multiplex (mPCR) for the serogroups typing was proposed (Sakamoto *et al.*, 2012). In the current study, 12 reference strains and 69 isolates of different serovars from Ecuador, Mexico, Panama and Peru were typed by mPCR. Three of 6 (50%) reference strains of the serogroup A, 2 (100%) of the serogroup B and 1 of 4 (25%) of the serogroup C were correctly typed by the mPCR. Similarly, 16 of 17 serogroup A isolates, 10 of 12 serogroup B isolates and 18 of 37 serogroup C isolates were correctly typed by the mPCR. Based on these findings, the mPCR is not recommended to replace the IH test for the typing of *Av. paragallinarum*. In the current study, the sequencing of the HagA and 16S rRNA genes of *Av. paragallinarum* isolates of different serovars allowed to establish the phylogenetic relationship between isolates from Bolivia, Ecuador, Mexico, Panama and Peru. The phylogenetic analysis concluded that some *Av. paragallinarum* isolates are closely related with reference strains previously reported. Particularly, the analysis of the 16S rRNA gene allowed the identification of a genotype for the isolates from America. In conclusion, the present study shows the need for monitoring outbreaks of the infectious coryza to determine the prevalence or emergence of *Av. paragallinarum* serovars. Also, the evaluation of infectious coryza vaccines is necessary to explain

these outbreaks. The analysis of more *Av. paragallinarum* isolates is necessary for confirm the genogroup identified.

Keywords: *Avibacterium paragallinarum*, infectious coryza, serovar C-1, protection, typified.

CONTENIDO

RESUMEN.....	6
SUMMARY.....	8
I. Introducción.....	12
II. Revisión de literatura.....	15
III. Justificación	21
IV. Hipótesis.....	22
V. Objetivos.....	23
VI. Material y Métodos	
1. Protección.....	25
2. Tipificación por PCR múltiple	27
3. Filogenia.....	29
VII. Resultados	
1. Protección.....	33
2. Tipificación.....	37
3. Filogenia	43
VIII. Discusión general.....	47
IX. Conclusiones.....	51
X. Bibliografía.....	53

ÍNDICE DE CUADROS Y FIGURAS

Cuadro	Nombre	Página
Cuadro 1	Identificación, origen, año de aislamiento y serovariedad de los aislamientos de <i>Av. paragallinarum</i> analizados.	31
Figura		
Figura 1	Árbol filogenético de cepas de referencia y aislamientos de <i>Av. paragallinarum</i> incluidos en el estudio basados en el análisis de máxima verosimilitud del gen 16S rRNA.	45
Figura 2	Árbol filogenético de cepas de referencia y aislamientos de <i>Av. paragallinarum</i> incluidos en el estudio basados en el análisis de neighbor-joining de las secuencias del gen <i>hagA</i> .	46

I. INTRODUCCIÓN

Avibacterium paragallinarum es el agente etiológico de la coriza infecciosa, una enfermedad del tracto respiratorio superior de pollos y gallinas (*Gallus gallus*). La enfermedad se caracteriza por producir descarga nasal, inflamación facial y estornudos, lo que ocasiona pérdidas en la producción avícola (Blackall y Soriano, 2013). A la fecha, se reconocen 9 serovariedades (A-1, A-2, A-3, A-4, B-1, C-1, C-2, C-3 y C-4) distribuidas en tres serogrupos (A, B y C) (Blackall *et al.*, 1990). La distribución de estas serovariedades en el mundo es muy diversa. En México se han identificado aislamientos de *Av. paragallinarum* de las serovariedades A-1, A-2, B-1 y C-2 (Soriano *et al.*, 2002). En el año 2011, se identificaron brotes de coriza infecciosa donde aislamientos de *Av. paragallinarum* de la serovariedad C-1 fueron identificados a partir de parvadas inmunizadas contra coriza infecciosa (Morales-Erasto *et al.*, 2011).

La mejor manera de prevenir la coriza infecciosa es mediante la bacterinización de parvadas susceptibles. Actualmente, en el mercado se encuentran disponibles bacterinas bivalentes (que incluyen aislamientos o cepas de referencia de los serogrupos A y C) y bacterinas trivalentes (que incluyen aislamientos o cepas de referencia de los serogrupos A, B y C) (Fernández *et al.*, 2005). La eficacia de las bacterinas contra coriza infecciosa se evalúa mediante la infección experimental de parvadas inmunizadas y la evaluación de la protección conferida. En el presente trabajo, se evaluó la protección conferida por bacterinas trivalentes comerciales frente a un aislamiento de la serovariedad C-1 de *Av. paragallinarum*. Una protección al menos del 70% conferida por una bacterina contra la coriza infecciosa y al desafío homólogo, no es diferente estadísticamente a una protección de 80% a 100% (Fernández *et al.*, 2005; Soriano *et al.*, 2004).

La asignación de serogrupos y serovariedades de *Av. paragallinarum*, se lleva a cabo mediante dos esquemas, el esquema de Page que fue originalmente desarrollado para la prueba de aglutinación en placa que reconoce 3 serovariedades (A, B y C) (Page, 1962). Posteriormente, se desarrolló otro esquema de serotipificación propuesto por Kume *et al.* (1983), y modificado por Blackall *et al.* (1990), reconociendo 9 serovariedades: A-1, A-2, A-3, A-4, B-1, C-1,

C-2, C-3 y C-4. La tipificación por ambos esquemas es complicada y requiere la producción de antígenos y antisueros específicos para las cepas de referencia de cada una de las serovariedades (Sakamoto *et al.*, 2012). Recientemente, se propuso una PCR múltiple para la tipificación, la cual permite el reconocimiento de los serogrupos A, B y C. En el presente estudio, se empleó esta PCR-múltiple para la tipificación de aislamientos de diferentes países de América.

Asimismo, la genotipificación permite establecer la diversidad genética y relación filogenética entre microorganismos. Para el caso de *Av. paragallinarum*, el gen *hagA* que codifica para la hemoaglutinina de la bacteria y el gen 16S rRNA han sido utilizados para establecer la relación filogenética de aislamientos de la serovariedad C-1 provenientes de México y Ecuador (García-Sánchez *et al.*, 2014). En el presente trabajo, se analizaron las secuencias de los genes *hagA* y 16S rRNA de 11 cepas de referencia y 48 aislamientos provenientes de Bolivia (2 aislamientos), Ecuador (19 aislamientos), México (9 aislamientos), Panamá (2 aislamientos) y Perú (16 aislamientos).

El objetivo de este trabajo fue evaluar la protección conferida por bacterinas comerciales frente a un aislamiento de la serovariedad C-1. Asimismo, la tipificación de aislamientos por la técnica de PCR múltiple y establecer la relación filogenética basada en los genes *hagA* y 16S rRNA de aislamientos de *Av. paragallinarum* de América.

II. REVISIÓN DE LITERATURA

Avibacterium paragallinarum es una bacteria Gram-negativa perteneciente a la familia *Pasturellaceae* y es el agente causal de la coriza infecciosa, una enfermedad del tracto respiratorio superior de pollos y gallinas (*Gallus gallus*). La enfermedad se caracteriza por producir descarga nasal, inflamación facial y estornudos. Las pérdidas que ocasiona en la avicultura se deben a la disminución en la producción de huevo (10% a 40%), retraso en el crecimiento, pérdida de peso y predisposición a enfermedad respiratoria crónica complicada (Blackall y Soriano, 2013).

Clasificación serológica

Existen dos esquemas relacionados para la serotipificación de *Av. paragallinarum* basados en la hemoaglutinina de la bacteria. El esquema de Page, originalmente desarrollado en la prueba de aglutinación en placa con tres serovariedades: A, B y C (Page, 1962). El esquema de Kume basado en la prueba de inhibición de la hemoaglutinación (IH) con nueve serovariedades: A-1, A-2, A-3, A-4, B-1, C-1, C-2, C-3 y C-4, distribuidas en tres serogrupos: A, B y C (Blackall *et al.*, 1990).

La distribución de las serovariedades en el mundo es muy diversa. En América, se han identificado aislamientos de la serovariedad B-1 en Panamá (Calderon *et al.*, 2010). Posteriormente, en Ecuador, las serovariedades A-3, B-1 y C-1, han sido identificadas (Cabrera *et al.*, 2011). Aislamientos de *Av. paragallinarum* de las serovariedades A-1, A-2, B-1 y C-2, han sido identificadas en México (Soriano *et al.*, 2001). Adicionalmente, en 2011, Morales-Erasto *et al.* (2011), identificaron aislamientos de la serovariedad C-1 a partir de parvadas inmunizadas contra coriza infecciosa en los estados de Jalisco y Puebla.

La hemoaglutinina es el principal componente relacionado con la patogenicidad e inmunogenicidad de *Av. paragallinarum*. Un estudio previo, demostró que aislamientos mutantes carentes de hemoaglutinina no son patogénicos, ni inmunogénicos (Yamaguchi *et al.*, 1993). Por lo tanto, la

serotipificación de hemoaglutininas de aislamientos de *Av. paragallinarum* es importante para conferir inmunidad en aves frente a ciertos aislamientos de cierta serovariedad. Soriano *et al.* (2004), identificaron protección cruzada entre aislamientos pertenecientes al mismo serogrupo confirmando así que los tres serogrupos, representan 3 distintos inmunovares, sugiriendo que la identificación de serovariedades presentes en ciertas áreas y la protección conferida por ciertas cepas, es importante para la selección de cepas vacunales.

Evaluación de la protección.

La inmunización de parvadas susceptibles empleando bacterinas de *Av. paragallinarum* es la mejor estrategia para la prevención de la coriza infecciosa. Como ya se mencionó previamente, la hemoaglutinina es el principal componente relacionado con la inmunogenicidad y por lo tanto en la protección de *Av. paragallinarum* (Yamaguchi *et al.*, 1993).

La disponibilidad de bacterinas en el mercado está basada en las serovariedades existentes en ciertas zonas geográficas. De esta manera, en el mercado existen bacterinas bivalentes que contienen bacterias inactivadas de los serogrupos A y C; y bacterinas trivalentes que contienen bacterias inactivadas de los serogrupos A, B y C. Se sugiere que en lugares con aislamientos circulantes del serogrupo B, las bacterinas trivalentes sean empleadas (Fernández *et al.*, 2005; Jacobs *et al.*, 1992).

La determinación de anticuerpos y la determinación de la protección mediante una prueba de desafío en aves son los métodos más usados para la evaluación de la eficacia de bacterinas de *Av. paragallinarum* (García *et al.* 2008; Chukiatsiri *et al.*, 2009). Los anticuerpos IH están estrechamente relacionados con la protección en *Av. paragallinarum* (Kume *et al.*, 1984).

La prueba de desafío en aves utilizada para la evaluación de la protección, consiste en la inmunización de aves susceptibles a *Av. paragallinarum* y posteriormente la inoculación con un cultivo vivo de *Av. paragallinarum*, incluyendo

aves inmunizadas y aves sin inmunización (grupo control). Las aves se evalúan durante 7 días y posteriormente se realiza el cultivo a partir del seno infraorbitario. Un ave es considerada protegida si no presentó signos clínicos durante el periodo de evaluación y es negativa al cultivo bacteriológico de *Av. paragallinarum* (Soriano *et al.*, 2004). Una protección al menos del 70% conferida por una bacterina contra la coriza infecciosa y al desafío homólogo, no es diferente estadísticamente a una protección de 80% a 100% (Fernández *et al.*, 2005; Soriano *et al.*, 2004).

El nivel de anticuerpos inhibidores de la hemoaglutinación, está estrechamente relacionado con los niveles de protección observados (Takagi *et al.*, 1991). Sin embargo, García *et al.* (2008), no detectaron títulos de anticuerpos IH en aves bacterinizadas en una sola ocasión, y al ser desafiadas se observó al menos un 70% de protección al desafío, sugiriendo que la prueba de desafío en aves inmunizadas, es la técnica más adecuada para la evaluación de bacterinas de coriza infecciosa.

Tipificación por PCR múltiple

Como ya se mencionó previamente, la serotipificación de aislamientos mediante la técnica de IH de *Av. paragallinarum* es importante para conocer las serovariedades presentes en ciertas zonas geográficas. Sin embargo, la técnica de IH, requiere de la disponibilidad de los 9 antígenos y antisueros de referencia, así como de eritrocitos fijados, lo que vuelve complicado el procedimiento (Sakamoto *et al.*, 2012). Basado en este principio, Sakamoto *et al.* (2012), desarrollaron una PCR múltiple para la identificación de los serogrupos de *Av. paragallinarum*.

Para el desarrollo de esta PCR múltiple, Noro *et al.* (2007) y Noro *et al.* (2008), reportaron los genes que codifican para la hemoaglutinina de *Av. paragallinarum*. La proteína (de 210 kDa) tiene propiedades hemoaglutinantes, induce anticuerpos IH y confiere protección en aves SPF (del inglés: *Specific*

Patogen Free) para las serovariedades A y C. Basados en estas secuencias de aproximadamente 5,157 pb, Sakamoto *et al.* (2012) diseñaron una PCR-múltiple que permite la tipificación de aislamientos de *Av. paragallinarum*. El diseño de la PCR múltiple, se basó en el gen *HMTp210* de 5 cepas del serogrupo A (221, 083, W, Georgia y Germany); 2 cepas del serogrupo B (Spross y 0222); y 3 cepas del serogrupo C (53-47, Modesto y HK-1). En el presente estudio, esta PCR múltiple fue evaluada con cepas de referencia de las 9 serovariedades reportadas y aislamientos de América.

Filogenia.

Los análisis filogenéticos basados en la secuencias del gen 16S rRNA, permitieron clasificar bacterias antes denominadas *Haemophilus paragallinarum*, *Pasteurella gallinarum*, *Pasteurella avium* y *Pasteurella volantium* dentro de un nuevo género, denominado *Avibacterium* (Blackall *et al.*, 2005). De este modo, *Avibacterium paragallinarum* y bacterias relacionadas pueden ser identificadas y clasificadas genotípicamente mediante el gen 16S rRNA (Blackall *et al.*, 2005). Christensen *et al.* (2004) al realizar análisis filogenéticos comparativos entre genes *housekeeping* y el gen 16S rRNA, sugieren que los análisis filogenéticos derivados del uso del gen 16S rRNA tienen una mayor congruencia con la filogenia basada en el genoma completo y pudiera ser adecuado para análisis filogenéticos. Acorde a lo anterior, Blackall *et al.* (2011), identifican mediante la secuenciación del gen 16S rRNA dos aislamientos con requerimientos especiales de NAD como *Av. paragallinarum*, asimismo, el análisis filogenético de estas secuencias, permitió establecer la relación genética entre estos aislamientos con secuencias del gen 16S rRNA correspondientes a cepas de referencia de *Av. paragallinarum* (Blackall *et al.*, 2011).

Hobb *et al.* (2002), identificaron una secuencia de un gen que codifica para el antígeno de una hemoaglutinina (*hagA*) de 1,026 pares de bases (pb) la cual codifica para una proteína de 39 kDa (HagA), que como ya se mencionó, es el principal componente relacionado con la inmunogenicidad de *Avibacterium*

paragallinarum, permitió establecer la relación filogenética basada en el gen *hagA* de cepas de referencia de *Av. paragallinarum* (Hobb *et al.*, 2002). García-Sánchez *et al.* (2014), realizaron la genotipificación mediante ERIC-PCR y el análisis filogenético basado en los genes 16S rRNA y *hagA* de aislamientos de *Av. paragallinarum* de la serovariedad C-1 de México y Ecuador, concluyendo que pudieran tener una relación clonal.

III. JUSTIFICACIÓN

Con base en el aislamiento de *Avibacterium paragallinarum* de la serovariedad C-1 a partir de brotes en parvadas inmunizadas contra coriza infecciosa en México y Ecuador, es indispensable conocer la protección conferida por bacterinas comerciales frente aislamientos de esta serovariedad, a fin de explicar dichos brotes. Asimismo, el uso de nuevas metodologías, como la PCR-múltiple para la identificación de los serogrupos A, B y C, parece una alternativa atractiva, para la tipificación frecuente y masiva de aislamientos. Adicionalmente, el análisis filogenético de aislamientos de América es importante, para la identificación de aislamientos relacionados y de esta manera coadyuvar en el diseño estrategias de prevención y control de la coriza infecciosa en América.

IV. HIPÓTESIS

Con base en el aislamiento de *Av. paragallinarum* de la serovariedad C-1 a partir de aves inmunizadas contra la coriza infecciosa, es posible que bacterinas comerciales disponibles en México, confieran menos de 70% de protección al desafío con un aislamiento de la serovariedad C-1 de México.

Con base en la prevalencia de los serogrupos A, B y C de *Av. paragallinarum* en América, y particularmente de las serovariedades A-1, A-2, A-3, B-1, C-1 y C-2, los aislamientos tipificados serológicamente recientemente en América, pertenezcan a alguna de estas serovariedades mediante la técnica de PCR múltiple.

Hasta el momento se conoce que aislamientos de *Av. paragallinarum* de la serovariedad C-1 de México y Ecuador tienen una estrecha relación filogenética, pero distantes de la cepa de referencia H-18 de la misma serovariedad de origen Japonés, formando un linaje genético nuevo. Con base en lo anterior, es posible que más aislamientos de América sean incluidos en este genogrupo Americano.

V. OBJETIVOS

Objetivo General

Evaluar la protección conferida por bacterinas comerciales frente a un aislamiento de la serovariedad C-1, tipificar por PCR múltiple y establecer la relación filogenética de aislamientos de *Av. paragallinarum* de diferentes orígenes y serovariedades.

Objetivos Específicos

1. Evaluar la protección conferida por cuatro bacterinas comerciales en aves SPF (del inglés: *Specific Pathogen Free*) mediante una prueba de desafío controlado frente al aislamiento ESV-135 de la serovariedad C-1 de *Av. paragallinarum*.
2. Tipificar cepas de referencia correspondientes a las 9 serovariedades y aislamientos provenientes de Ecuador, México, Panamá y Perú de las serovariedades A-1, A-3, B-1, C-1 y C-2, mediante la técnica de PCR múltiple previamente reportada.
3. Establecer la relación filogenética basada en los genes *hagA* y 16S rRNA de aislamientos de *Av. paragallinarum* provenientes de Bolivia, Ecuador, México, Panamá y Perú.

VI. MATERIAL Y MÉTODOS

1. Protección

Aislamiento de desafío. El aislamiento ESV-135 de *Av. paragallinarum* de la serovariedad C-1, fue utilizado para evaluar la protección conferida por bacterinas comerciales. El aislamiento fue obtenido del estado de Jalisco en el año 2008. La bacteria fue cultivada en embrión de pollo libre de patógenos específicos (ALPES, Tehuacán, Puebla, México) de 6 días de edad al cual se le determinó el título en UFC's/ml (Unidades Formadoras de Colonias/mililitro).

Aves. Se utilizaron un total de 98 aves SPF de 6 semanas de edad libres de patógenos específicos (ALPES, Tehuacán, Puebla, México) con agua y alimento a libre acceso.

Grupos experimentales e inmunización. Las aves se dividieron en 5 grupos: un grupo 18 aves: Grupo I; y tres grupos de 20 aves: Grupo II, Grupo III y Grupo IV, fueron inmunizados con bacterinas trivalentes (serogrupos A, B y C) comerciales a las semanas 6 y 9 de edad vía subcutánea con 0.5 ml de acuerdo a las instrucciones de los fabricantes. Adicionalmente, se incluyó un grupo control de 20 aves sin inmunización.

Serología. Se tomaron muestras sanguíneas para pruebas serológicas, 3 días antes de la primera vacunación y 3 días previos al desafío. Se examinó el suero de al menos 17 aves de cada grupo para la determinación de anticuerpos inhibidores de la hemoaglutinación frente a hemoaglutininas de las cepas de referencia H-18 (serovariedad C-1) y Modesto (serovariedad C-2), adicionalmente, se incluyó la hemoaglutinina del aislamiento de desafío ESV-135 (serovariedad C-1) según el procedimiento reportado (Soriano *et al.*, 2004). Brevemente, se realizaron diluciones dobles seriadas de los sueros, posteriormente se adicionaron 50 µl de cada hemoaglutinina ajustada a 4 UH y se adicionaron 100 µl de eritrocitos de pollo al 0.75% fijados con glutaraldehído. El título IH fue expresado como el recíproco de la máxima dilución en la cual se observa completa inhibición de la Hemoaglutinación. Para el análisis de los datos, los títulos fueron transformados a logaritmo base 10 y posteriormente, las diferencias fueron

analizadas mediante una prueba de Tukey. Los resultados fueron considerados significativos con una probabilidad de $P < 0.01$.

Desafío. Tres semanas posteriores a la segunda inmunización, el desafío fue realizado inoculando a cada uno de los pollos por instilación nasal con 0.2 ml del cultivo en embrión de pollo (ALPES, Tehuacán, Puebla, México) de *Av. paragallinarum*. La evaluación de las aves se llevó a cabo del día 1 al día 7 posteriores a la inoculación mediante una escala de signos asignada de la siguiente manera: 0, ausencia de signos; 1, exudado nasal o inflamación facial; 2, exudado nasal e inflamación facial moderada; 3, exudado nasal e inflamación facial severa; 4, exudado nasal e inflamación facial severa con conjuntivitis o inflamación de barbillas (Soriano *et al.*, 2004). La eutanasia de los pollos se realizó al día 7 de evaluación y se tomaron muestras bacteriológicas a partir de seno infraorbitario, el cultivo se realizó en agar sangre adicionado con 10% de sangre de ovino y se sembró una estría de *Staphylococcus aureus* como colonia nodriza y a las 24 horas de incubación a 37°C se registró el aislamiento de *Av. paragallinarum* de los pollos. Un pollo fue considerado como protegido si no presentó signos clínicos durante el tiempo de evaluación y fue negativo al aislamiento de *Av. paragallinarum* al día 7 posterior a la inoculación (Soriano *et al.*, 2004).

Análisis estadísticos. Los porcentajes de protección se compararon por la prueba de Ji-cuadrada ($P < 0.05$) y los signos clínicos de las aves pertenecientes a cada grupo se compararon obteniendo la sumatoria de las evaluaciones diarias de cada una de las aves y dividiéndolas entre el número total de aves del grupo. Las diferencias entre los grupos desafiados fueron analizadas por la prueba de ANOVA y comparadas por la prueba de Bonferroni para variables ordinales, las diferencias fueron consideradas significativas con una probabilidad de $P < 0.05$ (Soriano *et al.*, 2004).

2. Tipificación por PCR múltiple

Bacterias. Se incluyeron un total de 12 cepas de referencia de *Av. paragallinarum*: 9 de ellas representando a las 9 serovariedades del esquema de tipificación de Kume (Blackall *et al.*, 1990); y 2, del esquema original de tipificación de Page (Page, 1962). Además, la cepa de referencia 11296^T NCTC (del inglés: *National Collection of Type Cultures*); 12835^T CCUG (del inglés: *Culture Collection, University of Göteborg, Suiza*); 29545^T ATCC (del inglés: *American Type Culture Collection*). Adicionalmente, se incluyeron 69 aislamientos de *Av. paragallinarum* obtenidos de brotes de diferentes brotes de coriza infecciosa y previamente serotipificados por los esquemas de Page y Kume: 26 aislamientos de Ecuador (Cabrera *et al.*, 2011), 37 aislamientos de México (Morales-Erasto *et al.*, 2011) y 2 aislamientos de Panamá (Calderón *et al.*, 2010). Cuatro aislamientos provenientes de Perú, fueron serotipificados en el presente estudio por los esquemas de Page y Kume usando los métodos previamente reportados (Blackall *et al.*, 1990; Soriano *et al.*, 2001).

Medios de cultivo. Las bacterias fueron mantenidas y propagadas en placas de agar sangre suplementado con 10% de sangre de ovino utilizando una estría de *Staphylococcus epidermidis* como colonia nodriza. Adicionalmente, tubos con caldo infusión cerebro corazón suplementados con 25 µg/ml de NADH (dinucleótido de adenina nicotinamida) y 1% (v/v) de suero equino inactivado.

Extracción de ADN y PCR. Brevemente, el ADN genómico de cada una de los cultivos de *Av. paragallinarum* fue extraído según las indicaciones del fabricante (DNeasy blood & tissue kit, Qiagen, Hilden, Alemania). Las pruebas de PCR múltiple, fueron realizadas según el procedimiento previamente reportado (Sakamoto *et al.*, 2012). Las reacciones de PCR contenían un volumen de 25 µl: 2.5 µl de buffer 10x para PCR (Invitrogen, Sao Paulo. Brasil), 1.25 unidades de *Taq* DNA polimerasa (Invitrogen, Sao Paulo. Brasil), 0.2 mM de cada desoxirribonucleótido trifosfatado (dNTP), 0.2 µM de cada iniciador: ABC forward 5'-GGCTCACAGCTTTATGCAACGAA-3'; A reverse 5'-CGCGGGATTGTTGATTTTGT-3'; B reverse 5'-GGTGAATTTCCACCACACCAC-

3'; y C reverse 5'-TAATTTTCTTATTCCCAGCATCAATACCAT-3'; y 2 µl de cada DNA extraído. Los ciclos de amplificación constaron de una desnaturalización inicial de 98°C durante 1 minuto; 30 ciclos de 98°C por 10 segundos, 56°C por 10 segundos y 72°C por dos minutos; y una extensión final a 72°C durante 7 minutos (Sakamoto *et al.*, 2012). Los productos de PCR fueron visualizados y fotografiados en un gel de agarosa al 2% en luz ultravioleta. Las pruebas de PCR múltiple de todas las cepas de referencia y aislamientos de *Av. paragallinarum* del estudio, fueron realizadas en el Centro de Investigación y Estudios Avanzados en Salud Animal-Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia de la Universidad Autónoma del Estado de México (CIESA-FMVZ-UAEMex) y el laboratorio de biología molecular de la empresa FARVET, SAC, en Perú.

Interpretación de los resultados y análisis estadísticos. La interpretación de los resultados fue realizada de acuerdo a lo descrito previamente (Sakamoto *et al.*, 2012). Los aislamientos y cepas de referencia tipificadas con la PCR múltiple como A, amplificaron un fragmento de ADN de 0.8kb; los aislamientos tipificados como B, un fragmento de 1.1 kb; y los aislamientos tipificados como C, un fragmento de 1.6 kb. Los resultados de tipificación por PCR múltiple fueron comparados con los resultados de tipificación por IH y los datos fueron analizados determinando la sensibilidad, especificidad, valor predictivo positivo (PPV) y valor predictivo negativo (NPV) de las pruebas de PCR múltiple.

3. Filogenia.

Bacterias. La identificación, origen y serovariedad de los aislamientos analizados están representados en el Cuadro 1. Todos los aislamientos, fueron obtenidos a partir de brotes de coriza infecciosa de diferentes granjas.

Mantenimiento y propagación de los aislamientos. Los aislamientos fueron cultivados en embrión de pollo de 6 días de edad (ALPES, Tehuacán, Puebla, México), posteriormente, almacenados en congelación a -85°C hasta su utilización. La recuperación de los aislamientos se realizó en agar sangre suplementado con 10% de sangre de ovino. Posteriormente, las bacterias fueron inoculadas en caldo infusión cerebro corazón suplementado con 0.025% de NADH y 1% de suero inactivado de caballo e incubadas durante 24 horas a 37°C.

Extracción y amplificación de ADN. La extracción de ADN genómico de los aislamientos, fue realizada según las indicaciones del fabricante (DNeasy blood & tissue kit, Qiagen, Hilden, Alemania). La amplificación de los genes *hagA* y 16S rRNA, fue realizada con en un volumen de 100 µl con el kit de amplificación Platinum, *Taq* DNA Polimerasa de alta fidelidad (Platinum *Taq* DNA Polymerase High Fidelity, Invitrogen, 11304-011. Sao Paolo, Brazil). Los iniciadores utilizados para la amplificación del gen *hagA* fueron los reportados previamente: ha8: 5'-AAGCTTTTATTTTAGATTTATTG-3' y ha11: 5'-CGCACGGCATTGATATTGTG-3' (Hobb *et al.*, 2002). Para la amplificación del gen 16S rRNA, se utilizaron los iniciadores universales para este gen, 27f: 5'-AGAGTTTGATCATGGCTCAG-3' y 1492r: 5'-GGTTACCTTGTTACGACTT-3'. (Blackall *et al.*, 2005)

Secuenciación. Los productos de la amplificación de los genes, fueron visualizados en un gel de agarosa para verificar el tamaño del producto y la concentración aproximada mediante un marcador de peso molecular (High DNA Mass, Invitrogen 10068-013, Sao Paolo, Brazil). Los productos de PCR fueron purificados mediante un kit de purificación (QIAquick Purification Kit, Qiagen, 28104). Las muestras fueron enviadas para secuenciación a Macrogen, Seúl, Corea del Sur, para la secuenciación por el método de secuenciación de Sanger. La secuenciación se solicitó con los iniciadores previamente mencionados,

adicionalmente, para el gen 16S rRNA, se solicitó la secuenciación con iniciadores intermedios diseñados a partir de las secuencias reportadas en GenBank para *Av. paragallinarum* del gen 16S rRNA, dichas secuencias son las siguientes: 16S in F: 5'-GCTAACTCCGTGCCAGCAG-3' y 16S in R: 5'-CTGACGACAGCCATGCAG-3'.

Análisis filogenético. Las secuencias fueron analizadas con el programa MEGA 5.2 (Tamura *et al.*, 2011), un análisis mediante la herramienta BLAST, incluida en GenBank fue realizado con las secuencias analizadas (Altschul *et al.*, 1990). El análisis filogenético fue realizado mediante la construcción de un alineamiento múltiple y realizando el análisis por el método de neighbor-joining (Saitou y Nei, 1987) para el gen *hagA* (García-Sánchez *et al.*, 2014). Para el gen 16S rRNA, se realizó el análisis por el método de máxima verosimilitud (Blackall *et al.* 2005) usando el programa MEGA 5.2 (Tamura *et al.*, 2011).

Cuadro 1. Identificación, origen, año de aislamiento y serovariedad de los aislamientos de *Av. paragallinarum* incluidos en el estudio.

Identificación	País de origen	Año de aislamiento	Serovariedad	Referencia
ESV-58	México	2006	NT	*
ESV-117	México	2008	C-2	Morales-Erasto <i>et al.</i> , 2011
ESV-131	México	2008	B-1	Morales-Erasto <i>et al.</i> , 2014
ESV-142	México	2009	C-2	Morales-Erasto <i>et al.</i> , 2011
ESV-184	México	2008	B-1	Morales-Erasto <i>et al.</i> , 2014
ESV-226	México	2011	A-1	Morales-Erasto <i>et al.</i> , 2014b
ESV-240	México	2010	A-1	Morales-Erasto <i>et al.</i> , 2014b
ESV-244	México	2010	A-1	Morales-Erasto <i>et al.</i> , 2014b
ESV-346	México	2012	C-1	Morales-Erasto <i>et al.</i> , 2014b
Lavetec 01	Ecuador	2001	B-1	Cabrera <i>et al.</i> , 2011
Lavetec 02	Ecuador	-	A-3	Morales-Erasto <i>et al.</i> , 2014b
Lavetec 04	Ecuador	-	A-3	Morales-Erasto <i>et al.</i> , 2014b
Lavetec 11	Ecuador	-	A-3	Morales-Erasto <i>et al.</i> , 2014b
Lavetec 13	Ecuador	2001	B-1	Cabrera <i>et al.</i> , 2011
Lavetec 16	Ecuador	2006	A-3	Cabrera <i>et al.</i> , 2011
Lavetec 21	Ecuador	2004	B-1	Cabrera <i>et al.</i> , 2011
Lavetec 22	Ecuador	2005	A-3	Cabrera <i>et al.</i> , 2011
Lavetec 51	Ecuador	2007	A-3	Cabrera <i>et al.</i> , 2011
Lavetec 24	Ecuador	2004	A-3	Cabrera <i>et al.</i> , 2011
Lavetec 29	Ecuador	2004	A-3	Cabrera <i>et al.</i> , 2011
Lavetec 30	Ecuador	2004	B-1	Cabrera <i>et al.</i> , 2011
Lavetec 33	Ecuador	2001	B-1	Cabrera <i>et al.</i> , 2011
Lavetec 42	Ecuador	-	A-3	Morales-Erasto <i>et al.</i> , 2014b
Lavetec 45	Ecuador	-	A-3	Morales-Erasto <i>et al.</i> , 2014b
Lavetec 53	Ecuador	2007	A-3	Cabrera <i>et al.</i> , 2011
Lavetec 54	Ecuador	2007	A-3	Cabrera <i>et al.</i> , 2011
Lima 1	Perú		C-2	Morales-Erasto <i>et al.</i> , 2014b
Lima 2	Perú		C-2	Morales-Erasto <i>et al.</i> , 2014b
Panamá 1	Panamá	2007	B-1	Calderón <i>et al.</i> , 2010
Panamá 2	Panamá	2007	B-1	Calderón <i>et al.</i> , 2010
Farper-030	Perú	2010	B-1	*
Farper-031	Perú	2010	B-1	*
Farper-033	Perú	2010	B-1	*
Farper-050	Perú	2011	C-1	*
Farper-051	Perú	2011	C-1	*
Farper-052	Perú	2011	C-1	*
Farper-060	Perú	2012	A-1	*
Farper-064	Perú	2011	B-1	*
Farper-065	Perú	2011	A-2	*
Farper-066	Perú	2011	NT	*
Farper-086	Perú	2010	B-1	*
Farper-087	Perú	2010	C-1	*
Farper-088	Perú	2011	C-1	*
Farper-089	Perú	2011	C-1	*
Farper-034	Bolivia	2010	A-2	*
Farper-047	Bolivia	2011	C-2	*

* En el presente estudio

VII. RESULTADOS

**1. Protección conferida por bacterinas de coriza infecciosa
frente a un aislamiento de *Avibacterium paragallinarum*
de la serovariedad C-1 emergente.**

Artículo publicado en
Avian Diseases (2015): 59, 162-164.

Research Note—

Protection Conferred by Infectious Coryza Vaccines Against Emergent *Avibacterium paragallinarum* Serovar C-1

V. Morales-Erasto,^A E. Maruri-Esteban,^A H. H. Trujillo-Ruíz,^A M. Talavera-Rojas,^A P. J. Blackall,^B and E. Soriano-Vargas^{AC}

^ACentro de Investigación y Estudios Avanzados en Salud Animal, Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia, Universidad Autónoma del Estado de México, Toluca, 50200, México

^BQueensland Alliance for Agriculture and Food Innovation, The University of Queensland, St Lucia 4072, Australia

Received 22 September 2014; Accepted 4 December 2014; Published ahead of print 8 December 2014

SUMMARY. Infectious coryza is an upper respiratory disease of chickens caused by *Avibacterium paragallinarum*. Outbreaks of infectious coryza caused by *Av. paragallinarum* serovar C-1 isolates in coryza-vaccinated flocks in Ecuador and Mexico have been reported. In the current study, the protection conferred by four commercially available, trivalent infectious coryza vaccines in chickens challenged with a serovar C-1 isolate from an apparent coryza vaccine failure in a layer flock in Mexico was evaluated. Only one infectious coryza vaccine provided a good protection level (83%) in vaccinated chickens. These results might explain the infectious coryza outbreaks in vaccinated flocks that have been observed in the field.

RESUMEN. *Nota de Investigación-* Protección conferida por vacunas de coriza infecciosa contra la serovariedad emergente C-1 de *Avibacterium paragallinarum*.

La coriza infecciosa es una enfermedad del tracto respiratorio superior de los pollos causada por *Avibacterium paragallinarum*. Se han reportado brotes de coriza infecciosa causada por *A. paragallinarum* serovar C-1 aislados de parvadas vacunadas contra coriza en Ecuador y en México. En este estudio se evaluó la protección conferida por cuatro, vacunas trivalentes disponibles comercialmente contra la coriza infecciosa, en pollos desafiados con la serovariedad C-1 aislada de un brote aparentemente asociado con una falla vacunal en aves ponedoras en México. Sólo una vacuna contra la coriza infecciosa proporcionó un buen nivel de protección (83%) en los pollos vacunados. Estos resultados podrían explicar los brotes de coriza infecciosa en las aves vacunadas que han sido observados en el campo.

Key words: *Avibacterium paragallinarum*, serovar C-1, vaccines, infectious coryza, poultry

Abbreviations: HI = hemagglutination-inhibition

Infectious coryza is an upper respiratory disease of chickens caused by *Avibacterium paragallinarum* (2). A marked drop (40%) in egg production in layer hens is the major effect of infectious coryza. Vaccination with *Av. paragallinarum* is the main strategy to prevent infectious coryza in susceptible chicken flocks (4).

To date, nine hemagglutinin serovars distributed into three serogroups are recognized: A-1 to A-4, B-1, and C-1 to C-4 (3). Most of the commercial vaccines include *Av. paragallinarum* in combination with serovars A-1, B-1, C-1, or C-2 (1,9). Recently, *Av. paragallinarum* serovar C-1 has emerged in the Ecuadorian and Mexican poultry production systems, including outbreaks in infectious coryza-vaccinated flocks (5,8). Hence, the aim of the current study was to evaluate the protection conferred by commercially available infectious vaccines against an *Av. paragallinarum* serovar C-1 isolate obtained from an apparent coryza vaccine failure in a layer flock in Mexico.

MATERIALS AND METHODS

Bacterial strain. Isolate ESV-135, serovar C-1 of *Av. paragallinarum*, has been extensively characterized (7,8) and was used in the study. This

bacterium was isolated from infectious coryza-vaccinated layer hens in Jalisco, Mexico, in 2008 (8).

Media. Brain–heart infusion broth and agar, both supplemented with 1% (weight/volume) sodium chloride, 0.0025% (weight/volume) nicotinamide adenine dinucleotide, and 1% (volume/volume) filter-sterilized, heat-inactivated horse serum, were used for propagation and maintenance of bacterial cultures. Also, 10% sheep blood agar plates with a feeder/nurse culture of *Staphylococcus epidermidis* were used (9).

Chickens. In total, ninety-eight 6-wk-old, specific-pathogen free chickens (Aves Libres de Patógenos Específicos [ALPES]; Tehuacan, Puebla, Mexico) were used in the study. All chickens were individually identified, and antibiotic-free feed and water were provided *ad libitum*.

Vaccines and immunization protocol. Four commercially available, trivalent (serogroups A, B, and C) infectious coryza vaccines were included in the study. The vaccines were labeled I, II, III, and IV. A group of 18 chickens (vaccine I) and three groups of 20 chickens (vaccines II, III, and IV) were inoculated subcutaneously with a 0.5 ml dose per the manufacturer's instructions. All chickens were vaccinated at 6 and 9 wk of age as previously reported (9). A further group of 20 chickens that were not vaccinated formed the control group.

Serology. All chickens were bled 3 days before the first vaccination and 3 wk after the second vaccination. The sera of at least 17 chickens were examined in hemagglutination-inhibition (HI) tests as previously described (9). Two-fold dilutions from 1:2 to 1:1024 of each serum were carried out. Hemagglutinins of the ESV-135 isolate and reference strains H-18 (Kume serovar C-1) and Modesto (Kume serovar C-2) were used. The serum HI antibody titers were expressed as the reciprocal of the highest dilution of serum sample that showed complete inhibition of the hemagglutinating activity. To remove any skewness in the data, the

^CCorresponding author. Present address: CIESA, FMVZ, UAEM, Carretera Panamericana Toluca-Atlacomulco km 15.5, Toluca 50200, México. E-mail: soriano@uaemex.mx

Table 1. Clinical sign scores, reisolation results, and protection levels against challenge with the isolate ESV-135 of *Avibacterium paragallinarum* in chickens vaccinated with trivalent commercial vaccines used in the study.

Postchallenge day	Vaccine					Control
	I	II	III	IV		
1	0.0	0.0	0.4	0.6	0.7	
2	0.0	0.2	0.4	0.9	1.1	
3	0.1	0.3	0.5	0.9	1.6	
4	0.0	0.4	0.6	1.3	1.6	
5	0.0	0.3	0.4	1.0	1.6	
6	0.0	0.5	0.5	1.3	1.5	
7	0.0	0.6	0.3	0.9	1.0	
Total mean \pm SD ^A	0.0 \pm 0.1a	0.3 \pm 0.7ab	0.4 \pm 0.9ab	1.0 \pm 0.9bc	1.3 \pm 0.7c	
Number of chickens with reisolation	1	5	4	11	15	
Protection (%) ^A	83a	65b	50b	25b	0b	

^AGroups with different lowercase letters in the same row are significantly different ($P < 0.05$).

serum HI antibody titers were transformed to base 10 logarithms as previously reported (9).

Challenge. Three weeks after the second immunization, all chickens were housed under isolated laboratory conditions, bled, and relocated into the five treatment groups; four groups were vaccinated (each group receiving one of the four vaccines), and the fifth group was unvaccinated control chickens. The chickens were then challenged by nasal instillation into the right nostril with 0.2 ml of an overnight broth culture of the *Av. paragallinarum* ESV-135 isolate containing approximately 5×10^8 colony forming units per milliliter, as reported previously (9). Clinical signs of infectious coryza were recorded from 1 to 7 days postchallenge as previously reported (10). Briefly, the presence and degree of any nasal discharge and facial swelling in the challenged chickens were scored as follows: 0, no signs; 1, nasal discharge or slight facial swelling; 2, nasal discharge and severe facial swelling; and 4, nasal discharge, severe facial swelling, and swelling of wattles (10). All chickens were then humanely euthanized, and both infraorbital sinuses were cultured onto blood agar with a *Staphylococcus epidermidis* nurse colony. Protection against infectious coryza was regarded as the absence of clinical signs of coryza during 7 days of observation and a failure to reisolate *Av. paragallinarum* (9).

Statistics. The protection rates were compared by chi-square tests and considered significant at a probability of $P < 0.05$ (9). The total clinical signs score for each group for each day was calculated by dividing the sum of the daily clinical signs score of all chickens within a group by the total number of chickens in the group (10). Differences in the overall mean clinical signs scores between challenged groups were analyzed by one-way ANOVA, the means were compared by Bonferroni test for ordinal variables, and differences were considered significant at a probability of $P < 0.05$ (10).

RESULTS

All chickens (0% protection) in the control group showed typical clinical signs of infectious coryza.

In the vaccinated chickens, the protection rates were 83%, 65%, 50%, and 25% for groups I, II, III, and IV, respectively (Table 1).

Table 2. Mean of hemagglutination-inhibition antibody titers in vaccinated chickens tested with hemagglutinins of reference strains (H-18 and Modesto) and isolate ESV-135 of *Avibacterium paragallinarum* included in the study.

Hemagglutinin antigen of strain (serovar)	Mean (\log_{10}) of HI antibody titers raised by vaccine ^A (No. of tested chickens)				
	I (17)	II (18)	III (19)	IV (18)	Control (18)
H-18 (C-1)	1.20a	1.44a	0.86b ^B	0.90b ^B	0.0c
Modesto (C-2)	1.49a	1.32a	1.27a	1.39a	0.0b
ESV-135 (C-1)	1.35ab	1.67a	1.06b	1.20b	0.0c

^AGroups with different lowercase letters in the same row are significantly different ($P < 0.05$).

^BMarked groups in the same columns are significantly different ($P < 0.05$).

Only vaccine I provided significant protection ($P < 0.05$) against challenge with isolate ESV-135.

In the vaccinated chickens, the mean clinical sign scores were 0.0, 0.3, 0.4, and 1.0 for groups I, II, III, and IV, respectively (Table 1). Only vaccine I gave a significantly lower clinical signs score ($P < 0.05$) than the control group. Group IV and the unvaccinated chickens group showed the highest clinical signs score.

All chickens showed no HI antibodies before the first vaccination. The results of the serologic testing are presented in Table 2. Reference strain H-18 hemagglutinin antigen gave the highest HI titers in groups I and II and were significantly different ($P < 0.05$) from groups III and IV. Reference strain Modesto hemagglutinin antigen gave HI titers that were not significantly different among groups I, II, III, and IV. Isolate ESV-135 hemagglutinin antigen gave the highest HI titers only in group II and was significantly different ($P < 0.05$) from groups I, III, and IV. No HI titers were detected in the unvaccinated group, and this group was significantly different ($P < 0.05$) from all the vaccinated groups.

DISCUSSION

Outbreaks of infectious coryza produced by *Av. paragallinarum* serovar C-1 isolates in vaccinated flocks from Ecuador and Mexico have been reported (5,8). In the current study, differences in the protection conferred by four commercially available infectious coryza vaccines were observed.

In a study of cross-protection of the nine serovar reference strains of *Av. paragallinarum*, differences between serovars C-1 and C-2 were reported (9). Chickens vaccinated with reference strain H-18 (serovar C-1) were protected in the homologous challenge, but a significantly lower protection against Modesto (serovar C-2) challenge was observed. In contrast, the Modesto (C-2) vaccine gave the same level of protection for both the homologous challenge and against the H-18 (C-1) challenge. In the current study, the

serovar C strains used in the vaccines evaluated are not known. It is possible that the significantly higher protection associated with vaccine I is due to the use of a serovar C-1 strain. However, for a better understanding of infectious coryza outbreaks in vaccinated chickens, the serovars of *Av. paragallinarum* included in a vaccine may need to be shown on the label.

In terms of serology, depending of the hemagglutinin antigen used, detectable HI titers were obtained, and differences in the HI titers were observed (Table 2). Groups I and II, which showed protection rates of 83% and 65%, showed the highest HI titers, which were significantly different ($P < 0.05$) from HI titers detected in groups III and IV (50% and 25% protection rates, respectively), when the ESV-135 isolate hemagglutinin antigen was used. Similarly, reference strain H-18 hemagglutinin antigen gave the highest HI titers in groups I and II and were significantly different ($P < 0.05$) from groups III and IV. In contrast, reference strain Modesto hemagglutinin antigen gave HI titers that were not significantly different among groups I, II, III, and IV. An apparent relationship between the highest HI titers and protection appears to exist. However, in infectious coryza vaccination-challenge trials, the HI titers are not regarded as definitive predictors of vaccine efficacy (6).

In conclusion, only one of four evaluated commercially available, trivalent infectious coryza vaccines gave a good level of protection against challenge with Mexican *Av. paragallinarum* serovar C-1. These results might explain the infectious coryza outbreaks in vaccinated flocks that have been observed in the field (8). Further immunogenic studies of serovar C-1 *Av. paragallinarum* isolates are needed.

REFERENCES

1. Blackall, P. J. Vaccines against infectious coryza. *World Poult. Sci. J.* 51:17–26. 1995.
2. Blackall, P. J., H. Christensen, T. Beckenham, L. L. Blackall, and M. Bisgaard. Reclassification of *Pasteurella gallinarum*, [*Haemophilus*] *paragallinarum*, *Pasteurella avium*, and *Pasteurella volantium* as *Avibacterium gallinarum* gen. nov., comb. nov., *Avibacterium paragallinarum* comb. nov.,

Avibacterium avium comb. nov. and *Avibacterium volantium* comb. nov. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 55:353–362. 2005.

3. 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.

4. Blackall, P. J., and E. Soriano-Vargas. Infectious coryza and related bacterial infections. In: *Diseases of poultry*, 13th ed. D. E. Swayne, J. R. Glisson, L. R. McDougald, L. K. Nolan, D. L. Suarez, and V. L. Nair, eds. Wiley-Blackwell Publishing, Ames, IA. pp. 859–868. 2013.

5. Cabrera, A., V. Morales-Erasto, C. Salgado-Miranda, P. J. Blackall, and E. Soriano-Vargas. Hemagglutinin serotyping of *Avibacterium paragallinarum* isolates from Ecuador. *Trop. Anim. Health Prod.* 43:549–551. 2011.

6. García, A., F. Romo, A. M. Ortíz, and P. J. Blackall. The vaccination-challenge trial: the gold standard test to evaluate the predictive efficacy of infectious coryza vaccines. *Avian Pathol.* 37:183–186. 2008.

7. García-Sánchez, A., V. Morales-Erasto, M. Talavera-Rojas, F. Robles-González, M. S. Allen, P. J. Blackall, and E. Soriano-Vargas. Phylogenetic relationship of serovar C-1 isolates of *Avibacterium paragallinarum*. *Avian Dis.* 58:143–146. 2014.

8. Morales-Erasto, V., A. García-Sánchez, C. Salgado-Miranda, M. Talavera-Rojas, F. Robles-González, P. J. Blackall, and E. Soriano-Vargas. ERIC-PCR genotyping of emergent serovar C-1 isolates of *Avibacterium paragallinarum* from Mexico. *Avian Dis.* 55:686–688. 2011.

9. Soriano, E. V., M. L. Garduño, G. Téllez, P. F. Rosas, F. Suárez-Güemes, and P. J. Blackall. Cross-protection study of the nine serovars of *Haemophilus paragallinarum* in the Kume haemagglutinin scheme. *Avian Pathol.* 33:506–511. 2004.

10. Soriano, V. E., G. M. Longinos, R. P. Fernández, Q. E. Velásquez, C. A. Ciprián, F. Salazar-García, and P. J. Blackall. Virulence of the nine serovar reference strains of *Haemophilus paragallinarum*. *Avian Dis.* 48:886–889. 2004.

ACKNOWLEDGMENTS

This work was funded by the Universidad Autónoma del Estado de México, project 3784/2014/CID. Vladimir Morales-Erasto was supported by Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT), México.

2. Evaluación de la serotipificación de *Avibacterium paragallinarum* mediante el uso de una prueba múltiple de reacción en cadena de la polimerasa.

Artículo publicado en

Journal of Veterinary Diagnostic Investigation (2014): 26, 272-276

An evaluation of serotyping of *Avibacterium paragallinarum* by use of a multiplex polymerase chain reaction

Vladimir Morales-Erasto, José de Jesús Posadas-Quintana, Manolo Fernández-Díaz, Luis E. Saravia, José Simón Martínez-Castañeda, Patrick J. Blackall, Edgardo Soriano-Vargas¹

Abstract. In the present study, the ability of a recently proposed multiplex polymerase chain reaction (mPCR) to determine the serogroups (A, B, and C) of *Avibacterium paragallinarum* was evaluated. A total of 12 reference strains and 69 field isolates of *Av. paragallinarum* from Ecuador, Mexico, Panama, and Peru were included in the study. With some exceptions (which were serotyped in the current study), all of the isolates and strains had been previously examined by 2 serotyping schemes (Page and Kume) or were the formal reference strains for the schemes. Three of 6 (50%) reference strains of serogroup A, 2 (100%) of serogroup B, and 1 of 4 (25%) reference strains of serogroup C were correctly serotyped by the mPCR. With the field isolates, the mPCR correctly recognized 16 of the 17 serogroup A isolates, 10 of the 12 serogroup B isolates, and 18 of the 37 serogroup C isolates. Overall, the specificity and sensitivity of the PCR test was as follows: 82.6% and 87.3% (serogroup A), 85.7% and 71.9% (serogroup B), and 46.3% and 100% (serogroup C). The poor performance of the mPCR in terms of recognition of serogroup C isolates (low sensitivity of 46.3%) and the relatively high level of uncertainty about the accuracy of the serogroup A and B results (specificity of 87.3% and 71.9%, respectively) means that the assay cannot be recommended as a replacement for conventional serotyping.

Key words: *Avibacterium paragallinarum*; infectious coryza; polymerase chain reaction; poultry; serotyping.

Avibacterium paragallinarum, a member of the family *Pasteurellaceae*, is the etiological agent of infectious coryza, which is an upper respiratory disease of chickens.¹ Economic loss can be considerable due to reduction in egg production (40%) and increased culling of growing chickens.⁴

Isolates of *Av. paragallinarum* are serotyped by using 2 related schemes. The Page scheme was originally developed with the use of a slide agglutination test to recognize the 3 serovars, A, B, and C.¹³ It is now recommended to use a hemagglutination inhibition (HI) test to serotype isolates by the Page scheme.² The Kume scheme was based on HI tests that recognized 7 serovars organized into 3 serogroups termed I, II, and III.¹⁰ In further studies, 2 new serovars were recognized into serogroups I and II.^{3,9} Subsequently, it was proposed to alter the Kume scheme nomenclature on the basis of recognition that the 3 Kume serogroups corresponded to the 3 Page serovars.⁹ Thus, the 9 recognized Kume serovars are termed A-1, A-2, A-3, A-4, B-1, C-1, C-2, C-3, and C-4.⁹ For the purpose of the current study, the Page types are termed serogroups, in recognition that these Page serogroups match the Kume serogroups. The procedures to serotype *Av. paragallinarum* isolates by any of these

schemes are complicated and require the use of production of hemagglutinating antigens, reference antisera, and the use of chicken erythrocytes fixed with glutaraldehyde.⁴

The polymerase chain reaction (PCR) has become a widely used laboratory tool for detection, identification, differentiation, and typing of pathogenic microorganisms in diagnosis of animal diseases. However, there is a need for critical evaluation of any proposed methodology.¹⁴ A PCR for the identification and detection of *Av. paragallinarum* has been reported^{7,8} and has been consistently shown to specifically recognize *Av. paragallinarum*.¹¹ However, this species-specific PCR does not identify serogroups and/or

From the Center for Advanced Investigations and Studies on Animal Health, Faculty of Veterinary Medicine and Zootechny, Autonomous University of the State of Mexico, Mexico (Morales-Erasto, Posadas-Quintana, Martínez-Castañeda, Soriano-Vargas); FARVET S.A.C., Chinchá Alta, Peru (Fernández-Díaz, Saravia); and the Queensland Alliance for Agriculture and Food Innovation, The University of Queensland, St Lucia, Queensland, Australia (Blackall).

¹Corresponding Author: Edgardo Soriano-Vargas, CIESA-FMVZ-UAEM, Instituto Literario No. 100, Col. Centro, Toluca 50000, México. soriano@uaemex.mx

Table 1. Origin, Page serogroup, Kume serovar, and multiplex polymerase chain reaction (mPCR) results for the *Avibacterium paragallinarum* strains and isolates included in the current study.*

Strain	Origin	Page serogroup	Kume serovar	mPCR serogroup
221	Japan	A	A-1	A
2403	Germany	A	A-2	B
E-3C	Brazil	A	A-3	B
HP14	Australia	A	A-4	B
2671	Germany	B	B-1	B
H-18	Japan	C	C-1	B
Modesto	USA	C	C-2	C
SA-3	South Africa	C	C-3	B
HP60	Australia	C	C-4	NT
0083	USA	A	A-1	A
0222	USA	B	B-1	B
NCTC 11296 ^T (CCUG 12835 ^T ; ATCC 29545)	Germany	A	A-2	A
	Field isolates			
L-10	Ecuador	A	A-3	NT
L-02; L-11; L-16; L-20; L-22; L-24; L-29; L-42; L-45; L-51; L-53; L-54	Ecuador	A	A-3	A
L-01; L-21; L-33	Ecuador	B	B-1	B
L-38	Ecuador	NT	NT	A
L-04; L-30	Ecuador	B	B-1	A
L-13	Ecuador	B	B-1	B
L-14	Ecuador	B	B-1	NT
L-12; L-43	Ecuador	NT	NT	C
L-26; L-31	Ecuador	C	C-1	A
L-27	Ecuador	C	C-1	C
ESV-226; ESV-238; ESV-240; ESV-244	Mexico	A	A-1	A
ESV-86; ESV-131; ESV-184	Ecuador	B	B-1	B
ESV-87; ESV-129; ESV-130; ESV-135; ESV-182; ESV-218; ESV-231; ESV-326; ESV-328; ESV-330; ESV-331; ESV-333; ESV-346	Ecuador	C	C-1	B
ESV-109; ESV-227; ESV334; ESV-338	Ecuador	C	C-1	A
ESV-241; ESV-242; ESV-243; ESV-245; ESV-246; ESV-247; ESV-249; ESV-323; ESV-324; ESV-343	Ecuador	C	C-1	C
ESV-117; ESV-142; ESV-143	Ecuador	C	C-2	C
ESV-75; ESV-76	Panama	B	B-1	B
Arequipa; Chinchá; Lima 1; Lima 2	Peru	C	C-2	C

* NT = nontypeable, band of a size that does not match as reported.

serovars of this bacterium. A previous study has shown the potential of a multiplex PCR (mPCR) assay to recognize the Page serogroups.¹⁵ This multiplex assay targets the *HMTp210* gene, which codes for an outer membrane protein associated with protection against challenge.¹⁷ It is known that a region within the *HMTp210* gene (termed region 2), shows, on the basis of a limited data set, sequence diversity between Page serogroups, a diversity that has been exploited in the proposed PCR.¹⁵ In the current study, this proposed PCR alternative to conventional serotyping has been evaluated with the full set of Page and Kume reference strains as well a number of diverse *Av. paragallinarum* field isolates. In this evaluation, the 2 inter-related conventional serotyping schemes have been accepted as the “gold standard.”

A total of 11 reference strains, representing the 3 Page serogroups and the 9 Kume serovars of *Av. paragallinarum*

were used in the study. Also, strain NCTC (National Collection of Type Cultures) 11296^T (CCUG [Culture Collection, University of Göteborg, Sweden]12835^T; ATCC [American Type Culture Collection] 29545^T) of *Av. paragallinarum* was used. Furthermore, 69 field isolates of *Av. paragallinarum* were included in the current study (Table 1). The isolates were from collections held by the Center for Advanced Investigations and Studies on Animal Health (Mexico) and FARVET (Peru) laboratories, and were obtained from infectious coryza outbreaks on different farms with no epidemiological connections. Of these 69 field isolates, a total of 65 (26 from Ecuador, 37 from Mexico, and 2 from Panama) had been previously serotyped by the Page and Kume schemes.^{5,6,12} Strain NCTC 11296^T and the Peruvian isolates were serotyped, in the current study, by the Page and Kume schemes using methods reported elsewhere.^{3,16}

Bacteria were maintained and propagated in brain-heart infusion broth and agar, both supplemented with 1% (w/v) sodium chloride, 0.0025% (w/v) reduced nicotinamide adenine dinucleotide (NADH), and 1% (v/v) filter-sterilized, heat-inactivated horse serum.¹² All reference strains and field isolates included in the study were examined by a serotyping mPCR as reported.¹⁵ Briefly, the genomic DNA was extracted by using a commercial kit,^a according to the manufacturer's instructions. The PCR reactions were performed in a total volume of 25 μ l containing 2.5 μ l of 10 \times PCR buffer included in the kit,^b 0.2 mM of each deoxyribonucleotide triphosphate, 0.2 μ M of each Page serovar-specific primer: ABC forward 5'-GGCTCACAGCTTTATGCAACGAA-3'; A reverse 5'-CGCGGGATTGTTGATTTTGT-3'; B reverse 5'-GGTGAATTCACCCACACCAC-3'; and C reverse 5'-TAATTTTCTTATTCCAGCATCAATACCAT-3'.¹⁵ A total of 1.25 units of *Taq* DNA polymerase^b and 2 μ l of extracted DNA were used. The amplification steps were as reported previously: 98°C for 1 min; 30 cycles of 98°C for 10 sec, 56°C for 10 sec and 72°C for 2 min, and a final step at 72°C for 7 min.¹⁵ The PCR products were subjected to agarose gel electrophoresis using 2% agarose, visualized, and photographed under ultraviolet light. Multiplex PCR serotyping of all isolates and reference strains included in the study were performed in both testing laboratories (Mexico and Peru).

The results of the multiplex serotyping were the same for all reference strains and field isolates in both testing laboratories (Table 1). Reference strains 221, 0083, 0222, and Modesto were correctly identified as serogroup A, A, B, and C, respectively, as previously reported.¹⁵ Reference strain 2671 (serogroup B) was identified as serogroup B. However, reference strains 2403, E-3C, and HP14 of serogroup A were misidentified as serogroup B. Similarly, reference strains H-18 and SA-3 of serogroup C were misidentified as B. Reference strain HP60 (serovar C-4) was nontypeable (Fig. 1). Strain NCTC 11296^T of *Av. paragallinarum* from Germany was serotyped for the first time and was recognized as serovar A-2, with the PCR correctly assigning the strain to serogroup A. Three of the field isolates that were nontypeable by the HI test were identified as serogroup A or serogroup C. Of the 17 field isolates of serogroup A, 16 were correctly assigned to serogroup A by the mPCR. Of the 12 serogroup B field isolates, 10 were correctly assigned to serogroup B. Of the 37 serogroup C field isolates, only 17 isolates were correctly recognized as serogroup C by the mPCR.

To fully evaluate the performance of the mPCR, the complete results for all the reference strains and the field isolates were assembled and the sensitivity, specificity, positive predictive value (PPV), and negative predictive value (NPV) were calculated (Table 2). Overall, the sensitivity of the PCR assay ranged from 46.3% (serogroup C) to a high of 85.7% (serogroup B). In terms of specificity, the assays varied from 71.9% (serogroup B) to 100% (serogroup C). The PPV varied from 40% (serogroup B) to 100% (serogroup C) while

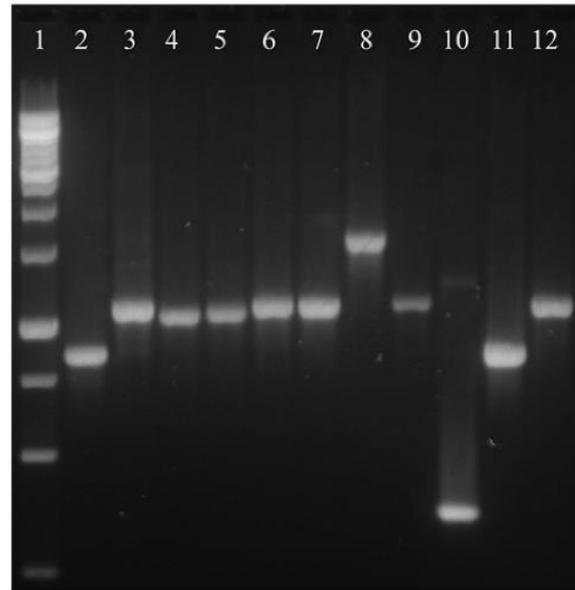


Figure 1. Agarose gel electrophoresis of multiplex polymerase chain reaction products from 11 *Avibacterium paragallinarum* reference strains included in the current study. Lane 1: molecular weight marker; lane 2: strain 221; lane 3: strain 2403; lane 4: strain E3-C; lane 5: HP14; lane 6: strain 2671; lane 7: H-18; lane 8: strain Modesto; lane 9: strain SA-3; lane 10: strain HP60; lane 11: strain 0083; lane 12: strain 0222.

the NPV varied from 62.7% (serogroup A) to 95.8% (serogroup B). Based on these results, field isolates that were nontypeable by the HI test may be misidentified by this mPCR.

The present study has confirmed the results of the initial evaluation of this mPCR,¹⁵ a study that was performed on a limited set of the reference strains and which indicated the possible potential of this assay. However, when evaluated on a more complete set of reference strains and a diverse set of field isolates, the limitations of the mPCR are clear. The results of the current study clearly show that the apparent link between sequence diversity in region 2 and Page serogroups only holds true for the small set of strains examined in the initial study that proposed the methodology.¹⁵ Indeed the evidence of greater diversity in the region has been shown in an earlier study using recombinant proteins based on region 2.¹⁷ This earlier study found that the HI antibodies elicited by a recombinant protein based on this region could be strain specific and not react with other strains of the same serovar.¹⁷ It is clear that there is no simple, direct connection between the regions targeted by the mPCR and Page serogroups. A more extensive study looking at the sequence of region 2 in a much larger and more diverse set of strains and isolates than that used in the original study¹⁵ may be able to identify alternative PCR assays that show a much closer alignment with Page serogroups.

The performance of the mPCR was poor with both the definitive internationally recognized reference strains as well as the field isolates. This poor level of performance with standard strains and field isolates strongly supports the

Table 2. Summarized results of the multiplex polymerase chain reaction (mPCR) assay as compared with conventional serotyping.*

mPCR result	Conventional serotyping result		Characteristics of the mPCR			
	Serogroup A	Not serogroup A	Sensitivity	Specificity	PPV	NPV
Serogroup A	19	7	82.6	87.3	73.1	92.3
Not serogroup A	4	48				
	Serogroup B	Not serogroup B	85.7	71.9	40.0	95.8
Serogroup B	12	18				
Not serogroup B	2	46				
	Serogroup C	Not serogroup C	46.3	100	100	62.7
Serogroup C	19	0				
Not serogroup C	22	37				

* PPV = positive predictive value; NPV = negative predictive value.

conclusion that it is the PCR results that are wrong and not the serotyping results. If the PCR had performed well with the reference strains (which by definition have to be correctly serotyped) and poorly with the field isolates, this would be an argument that the PCR was simply performing better than serotyping when examining field isolates. However, the poor performance of the PCR was found with both reference strains and field isolates.

The PCR did assign some isolates that were nontypeable by the conventional assay to a serovar. However, given the overall poor performance of the PCR assay, it is not possible to conclude if the PCR results for these nontypeable isolates are actually correct.

The original study on the mPCR also described an alternative technology—an assay in which a PCR using a different set of primers is followed up by a restriction fragment length polymorphism analysis to generate serogroup-specific patterns.¹⁵ This second technology has also only been evaluated with a very limited set of strains. Hence, this alternative technology also needs a thorough evaluation as it may also have the same limitations as have been found for the mPCR in the current study. The additional step of restriction digestion is a complication that many diagnostic laboratories may regard as too challenging for routine use. In conclusion, the mPCR cannot be recommended as an alternative to conventional serotyping of *Av. paragallinarum*.

Acknowledgements

The authors gratefully acknowledge Dr. Arturo Cabrera, LAVETEC CIA LTDA., Ecuador, for providing the Ecuadorian isolates of *Av. paragallinarum*.

Sources and manufacturers

- DNeasy blood & tissue kit, Qiagen, Hilden, Germany.
- Taq DNA polymerase recombinant, Invitrogen, Sao Paulo, Brazil.

Declaration of conflict interests

The author(s) declare no potential conflicts of interest with respect to the research, authorship, and/or publication of this article.

Funding

This work was supported by Universidad Autónoma del Estado de México, project 3102/2011. Vladimir Morales-Erasto held a scholarship from the Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT), Mexico.

References

- Blackall PJ, Christensen H, Beckenham T, et al.: 2005, Reclassification of *Pasteurella gallinarum*, [*Haemophilus*] *paragallinarum*, *Pasteurella avium* and *Pasteurella volantium* as *Avibacterium gallinarum* gen. nov., comb. nov., *Avibacterium paragallinarum* comb. nov., *Avibacterium avium* comb. nov. and *Avibacterium volantium* comb. nov. *Int J Syst Evol Microbiol* 55:353–362.
- Blackall PJ, Eaves LE, Aus G: 1990, Serotyping of *Haemophilus paragallinarum* by the Page scheme: comparison of the use of agglutination and hemagglutination-inhibition tests. *Avian Dis* 34:643–645.
- Blackall PJ, Eaves LE, Rogers DG: 1990, Proposal of a new serovar and altered nomenclature for *Haemophilus paragallinarum* in the Kume hemagglutinin scheme. *J Clin Microbiol* 28:1185–1187.
- Blackall PJ, Soriano EV: 2008, Infectious coryza and related bacterial infections. *In: Diseases of poultry*, ed. Saif YM, Barnes HJ, Glisson JR, et al., 12th ed., pp. 789–803. Iowa State University Press, Ames, IA.
- Cabrera A, Morales-Erasto V, Salgado-Miranda C, et al.: 2011, Hemagglutinin serotyping of *Avibacterium paragallinarum* isolates from Ecuador. *Trop Anim Health Prod* 43:549–551.
- Calderón EN, Thomas K, Morales-Erasto V, et al.: 2010, Identification of *Avibacterium paragallinarum* serovar B-1 from severe infectious coryza outbreaks in Panama. *Avian Dis* 54:1095–1097.

7. Chen X, Chen Q, Zhang P, et al.: 1998, Evaluation of a PCR test for the detection of *Haemophilus paragallinarum* in China. *Avian Pathol* 27:296–300.
8. Chen X, Mifflin JK, Zhang P, Blackall PJ: 1996, Development and application of DNA probes and PCR tests for *Haemophilus paragallinarum*. *Avian Dis* 40:398–407.
9. Eaves LE, Rogers DG, Blackall PJ: 1989, 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.
10. Kume K, Sawata A, Nakai T, Matsumoto M: 1983, Serological classification of *Haemophilus paragallinarum* with a hemagglutinin system. *J Clin Microbiol* 17:958–964.
11. Mifflin JK, Chen X, Bragg RR, et al.: 1999, Confirmation that PCR can be used to identify NAD-dependent and NAD-independent *Haemophilus paragallinarum* isolates. *Onderstepoort J Vet Res* 66:55–57.
12. Morales-Erasto V, García-Sánchez A, Salgado-Miranda C, et al.: 2011, ERIC-PCR genotyping of emergent serovar C-1 isolates of *Avibacterium paragallinarum* from Mexico. *Avian Dis* 55:686–688.
13. Page LA: 1962, *Haemophilus* infections in chickens. I. Characteristics of 12 *Haemophilus* isolates recovered from diseased chickens. *Am J Vet Res* 23:85–95.
14. Sachse K: 2004, Specificity and performance of PCR detection assays for microbial pathogens. *Mol Biotechnol* 26:61–80.
15. Sakamoto R, Kino Y, Sakaguchi M: 2012, Development of a multiplex PCR and PCR-RFLP method for serotyping of *Avibacterium paragallinarum*. *J Vet Med Sci* 74: 271–273.
16. Soriano VE, Blackall PJ, Dabo SM, et al.: 2001, Serotyping of *Haemophilus paragallinarum* isolates from Mexico by the Kume hemagglutinin scheme. *Avian Dis* 45:680–683.
17. Wu JR, Wu YR, Shien JH, et al.: 2011, Recombinant proteins containing the hypervariable region of the haemagglutinin protect chickens against challenge with *Avibacterium paragallinarum*. *Vaccine* 29:660–667.

**3. Relación filogenética de aislamientos de *Avibacterium
paragallinarum* de América.**

Artículo en redacción para su envío a la revista:
Veterinary Microbiology.

RESEARCH NOTE

Phylogenetic analysis of *Avibacterium paragallinarum* isolates from the Americas

V. Morales-Erasto,^A L. E. Saravia,^B F. Falconi-Agapito,^B M. Fernández-Díaz,^B
G. Luna-Galaz,^A P. J. Blackall,^C and E. Soriano-Vargas^{AD}

^ACentro de Investigación y Estudios Avanzados en Salud Animal, Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia, Universidad Autónoma del Estado de México, Toluca, 50200, México.

^BFARVET S.A.C. Carretera Panamericana Sur No. 766, Chincha Alta, Ica, Perú.

^CQueensland Alliance for Agriculture and Food Innovation, The University of Queensland, St Lucia 4072, Australia.

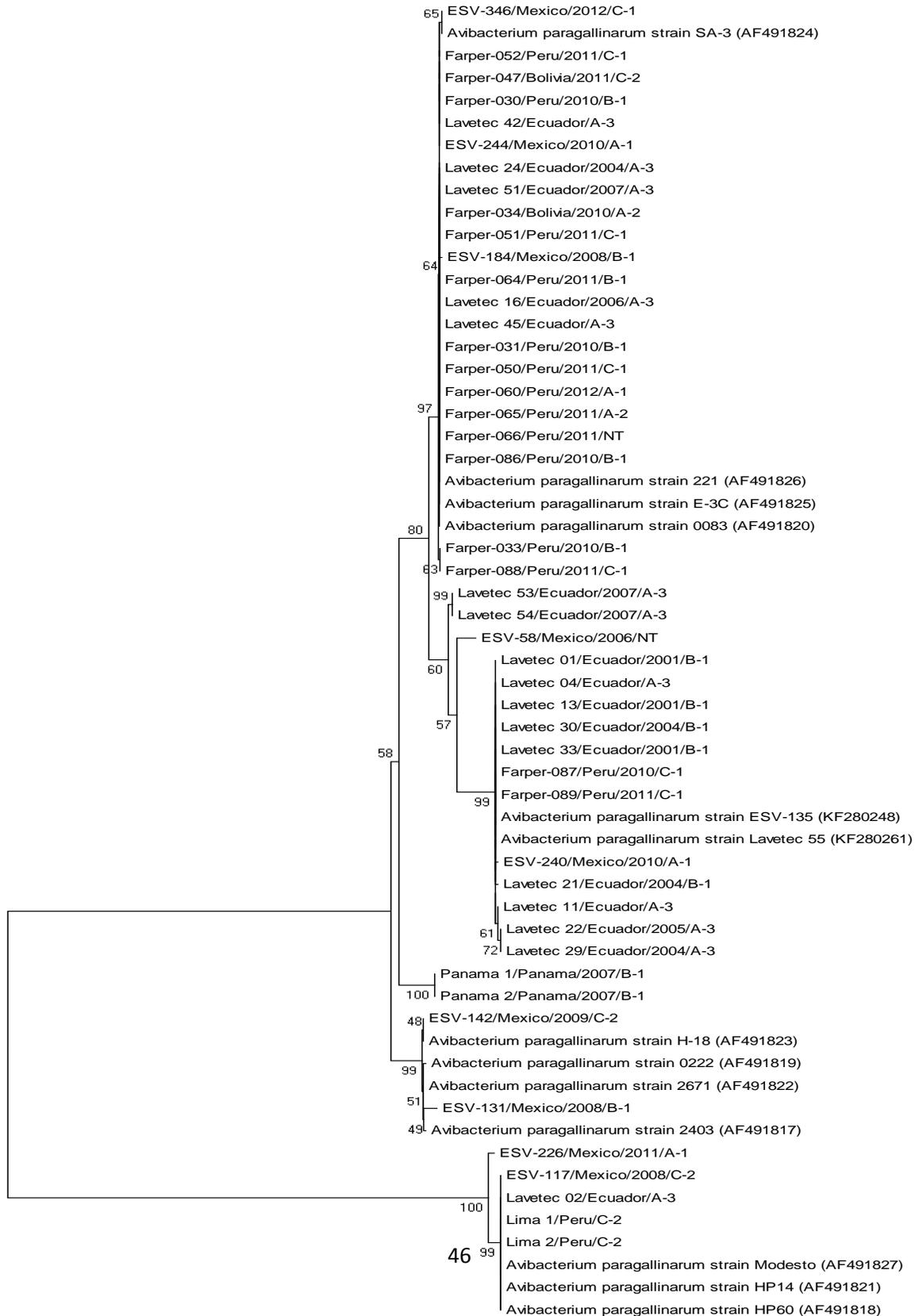
Running title: Phylogenetic analysis of *Avibacterium paragallinarum* from the Americas

^DCorresponding author: Edgardo Soriano-Vargas

Postal address: CIESA, FMVZ, UAEM. Carretera Panamericana Toluca-Atlacomulco km 15.5, Toluca 50200, México.

Telephone/Fax: + 55 722 2965555; E-mail: soriano@uaemex.mx

Figura 2. Árbol filogenético de cepas de referencia y aislamientos de *Av. paragallinarum* incluidos en el estudio basados en el análisis de neighbor-joining de las secuencias del gen *hagA*. La barra de escala representa la variación.



VIII. DISCUSIÓN GENERAL

Aislamientos de la serovariedad C-1 de *Av. paragallinarum* han sido reportados en México (Morales-Erasto *et al.*, 2011) y Ecuador (Cabrera *et al.*, 2011). Los aislamientos obtenidos de México, fueron identificados a partir de brotes de coriza infecciosa en parvadas inmunizadas contra coriza infecciosa, mediante la prueba de ERIC-PCR, se sugirió que los aislamientos pudieran tener un origen clonal. Previamente, en México, se han identificado aislamientos de la misma serovariedad genéticamente diferentes mediante la prueba de ERIC-PCR (Soriano *et al.*, 2004), contrario a lo observado con aislamientos de la serovariedad C-1 de México y Ecuador.

En 2014, García-Sánchez *et al.* (2014), mediante la secuenciación de los genes *hagA* y 16S rRNA de aislamientos C-1, concluyeron que los aislamientos de México y Ecuador de la serovariedad C-1 están estrechamente relacionados, sin embargo, el origen de esta relación clonal es desconocido. Es importante conocer la relación genética entre aislamientos, debido a que organismos genéticamente relacionados, comparten un origen común, por lo tanto, comparten factores de virulencia, características bioquímicas y características genéticas (Olive y Bean, 1999).

En el presente estudio, la protección conferida por bacterinas comerciales frente a un aislamiento de la serovariedad C-1 de México, fue evaluada mediante la infección experimental de pollos SPF, diferencias en los porcentajes de protección fueron observadas. Factores como la dosis del antígeno, agentes inactivantes y tipos de adyuvantes son factores importantes en la elaboración de bacterinas (Blackall, 1995). Adicionalmente, otro factor importante para la eficacia de las bacterinas en campo es la composición de las mismas, para el caso del serogrupo C, en un estudio de protección cruzada se reportaron diferencias entre cepas pertenecientes a las serovariedades C-1 y C-2 (Soriano *et al.*, 2004). Pollos vacunados con la cepa H-18 (serovariedad C-1) fueron protegidos en un desafío homólogo, sin embargo, aves desafiadas con la cepa Modesto (serovariedad C-2), mostraron una significativa menor protección. De manera similar, en aves

inmunizadas con la cepa Modesto (serovariedad C-2) y desafiadas con la cepa Modesto (serovariedad C-2) y la cepa H-18 (serovariedad C-1), se observaron porcentajes similares de protección en el desafío (70%). En el presente estudio, la composición de las bacterinas evaluadas fue desconocida, es posible que los más altos porcentajes de protección estuvieran relacionados con el uso de cepas o aislamientos de la serovariedad C-1. Sin embargo, estudios de protección con cepas de referencia del serogrupo C y de manera homóloga con aislamientos de la serovariedad C-1 son necesarios.

En el presente estudio, los títulos de anticuerpos inhibidores de la hemoaglutinación (IH) revelaron que los grupos de aves donde se observaron los mayores porcentajes de protección, tuvieron los mayores títulos de anticuerpos IH al evaluarlos contra antígenos de la cepa de referencia H-18 y el aislamiento ESV-135, ambos de la serovariedad C-1. Una aparente relación entre la presencia de títulos de anticuerpos IH y la protección, ha sido observada previamente (Soriano *et al.*, 2004). Sin embargo, García *et al.* (2008), observaron diferencias entre aves con anticuerpos IH y protección, concluyendo que la prueba de desafío es la prueba más adecuada para la evaluación de bacterinas de coriza infecciosa (García *et al.*, 2008).

En conclusión, únicamente 1 de 4 bacterinas evaluadas tuvo un porcentaje de protección mayor al 80% frente al aislamiento ESV-135 de la serovariedad C-1 de *Av. paragallinarum*. Estos resultados, pudieran explicar los brotes de coriza infecciosa en parvadas inmunizadas que han sido observados en la avicultura mexicana.

Adicionalmente, para la identificación oportuna de serogrupos de *Av. paragallinarum*, una PCR múltiple fue reportada (Sakamoto *et al.*, 2012). En el presente estudio, evaluamos la capacidad de esta PCR múltiple para la identificación de serogrupos de cepas de referencia de las 9 serovariedades existentes y aislamientos previamente tipificados de las serovariedades A-1, A-3, B-1, C-1 y C-2 provenientes de Ecuador, México, Panamá y Perú. Al realizar la evaluación de la PCR múltiple, se observaron discrepancias entre los resultados

obtenidos, El diseño de los iniciadores reportados, se realizó basado en el gen HMTp210 reportado previamente (Noro *et al.*, 2007 y Noro *et al.*, 2008). El gen cuenta con una región variable, donde se encuentran los mayores cambios entre las cepas utilizadas para el diseño de iniciadores para la PCR múltiple (Sakamoto *et al.*, 2012). La utilización de un número limitado de cepas de referencia y aislamientos utilizados para el diseño de los iniciadores, pudiera ser la causa de que los iniciadores no tuvieran el resultado esperado. Es probable que la región variable del gen *HMTp210*, sea más variable de lo esperado. Para el diseño de nuevos iniciadores, es probable que sea necesaria una evaluación con un mayor número de cepas de referencia y aislamientos de *Av. paragallinarum*.

El análisis de las secuencias del gen 16S rRNA de aislamientos de Bolivia, Ecuador, México, Panamá y Perú, mostraron que un gran número de aislamientos de las serovariedades A-1, A-3, B-1 y C-2, están relacionados genéticamente con los aislamientos de la serovariedad C-1 de México y Ecuador previamente reportados (García-Sánchez *et al.*, 2014), es interesante, que al realizar los análisis filogenéticos con cepas de referencia de diferentes orígenes, se agrupan dentro de un mismo genogrupo únicamente aislamientos provenientes de América, proponiendo que estos aislamientos pudieran pertenecer a un genogrupo diferente. Los aislamientos se agruparon en un mismo genogrupo aun siendo de serovariedades diferentes, debido a que el gen 16S rRNA, codifica para una proteína diferente a la de la hemoaglutinina que es la que le confiere la serovariedad. En un estudio previo, Hobb *et al.* (2002), no encontraron correlación entre las serovariedades de las cepas de referencia utilizadas comparadas con los resultados del análisis filogenético de las secuencias analizadas del gen *hagA*, sugiriendo que las diferencias entre las serovariedades pudieran estar dadas por otras hemoaglutininas diferentes, bloqueo de anticuerpos dirigidos a proteínas alternativas o modificaciones posteriores a la transcripción (Hobb *et al.*, 2002).

Estudios filogenéticos basados en genes *housekeeping* y otros genes, como el gen *HMTp210*, pudieran ser necesarios para tener un mayor poder discriminatorio en estudios filogenéticos de los aislamientos estudiados.

IX. CONCLUSIONES

La protección conferida por bacterinas comerciales frente a un aislamiento de *Av. paragallinarum* de la serovariedad C-1 (ESV-135) es muy diversa, únicamente una de cuatro bacterinas evaluadas tuvo un porcentaje de protección mayor al 80%, estos resultados pudieran explicar los brotes de coriza infecciosa de aislamientos de la serovariedad C-1 observados en el campo.

La prueba de PCR múltiple previamente reportada, no fue capaz de tipificar cepas de referencia y aislamientos de diferentes serovariedades provenientes de América, por lo tanto, la prueba de PCR múltiple no se sugiere para sustituir a la prueba de inhibición de la hemoaglutinación (IH) para la tipificación de aislamientos de *Av. paragallinarum*.

La secuenciación y análisis filogenéticos de las secuencias de los genes *hagA* y 16S rRNA de aislamientos de *Av. paragallinarum* de Bolivia, Ecuador, Panamá, Perú y México, permitió agrupar ciertos aislamientos con cepas de referencia previamente reportadas. Adicionalmente, el análisis basado en el gen 16S rRNA permitió la identificación de un genogrupo de aislamientos de América. El presente estudio muestra la necesidad de seguimiento de aislamientos de *Av. paragallinarum* a partir de brotes de coriza infecciosa para determinar la posible prevalencia o emergencia de serovariedades y genogrupos de *Av. paragallinarum*. El análisis de más aislamientos de América es necesario para confirmar el genogrupo identificado.

X. BIBLIOGRAFÍA

Altschul SF, Gish W, Miller W, Myers EW, Lipman DJ. (1990): Basic local alignment search tool. *J Mol Biol.* 215:403-410.

Blackall PJ, Christensen H, Beckenham T, Blackall LL, Bisgaard M. (2005): Reclassification of *Pasteurella gallinarum*, [*Haemophilus*] *paragallinarum*, *Pasteurella avium* and *Pasteurella volantium* as *Avibacterium gallinarum* gen. nov., comb. nov., *Avibacterium paragallinarum* comb. nov., *Avibacterium avium* comb. nov. and *Avibacterium volantium* comb. nov. *Int J Syst Evol Microbiol.*, 55: 353- 362.

Blackall PJ, Eaves LE, Rogers DG. (1990): Proposal of a new serovar and altered nomenclature for *Haemophilus paragallinarum* in the Kume hemagglutinin scheme. *J Clin Microbiol.*, 28:1185-1187.

Blackall PJ, Christensen H, Bisgaard M. (2011): Unusual growth variants of *Avibacterium paragallinarum*. *Aust Vet J.* 89:273-275.

Blackall PJ (1995): Vaccines against infectious coryza. *World's Poult Sci J.*, 51:17-26.

Blackall PJ y Soriano-Vargas E (2013): Infectious coryza and related bacterial infections. In: *Diseases of Poultry*, 13th ed. Swayne DE, Glisson JR, McDougald LR, Nolan LK, Suarez DL y Nair VL, eds. Wiley-Blackwell Publishing, Ames, IA. pp. 859-868.

- Cabrera A, Morales-Erasto V, Salgado-Miranda C, Blackall PJ, Soriano-Vargas E.(2010): Hemagglutinin serotyping of *Avibacterium paragallinarum* isolates from Ecuador. *Trop Anim Health Prod.*
- Calderón EN, Thomas K, Morales-Erasto V, Salgado-Miranda C, Soriano-Vargas E. (2010): Identification of *Avibacterium paragallinarum* serovar B-1 from severe infectious coryza outbreaks in Panama. *Avian Dis.*, 54:1095-1097.
- Christensen H, Kuhnert P, Olsen JE, Bisgaard M. (2004): Comparative phylogenies of the housekeeping genes atpD, infB and rpoB and the 16S rRNA gene within the Pasteurellaceae. *Int J Syst Evol Microbiol.* 54:1601-1609.
- Chukiatsiri K, Sasipreeyajan J, Neramitmansuk W, Chansiripornchai N. (2009): Efficacy of autogenous killed vaccine of *Avibacterium paragallinarum*. *Avian Dis.* 53:382-386.
- Fernández RP, Colíndres HL, Velásquez QE, Soriano VE, Blackall PJ. (2005): Protection conferred by bivalent and trivalent infectious coryza bacterins against prevalent serovars of *Avibacterium (Haemophilus) paragallinarum* in Mexico. *Avian Dis.*, 49:585-587.
- García A, Romo F, Ortiz AM, Blackall PJ. (2008): The vaccination-challenge trial: the gold standard test to evaluate the protective efficacy of infectious coryza vaccines. *Avian Pathol.*, 37:183-186.

- García-Sánchez A, Morales-Erasto V, Talavera-Rojas M, Robles-González F, Allen MS, Blackall PJ, Soriano-Vargas E. (2014): Phylogenetic relationship of serovar C-1 isolates of *Avibacterium paragallinarum*. *Avian Dis.* 58:143-146.
- Hobb RI, Tseng HJ, Downes JE, Terry TD, Blackall PJ, Takagi M, Jennings MP. (2002): Molecular analysis of a haemagglutinin of *Haemophilus paragallinarum*. *Microbiology.* 148:2171-2179.
- Jacobs AA, Cuenen W, Storm PK. (1992): Efficacy of a trivalent *Haemophilus paragallinarum* vaccine compared to bivalent vaccines. *Vet Microbiol.* 32:43-49.
- Kume K, Sawata A, Nakai T, Matsumoto M. (1983): Serological classification of *Haemophilus paragallinarum* with a hemagglutinin system. *J Clin Microbiol.*, 17:958-964.
- Morales-Erasto V, García-Sánchez A, Salgado-Miranda C, Talavera-Rojas M, Robles-González F, Blackall PJ, Soriano-Vargas E. (2011): ERIC-PCR genotyping of emergent serovar C-1 isolates of *Avibacterium paragallinarum* from Mexico. *Avian Dis.*, 55:686-688.
- Noro T, Oishi E, Kaneshige T, Yaguchi K, Amimoto K, Shimizu M. (2008): Identification and characterization of haemagglutinin epitopes of *Avibacterium paragallinarum* serovar C. *Vet Microbiol.* 131:406-413.
- Noro T, Yaguchi K, Amimoto K, Oishi E. (2007): Identification and expression of a gene encoding an epitope that induces hemagglutination inhibition antibody to *Avibacterium paragallinarum* serovar A. *Avian Dis.* 51:84-89.

- Olive DM y Bean P. (1999): Principles and applications of methods for DNA-based typing of microbial organisms. *J Clin Microbiol.* 37:1661-1669.
- Page LA (1962): *Haemophilus* infections in chickens. I. Characteristics of 12 *Haemophilus* isolates recovered from diseased chickens. *Am J Vet Res.*, 23:85-95.
- Saitou N, Nei M. (1987): The neighbor-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees. *Mol Biol Evol.* 4:406-425.
- Sakamoto R, Kino Y, Sakaguchi M. (2012): Development of a multiplex PCR and PCR-RFLP method for serotyping of *Avibacterium paragallinarum*. *J Vet Med Sci.* 74:271-273.
- Soriano VE, Blackall PJ, Dabo SM, Téllez G, García-Delgado GA, Fernández RP. (2001): Serotyping of *Haemophilus paragallinarum* isolates from Mexico by the Kume hemagglutinin scheme. *Avian Dis.*, 45:680-683.
- Soriano VE, Longinos GM, Fernández RP, Velásquez QE, Ciprián CA, Salazar-García F, Blackall PJ. (2004a): Virulence of the nine serovar reference strains of *Haemophilus paragallinarum*. *Avian Dis.*, 48:886-889.
- Soriano VE, Longinos GM, Téllez G, Fernández RP, Suárez-Güemes F, Blackall PJ. (2004b): Cross- protection study of the nine serovars of *Haemophilus*

paragallinarum in the Kume haemagglutinin scheme. *Avian Pathol.*, 33:506-511.

Soriano VE, Téllez G, Hargis BM, Newberry L, Salgado-Miranda C, Vázquez CJ. (2004c): Typing of *Haemophilus paragallinarum* strains by using enterobacterial repetitive intergenic consensus-based polymerase chain reaction. *Avian Dis.*, 48:890-895.

Takagi M, Hirayama N, Makie H, Ota S. (1991) Production, characterization and protective effect of monoclonal antibodies to *Haemophilus paragallinarum* serotype A. *Vet. Microbiol.* 27:327–338.

Tamura K, Peterson D, Peterson N, Stecher G, Nei M, Kumar S. (2011): MEGA5: molecular evolutionary genetics analysis using maximum likelihood, evolutionary distance, and maximum parsimony methods. *Mol Biol Evol.* 28:2731-9.

van Belkum A, Struelens M, de Visser A, Verbrugh H, Tibayrenc M. (2001): Role of genomic typing in taxonomy, evolutionary genetics, and microbial epidemiology. *Clin. Microbiol. Rev.*, 14:547-560.

Yamaguchi T, Kobayashi M, Masaki S, Iritani Y. (1993): Isolation and characterization of a *Haemophilus paragallinarum* mutant that lacks a hemagglutinating antigen. *Avian Dis.* 37(4):970-976.