



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL ESTADO DE MÉXICO

MAESTRÍA EN CIENCIAS AGROPECUARIAS Y RECURSOS NATURALES

TESIS

Tipificación, análisis filogenético y sensibilidad antimicrobiana de aislamientos de
Avibacterium paragallinarum del estado de Sonora

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

PRESENTA:

M.V.Z. LINDA PATRICIA LUNA CASTREJÓN

TUTOR ACADÉMICO:

Dr. en C. Edgardo Soriano Vargas

TUTORES ADJUNTOS:

Dra. en C. Celene Salgado Miranda

Dr. en C. Martín Talavera Rojas

El Cerrillo Piedras Blancas, Toluca, Estado de México, octubre, 2020.

AGRADECIMIENTOS

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT), por la beca otorgada durante mis estudios de Maestría.

Al CIESA, FMVZ, UAEM, por permitirme realizar mi investigación dentro de sus instalaciones.

A la industria farmacéutica Pecuarius Laboratorios S.A. de C.V. por proporcionarme los aislamientos de *Avibacterium paragallinarum* para el proyecto y darme la oportunidad de realizar una estancia de investigación.

Al laboratorio GD Animal Health por permitirme realizar una estancia de investigación y por el financiamiento para realizar parte de mi proyecto.

A Rianne Butter y Refke Peerboom por su asistencia técnica en GD Animal Health.

Al Dr. Soriano por confiar en mis capacidades e impulsarme a lograr todos mis propósitos durante la Maestría.

A mis tutores adjuntos, la Dra. Celene Salgado y el Dr. Martín Talavera por su tiempo y asesoría durante la Maestría.

A la Dra. Anneke Feberwee por su hospitalidad, apoyo, compañía y enseñanza durante mi estancia en el laboratorio GD Animal Health.

A mis amigos, Gabriel Pantoja, Marycruz, Hector Trujillo por su enseñanza y motivación.

A mis padres por creer en mi y brindarme su apoyo en todo momento.

A Carlos por estar conmigo en las buenas y en las malas y ser un ejemplo a seguir en mi vida profesional.

“La esperanza es esa cosa con plumas”.

Emily Dickinson.



ÍNDICE DE FIGURAS Y CUADROS

FIGURAS

Figura 1. Productos de PCR específico HPG-2 (0.5 kb) de los aislamientos de <i>Avibacterium paragallinarum</i> incluidos en este estudio	32
Figura 2. Árbol filogenético de las secuencias del gen 16S rRNA de los aislamientos y cepas de referencia de <i>Avibacterium paragallinarum</i> incluidos en este estudio	33
Figura 3. Árbol filogenético que muestra los diferentes genotipos del gen HPG-2 de aislamientos y cepas de referencia de <i>Avibacterium paragallinarum</i> de Sonora incluidos en este estudio	34

CUADROS

Cuadro 1. Historia clínica de los aislamientos de <i>Avibacterium paragallinarum</i> incluidos en este estudio	30
Cuadro 2. Identificación, origen, número de caso, año de aislamiento, serogrupo, serovariedad, genotipo HPG-2 de los aislamientos de <i>Avibacterium paragallinarum</i> incluidos en este estudio	31
Cuadro 3. Sensibilidad antimicrobiana de los aislamientos de <i>Avibacterium paragallinarum</i> incluidos en el presente estudio	35

CONTENIDO

RESUMEN	v
ABSTRACT	vii
I. INTRODUCCIÓN	1
II. REVISIÓN DE LITERATURA	3
III. JUSTIFICACIÓN	16
IV. HIPÓTESIS	17
V. OBJETIVOS	18
VI. MATERIALES Y MÉTODOS	19
VII. LÍMITE DE TIEMPO Y ESPACIO	25
VIII. RESULTADOS	26
Artículo enviado a la revista <i>Avian Diseases</i>	28
IX. DISCUSIÓN GENERAL	36
X. CONCLUSIONES	39
XI. BIBLIOGRAFÍA	40

Resumen

La coriza infecciosa es una enfermedad del tracto respiratorio superior de los pollos causada por la bacteria *Avibacterium paragallinarum*. La enfermedad esta presente donde se crían pollos y ocasiona pérdidas económicas en la industria avícola. La clasificación serológica de *A. paragallinarum* se basa en dos esquemas: Page que reconoce tres serogrupos (A, B y C) y Kume que reconoce nueve serovariedades (A-1 a A-4, B-1, y C-1 a C-4). Actualmente, en México, se han identificado las serovariedades A-1, B-1, C-1 y C-2. En 2011, la serovariedad C-1 se identificó por primera vez en aislamientos de *A. paragallinarum* en aves bacterinizadas contra coriza infecciosa en México. Adicionalmente, estudios de genotipificación basados en la técnica de ERIC-PCR y análisis filogenético basado en el gen 16S rRNA, mostraron que los aislamientos C-1 de México y Ecuador compartían el mismo genotipo y que estaban estrechamente relacionados. En Sonora, la situación epidemiológica se conoce poco. Hasta 2004, solo el serogrupo B había sido identificado con dos genotipos diferentes. Además, la sensibilidad antimicrobiana de los aislamientos, que puede ayudar en cierta manera en la elección del tratamiento de coriza infecciosa se desconocen en esta región. Con base en lo anterior, se realizó la serotipificación mediante el esquema de Page, genotipificación mediante el análisis de secuencias HPG-2, análisis filogenético de los genes 16S rRNA y HPG-2 y la determinación de la sensibilidad antimicrobiana de ocho aislamientos de *A. paragallinarum* del estado de Sonora. Los aislamientos en este estudio, fueron obtenidos de brotes de coriza infecciosa en aves inmunizadas con una bacterina trivalente. Todos los aislamientos fueron NAD-dependientes, catalasa negativos. Los aislamientos fueron identificados como *A. paragallinarum* mediante las técnicas de HPG-2, PCR y MALDI-TOF, así como la secuencia nucleotídica del gen 16S rRNA. Los serogrupos A, B y C de Page fueron identificados. El análisis filogenético basado en el gen 16S rRNA reveló dos grupos de aislamientos de *A. paragallinarum*. El grupo 2 presentó la secuencia TTTTT en las posiciones 182-186. El grupo 1 mostró la delección de la secuencia. El análisis genético de las secuencias HPG-2, mostró tres tipos diferentes: ST 1, ST 4 y ST 11. La ST 4 incluyó los

aislamientos PL-07, PL-08, PL-09, PL-01 y ESV-135, todos serogrupo C. Estudios previos han mostrado una relación clonal entre aislamientos americanos del serogrupo C. La ST 1 incluyó los aislamientos PL-06 y PL-05, serogrupos B y C, respectivamente. La ST 11 se identificó previamente en aislamientos de Holanda e incluyó los aislamientos PL-04 y PL-10, serogrupo A. Todos los aislamientos fueron susceptibles a la tetraciclina y eritromicina. El presente estudio parece ser el más extenso en la identificación y caracterización de aislamientos de *A. paragallinarum* de Sonora. Los resultados del presente estudio guiarán en el estudio de la antigenicidad e inmunogenicidad de las bacterinas empleadas en la zona, ya que inmunotipos diferentes a los incluidos en las bacterinas, podrían aparecer en los brotes de coriza infecciosa.

Palabras claves: *Avibacterium paragallinarum*, tipificación, Sonora, genotipificación, análisis filogenético, sensibilidad antimicrobiana, coriza infecciosa.

Abstract

Infectious coryza is an upper respiratory disease of chickens caused by the bacterium *Avibacterium paragallinarum*. The disease is occurring wherever chickens are raised and causes economically losses in the poultry industry. The serological classification of *A. paragallinarum* is based on two schemes, Page that recognizes three serogroups (A, B and C) and Kume that recognizes nine serovars (A-1 to A-4, B-1, y C-1 to C-4). Currently, In Mexico serovars A-1, A-2, B-1, C-1 and C-2 have been identified. In 2011, serovar C-1 were first identified in *A. paragallinarum* isolates in vaccinated chickens against infectious coryza in Mexico. In addition, a genotyping study based on ERIC-PCR test and phylogenetic analysis based on 16S rRNA gene, showed the C-1 isolates from Mexico and Ecuador shared the same genotype and were closely relationship. In Sonora, the epidemiological situation a little is known. Until 2004, serogroup B only have been identified with two different genotypes, likewise, antimicrobial susceptibility from isolates, which may help anywise in the choice of treatment for infectious coryza are unknown in that region. Based on the above, serotyping was performed by the Page scheme, the genotyping based on HPG-2 sequence analysis, phylogenetic analysis by 16S rRNA and HPG-2 gene and determination of the antimicrobial sensitivity *A. paragallinarum* of eight isolates the Sonora state. The isolates in this study were obtained from outbreaks of infectious coryza in immunized chickens with a trivalent vaccine. All isolates were NAD-dependent and negative catalase. The isolates were identified as *A. paragallinarum* by HPG-2, PCR and MALDI-TOF test, as well as the nucleotide sequence 16S rRNA gen. The Page serogroup A, B and C were identified. The phylogenetic analysis based on 16S rRNA gene showed the presence of two cluster of *A. paragallinarum* isolates. The cluster 2 showed the TTTTT sequence on the position 182-186. The cluster 1 showed the deletion of the TTTTT sequence. The genetic analysis HPG-2 sequences showed the presence of 3 different types: ST 1, ST 4 and ST 11. The ST 4 were included the PL-07, PL-08, PL-09 y PL-01 and ESV-135 isolates, all from serogroup C. Previous studies have been showing a clonal relationship between American isolates of serogroup C. The ST 1 were included PL-06 and PL-05 isolates,

serogroup B and C respect. The ST 11 were identified previously in Holland isolates and were included PL-04 and PL-10 isolates, serogroup A. All the isolates were tetracycline and erythromycin susceptibility. The present study seems be the most extensive in the identification and characterization of *A. paragallinarum* isolates from Sonora. The results of the present study will guide the immunogenicity and antigenicity study of the bacterins used in the area, since different immunotypes, different from those include bacterins could appear in outbreaks of infectious coryza.

Key words: *Avibacterium paragallinarum*, typing, Sonora, genotyping, phylogenetic analysis, antimicrobial sensibility, infectious coryza.

I. INTRODUCCIÓN

La coriza infecciosa es una enfermedad causada por la bacteria *Avibacterium paragallinarum* que pertenece a la familia Pasteurellaceae y afecta el tracto respiratorio superior de los pollos (Blackall y Soriano-Vargas, 2020). La enfermedad ocurre en todo el mundo donde se crían pollos y es un problema común en la industria avícola, ya que genera pérdidas económicas en la producción de huevo, disminuyendo entre 10% a 40% (Blackall y Soriano-Vargas, 2020).

Antigénicamente *A. paragallinarum* se clasifica de acuerdo con el esquema de aglutinación en placa propuesto por Page, (1962) que reconoce tres serogrupos: A, B y C, y el esquema de hemoaglutininas de Kume que reconoce nueve serovariedades: A-1 a A-4, B-1 y C-1 a C-4 (Blackall *et al.*, 1990). La distribución de serovariedades en el mundo es la siguiente: A-4, C-2 y C-4 en Australia, A-1, A-2, B-1 y C-2 en Alemania, A-1 y C-2 en Japón, A-1, B-1, C-2 y C-3 en Sudáfrica, C-3 en Zimbabwe e Israel (Morales-Erasto *et al.*, 2011). Recientemente, se identificaron las serovariedades A-1, A-2 y B-1 en Holanda, siendo la serovariedad A-1 la más frecuente y virulenta para los pollos (Feberwee *et al.*, 2019). En América, se han identificado las serovariedades: A-1, B-1 y C-2 en Estados Unidos de América, A-3 en Brasil, B-1 en Panamá, A-3, B-1 y C-1 en Ecuador (Morales-Erasto *et al.*, 2011; Cabrera *et al.*, 2011).

De manera particular, en México, se han identificado las serovariedades A-1, A-2, B-1, C-1 y C-2 (Morales-Erasto *et al.*, 2011; Soriano *et al.*, 2001). En Sonora, se identificó la serovariedad B-1 y dos genotipos ERIC-PCR (Soriano *et al.*, 2004c). La tipificación genética es importante para conocer la situación epidemiológica en una determinada región. La técnica de ERIC-PCR ha sido extensamente utilizada para la genotipificación de cepas y aislamientos de *A. paragallinarum* (Soriano *et al.*, 2004c). Sin embargo, recientemente un análisis de secuencias HPG-2 de aislamientos *A. paragallinarum* de Países Bajos mostrarán resultados concordantes con la genotipificación ERIC-PCR, ya que ambas técnicas agruparon a los mismos aislamientos (Feberwee *et al.*, 2019). Así mismo, el análisis filogenético basado en

el gen 16S rRNA permite ver las relaciones evolutivas y las distancias entre aislamientos y cepas de *A. paragallinarum* (García-Sánchez *et al.*, 2014). En el 2011, aislamientos serovariedad C-1 de México y Ecuador mostraron una relación clonal (Morales-Erasto *et al.*, 2011). El análisis filogenético basado en los genes *hagA* y 16S rRNA, incluyó en el mismo grupo monofilético aislamientos C-1 de México y Ecuador, distantes de la cepa de referencia H-18 serovariedad C-1 (García-Sánchez *et al.*, 2014). Ahora, la situación epidemiológica respecto a los brotes de coriza infecciosa en Sonora se conoce poco. El estudio de la sensibilidad antimicrobiana también contribuye al conocimiento de la epidemiología de *A. paragallinarum* y la coriza infecciosa.

Por lo tanto, el objetivo de este trabajo fue realizar la serotipificación, genotipificación, análisis filogenético y la sensibilidad antimicrobiana de aislamientos de *A. paragallinarum* obtenidos de brotes de coriza infecciosa en Sonora.

II. REVISIÓN DE LITERATURA

Etiología

La enfermedad de coriza infecciosa es causada por *Avibacterium paragallinarum*, una bacteria gram negativa en forma de cocobacilo con tendencia al pleomorfismo que pertenece a la familia Pasteurellaceae (Blackall y Soriano-Vargas 2020).

Los requerimientos para el óptimo crecimiento de *A. paragallinarum* son los siguientes: cloruro de sodio (NaCl 1.0-1.5 %), caldo de infusión cerebro-corazón y agar, ambos complementados con 1% (v/v) de cloruro de sodio, 0.0025% (p/v) de NAD esterilizado por filtrado y 1% (v/v) de suero de caballo esterilizado por filtración, además, se utiliza agar con 10% de sangre de oveja con *Staphylococcus epidermidis* como colonia nodriza, agar chocolate para aislamientos NAD-depedientes y medios de cultivo que tengan un pH entre 6.9 y 7.6 son viables para el crecimiento de la bacteria (Blackall y Soriano-Vargas, 2020).

A. paragallinarum es capaz de reducir el nitrato a nitrito y fermentar la glucosa, no produce indol, no hidroliza urea y gelatina, no tiene la capacidad para fermentar la galactosa y trehalosa, además, la falta de actividad catalasa la distingue de otras especies del género *Avibacterium* (Blackal, 1999; Blackall *et al.*, 2005).

Las temperaturas óptimas de crecimiento para *A. paragallinarum* son de 34 a 42 °C y requiere una atmósfera de 5% de dióxido de carbono (Blackall y Soriano-Vargas, 2020).

Signos clínicos y lesiones

Los signos clínicos típicos de coriza infecciosa en las aves afectadas son: secreción nasal, inflamación de los pasajes nasales y senos infraorbitarios, descarga nasal serosa o mucosa, edema facial, conjuntivitis catarral, inflamación de barbillas particularmente en machos, artritis y septicemia (Blackall y Soriano-Vargas, 2020).

En casos de coinfección de *A. paragallinarum* y *Gallibacterium anatis*, así como, *A. paragallinarum* y *Ornithobacterium rhinotracheale*, en las aves se ha observado un aumento de la gravedad de los signos clínicos (Paudel *et al.*, 2017; Morales-Erasto *et al.*, 2016). En California, en pollos de engorda coinfectados con *A. paragallinarum* y virus de bronquitis infecciosa, se reportó otitis y meningoencefalitis (Crispo *et al.*, 2018). Las lesiones histológicas incluyeron: meningoencefalitis heterofílica del cerebelo, infiltración heterofílica en leptomeninges de la médula espinal cervical, osteomielitis granulomatosa extensa, acumulación de residuos queratinizados y exudado fibrinoheterofílico en canal auditivo (Crispo *et al.*, 2018).

Estudios con aislamientos NAD-independientes de *A. paragallinarum* obtenidos de Sudáfrica, se observó que causan aerosaculitis, a diferencia de los aislamientos NAD-dependientes. Con base en estudios de infección experimental, los aislamientos NAD-independientes mostraron ser más virulentos que los aislamientos NAD-dependientes (Bragg, 2002).

Hemoaglutininas

Hasta el momento, se ha prestado mayor atención al papel de los antígenos hemoaglutinantes como aquéllos que dan protección a los pollos y que son candidatos para la producción de inmunógenos (Hobb *et al.*, 2002). La hemoaglutinina es una adhesina autotransportadora trimérica que pertenece al grupo de proteínas de la membrana externa; está implicada en la inmunogenicidad y patogenicidad de *A. paragallinarum* (Wang *et al.*, 2014).

Desde 1980, se han realizado estudios de los antígenos hemoaglutinantes de *A. paragallinarum*. Una hemoaglutinina de 36 kDa fue capaz de aglutinar glóbulos rojos fijados con glutaraldehído (Iritani *et al.*, 1980). Más tarde, se identificaron tres hemoaglutininas denominadas HA-HL resistente al calor y a la tripsina, HA-HS resiste a la tripsina y estable al calor y HA-L sensible a la tripsina y sensible al calor, la HA-L es una variante de hemoaglutinina específica, mientras que las otras son las hemoaglutininas comunes en *A. paragallinarum* (Sawata *et al.*, 1982). Es

interesantes saber, que los serogrupos definidos por la hemoaglutinina HA-L específica de serogrupo, parecen estar relacionada con sus orígenes geográficos (Kume, 1983).

El gen *hagA* que codifica para una proteína de 39 kDa, se estudió en 11 cepas de referencia y aislamientos de *A. paragallinarum*, permitiendo establecer la relación inmunogénica entre las cepas de *A. paragallinarum*. Sin embargo, las variaciones en las secuencias del gen *hagA* no explican las diferencias fenotípicas observada entre las cepas en los ensayos de HI; por ejemplo modificaciones postraduccionales de la proteína HagA permiten la expresión de fenotipos particulares para que se desarrolle una variación en la serotipificación entre las cepas, otras proteínas pueden estar implicadas en lugar de la proteína hemoaglutinante, otras proteínas hemoaglutinantes o bloqueo de anticuerpos dirigidos a proteínas alternativas (Hobb *et al.*, 2002).

Previamente, se investigó la región hipervariable de una HA de 210 kDa de la membrana externa de *A. paragallinarum* que es codificada por el gen *hntp-210* y parece ser altamente antigénica, sin embargo, es necesaria una mejor caracterización genética para desarrollar mejores estrategias inmunogénicas (Wu *et al.*, 2011; Araya-Hidalgo *et al.*, 2017).

La hemoaglutinina de 210 kDa es una adhesina autotransportadora trimérica que además de conferir hemoaglutinación, permite la adherencia celular y actividades de formación de biopelículas (Wang *et al.*, 2014).

En otros estudios, se ha mostrado que la cápsula algunos aislamientos de *A. paragallinarum* tiene la capacidad de enmascarar a las hemoaglutininas y se considera es responsable de la adherencia o colonización, pero no de la virulencia en pollos infectados (Sawata *et al.*, 1984).

Clasificación antigénica

El esquema de Page que originalmente se desarrolló con la prueba de aglutinación en placa (HA) reconoce tres serogrupos A, B y C (Page, 1962). Algunos aislamientos de Page que no podían ser tipificados ahora son reconocidos gracias

al esquema de inhibición de la hemoaglutinación de Kume (Blackall y Soriano-Vargas, 2020). Este esquema reconoce tres serogrupos A, B y C y nueve serovariedades A-1 a A-4, B-1 y C-1 a C-4 (Blackall *et al.*, 1990). Ambos esquemas se pueden realizar por la prueba de inhibición de la hemoaglutinación (HI) y los serogrupos de Kume corresponden a los serogrupos de Page (Kume *et al.*, 1983; Blackall *et al.*, 1990). Hasta ahora, la técnica de inhibición de la hemoaglutinación de Kume ha sido utilizada para la serotipificación de aislamientos de *A. paragallinarum*. Sin embargo, es una prueba laboriosa y costosa que aún no puede ser reemplazada por otras técnicas, como la secuenciación del gen *hntp-210*, la cual requiere el estudio de más aislamientos para validar la técnica (Feberwee *et al.*, 2019; Blackall y Soriano-Vargas, 2020).

En el 2012, una técnica de PCR-RFLP para la región hipervariable *hntp-210* fue utilizada para la serotipificación de aislamientos de *A. paragallinarum* en Japón, siendo un método alternativo para la identificación de serovariedades (Sakamoto *et al.*, 2012). Sin embargo, el estudio incluyó un número pequeño de aislamientos. Un estudio posterior que incluyó más de 80 aislamientos de varios países de América no mostró una correlación entre esta técnica y la serotipificación tradicional por inhibición de la hemoaglutinación (Morales-Erasto *et al.*, 2014b).

Recientemente, se ha estudiado la región hipervariable *hntp-210* que codifica para una hemoaglutinina de 210 kDa. La secuencia de este gen muestra una alta correlación con las serovariedades de Kume, indicando la posibilidad de alternativa para la identificación antigénica en esta bacteria (Buter *et al.*, 2019).

Distribución global de las serovariedades de *A. paragallinarum*

La distribución de serovariedades de *A. paragallinarum* en el mundo es: A-4, C-2 y C-4 en Australia, A-1, A-2, B-1 y C-2 en Alemania, A-1 y C-1 en Japón, A-1, B-1, C-2 y C-3 en Sudáfrica, C-3 en Zimbabwe e Israel, A-1, B-1 y C-2 han sido identificados en Estados Unidos de América, A-3 en Brasil, B-1 en Panamá, A-3, B-1 y C-1 en Ecuador y en México A-1, A-2, B-1, C-1 y C-2 (Blackall y Soriano-Vargas,

2020). Recientemente, en Holanda, se identificaron las serovariedades A-1, A-2 y B-1 (Feberwee *et al.*, 2019).

En América, están presentes los tres serogrupos A, B y C. En Panamá, se identificó la serovariedad B-1 aislamientos NAD-dependientes en brotes severos de coriza infecciosa, donde incluyeron estos aislamientos para el control de los brotes (Calderón *et al.*, 2010).

Posteriormente, en Ecuador, se reconocieron 3 serovariedades A-3, B-1 y C-1, siendo más frecuente la serovariedad A-3, debido a estos brotes, se sugirió el uso de bacterinas trivalente (A-3, B-1 y C-1) para la prevención de coriza infecciosa en granjas de Ecuador (Cabrera *et al.*, 2011). Así mismo, en California, se identificó el serogrupo C de Page y C-2 de Kume en 56 casos de coriza infecciosa obtenidos de brotes aparentemente relacionados con el mismo clon (Crispo *et al.*, 2019).

Actualmente, en México, se han identificado las serovariedades A-1, A-2, B-1, C-1 y C-2 (Morales-Erasto *et al.*, 2011). En el 2004, se realizó la serotipificación de 42 aislamientos de *A. paragallinarum* de diferentes estados de México, identificando los 3 serogrupos (A, B y C) y las serovariedades (A-1, A-2, B-1 y C-2) (Soriano *et al.*, 2004c). Particularmente, en Sonora, se identificó la serovariedad B-1 (Soriano *et al.*, 2001). Entre los años 2008-2011 se presentaron brotes de coriza infecciosa en aves con historia de vacunación, la serovariedad C-1 fue la más predominante en los brotes de coriza infecciosa, además, fue identificada por primera vez en México (Morales-Erasto *et al.*, 2011).

Cabe mencionar, que la serovariedad C-1 de *A. paragallinarum* fue aislada por primera vez en Japón, por lo que se consideraba restringida geográficamente a ese país (Kume, 1983). Posteriormente, se identificó en aislamientos obtenidos en el 2000 en Cotopaxi, Ecuador, y desde 2008 en brotes de coriza infecciosa en Jalisco y Puebla, México (Cabrera *et al.*, 2011; Morales-Erasto *et al.*, 2011).

Patogenicidad y virulencia

Actualmente, se han investigado diversos factores de virulencia en *A. paragallinarum*: la cápsula, fimbrias, lipopolisacáridos, hemoaglutininas, hierro,

proteínas RTX, entre otros, que son importantes para el entendimiento de la patogenicidad de *A. paragallinarum* (Liu *et al.*, 2016). Además, esta patogenicidad depende de las condiciones de crecimiento, serogrupo involucrado y la historia de pasaje de aislamientos en el hospedero (Blackall y Soriano-Vargas, 2020).

Se han registrado diferencias en la virulencia entre serovariedades de *A. paragallinarum* (Soriano *et al.*, 2004b).

Las serovariedades de Kume A-1, A-4, C-1, C-2 y C-3 mostraron alta virulencia en comparación con otras serovariedades (Blackall y Soriano-Vargas, 2020).

Cabe mencionar, que aislamientos NAD-independientes de *A. paragallinarum* son antigénicamente diferentes y se han vinculado con brotes de campo en aves bacterinizadas, particularmente con aislamientos de la serovariedad C-3 de Sudáfrica (Bragg, 2004). Además, esta virulencia es elevada en comparación con aislamientos NAD-dependientes (Blackall y Soriano-Vargas, 2020).

Similarmente, se ha encontrado una marcada diversidad genética y diferencias en la virulencia de cepas y aislamientos de la serovariedad B-1 de pollos en América, incluido México (Morales-Erasto *et al.*, 2014a).

En un estudio realizado en Panamá, se presentaron brotes severos de coriza infecciosa que causó una baja producción del huevo de hasta el 45% en gallinas ponedoras, siendo B-1 la serovariedad involucrada en los brotes (Calderon *et al.*, 2010). También se ha investigado la patogenicidad y virulencia de aislamientos serovariedad C-1 de México (Trujillo-Ruíz *et al.*, 2016). Estos aislamientos se obtuvieron de brotes de coriza infecciosa en aves bacterinizadas (Morales-Erasto *et al.*, 2011).

Protección

Actualmente, bacterinas comerciales bivalentes y trivalentes contra coriza infecciosa están disponibles en el mercado (Blackall y Soriano-Vargas, 2020; Fernández *et al.*, 2005). La inmunización es la principal estrategia de prevención en

granjas donde los pollos son susceptibles a la enfermedad de coriza infecciosa (Fernández *et al.*, 2005).

Los antígenos de *A. paragallinarum* vinculados protección frente a una infección aún no se han definido del todo (Blackall y Soriano-Vargas, 2020). Principalmente, se ha prestado mayor atención a los antígenos hemoaglutinantes ya que juegan un papel importante en la inmunogenicidad de los pollos (Blackall y Soriano-Vargas, 2020). Recientemente, las posiciones 1100-1600 de la región hipervariable de una proteína hemoaglutinante se considera que es la región más antigénica de la proteína y se ha propuesto como candidata para la producción de vacunas recombinantes contra *A. paragallinarum* (Wu *et al.*, 2011).

En general, la prueba de desafío es la clave para verificar la respuesta inmune en pollos bacterinizados y evaluar la eficacia de las bacterinas contra coriza infecciosa, este método, implica un conteo de células vivas, un periodo de observación de signos clínicos de entre 2 a 7 días después del desafío y necropsia a los 7 días después de la exposición (Soriano *et al.*, 2004a).

Por lo tanto, los niveles de anticuerpos inhibidores de la hemoaglutinación tanto de pollos bacterinizados e inmunizados pasivamente se ha correlacionado con la protección contra los signos clínicos del organismo de desafío (Kume *et al.*, 1984). En cambio, otros estudios revelaron que un grupo de aves donde se usó una dosis única de la bacterina, no hubo correlación entre anticuerpos HI y la protección (García *et al.*, 2008). Es posible, que anticuerpos que no sean los dirigidos contra hemoaglutininas también puedan brindar protección a los pollos bacterinizados (García *et al.*, 2008).

Con base en los resultados de protección cruzada entre las nueve cepas de referencia de Kume, la cual es variable, se recomienda incluir en las bacterinas una serovariedad de la gamma reconocida del serogrupo A para dar protección a los pollos (Soriano *et al.*, 2004a). En cambio, las bacterinas deben contener en su fórmula más de una serovariedad del serogrupo C dependiendo de las presentes en campo (Soriano *et al.*, 2004a). Por lo tanto, una selección racional de cepas en la bacterina solo es posible en áreas donde existe el conocimiento de la distribución

de las serovariedades de Kume, particularmente del serogrupo C (Soriano *et al.*, 2004a).

En el 2015, en México, se estudió la protección conferida por cuatro bacterinas trivalentes en pollos desafiados con la serovariedad C-1, la cual fue aislada de un brote de gallinas ponedoras de México, solo una bacterina proporcionó un nivel de protección de hasta un 83% en los pollos bacterinizados, estos resultados podrían explicar los brotes de coriza infecciosa en aves que han sido previamente inmunizadas (Morales-Erasto *et al.*, 2015).

Cabe mencionar, que las bacterinas que confieren protección del 70% no es estadísticamente significativo en comparación a una protección del 80% al 100% (Fernández *et al.*, 2005; Soriano *et al.*, 2004a).

En áreas avícolas donde la serovariedad B-1 es prevalente, es necesario incluirla en las bacterinas trivalentes para conferir protección contra coriza infecciosa (Fernández *et al.*, 2005). Se realizó una prueba de inmunización y desafío en diferentes grupos de aves. Los pollos fueron inmunizados con una bacterina preparada con la cepa de referencia 2671 serovariedad B-1 y posteriormente desafiados con 4 aislamientos: 1 de Panamá, 2 de México y 1 de Ecuador. Los pollos desafiados fueron protegidos excepto aquéllos que se desafiaron con el aislamiento de Ecuador, confiriendo una protección del 40% (Morales-Erasto *et al.*, 2014a). Parece ser que existen diferencias antigénicas entre aislamientos de la serovariedad B-1. Sin embargo, no se observaron diferencias antigénicas significativas en las pruebas de HI cruzadas entre la cepa de referencia 2671 y los 4 aislamientos americanos, es posible, que la baja protección ante el desafío del aislamiento ecuatoriano sea por la virulencia relativamente alta o el papel de otros antígenos diferentes a las hemoaglutininas (Morales-Erasto *et al.*, 2014a). Similarmente, los aislamientos NAD-independientes que pertenecen a la serovariedad C-3 de *A. paragallinarum*, son antigénicamente diferentes y se han vinculado a brotes en campo (Bragg, 2005; Jacobs *et al.*, 2000).

Así mismo, una bacterina comercial que contenía los serogrupos A, B y C sin detalles de los antígenos contenidos en la misma, proporcionó niveles de protección contra aislamientos NAD-independientes del serogrupo A de Page y la serovariedad

C-3 de Kume (Bragg, 2005). Es posible que las diferencias en los modelos de desafío puedan explicar estos resultados diferentes, claramente, en aquellas regiones del mundo con formas NAD-independientes de *A. paragallinarum*, existe la necesidad de una selección cuidadosa de bacterinas para un programa de prevención y control (Blackall y Soriano-Vargas, 2020).

Genotipos de *A. paragallinarum* en México

Hasta ahora, diversas técnicas de tipificación como el análisis de endonucleasas de restricción, ribotipificación, secuencias intergénicas repetitivas enterobacterianas (ERIC-PCR) y análisis de secuencias HPG-2, han contribuido para proporcionar información relevante de la situación epidemiológica de cepas y aislamientos de *A. paragallinarum* en un área geográfica (Blackall y Soriano-Vargas, 2020; Feberwee *et al.*, 2019).

En el 2004, se obtuvieron 17 patrones ERIC-PCR de 29 aislamientos mexicanos, de los cuales se identificaron 8 genotipos diferentes en aislamientos que pertenecieron a la serovariedad B-1, indicando una gran diversidad genética entre los aislamientos (Soriano *et al.*, 2004c).

Particularmente, en Sonora, se identificaron dos aislamientos que pertenecieron a la serovariedad B-1 y dos genotipos diferentes (Soriano *et al.*, 2004c).

Más tarde, se presentaron brotes de coriza infecciosa en aves con historia de vacunación, 14 de 17 aislamientos pertenecieron a la serovariedad C-1, la cual, fue identificada por primera vez en México (Morales-Erasto *et al.*, 2011).

En este estudio, los aislamientos serovariedad C-1 compartieron el mismo perfil ERIC-PCR confirmando una relación clonal (Morales-Erasto *et al.*, 2011). Sin embargo, esta clonalidad no se esperaba ya que se ha observado diversidad genética en aislamientos de otras serovariedades en el mismo país (García-Sánchez *et al.*, 2014).

Por lo anterior, surge la necesidad de confirmar la relación clonal con otros aislamientos serovariedad C-1 de América (Morales-Erasto *et al.*, 2011). Por lo que

en el 2014, se realizó la genotipificación de aislamientos mexicanos y ecuatorianos, todos los aislamientos compartieron el mismo genotipo y formaron un genogrupo separado de la cepa de referencia H-18 serovariedad C-1 (García-Sánchez *et al.*, 2014).

Recientemente, el análisis de secuencias HPG-2 de aislamientos de *A. paragallinarum* provenientes de Holanda, mostró concordancia con los resultados de genotipificación de la técnica ERIC-PCR (Feberwee *et al.*, 2019).

Además, el análisis de secuencias HPG-2 puede realizarse apartir de ADN de muestras primarias no puras (hisopados nasales de aves con coriza infecciosa en campo), en cambio, la técnica de ERIC-PCR cultivos puros de *A. paragallinarum* son necesarios (Feberwee *et al.*, 2019).

Por lo anterior, más estudios de tipificación genética mediante el análisis HPG-2 son necesarios para el poder discriminatorio como técnica de genotipificación única que podría remplazar a la técnica de ERIC-PCR (Feberwee *et al.*, 2019).

Filogenia de *A. paragallinarum*

La mayoría de los taxones de la familia Pasteurellaceae han sido caracterizados mediante el análisis de secuencias del gen 16S rRNA. Este gen es un punto de partida para la identificación y clasificación de taxones (Christensen y Bisgaard, 2018).

En el 2005, se realizó un análisis filogenético basado en el gen 16S rRNA para diferentes miembros de la familia Pasteurellaceae encontrando que los taxones *Haemophilus paragallinarum*, *Pasteurella gallinarum*, *Pasteurella avium* y *Pasteurella volantium* formaron un grupo monofilético, este grupo fue asignado a un nuevo género llamado “*Avibacterium*”, sin embargo, algunas características bioquímicas como la reacción catalasa, permitió la separación de *A. paragallinarum* del resto de los taxones (Blackall *et al.*, 2005).

Así mismo, secuencias parciales de distintos genes *housekeeping* han sido estudiados para mejorar la clasificación, principalmente de los taxones de la familia Pasteurellaceae (Christensen *et al.*, 2004; Bisgaard *et al.*, 2012).

No obstante, la filogenia del 16S rRNA del género *Avibacterium* no es la misma comparada con genes *housekeeping* altamente conservados (Bisgard *et al.*, 2012).

La bacteria *A. paragallinarum* ha sido considerada como una especie incipiente, ya que no ha divergido completamente para convertirse en una especie nueva y conserva rasgos de otras especies, esto puede ser debido a la transferencia de genes, de hecho, un estudio de análisis filogenético de secuencias multilocus, reveló que los genes *housekeeping* *rpoB* y *RecN* son altamente divergentes en *A. paragallinarum*, en cambio, el gen *SodA* mostró alta similitud con las especies de *A. paragallinarum* y *A. avium*, es posible que haya ocurrido una transferencia de genes entre estas dos especies, sin embargo, parece ser que la clasificación de especies del género *Avibacterium* mediante la secuenciación del ADN es problemática, especialmente en *A. paragallinarum* ya que necesitan ser clasificadas de acuerdo a sus características genotípicas y fenotípicas adicionales (Bisgard *et al.*, 2012).

Recientemente, un estudio realizado en Korea del Sur, mostró que aislamientos de *A. paragallinarum* NAD-independientes mediante un análisis filogenético basado en el gen 16S rRNA, no se agruparon con otras especies de *A. paragallinarum*. Sin embargo, con base en la filogenia de múltiples genes se piensa que la PCR específica de especie reconoce correctamente todas las *A. paragallinarum* de pollo (Bisgard *et al.*, 2012; Jeong *et al.*, 2020).

Este hallazgo proporciona evidencia de que la filogenia del 16S en algunos casos, no produce grupos monofiléticos para la especie de *A. paragallinarum*, los aislamientos NAD-independientes presentaron una delección (TTTTT) en las posiciones 182-186, esta misma delección fue observada en aislamientos de México que pertenecieron al genogrupo II en el trabajo de García-Sánchez (2016), y se desconoce el efecto biológico de esta delección (Jeong *et al.*, 2020).

Filogenia de aislamientos de *A. paragallinarum* de México

En el 2014, se realizó el análisis filogenético de 15 aislamientos de la serovariedad C-1 provenientes de México y Ecuador, esto mostró un grupo

monofilético compartido entre los 15 aislamientos de *A. paragallinarum*. El análisis filogenético basado en secuencias del gen *hagA*, confirmó el grupo monofilético de los aislamientos incluidos en el estudio (García-Sánchez *et al.*, 2014).

En términos de inmunogenicidad, la secuencia completa del gen *hagA* que codifica una hemoaglutinina de 39 kDa ha sido estudiada en cepas y aislamientos de *A. paragallinarum*, sabemos que la hemoaglutinina es un antígeno que juega un papel importante en la inmunogenicidad, patogenicidad y antigenicidad de *A. paragallinarum* (Hobb *et al.*, 2002).

Sensibilidad antimicrobiana

La determinación de la sensibilidad/suceptibilidad antimicrobiana, es importante en brotes causados por patógenos bacterianos en las aves, para elegir un tratamiento antimicrobiano eficaz que permita aliviar los signos clínicos de la enfermedad y evitar la resistencia antimicrobiana en las bacterias, así mismo, contribuir a la reducción de las pérdidas económicas que son generadas por antimicrobianos ineficaces y la carga de enfermedades presentes en las aves de corral que no son tratadas adecuadamente (Nhung *et al.*, 2017).

Hasta el momento, pocos estudios de sensibilidad antimicrobiana en aislamientos de *A. paragallinarum* han sido investigados en México (Luna-Galaz *et al.*, 2016).

En el 2000, se realizó el primer estudio de sensibilidad antimicrobiana en aislamientos de *A. paragallinarum* obtenidos en México, donde hubo variación en estreptomicina, neomicina y tetraciclina, los cuales fueron agrupados en 5 patrones de resistencia (I, II, III, IV y V) (Blackall *et al.*, 1989; Fernández *et al.*, 2000).

Más tarde, se utilizó un método de difusión en disco para la sensibilidad antimicrobiana en aislamientos de *A. paragallinarum* en México, Panamá, Ecuador y Perú, prestando mayor atención en el alto número de aislamientos de México y Ecuador, sugiriendo que los niveles en las diferencias de sensibilidad parecen ocurrir en diferentes regiones geográficas (Luna-Galaz *et al.*, 2016).

Como ya se ha descrito, las coinfecciones de *A. paragallinarum* con otros patógenos bacterianos pueden exacerbar los signos clínicos en las aves (Paudel *et al.*, 2017; Morales-Erasto *et al.*, 2016). Por esta razón, en brotes que involucran más de un microorganismo, se debe conocer la sensibilidad antimicrobiana de ambos agentes patógenos para un tratamiento exitoso (Morales-Erasto *et al.*, 2016).

Recientemente, un método de microdilución en caldo previamente utilizado para *Haemophilus parasuis*, fue modificado y adaptado para determinar la sensibilidad antimicrobiana de aislamientos de *A. paragallinarum* provenientes de brotes en Holanda (Heuvelink *et al.*, 2018; Prüller *et al.*, 2016).

Al comparar los niveles de susceptibilidad utilizando el método de difusión en disco en el estudio de Luna-Galaz *et al.* (2016), se encontraron niveles reducidos de susceptibilidad de eritromicina (10 mm) de la cepa de referencia H-18, en cambio, en el estudio de Heuvelink (2018) cuando se usó microdilución en caldo, esta cepa mostró niveles bajos de MIC (0.5 mg/ml), sugiriendo que las diferencias de susceptibilidad antimicrobiana podrían ser causadas por el uso de distintos métodos, diferentes formas de interpretación y diferentes tratamientos utilizados contra coriza infecciosa (Heuvelink *et al.*, 2018).

Por lo anterior, la sensibilidad antimicrobiana en diferentes regiones de México donde los brotes de coriza infecciosa son prevalentes se conocen poco. Ahora este es el primer estudio de sensibilidad antimicrobiana utilizando el método de microdilución en caldo de aislamientos de *A. paragallinarum* obtenidos en Sonora.

III. JUSTIFICACIÓN

Hasta el momento, las serovariedades A-1, A-2, B-1, C-1 y C-2 están presentes en México. En el 2004, la serovariedad B-1 era la única identificada en aislamientos de *A. paragallinarum* de Sonora. Sin embargo, en la última década, brotes de coriza infecciosa han sido causados por la serovariedad C-1 en aves bacterinizadas en Jalisco y Puebla. Con base en lo anterior es necesario conocer la serovariedad de los aislamientos de *A. paragallinarum* en Sonora. El conocimiento de la diversidad genética entre aislamientos de Sonora, los perfiles de sensibilidad antimicrobiana, así como la relación filogenética con otros aislamientos y cepas de *A. paragallinarum* de México y del mundo, permitirán explicar los brotes de coriza infecciosa en la entidad. Adicionalmente, los resultados obtenidos permitirán diseñar estrategias de prevención y control mediante el uso de bacterinas y, eventualmente, la posible elección terapéutica antimicrobiana.

IV. HIPÓTESIS

Con base en la mayor frecuencia de brotes de coriza infecciosa ocasionados por el serogrupo C de *A. paragallinarum*, es posible que aislamientos obtenidos recientemente pertenezcan a esta serovariedad, sin descartar las otras serovariedades prevalentes en México.

Con base en los estudios previos de genotipificación de aislamientos serogrupo C de México, es posible que exista limitada diversidad genética, o que incluso, pertenezcan al mismo tipo genético de los aislamientos incluidos en estos estudios. De ser cierto esto, los perfiles de sensibilidad antimicrobiana también serán compartidos entre esos aislamientos.

Con base en los análisis filogenéticos previos basados en el gen 16S rRNA de aislamientos de México y otros países del mundo, es posible que los aislamientos recientes de Sonora se relacionen estrechamente con otros aislamientos de *A. paragallinarum* de México.

V. OBJETIVOS

Objetivo general

Realizar la Serotipificación, genotipificación, análisis filogenético y la sensibilidad antimicrobiana de aislamientos de *A. paragallinarum* de Sonora.

Objetivos específicos

1. Identificar el serogrupo hemoaglutinante de Page en aislamientos de *A. paragallinarum* de Sonora.
2. Realizar la genotipificación de aislamientos de *A. paragallinarum* por medio del análisis de secuencias HPG-2.
3. Analizar filogenéticamente los aislamientos de *A. paragallinarum* a partir del gen 16S rRNA.
4. Determinar la sensibilidad antimicrobiana de aislamientos de *A. paragallinarum* a partir de un método de microdilución en caldo.

VI. MATERIALES Y MÉTODOS

Mantenimiento de aislamientos. En este estudio se incluyeron 8 aislamientos de *A. paragallinarum* obtenidos en el periodo 2007-2019. Los aislamientos fueron conservados en cosechado de embrión de pollo a -80 °C. El procedimiento fue el siguiente: se inocularon en el saco vitelino de embrión de pollo de 5 a 7 días (ALPES, México). Después de 24 horas el saco vitelino se colectó y se realizaron alícuotas de 1 ml en viales con tapón de rosca y se almacenó a -196 °C en nitrógeno líquido (Page, 1962).

Identificación bacteriológica. Los aislamientos se cultivaron en base de agar con 10% de oveja de oveja a una temperatura de 37 °C con 5% de CO₂. La bacteria fue identificada mediante la observación de colonias iridiscentes en crecimiento satelital junto a la colonia nodriza de *Staphylococcus epidermidis* y pruebas bioquímicas primarias; oxidasa y catalasa (Soriano *et al.*, 2004c).

Identificación por MALDI-TOF. Todos los aislamientos fueron cultivados en agar chocolate e incubados en microaerofilia por 24-48 horas. Las colonias de *A. paragallinarum* fueron trasferidas a una placa de acero de 96 pozos, cada 6 pozos se colocó un aislamiento diferente de *A. paragallinarum*, posteriormente, las manchas bacterianas se cubrieron con 1 ml de matriz (ácido-ciano-4-hidroxicinámico en acetonitrilo al 50% con ácido trifluoroacético al 2.5%), las muestras se secaron durante 10 minutos, cada aislamiento fue hecho por triplicado y los espectros de masas MALDI-TOF para la identificación y tipificación de especies se generaron en un sistema MALDI Biotyper (Microflex LT/SH, Bruker Daltonik) (Dinkelacker *et al.*, 2018).

Serotipificación

Preparación de hemoaglutininas. Para la propagación de los aislamientos se utilizó caldo de infusión cerebro corazón suplementado con NAD en su forma oxidada (0.0025%) o NADH en su forma reducida (25 µg/ml) y 1% de suero de caballo esterilizado por filtrado (BIOCEL). Los aislamientos fueron incubados a 37 °C durante 48 horas (Blackall *et al.*, 1990). Posteriormente, el antígeno obtenido fue centrifugado y lavado tres veces con PBS, finalmente, se resuspendió en PBS con timerosal al 0.01% (w/v) y los antígenos obtenidos se mantuvieron en refrigeración a 4 °C hasta su uso (Blackall *et al.*, 1990).

Eritrocitos de pollo. La sangre fue colectada en solución de Alsever (Blackall *et al.*, 1990). Las células sanguíneas se obtuvieron por centrifugación y se lavaron 3 veces en 0.15 M de NaCl. Posteriormente, una solución de glutaraldehído al 1% se preparó por dilución con una solución de Na₃PO₄, pH 8.2 (1 volumen) y 0.15 M de NaCl (9 volúmenes) en agua destilada (5 volúmenes), de 1-2% de suspensión de eritrocitos de pollo se preparó en una solución de 1% de glutaraldehído y se mantuvo a 4 °C durante 30 minutos, los eritrocitos fijados se centrifugaron y se lavaron 5 veces con 0.15 M de NaCl y 5 veces con agua destilada. Finalmente, los eritrocitos se suspendieron en una solución no mayor al 30% de PBS con timerosal al 1% y fueron conservados en refrigeración a 4 °C (Soriano *et al.*, 2001).

Hemoaglutinación. Los títulos de hemoaglutinación fueron obtenidos con volúmenes de 50 ml del antígeno previamente preparado, 1% de eritrocitos (50 ml) fijados con glutaraldehído y 50 ml de PBS como diluyente en un método de microdilución utilizando una microplaca de fondo "U" de 96 pozos, finalmente, se dejó incubar la placa por 20 minutos y se registró el título HA como el recíproco de la dilución donde se observa completa hemoaglutinación (Blackall *et al.*, 1990). Posteriormente, el procedimiento fue repetido para ajustar todos los antígenos a 4

UH en volúmenes de 50 ml para asignar el serogrupo correspondiente (Soriano *et al.*, 2001; Blackall *et al.*, 1999).

Inhibición de la hemoaglutinación

Antisueros. Se emplearon antisueros de las nueve cepas de referencia de *A. paragallinarum*, elaborados en conejo previamente (Soriano *et al.*, 2001).

Absorción de antisueros. Los antígenos se ajustaron a 64 unidades hemoaglutinantes y se checaron títulos de antisueros específicos. 5 volúmenes de antígeno a 64 unidades hemoaglutinantes y 1 volumen de antisuero 1/40 se utilizaron para la absorción (Eaves *et al.*, 1989). La suspensión se mantuvo a temperatura ambiente por 2 horas y luego a 4 °C toda la noche. El antisuero se absorbió 3 veces hasta que todas las reacciones con antígenos heterólogos se removieran y, todos los antisueros que fueron absorbidos con los antígenos se absorbieron con eritrocitos al 10% (Blackall *et al.*, 1990; Eaves *et al.*, 1989). Finalmente, el antisuero absorbido se mantuvo a 4 °C hasta su uso (Eaves *et al.*, 1989).

Inhibición de la hemaglutinación. En una microplaca de 96 pozos fondo "U" se adicionó 50 ml de PBS con timerosal al 0.01%, 50 ml de antisuero específico en el primer pozo y se realizaron diluciones dobles seriadas. Así mismo, se adicionó 50 ml de antígeno ajustado a 4 UH en cada uno de los pozos y al final, se adicionó RBC al 1% fijados con glutaraldehído dejando incubar la placa por 20 minutos (Soriano *et al.*, 2001; Blackall *et al.*, 1999).

Asignación de serogrupo y serovariedad. Para la asignación del serogrupo se utilizó suero sin absorber de las 9 cepas de referencia, registrando el título donde se observó completa inhibición de la hemoaglutinación. Para la asignación de la serovariedad, antisueros absorbidos fueron usados registrando el

título HI donde se observó completa inhibición de la hemoaglutinación con el antisuero específico (Soriano *et al.*, 2001).

Genotipificación

Preparación del ADN genómico. Se realizó la extracción a partir del paquete bacteriano cultivado en caldo BHI de los aislamientos de *A. paragallinarum* con el kit *DNeasy blood & tissue* (QIAGEN, Hilden, Alemania) (Chen *et al.*, 1996).

Identificación por PCR-conveccional HPG-2. Se realizó la amplificación de un fragmento de 0.5 kb del fragmento HPG-2 empleando los oligonucleótidos N1 5'-TGAGGGTAGTCTTGACGCAAT-3' y R1 5'-CAAGGTATCGATCGTCTCTCTACT-3' (Chen *et al.*, 1996). La mezcla de reacción fue de 25 µl, las condiciones de PCR fueron: desnaturalización inicial a 95 °C durante 3 minutos; seguido de 25 ciclos a 95 °C durante 30 s, 56 °C por 30 s y 72 °C por 1 min y una extensión final de 72 °C por 5 min. Finalmente, el ADN de los productos amplificados fue visualizado en un gel de agarosa al 1% a 80 V durante 1 hora en un buffer de etilendiaminotetraacético de tris-borato conteniendo bromuro de etídio (0.5 mg/ml), y se visualizó en transiluminador con luz ultravioleta (Blackall y Soriano-Vargas, 2020).

Análisis de secuencias HPG-2. El producto de PCR de 0.5 kb de la PCR convencional (Chen *et al.*, 1998) se envió a Baseclear (Leiden, Holanda, Países Bajos) para el análisis de secuencia utilizando los oligonucleótidos 5' (N1) y 3' (R1). Las secuencias de consenso se derivaron de las secuencias alineadas usando el software MEGA 6.5. El alineamiento y los árboles filogenéticos se construyeron usando BioNumerics 7.6 (Applied Maths, Belgium). Los coeficientes de similitud se calcularon sobre la base de alineaciones múltiples y el análisis de conglomerados se realizó mediante el método de enlace completo. Así mismo, secuencias HPG-2 de cepas de referencia y aislamientos de Países Bajos de 2009 fueron incluidos en el análisis. Las secuencias de 8 aislamientos de *A. paragallinarum* fueron remitidas

al GenBank y les fueron asignados los siguientes números de acceso: MT733825, MT733826, MT733827, MT733828, MT733829, MT733830, MT733831, MT733832.

Análisis filogenético

Amplificación del gen 16S rRNA. El gen 16S rRNA se amplificó empleando los oligonucleótidos 27F 5'-AGAGTTTGATCMTGGCTCAG-3' y 1492R 5'-TACGGYTACCTTGTTACGACTT-3', secuencia que cubre la posición de *Escherichia coli* 27-1492 (García-Sánchez *et al.*, 2014). Brevemente, se extrajo ADN del cultivo puro de colonias de *A. paragallinarum* utilizando el kit *DNeasy Blood & Tissue* (QIAGEN, Hilden, Alemania). La mezcla de reacción fue de 25 µl, las condiciones de PCR fueron; desnaturalización inicial: 95 °C por 5 minutos 1 ciclo, seguido de una segunda desnaturalización a 95 °C por 30 segundos 35 ciclos, alineamiento a 54 °C por 60 segundos, elongación a 72 °C por 60 segundos y una extensión final de 72 °C por 5 minutos durante 1 ciclo (Kuhnert *et al.*, 2006). Los productos fueron separados en un gel de agarosa al 2% por 45 minutos a 80 voltios y visualizados con luz ultravioleta (Kuhnert *et al.*, 2006).

Análisis filogenético. El producto de PCR del gen 16S rRNA obtenido de la extracción se envió a Baseclear (Leiden, Holanda) para secuenciación. Las secuencias de consenso se obtuvieron utilizando el software MEGA 6.5. El alineamiento y la construcción del árbol filogenético se realizó en BioNumerics v7.6 (Applied Maths, Bélgica). Los coeficientes de similitud se calcularon en función de la alineación múltiple y el análisis de conglomerados se realizó mediante el método de enlace completo. Las secuencias de 8 aislamientos de *A. paragallinarum* fueron remitidas a Genbank y los siguientes números de acceso les fueron asignados: MT733825, MT733826, MT733827, MT733828, MT733829, MT733830, MT733831, MT733832.

Sensibilidad antimicrobiana. La sensibilidad antimicrobiana de los 8 aislamientos de *A. paragallinarum* fue determinada mediante el método de

microdilución en caldo (MIC) (CLSI, 2013). Se uso caldo Müller-Hinton suplementado con NAD (Sigma-Aldrich) y suero de pollo esterilizado por filtración. Este es un método de microdilución en caldo para bacterias dependientes de NAD y modificado para aislamientos de *A. paragallinarum* (Prüller *et al.*, 2016). Todos los aislamientos fueron ajustados a la escala de McFarland 0.5 y posteriormente adicionados a los tubos que contenían el caldo Müller-Hinton preparado para el crecimiento del microorganismo, las placas fueron incubadas en microaerofilia a 35 °C por 22 horas. Finalmente, se realizó la lectura de las placas visualmente y después con un fotómetro. La interpretación de los resultados se realizó con el software MCN-6 (AES, Merlin Diagnostics). Los antimicrobianos y las concentraciones empleadas fueron: amoxicilina/ácido clavulánico (0.25/0.125-32/16 µg/ml), ampicilina (0.0625-32 µg/ml), cefepima (0.5-16 µg/ml), ceftiofur (0.25-8 µg/ml), clindamicina (0.25-4 µg/ml), enrofloxacin (0.25-4 µg/ml), eritromicina (0.125-8 µg/ml), florfenicol (2-16 µg/ml), neomicina (4-16 µg/ml), oxacilina (0.25-8 µg/ml), penicilina (0.0625-32 µg/ml), sulfametoxazol (16-512 µg/ml), trimetoprima/sulfametoxazol (0.03125/0.59375-4/76 µg/ml), tetraciclina (0.25-16 µg/ml) y tilmicosina (4-32 µg/ml) (Heuvelink *et al.*, 2018).

VII. LÍMITE DE TIEMPO Y ESPACIO

Esta investigación se realizó en el Centro de Investigación de Estudios Avanzados en Salud Animal (CIESA), FMVZ, UAEM, particularmente en el Área de Microbiología Aviar, en un periodo de agosto 2018 a mayo 2020. La primera etapa consistió en realizar la propagación y conservación de los aislamientos de *Avibacterium paragallinarum* en el CIESA. Así mismo, se preparó el antígeno durante la estancia en Pecuarius Laboratorios S. A de C. V., Cd. Obregón, Sonora, en los meses de julio a septiembre 2019. En la segunda etapa se realizó la serotipificación de los aislamientos de *A. paragallinarum* mediante el esquema de Page y Kume, actividad que se llevó a cabo en el CIESA. En la tercera etapa se realizó la identificación de los aislamientos mediante pruebas de PCR con los genes (HPG-2 y 16S rRNA). Así mismo, se realizó la genotipificación mediante el análisis de secuencias HPG2, también se realizó el análisis de datos y alineamiento de secuencias. Posteriormente, se realizó la construcción de un árbol filogenético por medio del gen 16S rRNA y un árbol filogenético basado en el análisis de secuencias del gen HPG-2. Además, se realizó la sensibilidad antimicrobiana de los aislamientos de *A. paragallinarum*, actividad llevada a cabo durante una estancia en GD Animal Health, Deventer, Países Bajos, en 3 semanas (18 de noviembre a 9 de diciembre, 2019). Finalmente, se continuó con la redacción de la tesis, específicamente la interpretación de resultados, discusión, conclusiones y la redacción del artículo científico, actividades que se llevaron a cabo en el CIESA.

VIII. RESULTADOS

Se obtuvo la historia clínica de 8 aislamientos de *A. paragallinarum* del estado de Sonora (Cuadro 1). Todos los aislamientos en este estudio fueron confirmados como *A. paragallinarum* en el cultivo bacteriano, todos fueron NAD-dependientes, se obtuvieron colonias pequeñas irridicentes con crecimiento satelital en agar sangre, cocobacilos gram negativos con tendencia al pleomorfismo y confirmados en el MALDI-TOF.

Así mismo, todos los aislamientos fueron identificados mediante el gen 16S rRNA y confirmados como *A. paragallinarum* mediante una PCR punto final (Figura 1). La serotipificación basada en el esquema de Page clasificó a los aislamientos PL-09, PL-08, PL-07, PL-06 y PL-01 en serogrupo C, los aislamientos PL-10 y PL-04 en serogrupo A y el aislamiento PL-05 al serogrupo B (Cuadro 2).

El análisis de secuencias HPG-2 mostró la presencia de 3 tipos de secuencias diferentes (ST) 4, 11 y 1, la mayoría de los aislamientos se agruparon dentro de la ST 4 (PL-09, PL-08, PL-07 y PL-01), dos aislamientos fueron agrupados en la ST 1 (PL-05 y PL-06), y dos aislamientos fueron agrupados la ST 11 (PL-10 y PL-04) (Cuadro 2 y Figura 3).

El análisis filogenético basado en el gen 16S rRNA dividió a los aislamientos de *A. paragallinarum* en dos grupos, además, en el análisis de las secuencias del gen 16S rRNA, se registró la secuencia TTTTT en las posiciones 182-186 en el grupo 2 y el grupo 1 mostró la delección de la secuencia (Figura 2).

Los resultados de la sensibilidad antimicrobiana mostraron que todos los aislamientos incluidos en este estudio fueron sensibles a la mayoría de los antimicrobianos, incluida la eritromicina, tetraciclina, también, la oxitetraciclina y tilosina que se encuentra dentro de la clasificación de estos dos antibióticos. Los aislamientos PL-01 y PL-09 mostraron una susceptibilidad reducida a la clindamicina así mismo, el aislamiento PL-01 mostró una susceptibilidad reducida al sulfametoxazol (Cuadro 3).

A partir de los resultados antes descritos, se escribió el artículo científico "*Identification, HPG2 sequence analysis and antimicrobial susceptibility of*

Avibacterium paragallinarum isolates obtained from outbreaks of infectious coryza in commercial chickens in Sonora State, Mexico". El artículo se envió a la revista *Avian Diseases* (JCR, 1.306):

Anneke Feberwee
DVM, PhD, EBVS® European Specialist in Poultry Veterinary Science

GD
Postbus 9, 7400 AA Deventer
Tel: 0900 - 1770
Direct: 0570 - 660384
Mobiel: 06 - 53337573

a.feberwee@gddiergezondheid.nl
www.gddiergezondheid.nl

Volg ons op Facebook, Twitter en LinkedIn.

-----Oorspronkelijk bericht-----

Van: em.aviandiseases.0.6dac3f.d07999b5@editorialmanager.com <em.aviandiseases.0.6dac3f.d07999b5@editorialmanager.com> Namens Avian Diseases

Verzonden: maandag 31 augustus 2020 23:30

Aan: Feberwee, Anneke <a.feberwee@gddiergezondheid.nl>

Onderwerp: A manuscript number has been assigned to Research Note: Identification, HPG2 sequence analysis and antimicrobial susceptibility of Avibacterium paragallinarum isolates obtained from outbreaks of infectious coryza in commercial chickens in Sonora State,...

Dear PhD Feberwee,

Your submission entitled "Research Note: Identification, HPG2 sequence analysis and antimicrobial susceptibility of Avibacterium paragallinarum isolates obtained from outbreaks of infectious coryza in commercial chickens in Sonora State, Mexico" has been assigned the following manuscript number: aviandiseases-D-20-00103.

You will be able to check on the progress of your paper by logging on to <https://www.editorialmanager.com/aviandiseases/>.

Thank you for submitting your work to this journal.

Kind regards,

Janece Bevans-Kerr
Office Manager
Avian Diseases

Avian Diseases

Research Note: Identification, HPG2 sequence analysis and antimicrobial susceptibility of *Avibacterium paragallinarum* isolates obtained from outbreaks of infectious coryza in commercial chickens in Sonora State, Mexico

--Manuscript Draft--

Manuscript Number:	
Article Type:	Research Note
Section/Category:	
Keywords:	<i>Avibacterium paragallinarum</i> ; Sonora; Mexico; 16S rRNA gene analysis and HPG2 genotyping; antimicrobial susceptibility
Corresponding Author:	Anneke Feberwee, PhD GD Animal Health Deventer NETHERLANDS
First Author:	Linda Patricia Luna, MVZ
Order of Authors:	Linda Patricia Luna, MVZ Rianne Buter, Technician Gabriel Iván Pantoja-Nuñez, MVZ Martín Acuña-Yanes Acuña-Yanes, MVZ Karla Ceballos-Valenzuela, Ing. Martín Talavera-Rojas, Dr. Celene Salgado-Miranda, Dra. Annet Heuvelink, PhD Sjaak de Wit, PhD Edgardo Soriano-Vargas, Dr. Anneke Feberwee, PhD
Manuscript Region of Origin:	MEXICO
Abstract:	<p>SUMMARY</p> <p>This is the first extensive report on the identification and characterization of <i>Avibacterium paragallinarum</i> (AVP) isolates obtained from outbreaks of infectious Coryza (IC) in layer flocks from Sonora State in Mexico with an IC vaccination history. Isolates obtained from IC outbreaks during the years 2007 up to and including 2019 were identified by conventional PCR test and 16S rRNA gene analysis, serotyped by Page serotyping and genotyped by the recently described partial sequence analysis of the HPG2 region. Furthermore, antimicrobial susceptibility profiles were determined by a recently improved MIC test. The conventional PCR test and the 16S rRNA analyses confirmed the isolates as AVP. Serotyping results showed the involvement of isolates belonging to serotypes A, B and C in the IC outbreaks. Genotyping of the HPG2 region revealed the presence of Sequence Type (ST)1, ST4 and ST11 of which the latter is also identified in Europe. The Minimal Inhibitory Concentration (MIC) susceptibility test showed that all tested isolates were susceptible for the majority of tested antimicrobials including erythromycin and tetracycline which are important antibiotics for the treatment of IC. Vaccination failures due to inadequate vaccination application procedures should be ruled out in the control of IC in Sonora State.</p>

Cuadro 1. Historia clínica de los aislamientos de *Avibacterium paragallinarum* incluidos en este estudio.

AISLAMIENTO	ÁREA GEOGRÁFICA	VACUNACIÓN SI/NO*	TIPO DE GRANJA	AÑO Y MES DE AISLAMIENTO	EDAD	SIGNOS CLÍNICOS	BACTERINA	EDAD Y DOSIS DE BACTERINIZACIÓN
PL-01	Navojoa, Sonora	SI	Postura comercial	Abr-2019	35 semanas	Fluido nasal seromucoso y turbio, edema corneal.	Tetravalente (A-1, B-1, C-1 y C-2)	1 dosis a las 13 semanas
PL-04	Cajeme, Sonora	SI	Postura comercial	Nov-2007	-	-	Trivalente (A-1, B-1 y C-2)	2 dosis a las 8 y 12 semanas
PL-05	Cajeme, Sonora	-	Postura comercial	Nov-2007	-	-	-	-
PL-06	Cajeme, Sonora	-	Postura comercial	Nov-2007	-	-	-	-
PL-07	Cajeme, Sonora	SI	Postura comercial	Ene-2015	39 semanas	Estertor traqueal, tumefacción unilateral de la barbilla, secreción mucosa nasal.	Tetravalente (A-1, B-1, C-1 y C-2)	1 dosis a las 13 semanas
PL-08	Cajeme, Sonora	SI	Postura comercial	Dic-2014	68 semanas	Estertores, lagrimeo bilateral.	Trivalente (A-1, C-1 y C-2)	2 dosis a las 8 y 12 semanas
PL-09	Cajeme, Sonora	SI	Postura comercial	Feb-2015	28 semanas	Edema corneal, secreción mucosa nasal y catarral y emaciación.	Trivalente (A-1, B-1 y C-2)	2 dosis a las 8 y 12 semanas
PL-10	Navojoa, Sonora	SI	Crianza comercial	Oct-2017	11 semanas	Cara y párpados hinchados, lagrimeo, ojo cerrados y secreción nasal transparente.	Tetravalente (A-1, B-1, C-1 y C-2)	3 dosis a las 8, 12 y 16 semanas

-, Sin información.

Cuadro 2. Identificación, origen, número de caso, año de aislamiento, serogrupo, serovariedad, genotipo HPG-2 de los aislamientos de *A. paragallinarum* incluidos en el estudio.

AISLAMIENTO	No. DE CASO	ORIGEN	AÑO	SEROGRUPO	SEROVARIEDAD	GENOTIPO HPG-2
PL-01	29	Navojoa, Sonora	2019	C	S/D	4
PL-04	S/D	Cajeme, Sonora	2007	A	A-1	11
PL-05	S/D	Cajeme, Sonora	2007	B	B-1	1
PL-06	S/D	Cajeme, Sonora	2007	C	C-2	1
PL-07	10	Cajeme, Sonora	2015	C	S/D	4
PL-08	32	Cajeme, Sonora	2014	C	S/D	4
PL-09	150	Cajeme, Sonora	2015	C	S/D	4
PL-10	48	Navojoa, Sonora	2017	A	A-1	11

S/D, Sin dato.

Figura 1. Productos de PCR específico para el gen HPG-2 (0.5 kb) de los aislamientos de *Avibacterium paragallinarum* incluidos en este estudio. 1) Marcador de peso molecular (MMM) (1kb); 2) control negativo (NC); 3) control positivo (PC); 4) aislamiento PL-01; 5) aislamiento PL-04; 6) aislamiento PL-05; 7) aislamiento PL-06; 8) aislamiento PL-07; 9) aislamiento PL-08; 10) aislamiento PL-09; 11) aislamiento PL-10.

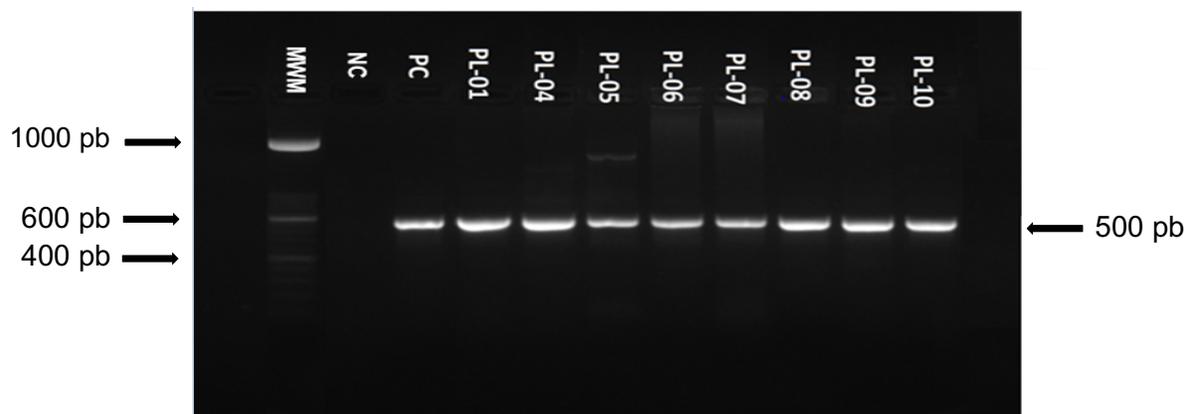


Figura 2. Árbol filogenético de las secuencias del gen 16S rRNA de los aislamientos y cepas de referencia de *Avibacterium paragallinarum* incluidos en este estudio. El árbol filogenético fue contruido con el método de enlace completo en Bionumerics v7.6.

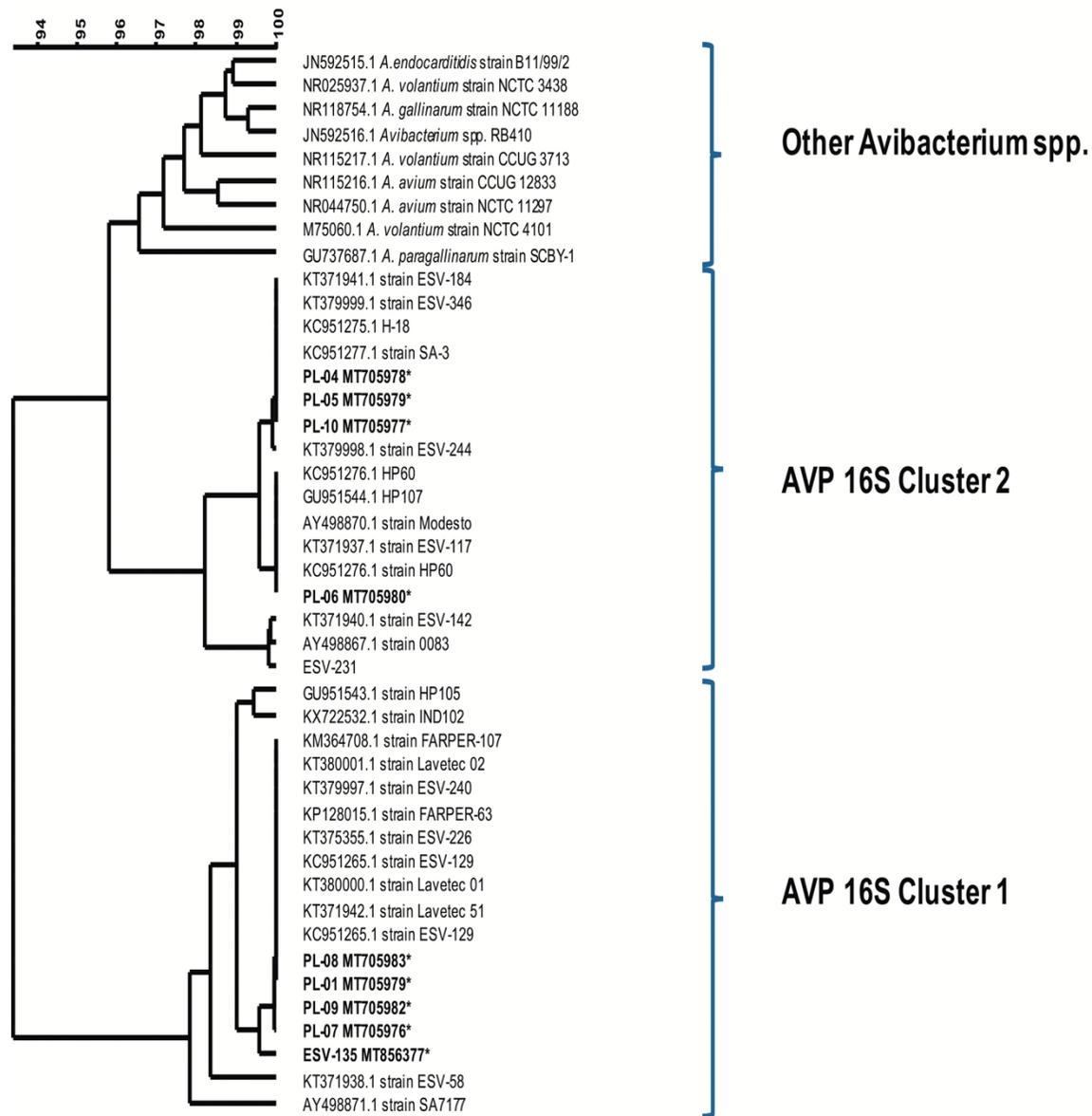
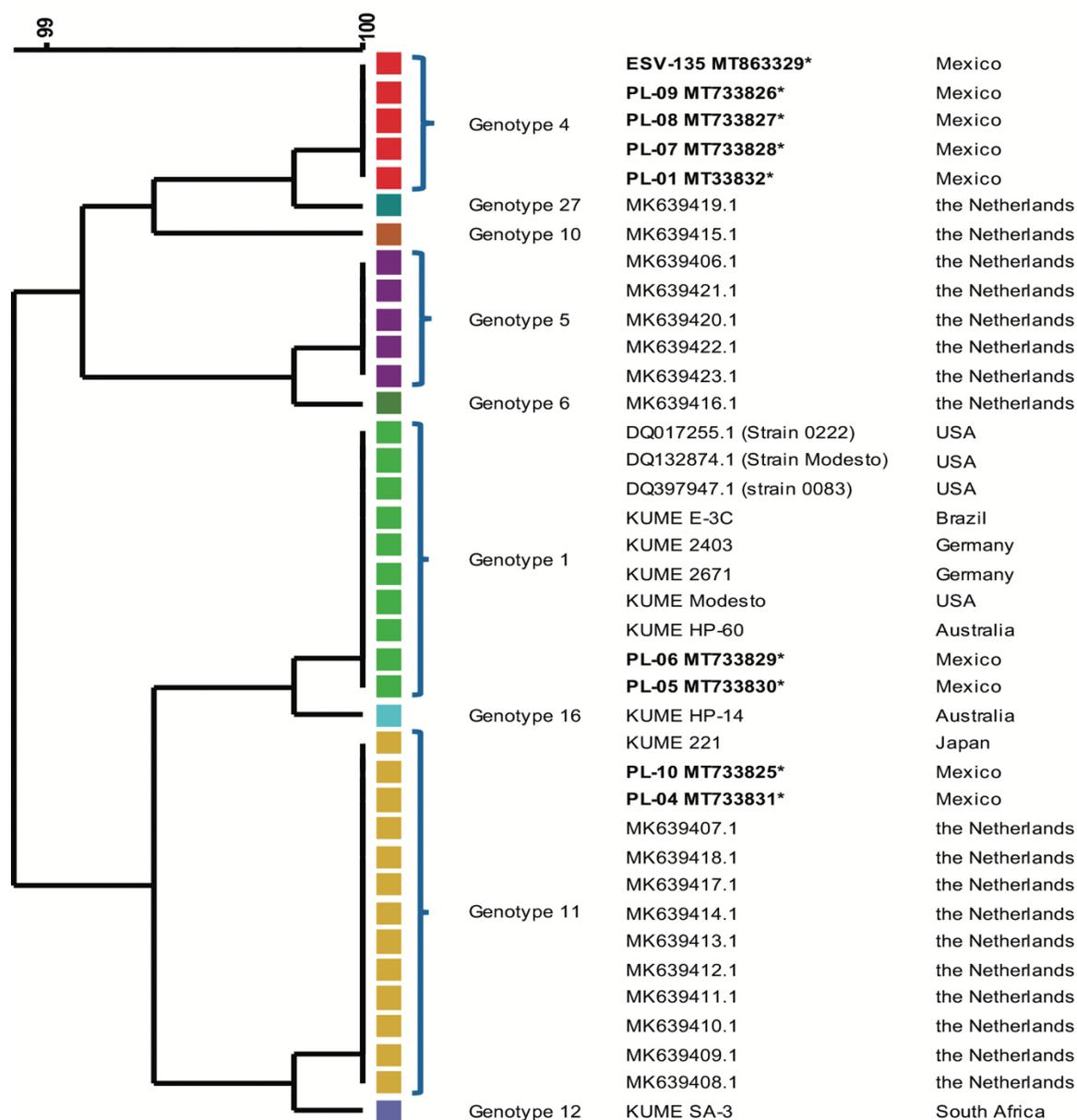


Figura 3. Árbol filogenético que muestra los diferentes genotipos del gen HPG-2 de aislamientos y cepas de referencia de *Avibacterium paragallinarum* de Sonora incluidos en este estudio. El árbol filogenético se construyó utilizando el método de enlace completo v7.6 genotipificación-HPG-2 de *Avibacterium paragallinarum*.



Cuadro 3. Sensibilidad antimicrobiana de los aislamientos de *Avibacterium paragallinarum* incluidos en el presente estudio.

MIC (µg/ml) DE:															
AGENTE ANTIMICROBIANO															
AISLAMIENTO	Amoxicilina/ácido clavulánico	Ampicilina	Cefepima	Ceftiofur	Clindamicina	Enrofloxacin	Eritromicina	Flofenicol	Neomicina	Oxacilina	Penicilina G	Sulfametoxazol	Sulfametoxazol /trimetoprima	Tetraciclina	Tilmicosin
PL-01	<=0.25/0.125	=0.25	<=0.5	<=0.25	>4	=0.5	=2	<=2	<=4	<=0.25	=1	=128	=0.0625/1.1875	=1	<=4
PL-04	<=0.25/0.125	<=0.0625	<=0.5	<=0.25	=2	<=0.25	=0.5	<=2	<=4	<=0.25	<=0.0625	<=16	<=0.03125/0.59375	<=0.25	<=4
PL-05	<=0.25/0.125	<=0.0625	<=0.5	<=0.25	=2	<=0.25	=0.5	<=2	<=4	<=0.25	<=0.0625	<=16	<=0.03125/0.59375	<=0.25	<=4
PL-06	<=0.25/0.125	<=0.0625	<=0.5	<=0.25	=2	<=0.25	=0.5	<=2	<=4	<=0.25	<=0.0625	<=16	<=0.03125/0.59375	<=0.25	<=4
PL-07	<=0.25/0.125	<=0.0625	<=0.5	<=0.25	=2	<=0.25	=1	<=2	<=4	=0.5	=0.125	<=16	<=0.03125/0.59375	=1	<=4
PL-09	<=0.25/0.125	<=0.0625	<=0.5	<=0.25	=4	<=0.25	=1	<=2	<=4	=1	=0.125	<=16	<=0.03125/0.59375	=1	<=4
PL-10	<=0.25/0.125	<=0.0625	<=0.5	<=0.25	=2	<=0.25	=1	<=2	<=4	<=0.25	<=0.0625	<=16	<=0.03125/0.59375	<=0.25	<=4
SA-3	<=0.25/0.125	<=0.0625	<=0.5	<=0.25	=2	<=0.25	=0.5	<=2	<=4	<=0.25	<=0.0625	<=16	<=0.03125/0.59375	<=0.25	<=4

IX. DISCUSIÓN GENERAL

Aislamientos del serogrupo B de *A. paragallinarum* han sido identificados en 6 entidades de México. Hasta 2004, en Sonora, solo se había registrado la presencia del serogrupo B (Soriano *et al.*, 2004c). En el presente estudio, aislamientos de *A. paragallinarum* obtenidos en el periodo 2007-2019 pertenecieron a los 3 serogrupos (A, B y C) prevalentes en México, a apartir de aves bacterinizadas en Sonora. Además, el serogrupo C fue el más frecuente entre los serogrupos involucrados. Los brotes de coriza infecciosa en la última década han sido causados por los tres serogrupos (A, B y C) aún en aves inmunizadas, particularmente, por el serogrupo C (Morales-Erasto *et al.*, 2011). Estudios previos, han demostrado que el serogrupo C (serovariedad C-1) es de alta virulencia en comparación con otras serovariedades en México (Trujillo-Ruíz *et al.*, 2016). No obstante, el serogrupo C sigue siendo el más frecuente en brotes de coriza infecciosa en granjas de aves en México. Por lo tanto, el conocimiento de serovariedades en los brotes de coriza infecciosa, permitirá mejorar el diseño de estrategias de prevención y control mediante el uso de bacterinas eficaces contra la enfermedad.

Recientemente, un estudio de genotipificación de aislamientos de *A. paragallinarum* de Países Bajos basado en el análisis de secuencias HPG-2, mostró concordancia en los resultados de genotipificación con la técnica de ERIC-PCR (Feberwee *et al.*, 2019). En el presente estudio fue posible utilizar el análisis de secuencias HPG-2 como herramienta válida de genotipificación, la cual, identificó 3 tipos de secuencias diferentes, el tipo de secuencia ST 4 (genotipo 4) se integró por la mayoría de los aislamientos del serogrupo C y el aislamiento ESV-135, es posible que se trate del mismo clon. En el 2011, lo mismo se observó en aislamientos del serogrupo C de México y Ecuador, incluido el aislamiento ESV-135 obtenido en México, los cuales se agruparon en el mismo grupo monofilético (Morales-Erasto *et al.*, 2011). El tipo de secuencia ST 11 (genotipo 11) fue reportada en Europa donde aislamientos de Países Bajos fueron incluidos, ahora, aislamientos de México del serogrupo A fueron incluidos es ese genotipo. Por lo tanto, aislamientos que estan

relacionados genéticamente pertenecen a la misma especie, comparten características bioquímicas, factores de virulencia y características genéticas (Olive y Bean, 1999).

Así mismo, se ha observado que cepas de referencia y aislamientos de *A. paragallinarum* aún siendo de distintas serovariedades comparten características genéticas, en este estudio, la ST 1 (genotipo 1) se integró por un aislamiento del serogrupo C y un aislamiento del serogrupo B, por lo que las diferencias serológicas pueden deberse a otras proteínas de superficie, modificaciones postraduccionales o bloqueo de anticuerpos dirigidos a otras proteínas alternativas (García-Sánchez *et al.*, 2014; Hobb *et al.*, 2002). Por lo tanto, el empleo de técnicas de genotipificación nos dará información importante para conocer la situación epidemiológica y las variaciones entre cepas y aislamientos de *A. paragallinarum* en las distintas regiones geográficas (Soriano *et al.*, 2004c).

El análisis filogenético basado en el gen 16S rRNA permite establecer las relaciones evolutivas y las distancias entre aislamientos y cepas de *A. paragallinarum*, sin embargo, en algunos casos la filogenia del gen 16S rRNA no produce grupos monofiléticos para la especie *A. paragallinarum*. Recientemente, un estudio mostró que las secuencias de aislamientos NAD-independientes presentaron la delección de TTTTT en las posiciones 182-186 en el gen 16S rRNA (Jeong *et al.*, 2020). En el presente estudio, no ocurrió esta delección en el grupo 2, únicamente en el grupo 1 de *A. paragallinarum*, a diferencia del estudio de Jeong *et al.*, (2020), todos los aislamientos en este estudio fueron NAD-dependientes. Por lo tanto, es posible que la delección TTTTT en las posiciones 182-186 codifique características con un papel importante.

Pocos estudios de sensibilidad/suceptibilidad antimicrobiana han sido realizados en México. Previamente, se demostró que existen diferencias en la sensibilidad antimicrobiana basado en el origen geográfico (Luna-Galaz *et al.*, 2016). En el 2016, solo el 14% de los 35 aislamientos de *A. paragallinarum* de México analizados mediante difusión en agar resultaron susceptibles a la eritritromicina, el presente estudio, reveló que los aislamientos son sensibles a la mayoría de los antimicrobianos incluida la eritromicina y tetraciclina, también la

oxitetraciclina y tilosina que se encuentran dentro de la clasificación de estos dos antibióticos funcionan bien para el tratamiento de coriza infecciosa. Para el caso de los aislamientos PL-01 y PL-09 que mostraron una susceptibilidad reducida a la clindamicina, y el PL-01 al sulfametoxazol, es posible que para esta región estos dos antimicrobianos no sean de primera elección para el tratamiento de coriza infecciosa en Sonora. En general, los perfiles de sensibilidad antimicrobiana son compartidos entre la mayoría de los aislamientos de *A. paragallinarum* obtenidos en este estudio.

Cabe mencionar, que el empleo de diferentes métodos de sensibilidad antimicrobiana y diferentes criterios de interpretación, resultan complicados para clasificar a los aislamientos en susceptibles y resistentes. Además, los diferentes tratamientos para el control de coriza infecciosa puede verse influenciados en la susceptibilidad y resistencias de los aislamientos a los antimicrobianos, por lo que las pruebas de sensibilidad antimicrobiana siguen siendo necesarias para una posible elección terapéutica antimicrobiana.

X. CONCLUSIONES

La serotipificación reveló la presencia de los tres serogrupos (A, B y C) en los aislamientos obtenidos de brotes de coriza infecciosa en granjas de Sonora, siendo el serogrupo C el más frecuente.

Así mismo, el análisis de secuencias HPG-2 permitió la identificación de tres diferentes tipos de secuencias (ST), lo cual indica que existen variaciones entre los aislamientos. El análisis filogenético basado en el gen 16S rRNA permitió agrupar los aislamientos de Sonora en dos grupos. Adicionalmente, el análisis filogenético del gen 16S rRNA en el grupo 2 de los aislamientos de *A. paragallinarum* de este estudio presentaron la secuencia TTTTT en las posiciones 182-186 de este gen, en cambio, el grupo 1 mostró la delección de la secuencia TTTTT. Finalmente, el estudio de sensibilidad antimicrobiana mostró que los perfiles obtenidos son compartidos entre los aislamientos y que la mayoría de los antimicrobianos funcionan bien para el tratamiento de coriza infecciosa, incluida la eritromicina y tetraciclina.

El presente estudio, confirmó que el control de coriza infecciosa debe basarse en inmunógenos que incluyan los tres serogrupos, sin embargo, los brotes de coriza infecciosa se produjeron a pesar de que las aves fueron inmunizadas con bacterinas que incluían los tres serogrupos, es posible que inmunotipos diferentes a los incluidos en las bacterinas estén causando fallas vacunales. Estudios para investigar la efectividad de las bacterinas son necesarios para una protección adecuada, además, el presente estudio guiará en la investigación de la antigenicidad e inmunogenicidad de las bacterinas empleadas en esa región.

XI. BIBLIOGRAFÍA

- Araya-Hidalgo E, Gutiérrez-Jiménez C, Chaves-Ramírez M, Suárez-Esquivel M, Guzmán-Verri C, Barquero-Calvo E. (2017): Sequence analysis of the hypervariable region in hmtp210 of *Avibacterium paragallinarum*. *J Vet Med Sci*; 79:1210-1214.
- Bisgaard M, Norskov-Lauritsen N, de Wit SJ, Hess C, Christensen H. (2012): Multilocus sequence phylogenetic analysis of *Avibacterium*. *Microbiology*; 158:993-1004.
- Blackall PJ, Eaves LE, Rogers DG. (1989): Biotyping of *Haemophilus paragallinarum* isolates using hemagglutinin serotyping, carbohydrate fermentation patterns, and antimicrobial drug resistance patterns. *Avian Dis*; 33:491-496.
- 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. (1999): Infectious coryza: overview of the disease and new diagnostic options. *Clin Microbiol Rev*; 12:627-632.
- 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, Soriano-Vargas E. (2020): Infectious coryza and related bacterial infections. In: Swayne DE, Boulianne M, Logue CM, McDougald LR, Nair V,

Suarez DL, editors. Diseases of Poultry. 14th ed. Hoboken (NJ): Wiley-Blackwell. p. 890-906.

Bragg RR. (2002): Virulence of South African isolates of *Haemophilus paragallinarum*. Part 2: naturally occurring NAD-independent field isolates. Onderstepoort J Vet Res; 69:171-175.

Bragg RR. (2004): Evidence of possible evasion of protective immunity by NAD-independent isolates of *Haemophilus paragallinarum* in poultry. Onderstepoort J Vet Res; 71:53-58.

Bragg RR. (2005): Effects of differences in virulence of different serovars of *Haemophilus paragallinarum* on perceived vaccine efficacy. Onderstepoort J Vet Res; 72:1-6.

Buter R, Feberwee A, Heuvelink A, Peerboom R, de Wit S, Soriano-Vargas E, Dijkman R. (2019). Opportunities and challenges in molecular typing of *Avibacterium paragallinarum*. (Bouwstra), International Symposium on Avian Mycoplasmosis and Infectious Coryza. Deventer, The Netherlands.

Cabrera A, Morales-Erasto V, Salgado-Miranda C, Blackall PJ, Soriano-Vargas E. (2011): Hemagglutinin serotyping of *Avibacterium paragallinarum* isolates from Ecuador. Trop Anim Health Prod; 43:549-551.

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.

Chen X, Chen Q, Zhang P, Feng W, Blackall PJ. (1998): Evaluation of a PCR test for the detection of *Haemophilus paragallinarum* in China. Avian Pathol; 27:296–300.

- 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.
- Christensen H, Bisgaard M. (2018): Classification of genera of Pasteurellaceae using conserved predicted protein sequences. *Int J Syst Evol Microbiol*; 68:2692-2696.
- 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.
- Crispo M, Blackall P, Khan A, Shivaprasad HL, Clothier K, Senties-Cué CG, Cooper G, Blakey J, Pitesky M, Mountainspring G, Cutler G, Bickford A, Stoute S. (2019): Characterization of an outbreak of infectious coryza (*Avibacterium paragallinarum*) in commercial chickens in Central California. *Avian Dis*; 63:486-494.
- Crispo M, Senties-Cué CG, Cooper GL, Mountainspring G, Corsiglia C, Bickford AA, Stoute ST. (2018): Otitis and meningoencephalitis associated with infectious coryza (*Avibacterium paragallinarum*) in commercial broiler chickens. *J Vet Diagn Invest*; 30:784-788.
- Dinkelacker AG, Vogt S, Oberhettinger P, Mauder N, Rau J, Kostrzewa M, Rossen JWA, Autenrieth IB, Peter S, Liese J. (2018): Typing and species identification of clinical *Klebsiella* isolates by Fourier transform infrared spectroscopy and matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry. *J Clin Microbiol*; 56:1-27.

- 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.
- Feberwee A, Dijkman R, Buter R, Soriano-Vargas E, Morales-Erasto V, Heuvelink A, Fabri T, Bouwstra R, de Wit S. (2019): Identification and characterization of Dutch *Avibacterium paragallinarum* isolates and the implications for diagnostics. Avian Pathol; 48:549-556.
- Fernández RP, Garcia-Delgado GA, Ochoa P, Soriano VE. (2000): Characterization of *Haemophilus paragallinarum* isolates from Mexico. Avian Pathol; 29:473-476.
- 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 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.
- Heuvelink A, Wiegel J, Kehrenberg C, Dijkman R, Soriano-Vargas E, Feberwee A. (2018): Antimicrobial susceptibility of *Avibacterium paragallinarum* isolates from outbreaks of infectious coryza in Dutch commercial poultry flocks, 2008-2017. Vet Microbiol; 217:135-147.

- Hobb RI, Tseng H-J, Downes JE, Terry TD, Blackall PJ, Takagi M, Jennings MP. (2002): Molecular analysis of a haemagglutinin of *Haemophilus paragallinarum*. *Microbiology*; 148:2171-2179.
- Iritani Y, Iwaki S, Yamaguchi T. (1980): Properties of heat-stable antigen in the culture supernate of *Haemophilus paragallinarum*. *Nihon Juigaku Zasshi*; 42:635-641.
- Jacobs AA, Werf JVD. (2000): Efficacy of a commercially available coryza vaccine against challenge with recent South African NAD-independent isolates of *Haemophilus paragallinarum* in chickens. *J S Afr Vet Assoc*; 71:109-110.
- Jeong O-M, Kang M-S, Blackall PJ, Jeon B-W, Kim J-H, Jeong J, Lee H-J, Kim D-W, Kwon Y-K, Kim J-H. (2020): Genotypic divergence of *Avibacterium paragallinarum* isolates with different growth requirements for nicotinamide adenine dinucleotide. *Avian Pathol*; 49:153-160.
- Kuhnert P, Korczak BM. (2006): Prediction of whole-genome DNA-DNA similarity, determination of G+C content and phylogenetic analysis within the family Pasteurellaceae by multilocus sequence analysis (MLSA). *Microbiology*; 152:2537-2548.
- Kume K, Sawata A. (1984): Immunologic properties of variants dissociated from serotype 1 *Haemophilus paragallinarum* strains. *Nihon Juigaku Zasshi*; 46:49-56.
- Kume K, Sawata A, Nakai T, Matsumoto M. (1983): Serological classification of *Haemophilus paragallinarum* with a hemagglutinin system. *J Clin Microbiol*; 17:958-964.

- Liu C-C, Ou S-C, Tan D-H, Hsieh M-K, Shien J-H, Chang P-C. (2016): The Fimbrial protein is a virulence factor and potential vaccine antigen of *Avibacterium paragallinarum*. *Avian Dis*; 60:649-655.
- Luna-Galaz GA, Morales-Erasto V, Peñuelas-Rivas CG, Blackall PJ, Soriano-Vargas E. (2016): Antimicrobial sensitivity of *Avibacterium paragallinarum* isolates from four Latin American countries. *Avian Dis*; 60:673-676.
- Morales-Erasto V, Falconi-Agapito F, Luna-Galaz GA, Saravia LE, Montalvan-Avalos A, Soriano-Vargas E, Fernández-Díaz M. (2016): Coinfection of *Avibacterium paragallinarum* and *Ornithobacterium rhinotracheale* in chickens from Peru. *Avian Dis*; 60:75-78.
- Morales-Erasto V, Fernández-Rosas P, Negrete-Abascal E, Salazar-García F, Blackall PJ, Soriano-Vargas E. (2014a). Genotyping, pathogenicity, and immunogenicity of *Avibacterium paragallinarum* serovar B-1 isolates from the Americas. *Avian Dis*; 58:293-296.
- Morales-Erasto V, García-Sánchez A, Salgado-Miranda C, Talavera-Rojas M, Robles-Gonzalez 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.
- Morales-Erasto V, Mauri-Esteban E, Trujillo-Ruíz HH, Talavera-Rojas M, Blackall PJ, Soriano-Vargas E. (2015): Protection conferred by infectious coryza vaccines against emergent *Avibacterium paragallinarum* serovar C-1. *Avian Dis*; 59:162-164.
- Morales-Erasto V, Posadas-Quintana Jde J, Fernández-Díaz M, Saravia LE, Martínez-Castañeda JS, Blackall PJ, Soriano-Vargas E. (2014b): An

evaluation of serotyping of *Avibacterium paragallinarum* by use of a multiplex polymerase chain reaction. *J Vet Diagn Invest*; 26:272-276.

Nhung NT, Chansiripornchai N, Carrique-Mas JJ. (2017): Antimicrobial resistance in bacterial poultry pathogens: a review. *Front Vet Sci*; 4:1-17.

Olive DM, 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.

Paudel S, Ruhnau D, Wernsdorf P, Liebhart D, Hess M, Hess C. (2017): Presence of *Avibacterium paragallinarum* and histopathologic lesions corresponds with clinical signs in a co-infection model with *Gallibacterium anatis*. *Avian Dis*; 61:335-340.

Prüller S, Turni C, Blackall PJ, Beyerbach M, Klein G, Kreienbrock L, Strutzberg-Minder K, Kaspar H, Meemken D, Kehrenberg C. (2016): Towards a standardized method for broth microdilution susceptibility testing of *Haemophilus parasuis*. *J Clin Microbiol*; 55:264-273.

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.

Sawata A, Kume K, Nakai T. (1984): Hemagglutinin of *Haemophilus paragallinarum* serotype 1 organisms. *Nihon juigaku Zasshi*; 46:21-29.

- Sawata A, Kume K, Nakase Y. (1982): Hemagglutinin of *Haemophilus paragallinarum* serotype 2 organisms: occurrence and immunologic properties of hemagglutinin. *Am J Vet Res*; 43: 1311-1314.
- 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 EV, Garduño ML, Téllez G, Rosas PF, Suárez-Güemes F, Blackall PJ. (2004a): Cross-protection study of the nine serovars of *Haemophilus paragallinarum* in the Kume haemagglutinin scheme. *Avian Pathol*; 33:506-511.
- Soriano VE, Longinos GM, Fernández RP, Velásquez QE, Ciprián CA, Salazar-García F, Blackall PJ. (2004b): Virulence of the nine serovar reference strains of *Haemophilus paragallinarum*. *Avian Dis*; 48:886-889.
- Soriano VE, Téllez G, Hargis BM, Newberry L, Salgado-Miranda C, Vázquez JC. (2004c): Typing of *Haemophilus paragallinarum* strains by using enterobacterial repetitive intergenic consensus-based polymerase chain reaction. *Avian Dis*; 48:890-895.
- Trujillo-Ruíz HH, Shivaprasad HL, Morales-Erasto V, Talavera-Rojas M, Salgado-Miranda C, Salazar-García F, Blackall PJ, Soriano-Vargas E. (2016): Virulence of serovar C-1 strains of *Avibacterium paragallinarum*. *Avian Dis*; 60:837-840.
- Wang Y-P, Hsieh M-K, Tan D-H, Shien J-H, Ou S-C, Chen C-F, Chang P-C. (2014): The haemagglutinin of *Avibacterium paragallinarum* is a trimeric autotransporter adhesin that confers haemagglutination, cell adherence and biofilm formation activities. *Vet Microbiol*; 174:474-482.

Wu J-R, Wu Y-R, Shien J-H, Hsu Y-M, Chen C-F, Shieh HK, Chang PC. (2011): Recombinant proteins containing the hypervariable region of the haemagglutinin protect chickens against challenge with *Avibacterium paragallinarum*. *Vaccine*; 29:660-667.