

**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA AGRARIA
ANTONIO NARRO
“UNIDAD LAGUNA”**

DIVISIÓN REGIONAL DE CIENCIA ANIMAL



**“Epizootiología y situación del *Haemophylus
paragallinarum*”.**

POR

MARCO ANTONIO GONZÁLEZ RAMOS

MONOGRAFÍA

**PRESENTADA COMO REQUISITO PARCIAL PARA OBTENER
EL TÍTULO DE:**

MÉDICO VETERINARIO ZOOTECNISTA

ASESOR

MVZ. FRANCISCO J CARRILLO MORALES

Co-Asesor

MVZ RODRIGO ISIDRO SIMON ALONSO

TORREÓN, COAHUILA.

Junio 2010

**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA AGRARIA
ANTONIO NARRO
“UNIDAD LAGUNA”**

DIVISIÓN REGIONAL DE CIENCIA ANIMAL



**“Epizootiología y situación del *Haemophylus
paragallinarum*”.**

POR

MARCO ANTONIO GONZÁLEZ RAMOS

MONOGRAFÍA

**PRESENTADA COMO REQUISITO PARCIAL PARA OBTENER
EL TÍTULO DE:**

MÉDICO VETERINARIO ZOOTECNISTA

TORREÓN, COAHUILA

Junio 2010

**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA AGRARIA
ANTONIO NARRO
“UNIDAD LAGUNA”**

DIVISIÓN REGIONAL DE CIENCIA ANIMAL



“Epizootiología y situación del *Haemophylus paragallinarum*”.

POR

MARCO ANTONIO GONZÁLEZ RAMOS

MONOGRAFÍA

Aprobada por el

PRESIDENTE DEL JURADO

MVZ. FRANCISCO JAVIER CARRILLO MORALES

**COORDINADOR DE LA DIVISIÓN REGIONAL
DE CIENCIA ANIMAL**

MVZ. RODRIGO ISIDRO SIMÓN ALONSO

**Coordinación de la División
Regional de Ciencia Animal**



TORREÓN, COAHUILA

Junio 2010

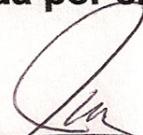
**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA AGRARIA
ANTONIO NARRO
“UNIDAD LAGUNA”**

DIVISIÓN REGIONAL DE CIENCIA ANIMAL

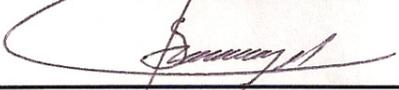


**“Epizootiología y situación del Haemophylus
paragallinarum”.**

Monografía Aprobada por el H jurado examinador



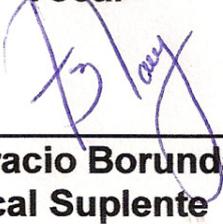
**MVZ. Francisco Javier Carrillo Morales
PRESIDENTE**



**MVZ. Rodrigo Isidro Simón Alonso
Vocal**



**MVZ. Cuauhtémoc Félix Zorrilla
Vocal**



**IZ. Jorge Horacio Borunda Ramos
Vocal Suplente**

AGRADECIMIENTO

Antes de comenzar la descripción de esta monografía quiero presentar mis más grandes agradecimientos.

A DIOS. Mi mejor amigo, compañero por su gracia y voluntad de darme la oportunidad de terminar mis estudios y lograr el objetivo de un esfuerzo de mi familia y mío.

“A mi Universidad”: por a verme cedido un espacio en sus aulas y permitirme tener una formación profesional adecuada, además de haberme enseñado a amar sus colores.

A mi Asesor Mvz. Francisco J. Carrillo Morales por la ayuda valiosa y su esfuerzo puesto en la realización de esta monografía.

Al Mvz. Rodrigo I. Simón Alonso, al M.C. José Moncebáez Pérez y a los demás profesores que colaboraron en mi formación durante 5 años de mi carrera.

Al Dr. Luis Lauro Flores Flores y al Mvz. Sergio Ricardo Alvares Flores. Por su colaboración y ayuda en mi aprendizaje en ave de engorda.

DEDICATORIAS

A mi Señor Padre. José Félix González Martínez el mejor padre del mundo por el amor, apoyo y comprensión que siempre me brindo.

A mi Señora Madre. Josefa Ramos García por ser la mejor madre para mi, por tenerme confianza, cariño y por todo el apoyo que siempre me brindo en las buenas y en las malas.

A mis Hermanos. Miguel Ángel González Ramos y Neli González Ramos a estos dos tesoros que dios me dio como hermanos que supieron confiar en mí y me apoyaron hasta el final de mi carrera.

A mi Tío. Marcelino González Martínez por el cariño y consejos que durante estos 5 años me dio.

A mi Novia. Rosario Monserrat López Ramírez por la paciencia, comprensión y cariño que siempre tuvo hacia a mi.

A mi compañero y Amigo Edwin Estivé Mendieta Miranda por la amistad que siempre hemos tenido y el apoyo mutuo que nos hemos brindado.

A si mismo este trabajo es dedicado a mi mismo por el empeño para la culminación y presentación de este proyecto que es mi carrera.

RESUMEN.

Las infecciones causadas por *Haemophilus paragallinarum* (ahora denominado *Avibacterium paragallinarum*) es el agente causal de la coriza infecciosa es una enfermedad respiratoria aguda de las gallinas domesticas y requiere para su crecimiento NAD (nicotinamida-adenin dinucleotido) y los medios de cultivo que son necesarios para el desarrollo de este microorganismo es la gelosa sangre y el NAD. Excepcionalmente pueden enfermarse también los faisanes y gallinas de Guinea. El *H. paragallinarum* infecta al ave por vía respiratoria y luego de un corto periodo de incubación, que varia entre 1 a 3 días, produce una enfermedad que se manifiesta por inflamación catarral de los senos paranasales y asociado a inflamación de los barbillones, conjuntivitis o queratitis. Los casos de neumonía y aerosaculitis son menos frecuentes pero también suelen ocurrir en las infecciones puras por estos hemofilos. En las gallinas en producción causa alta morbilidad, baja o nula mortalidad y una importante perdida en la producción de huevos, la que generalmente oscila entre 10% y 40%. En pollos parrilleros puede causar un cuadro descrito como «cabeza hinchada» y ocasionalmente también producir septicemia y muerte.

Esta bacteria generalmente se asocia con otros agentes bacterianos, víricos o parasitarios y cuando esto ocurre se agrava el curso de la enfermedad. Entre los agentes bacterianos más comunes deben mencionarse los mycoplasmas y las pasteurellas. Cuando *H. paragallinarum* se asocia con otros agentes esta enfermedad se denomina coriza infecciosa complicada.

En esta recopilación se aportaran detalles sobre la clasificación, identificación y serotipificación del agente causal, nuevos métodos de diagnóstico y programas de vacunación para prevenir esta enfermedad. A lo largo de esta revisión se hará referencia a los hemofilos aviarios que, para el propósito de este trabajo, serán definidos como organismos gram negativos aislados de aves y que necesariamente requieren factores de crecimiento in vitro. Los dos factores que pueden ser requeridos por los hemofilos para su crecimiento in vitro son hemina (factor X) y/o nicotin-adenin-dinucleotido (NAD o factor V). (141)

Palabras claves: Coriza infecciosa, *Avibacterium paragallinarum* *Haemophilus*, Vacunas, serovariedades.

INDICE

RESUMEN.....	III
INTRODUCCIÓN.....	1
ANTECEDENTES EPIZOOTIOLÓGICOS.....	2
Hospederos naturales y experimentales.....	4
Reservorios de infección.....	4
Periodo de incubación.....	4
Características de la infección.....	5
Coriza infecciosa complicada.....	7
Morbilidad y mortalidad.....	8
Hallazgos Histopatológicos.....	8
Epizootiología molecular.....	9
ANTIGENICIDAD PATOGENICIDADE E INMUNOGENICIDAD.....	10
DIAGNÓSTICO.....	15
Aislamiento e identificación del agente.....	15
Identificación serológica.....	17
Caracterización molecular.....	17
Diagnóstico diferencial.....	19
PREVENCIÓN Y CONTROL.....	20
Inmunidad e inmunógenos.....	20
Integridad de las cepas.....	24
Hemoaglutinantes y capsulares.....	24
Protección cruzada entre serovariedades.....	25
Concentración bacteriana por dosis.....	27
Medios de cultivo.....	27
Agentes inactivantes.....	28
Adyuvantes.....	28
Vías de administración.....	29
Programa de vacunación.....	30
Dosis y edad.....	30
Evaluación serológica.....	31
TRATAMIENTO Y DESINFECCIÓN.....	33
CONCLUSIONES.....	35
LITERATURA CITADA.....	39

INTRODUCCIÓN.

Las infecciones causadas por *Haemophilus paragallinarum* (ahora denominado *Avibacterium paragallinarum*) son la causa y el agente causal de la coriza infecciosa y requiere para su crecimiento NAD (nicotinamida-adenin dinucleotido) y los medios de cultivo que son necesarios para el desarrollo de este microorganismo es la gelosa sangre y el NAD. La Coriza infecciosa en aves puede causar pérdidas económicas en las operaciones avícolas en el mundo entero.

La Coriza Infecciosa es una enfermedad respiratoria muy contagiosa, caracterizada por conjuntivitis espumosa, sinusitis, descarga nasal, depresión y letargo. Las parvadas afectadas que están en el periodo de postura pueden sufrir una disminución de 5% a 10% en la producción de huevos y en algunos casos hasta del 40% al 100% (pérdida total). Otras especies animales no se enferman exceptuando los faisanes y gallinas de Guinea. La enfermedad está difundida mundialmente y causa importantes pérdidas económicas a la industria avícola sobre todo al disminuir la producción de huevos. Recientemente se ha descrito también esta enfermedad en pollos parrilleros de Norte y Sud América (7, 19, 21) estando asociado *H. paragallinarum* con otros agentes bacterianos y víricos. El ser humano no es susceptible y por lo tanto la coriza no tiene implicancia para la salud pública.

El impacto económico de esta enfermedad radica en las pérdidas que ocasiona a la avicultura, debido a retraso del crecimiento, pérdida de peso, incremento en el número de aves eliminadas y predisposición a la enfermedad respiratoria crónica complicada. En gallinas de postura, la producción de huevo puede reducirse considerablemente. (1)

La protección y control de la coriza infecciosa de los pollos principalmente es a través del uso de vacunas conteniendo bacterias inactivadas de la enfermedad. La utilización de vacunas con cepas vivas atenuadas o patógenas aún requieren de una mayor investigación ya que no

obstante su ideal ventaja de conferir protección cruzada contra todas las serovariedades todavía no la ofrecen.

ANTECEDENTES EPIZOOTIOLÓGICOS.

El género *Haemophilus* ha sido tradicionalmente definido como integrado por bacterias Gram negativas que requieren uno o dos factores de crecimiento: hemina (factor X) y nicotín-adenín-dinucleótido (NAD o factor V). Dentro de este género *H. paragallinarum* es el agente etiológico de la coriza infecciosa (1, 7). Otras tres especies bacterianas de la gallina doméstica, antes integrantes del género *Haemophilus* y descritas en conjunto como *H. avium*, se encuentran actualmente ubicadas dentro del género *Pasteurella*: *P. avium* y *P. volantium* y "Pasteurella especie A". Las dos primeras son completamente patógenas mientras que la última se ha descrito como levemente virulenta para el tracto respiratorio de la gallina, aunque ninguna de ellas es causante de coriza.

Clásicamente estas cuatro especies bacterianas requieren únicamente del NAD para desarrollar (1, 2,7). Originalmente la bacteria considerada el agente causal de la coriza infecciosa se denominó *H. gallinarum* y erróneamente se demostró que requería ambos factores de crecimiento. Ello fue debido a que los antiguos medios de cultivo disponibles para las pruebas tenían serias deficiencias. Por ello, se cuestiona la vieja descripción de *H. gallinarum* y sólo se considera la existencia de *H. paragallinarum*, que necesita sólo del NAD para su crecimiento (1,6). Es interesante acotar que varios de los discos comerciales actuales erróneamente identifican a *H. paragallinarum* como dependiente del factor X por lo cual se debe realizar la prueba de la porfirina en vez de la prueba con los mencionados discos⁴. *H. paragallinarum* es realmente un hemófilo atípico. De hecho existe evidencia taxonómica de que esta especie bacteriana se encuentra más estrechamente relacionada con el género *Actinobacillus* que con el género *Haemophilus* (1).

El concepto taxonómico que hasta ahora se sustentaba para definir el género *Haemophilus* ha sido bruscamente cambiado en la literatura internacional cuando en Sudáfrica se describieron brotes de coriza infecciosa causados por cepas de *H. paragallinarum* NAD independientes que son taxonómicamente muy similares a las cepas clásicas (12). Estas bacterias adquieren la capacidad de sintetizar el NAD al captar el DNA de un plásmido por transformación (11). Este plásmido puede además difundirse por transformación entre distintas cepas de *H. paragallinarum* y posiblemente también entre las citadas *Pasteurellas* NAD dependientes de las aves. Quizás por este motivo en Sudáfrica también existen cepas NAD independientes de *P. avium*, *P. volantium* y "*Pasteurella especie A*" (12). Es importante señalar que en este país también se describieron cepas de *H. influenzae* de origen humano que desarrollan también independientes del NAD11. Esto significa que en Sudáfrica podría existir una infección generalizada por el citado plásmido. Más interesante aún es que las cepas transformadas mantienen inalterados sus antígenos hemoaglutinantes (AgHems) por lo cual sería posible eliminar en el laboratorio la dependencia del NAD en cepas destinadas a la elaboración de vacunas (13).

Este nuevo concepto permitiría elaborar vacunas con cepas de más fácil crecimiento al eliminar la dependencia del NAD. Esta posibilidad debe ser considerada con mucha cautela pues las cepas de *H. paragallinarum* independientes del NAD han demostrado ser muy patógenas y de hecho van reemplazando paulatinamente a las dependientes en los brotes de la coriza que se registran en Sudáfrica (17). Por ello, para un país como el nuestro, en el cual no se han registrado aislamientos de cepas independientes del NAD sería peligroso introducir este plásmido para transformar a las cepas regionales, destinadas a la elaboración de vacunas, si no se cuenta con una muy estricta seguridad biológica. Aún más, si bien la coriza infecciosa existe en nuestro país desde hace varios años²⁴, hasta la fecha no se han detectado cepas independientes del NAD por lo cual este tipo particular de coriza infecciosa debería ser considerada una enfermedad exótica cuando es causada por cepas NAD independientes.

Hospederos naturales y experimentales.

Los pollos y gallinas (*Gallus gallus*) son hospederos naturales de *H. paragallinarum*, susceptibles en todas las edades. (1). No obstante, existen informes del aislamiento de esta bacteria en codornices (2, 3) y psitácidos.(4,5).

Tres pavos mostraron signos de coriza y sinusitis similares a los observados en pollos desafiados experimentalmente con el mismo cultivo.⁶ Sin embargo, no se han efectuado estudios bacteriológicos definitivos que evidencien presencia y susceptibilidad de otras especies aviares a *H. paragallinarum*. Los conejos, caballos, ratones, gorriones, patos⁷ y palomas⁶ son refractarios a la infección experimental.

Reservorios de infección.

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

Periodo de incubación

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



En esta imagen nos muestra el medio de cultivo de agar chocolate y agar sangre con su colonia nodriza de Avibacterium paragallinarum.

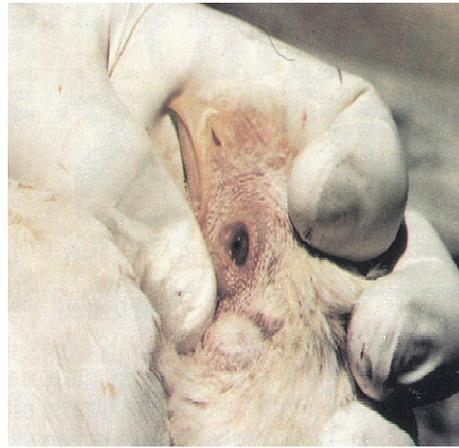
Características de la infección.

Los signos clínicos de la coriza infecciosa como estornudo, conjuntivitis, con olor fétido exudado nasal seroso o mucoso, estornudo, inflamación de senos infraorbitarias, edema facial y conjuntivitis. (1). Esto nos permite establecer un diagnóstico presuntivo de coriza infecciosa; no obstante es importante realizar el diagnóstico definitivo, para ello es necesario el aislamiento del *Avibacterium paragallinarum* en gelosa sangre, con una colonia nodriza de *Avibacterium paragallinarum*.

La inflamación de barbillas puede ser particularmente evidente en machos. También se puede escuchar estertor traqueal cuando las aves tienen afectado el tracto respiratorio inferior.



Conjuntivitis



Exudado nasal y edema facial

Se ha observado un cuadro respiratorio más severo en casos donde se asocia *H. paragallinarum* con otros agentes: *Mycoplasma sinoviae*, (12). *M. gallisepticus*,(13) *Ornithobacterium rhinotracheale*,(14,15) *Escherichia coli*, *Salmonella* spp, *Pasteurella* spp y virus de la bronquitis infecciosa,(16,17) entre otros. Malkinson *et al.*¹⁸ informaron la asociación de *H. gallinarum* con *Chlamydia psittaci* y el virus de la viruela aviar en reproductores pesados. Sin embargo, parece muy común la asociación con *Pasteurella gallinarum*, bacteria que puede aparecer luego de la fase aguda de la coriza infecciosa y causa panoftalmía purulenta y contenido de masas caseosas en los senos paranasales. (17).

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

La coriza infecciosa ha sido descrita como una enfermedad sólo importante para la gallina en postura. Sin embargo esta enfermedad ocurre tanto en pollos parrilleros y pollas en recría como en gallinas ponedoras y reproductoras. Los síntomas más comunes son descarga nasal, tumefacción facial, lagrimeo, anorexia y diarrea. Cuando la infección se difunde al tracto respiratorio inferior los animales afectados evidencian reales. Como consecuencia de estos síntomas disminuye el consumo de alimentos y agua con el consiguiente retardo en el crecimiento o disminución de la postura,

aumentando el número de aves que deben descartarse (4). En pollos parrilleros se han descrito casos más severos, aunque menos frecuentes, caracterizados por celulitis fibrinopurulenta de la cabeza y barbillones, aerosaculitis, septicemia generalizada y artritis (7, 21).

En los casos de coriza no complicada generalmente se produce alta morbilidad y baja o nula mortalidad. Sin embargo, si la cepa infectante es muy patógena o si existe asociación con otros agentes infecciosos puede ocurrir alta mortalidad. De hecho en Argentina, India, Marruecos, Sudáfrica y Tailandia se han descrito casos de Coriza infecciosa causantes de mortalidad producida por cepas de *H. paragallinarum* muy patógenas y con frecuencia asociadas a otros agentes víricos o bacterianos (3, 4, 21).

Coriza infecciosa complicada.

Cuando *H. paragallinarum* se asocia con otros agentes se agrava el curso de la enfermedad, que entonces se denomina "coriza infecciosa complicada". Entre los agentes bacterianos más comunes deben mencionarse *Escherichia coli*, *P. gallinarum* y *Mycoplasma gallisepticus* y menos frecuentemente *P. haemolytica*, *P. multocida*, *M. synoviae* y *Salmonella* entérica (3, 4, 19,21).

Más recientemente se describe a una nueva especie, denominada *Ornithobacterium rhinotracheale* (27), como agente asociado a coriza infecciosa y con capacidad patógena para producir infecciones respiratorias en gallinas ponedoras y pollos parrilleros (3,28). Las citadas *P. avium*, *P. volantium* y "Pasteurella especie A" también pueden asociarse con *H. Paragallinarum* (3,6). La coriza infecciosa puede ocurrir en forma simultánea con diversas infecciones virales del tracto respiratorio, siendo las asociaciones más frecuentes con la viruela, bronquitis y laringotraqueítis infecciosas (4).

Morbilidad y mortalidad

La coriza infecciosa clásica está generalmente caracterizada por alta morbilidad y baja mortalidad.¹ Sin embargo, se ha informado de cuadros clínicos atípicos donde *H. paragallinarum* ha causado mortalidad.

En parvadas de pollos de engorda y gallinas de postura, las pérdidas debidas a mortalidad persistente y eliminación de aves fue de 2%-5%.¹⁷ En estos casos, *H. paragallinarum* fue aislado a partir de hígado, riñón y especialmente de la articulación del tarso y globos oculares, ella indica septicemia. Droual *et al.*,⁽²⁰⁾. Describieron desechos en matadero de pollos de engorda por lesiones de celulitis fibrinopurulenta de la cabeza y barbillas y aerosaculitis. Bland *et al.*,⁽²¹⁾, informaron que en un complejo de gallinas de postura en California, durante un periodo de 13 semanas, la mortalidad varió del 8% al 64% y la producción de huevo cayó de un promedio de 77% a tan sólo 15%, en el brote de coriza infecciosa más severo registrado a la fecha en esta área.

Hallazgos Histopatológicos.

En pollos infectados con *H. paragallinarum*, la cavidad nasal y senos infraorbitarios presentan exudado seroso o mucoso. (22). Las membranas mucosas de estos sitios se observan congestionadas con inflamación hidrópica o edematosa (inflamación catarral aguda). También se observa edema en el tejido subcutáneo de la región periorbital y de las barbillas.⁽²³⁾. Los cambios microscópicos se limitan principalmente a la mucosa de los pasajes nasales y senos infraorbitarios.

La lesión básica observada es un infiltrado inflamatorio de la mucosa respiratoria con indicación de un efecto citotóxico en el epitelio y marcada estimulación de las glándulas mucosas intraepiteliales. (24). También se observa infiltración marcada de mastocitos en la lámina propia de las membranas mucosas de la cavidad nasal. Los productos de los mastocitos, heterófilos

y macrófagos pueden ser responsables de los cambios vasculares severos y el daño celular que conduce a coriza.(23). Sin embargo, aún no se comprende bien la patogenia de *H. paragallinarum* en la coriza infecciosa.

Epizootiología molecular.

De forma Adicionales Pruebas de biotipificación y serotipificación, Blackall y cols. (8). Incluyeron globos oculares indicando una septicemia. Droual y cols. (20), describen condenas de pollos de engorde en el matadero, principalmente debido a lesiones de celulitis fibrinopurulenta de la cabeza y las barbillas, junto con aerosaculitis. Bland et al. (21), informaron a la coriza infecciosa brote más grave registrado hasta ahora en un complejo por el que se encuentra el área de California. Durante un período de 13 semanas, la mortalidad varió desde 8% hasta 64% y la producción de huevos se redujo de un promedio de 77% a sólo el 15%.

El perfil obtenido permitió reconocer tres grupos de brotes relacionados. Los resultados indicaron que las granjas pueden tener infección crónica causada por una sola cepa de *H. paragallinarum* que reaparece a intervalos. Este estudio también mostró la primera evidencia detallada de que las aves de reemplazo son la mayor fuente de coriza infecciosa.

De forma similar, Mifflin *et al.* (26, 27), caracterizaron 15 aislamientos de *H. paragallinarum* independientes de NAD obtenidos a partir de 1989 en Sudáfrica, mediante serotipificación, biotipificación, análisis con endonucleasas de restricción y ribotipificación.

Todos los aislamientos fueron serovariedad A y mostraron un único patrón en el análisis con endonucleasas de restricción y ribotipificación, que fue diferente a los patrones de aislamientos dependientes de NAD obtenidos antes de 1989. Basados en lo anterior, los autores sugirieron que los aislamientos independientes de NAD corresponden a clones de las cepas clásicas. En un estudio similar, mediante perfiles de ribotipificación se estableció la epidemiología molecular de 12 aislamientos (serovariedad A) de *H. paragallinarum* obtenidos en cinco brotes de coriza infecciosa en Hebei, China

(26). Los resultados obtenidos mostraron cuatro perfiles de ribotipificación, los cuales se correspondieron con la historia epidemiológica de los aislamientos, confirmando que existe diversidad genética en la población de *H. paragallinarum* de ese país.

En México, Soriano y Blackall, (27), mediante la prueba de ERIC-PCR estudiaron 15 aislamientos de *H. paragallinarum* de las serovariedades de Blackall. Los resultados mostraron dos perfiles ERIC en los aislamientos serovariedad A-1, uno para el aislamiento A-2, tres para los aislamientos B-1 y dos para los aislamientos C-2. Con base en el origen de los aislamientos, los autores establecieron una relación entre la serovariedad y el perfil ERIC obtenido, concluyeron que esta prueba puede ser una herramienta de laboratorio rápida en la caracterización epidemiológica de *H. paragallinarum*.

ANTIGENICIDAD PATOGENICIDADE E INMUNOGENICIDAD.

Los antígenos hemoaglutinantes, o hemoaglutininas, son las estructuras principalmente relacionadas con la antigenicidad, patogenicidad e inmunogenicidad de *H. paragallinarum*. Así, una cepa variante que no hemoaglutina, aun después de tratamientos o envejecimiento, tampoco produce coriza cuando se instila o inocula en aves susceptibles.(28,29) Takagi *et al.*(30) purificaron esta hemoaglutina mediante el uso de cromatografía de afinidad y anticuerpos monoclonales y demostraron su importancia crucial en la inmunogenicidad al inocular con la hemoaglutinina purificada aves susceptibles por vía intramuscular.

De este modo se logró protección frente a desafíos con una cepa patógena. Es más, esta protección activa depende totalmente de la presencia de anticuerpos humorales inhibidores de la hemoaglutinación en el suero sanguíneo. Además, Takagi *et al* (.31, 32) demostraron que se puede conferir una sólida protección frente al desafío con la misma cepa, administrando por vía intraperitoneal anticuerpos monoclonales de ratón, específicamente dirigidos contra las hemoaglutininas; esta vez, mediante un mecanismo de

inmunidad pasiva. Si bien estos últimos estudios se realizaron con la cepa 221 (A-1), estos resultados son, con certeza, generales y por extensión pueden ser aplicados a las hemoaglutininas de la mayoría de las cepas de *H. paragallinarum*.

Se considera que la adherencia bacteriana a las células epiteliales es el primer paso en el proceso de infección de las superficies mucosas. Las adhesinas son las estructuras bacterianas que median la adherencia a estructuras celulares complementarias, los receptores.(33). Con base en lo anterior, se ha mostrado adherencia *in vivo* e *in vitro* de *H. paragallinarum* a células epiteliales traqueales de pollo.(34,35). De forma similar, se ha mostrado que bacterias de *H. paragallinarum*, adsorbidas de manera homóloga o heteróloga con antisueros de conejo o pollo y lavados traqueales de aves inmunizadas, perdieron la actividad hemoaglutinante y capacidad de adherencia a las células epiteliales. (36).

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

Recientemente, Terry *et al.* (37), informaron de la producción de hemocina, una bacteriocina, por parte de *H. paragallinarum*. Adicionalmente identificaron el gen cromosómico que codifica para esta hemocina, así como un plásmido que porta este gen un aislamiento de Australia. Los autores

mencionan que la hemocina producida por *H. paragallinarum* puede ser importante en la colonización de los senos respiratorios de los pollos, ya que encontraron que aislamientos de *Pasteurella avium*, *P. volantium* y *P.* especie A, todos ellos considerados bacterias gram negativas no patógenas y que se encuentran en el tracto respiratorio superior de pollos que sufren enfermedad respiratoria debida a otros agentes, fueron sensibles a esta hemocina.

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

Thornton y Blackall (41), encontraron que la cepa 0222 había producido anticuerpos aglutinantes específicos de serovariedad. Yamaguchi *et al.*(42) investigaron la patogenicidad de cinco cepas serovariedad B, las cuales incluyeron las cepas 0222 y Spross. A diferencia de las otras tres cepas, la cepa 0222 no produjo signos clínicos de coriza infecciosa. Sin embargo, se observaron lesiones (engrosamiento de membranas mucosas y exudado amarillento) en senos infraorbitarios y aislamiento del microorganismo de desafío. Estos resultados evidencian que la cepa 0222 es capaz de producir infección e indican, probablemente, que es una cepa de baja virulencia. Sin embargo, no se han conducido los estudios definitivos al respecto. Bragg *et al.* (43), registraron diferentes grados de virulencia en pollos desafiados con aislamientos sudafricanos de las serovariedades A-1, B-1, C-2 y C-3.

El aislamiento serovariedad C-3 produjo los signos más graves en las aves desafiadas. De forma similar, Soriano *et al.* (44), desafiaron grupos de pollos de manera independiente con las nueve cepas de referencia del esquema de Blackall, e informaron que los signos más graves de coriza

infecciosa se observaron en aves desafiadas con las cepas de las serovariedades C-1 y C-3. Sandoval y Terzolo (29), estudiaron diferentes cepas regionales de las serovariedades A, B y C de Argentina, mediante el desarrollo de modelos de reproducción de la enfermedad para evaluar su patogenicidad, difusión horizontal e invasividad. Se demostró que las cepas B fueron consistentemente patógenas y causan lesiones de coriza muy aguda, siempre con alto grado de contagio e invasividad. En cambio las cepas A y C mostraron distinto comportamiento: algunas fueron muy virulentas, difusoras e invasivas; otras fueron patógenas, pero sólo difundían muy lentamente, y otras fueron poco patógenas e inclusive se encontraron unas pocas cepas de campo que mostraron ser totalmente patógenas. Horner *et al.*⁴⁶ sugirieron que los aislamientos independientes de NAD pueden causar aerosaculitis de manera más frecuente que los *H. paragallinarum* típicos. Además, se especula que los aislamientos independientes de NAD pueden ser diferentes como para producir fallas de las bacterinas actualmente empleadas. (47).

La virulencia de aislamientos de *H. paragallinarum* independientes de NAD también ha sido investigada. Bragg⁴⁸ desafió grupos de aves con aislamientos independientes de NAD en los cuales su patogenicidad fue evidente. Sin embargo, los signos de coriza infecciosa fueron menores que los observados en aves desafiadas con cepas dependientes de NAD. Es importante destacar que Bragg *et al.*⁴⁹ han demostrado que la independencia de NAD puede ser adquirida por transformación mediante la adquisición de un plásmido.

De forma similar, Taole *et al.* (49), transformaron una cepa serovariedad C-3 dependiente de NAD en independiente de este factor, mediante la técnica de electroporación. Los signos de coriza infecciosa fueron menos graves en las aves que fueron desafiadas con la cepa transformada.

No se pudo explicar el mecanismo por el cual la virulencia es afectada por este proceso. Lo interesante de esta transformación es su posible aplicación práctica, ya que sería factible reducir el costo de producción de las bacterinas al usar cepas que no requieren de la adición de NAD en los cultivos

industriales. De hecho, Bragg *et al.* (50) demostraron que estas cepas transformadas mantienen inalterables su capacidad de producir hemoaglutininas, antígenos fundamentales para lograr una buena protección en la bacterinización. Sin embargo, la posible introducción de plásmidos infectivos en países carentes de cepas independientes de NAD, plantea muy serios problemas de bioseguridad, sobre todo si se toma en cuenta que en Sudáfrica, por ejemplo, además de *H. paragallinarum*, también existen cepas NAD independientes de *P. avium*, *P. volantium* y “*Pasteurella especie A*” en las aves, (47), e inclusive de *H. parainfluenzae* en seres humanos, (52), lo que indica que podría existir una posible infección por este plásmido. (53).

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

Es importante señalar que la independencia de NAD puede ser adquirida por la transformación por medio de un plásmido, según lo informado por Bragg y cols.⁴⁹ Del mismo modo, un dependiente de NAD C-3 de las cepas se transforma en una cepa NAD-independientes por medio de electroporación técnica llevada a cabo por Taole *et al.*, (49), los signos menos graves de coriza infecciosa se observaron en pollos que fueron desafiados con la cepa transformada. El mecanismo por el cual la virulencia es afectada en este proceso no se ha explicado. Una interesante aplicación práctica de esta transformación podría ser una posible reducción en la producción de vacunas en los costos por el uso de cepas NAD en los cultivos industriales. De hecho, como se demostró por Bragg *et al.*, de 51 años que estas cepas transformadas puede mantener inalterable la producción de hemaglutininas, antígenos fundamentales para lograr una buena protección de la vacuna.

Sin embargo, la introducción de plásmidos infecciosos en los países libres de cepas NAD independientes surgen graves problemas de bioseguridad, en particular teniendo en cuenta que en Sudáfrica también existen cepas de *P. avium* de NAD independiente, *volantium P.* y *Pasteurella especie A* en los pollos, de 47 e incluso en las cepas de *H. parainfluenzae* aisladas de seres

humanos, (52) lo que indica que en este país pudo haber ocurrido una infección generalizada de este plásmido. (53).

Se ha informado de que la cápsula de *H. paragallinarum* puede ser implicada en la patogenicidad y virulencia de esta bacteria. (54-57). No obstante, los estudios definitivos que muestren la importancia de la cápsula en la patogenia de *H. paragallinarum* no se han llevado a cabo. Gallinacin Mayor-3 en forma experimental de *H. paragallinarum* en pollos infectados fue recientemente reportado.(58). Gallinacin-3 es un β -defensinas epiteliales que participan en la inmunidad innata mediante propiedades antimicrobianas de las células epiteliales y secreciones traqueales. Podría ser un factor limitante para la dispersión del tejido de *H. paragallinarum* en el tracto respiratorio y de los procesos de colonización en los pollos. Un estudio reciente mostró que pollos infectados de manera experimental con *H. paragallinarum*, incrementaron la expresión de gallinacina-3, una β -defensina epitelial que contribuye a la inmunidad innata mediante propiedades antimicrobianas propias de las células epiteliales y secreciones traqueales.58 Los autores mencionan que es probable que éste sea un factor limitante de la distribución tisular de *H. paragallinarum* en el proceso de infección y colonización del tracto respiratorio de los pollos.

DIAGNÓSTICO.

Aislamiento e identificación del agente.

Para el aislamiento bacteriológico se recomienda el estudio de tres o cinco aves con signos agudos de coriza. El procedimiento de toma de muestras se debe efectuar con estricta esterilidad. Para ello, una vez sacrificada el ave, se cauteriza la piel de la región infraorbital y se practica una incisión sobre el seno infraorbitario correspondiente, se separa la piel en la incisión y se introduce un hisopo estéril humedecido en un caldo nutritivo o solución tamponada de fosfatos a pH neutro. Lo más recomendable es el cultivo antes de las 5 h debido a la reducida viabilidad de *H. paragallinarum*. Para la siembra de los hisopos pueden utilizarse placas en base de agar, o agar Columbia con 7% de sangre de bovino u ovino con el agregado de cepas nodriza de

Staphylococcus spp, las cuales eliminan el factor V, o bien usar agar chocolate o agar con sangre hemolizada, en vez de las cepas nodriza. Como se refirió anteriormente, con este último procedimiento se obtienen colonias mucho más grandes.

El uso de medios de cultivo selectivos con antibióticos e incubados a 37°C durante 48 h en una atmósfera microaerofílica, es un procedimiento que permite diferenciar y aislar a *H. paragallinarum* en cultivo puro, aun cuando la flora bacteriana sea compleja. La atmósfera microaerofílica puede obtenerse mediante el clásico método de incubación de las placas en un recipiente con vela, la cual se apaga al consumirse parte del oxígeno contenido en un recipiente herméticamente cerrado, o bien usando los distintos productos comerciales disponibles, tanto para generar CO₂ como para las atmósferas destinadas al género *Campylobacter*. (53). La identificación de *H. paragallinarum* debe efectuarse mediante pruebas bioquímicas y enzimáticas diferenciales. La dependencia o independencia de NAD no permite inferir si se trata de *H. paragallinarum* o de otros microorganismos del género *Pasteurella*, sobre todo en los lugares donde existen cepas independientes de NAD.59 A la fecha, únicamente se ha informado el aislamiento de *H. paragallinarum* independientes de NAD en Sudáfrica (serovariedades A-1 y C-3)^{60,61} y México (serovariedades B-1 y C-2).⁽⁶²⁾.



Para la realización del diagnóstico definitivo se procede a realizar una incisión para posteriormente tomar una muestra con un hisopo.



Después que se tomó la muestra con un hisopo se siembra en gelosa sangre como lo muestra esta foto.

Identificación serológica.

Se han descrito varias pruebas serológicas para la detección de anticuerpos contra *H. paragallinarum* en los pollos: precipitación en gel, (63) aglutinación en placa (64), aglutinación en látex⁶⁵ y ELISA.⁶⁶⁻⁶⁸ Sin embargo, la prueba de inhibición de la hemoaglutinación es la más usada. (69).

Se han producido un número de paneles de anticuerpos monoclonales que han sido empleados para identificar *H. paragallinarum*, principalmente mediante pruebas de inhibición de la hemoaglutinación y ELISA.⁷⁰⁻⁷⁴ En Argentina, cuatro de diez aislamientos de la serovariedad A75 y en Brasil seis de 14 aislamientos de esta misma serovariedad⁷⁶ no reaccionaron con los anticuerpos monoclonales específicos que reconocieron a 49 aislamientos japoneses de la serovariedad A77 y más de 20 aislamientos de la serovariedad A de varias partes del mundo;^(71,72) en estas cepas de Latinoamérica se observaron ciertas diferencias antigénicas.

Caracterización molecular.

Chen *et al.* (78) desarrollaron una prueba de reacción en cadena de la polimerasa (PCR, por sus siglas en inglés, *polymerase chain reaction*), específica para *H. paragallinarum*. Esta prueba es rápida y los resultados se obtienen aproximadamente en 6 h. Asimismo, identifica aislamientos tanto

dependientes como independientes de NAD.⁷⁹ Esta prueba es llamada HP-2 PCR y utiliza los siguientes iniciadores: N1, 5' TGA GGG TAG TCT TGC ACG CGA AT 3' y R1, 5' CAA GGT ATC GAT CGT CTC TCT ACT 3', que amplifican un fragmento de 0.5 kb.⁷⁸ Esta prueba fue desarrollada en Australia y ha sido transferida con éxito a Sudáfrica, (79), China (80) y México (81). Estudios posteriores han mostrado excelentes resultados cuando las muestras incluidas en la prueba son tomadas directamente de senos infraorbitarios de aves infectadas de manera experimental.⁷⁸ De forma similar, se obtienen resultados positivos en muestras mantenidas a 4°C o -20°C durante 180 días (82).

Blackall *et al* (83). Evaluaron las endonucleasas de restricción BamHI, EcoRI HindII y SmaI en la caracterización de ADN cromosómico de *H. paragallinarum*. La enzima HindII produjo el mayor número de fragmentos y mostró un mayor grado de discriminación entre los aislamientos estudiados. La creación de una genoteca de la cepa Modesto (serovariedad C-2) sentó las bases del desarrollo de la prueba de PCR (78). El estudio de esta genoteca identificó cuatro sondas que reaccionaron de manera específica con *H. paragallinarum*. Ninguna de las sondas reaccionó con bacterias de los géneros *Pasteurella* y *Actinobacillus*, o *M. gallisepticus* y *M. synoviae*. Se obtuvo la secuencia de la sonda más pequeña (P601, 1.8 kb) que permitió el diseño de los iniciadores para la prueba de PCR.

Basada en el empleo de esta técnica para el consenso intergénico repetitivo de enterobacterias (ERIC-PCR, por sus siglas en inglés, *enterobacterial repetitive intergenic consensus*), Khan *et al.*, (84), identificaron 18 patrones ERIC en 39 aislamientos y cepas de referencia de *H. paragallinarum*. Mencionan que todas las cepas de referencia mostraron un patrón ERIC único, excepto las cepas HP14 (A-4) y HP60 (C-4), procedentes de Australia. Sin embargo, en un estudio similar, Soriano y Blackall (27), encontraron diferencias en los patrones ERIC obtenidos para estas cepas. Recientemente, Hobb *et al.*⁸⁵ aislaron, identificaron y obtuvieron la secuencia del gen HagA que codifica para una hemoaglutinina de *H. paragallinarum*.

La secuencia de 11 cepas de referencia reveló un pequeño grado de variación entre las cepas. Como la hemoaglutinina es el principal antígeno de serotipificación, se esperaba encontrar variaciones en la secuencia de aminoácidos. Sin embargo, ninguna de las variaciones se correlacionó con los grupos sexológicos de las cepas. Como se hará mención posteriormente, es probable que el gen HagA codifique para una hemoaglutinina común identificada en cepas de *H. paragallinarum*.

Diagnóstico diferencial.

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

Esta bacteria gran negativa produce un cuadro corizoide caracterizado por retraso del crecimiento, incremento en la mortalidad y disminución considerable de la producción de huevo. Las lesiones principalmente observadas son aerosaculitis y neumonía.

La diferenciación entre *O. rhinotracheale* y *H. paragallinarum* no es difícil en la mayoría de los países. Sin embargo, en Sudáfrica (40, 60,61) y México,(62), donde están presentes *H. paragallinarum* independientes de NAD, se requieren pruebas bioquímicas y patrones de fermentación de carbohidratos para establecer el agente causal en cuadros corizoides. Otros microorganismos implicados en pollos con enfermedad sugestiva de coriza infecciosa son: *P. volantium*, tanto dependiente como independiente de NAD, *P. avium*, tanto dependiente como independiente de NAD y *Pasteurella* spp taxón A, tanto dependiente como independiente de NAD.(47). En pollos de engorda la coriza debería ser diferenciada del síndrome de cabeza hinchada por virus de la rinotraqueítis infecciosa del pavo (TRT). También se cita que la hipovitaminosis A y la viruela, en ocasiones, pueden producir signos clínicos similares a coriza infecciosa (7).

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

PREVENCIÓN Y CONTROL

Inmunidad e inmunógenos

La bacterinización de parvadas susceptibles es la estrategia más eficaz en la prevención de la coriza infecciosa. Se han desarrollado modelos experimentales con aves susceptibles para evaluar la protección cruzada entre distintas serovariedades, o bien el grado de protección conferido por diferentes bacterinas experimentales o comerciales combinadas en planes de bacterinización. Estas pruebas consisten en inmunizar a las aves con las bacterinas comerciales a probar o bien con las bacterinas monovalentes elaboradas con las cepas a estudiar y transcurrido un periodo necesario para que las aves desarrollen inmunidad activa, éstas se desafían por vía intrasinusal o por instilación nasal. Al segundo o tercer días posdesafío se evalúa el grado de protección como el porcentaje de aves que no se enferman según un criterio establecido. Un criterio estricto es considerar que un ave está enferma cuando presenta signos clínicos de coriza infecciosa, mucus en uno o ambos senos paranasales y aislamiento de *H. paragallinarum* de uno o ambos senos paranasales. (87, 88).

La protección y control de la coriza infecciosa de los pollos principalmente es a través del uso de vacunas conteniendo bacterias inactivadas de la enfermedad. La utilización de vacunas con cepas vivas atenuadas o patógenas aún requieren de una mayor investigación ya que no obstante su ideal ventaja de conferir protección cruzada contra todas las serovariedades todavía no ofrecen seguridad o protección completa. Las bacterinas tienen particularidades que las hacen distintas unas de otras que son necesarias tenerlas en cuenta al momento de elegir la mas conveniente para alcanzar el mayor grado de defensa contra la infección, a su vez es

preciso considerar aspectos relacionados con cepas y serotipos de desafíos que son precisos considerarlo para desarrollar una inmunidad amplia y precisa.

En la práctica la utilización de bacterinas contra coriza infecciosa no siempre es satisfactoria ya que suelen presentarse brotes de la enfermedad. Tras su aplicación, inclusive con autovacunas elaboradas ex profesamente para conseguir una respuesta inmune específica contra cepas aisladas de la enfermedad. La razón de los quiebres de protección vacunal se debe principalmente a factores relacionados con la elaboración de las vacunas pero también a causas que tienen que ver con la expresión inmunológica de las aves y a la posibilidad de aparición de cepas que no son protegidas por las vacunas usadas. Se requiere tener algunos alcances sobre las vacunas vivas para tenerlas en cuenta en la posibilidad de aparecer en el mercado productos peculiares como la indicada.

Los factores reconocidos para conseguir una adecuada respuesta inmunológica con el uso de bacterinas son:

Las cepas a utilizarse.

La integridad de las cepas

La protección cruzada entre serovariedades.

La concentración bacteriana por dosis.

El medio de cultivo elegido.

Los agentes inactivantes.

El tipo de adyuvante.

La vía de administración.

La edad de vacunación.

El programa de vacunación.

El complemento para determinar la eficacia de estos factores es el seguimiento serológico.

Para Fernández y colaboradores (2000) los antígenos hemoaglutinantes son las adhesinas de *Av. paragallinarum*. En cambio, Sawata y colaboradores (1985) sugieren que la cápsula está asociada también a la

adherencia epitelial y es responsable de las lesiones reportadas en coriza infecciosas.

Se ha discutido en cuanto a la patogenicidad de la serovariedad B. Sawata *et al.* (1980) informaron que esta cepa carecía de antígenos hemoaglutinantes y que no era patógena en pollos desafiados. Sin embargo otros investigadores como Rimler *et al* (1977), Thorntón y Blackall, (1984) reportan que las cepas Spross y 0222 (prototipos de la serovariedad B) fueron patógenas en pollos desafiados y que la segunda cepa mencionada producían anticuerpos aglutinantes específicos de serovariedad.

Yamaguchi *et al* (1990), investigaron la patogenicidad de cinco cepas Serovariedad B, incluyendo las cepas 0222 y Spross y encontraron que la cepa 0222 no produjo signos clínicos de coriza infecciosa. Sin embargo, observaron lesiones (engrosamiento de membranas mucosas y exudado amarillento en senos infraorbitarios y aislamiento del microorganismo de desafío. Estos resultados indican que la cepa 0222 es probablemente una cepa de baja virulencia (Soriano y Terzolo, 2004). Mas recientemente se han reportado en Argentina la aparición de cepas serovariedad B “variantes” que son genéticamente muy diferentes a las cepas de todas partes del mundo y por lo mismo no son protegidos con las cepas serovariedad B de referencia (0222 y Spross) y menos aún con las otras dos serovariedades de Page. Para la protección contra el desafío de estas cepas B es necesario incluirlas en la formulación de bacterinas locales (Soriano y Terzolo, 2004).

La elaboración de bacterinas requiere de la selección de cepas que confieran la mayor antigenicidad e inmunogenicidad no solo contra las inmunovariedades que tiene cada grupo de Page si no también cierta protección cruzada entre los tres serogrupos (aún cuando exista el dogma aceptado que las bacterinas no inducen protección cruzada entre las serovariedades).

En la actualidad se emplean en todo el mundo bacterinas comerciales bivalentes utilizando cepas con serovariedades A- 1 y C- 1 y trivalentes con cepas de serovariedades A-1, B- 1 y C- 2 siendo la discrepancia la necesidad de incluir o no cepas de la serovariedad B (Soriano y Terzolo 2004).

Según Terzolo, 2009. Los laboratorios transnacionales preparan vacunas con cepas estándar internacionalmente reconocidas para ser usadas en diferentes países alrededor del mundo. Aseguran que sus vacunas son siempre efectivas cuando son elaboradas con estas cepas internacionales y por lo tanto no se preocupan en incluir cepas regionales. Algunas de estas cepas son la cepa 0083 (serovariedad A), la cepa Modesto (serovariedad C), la Spross y la 0222 (serovariedad B), la H- 221 (serovariedad A) y la H-18 (serovariedad C). Estas dos últimas también son conocidas como cepas Kitasato y basan su prestigio en que son capaces de brindar protección contra las 7 subvariedades del modelo inicial de Kume. De este modo, la cepa H-221 (serovariedad H-1) confiere protección contra las infecciones causadas por los serotipos HA- 1, HA- 2 y HA-3; y la cepa H-18 (serovariedad H- 4) es efectiva contra los serotipos HA- 4, HA- 5, HA- 6 y HA- 7.

Las bacterinas elaboradas con cualquiera de los otros 5 serotipos restantes dan una protección limitada ya que existe correlación entre el serotipo y el origen geográfico de las cepas, como es el caso de Brasil y la H- 5 (cepa Modesto) aislado en USA en el estado de California. Se observa que el uso de ambas cepas incrementa la protección contra las otras serovariedades con reporte de protección también al serotipo B. Esta es la razón por la que las vacunas comerciales conteniendo cepas Kitasato son bivalentes ya que solo contienen los serotipos A y C de Page a través de las cepas japonesas 221 y H- 18 respectivamente (Separata Coriza Acuosa Bivalente). Si bien esta vacunas bivalentes provee protección contra desafíos efectuados con la cepa Spross de la serovariedad B, no ocurre lo mismo contra serovariedades B de Sudáfrica y Argentina (Terzolo, 2009). Por tal razón varios trabajos confirman la necesidad de usar bacterinas trivalentes en todas las áreas donde se ha diagnosticado cepas regionales de la serovariedad B. Por todos estos datos se

indica la necesidad de efectuar estudios de aislamiento y serotipificación que con llevará a la necesidad de elaborar vacunas con cepas regionales.

Integridad de las cepas.

Los *Avibacterium paragallinarum* poseen estructuras antigénicas complejas que pueden clasificarse en somáticas y de membrana.

Avibacterium un género de bacterias gram negativas, anaerobias facultativas, bacterias con forma de varilla en el Pasteurellaceae familia que se encuentran sobre todo en las aves. Anteriormente los miembros del género *Pasteurella*.

Avibacterium avium comensales en las aves. Puede causar la sinusitis y la neumonía en los terneros. Anteriormente llamado *avium avium Pasteurella* y *Haemophilus*.

Avibacterium gallinarum comensales en las aves, sino una causa ocasional de la enfermedad de bajo grado.

Avibacterium paragallinarum la causa de la coriza infecciosa en pollos.

Avibacterium volantium comensales en las aves, no sabe que son patógenas. Anteriormente llamado *Haemophilus paragallinarum*.

Hemoaglutinantes y capsulares.

Estos antígenos pueden afectarse e inclusive perderse por varios factores tanto en el cultivo de las cepas, la inactivación y el proceso de purificación, como son la filtración y la centrifugación, por tal razón es importante considerar las técnicas más idóneas en la elaboración de vacunas a efecto de mantener íntegro la estructura antigénica de la bacteria (Terzolo, 2009) ya que de nada vale alcanzar concentración bacteriana por dosis si ésta está compuesta por bacterias sin capacidad inmunogénica. Muchas bacterinas sobre todo las llamadas autovacunas pueden no tener eficacia por esta razón. Sawata y colaboradores examinaron la morfología y las propiedades serológicas de los *Avibacterium paragallinarum* y observaron relación estrecha

entre la forma fenotípica de organismos encapsulados y la formación de colonias iridiscentes así como la relación de organismos no encapsulados con colonias no iridiscentes. (La **iridiscencia** es un fenómeno óptico caracterizado como la propiedad de ciertas superficies en las cuales el tono de la luz varía de acuerdo al ángulo).

Concluyeron que las colonias iridiscentes son las más inmunogénicas Y por lo tanto candidatas a ser seleccionadas para la elaboración de vacunas con cepas Kitasato. Cuando el *Avibacterium paragallinarum* es cultivado en medios inadecuados, la cápsula se pierde rápidamente y con ella el poder antigénico del cultivo bacteriano.

Protección cruzada entre serovariedades.

Page en 1962, utilizando prueba de aglutinación en placa fue el primero en clasificar a las cepas de *Avibacterium paragallinarum* en tres serovariedades: A, B y C y desde entonces se toma como referencia para serotipificar todo aislado de la bacteria (Blackall y Soriano, 2008). La técnica de Page se implementa utilizando antisueros de conejo contra las tres cepas de referencia. Para efectuar la prueba se realizan diluciones de los correspondientes sueros y se enfrentan a cultivos de cepas a clasificar en una prueba de aglutinación rápida en placa.

Como las tres serovariedades tienen antígenos comunes se evidencia abundantes reacciones serológicas cruzadas, por lo que una cepa se identifica como perteneciente a una determinada serovariedad si comparativamente aglutina a la dilución mas alta del suero correspondiente a la serovariedad asignada (Blackall y Terzolo, 1995). Una gran desventaja del esquema de Page es la alta incidencia de cepas no serotipificadas, tanto por ser autoaglutinantes como no autoaglutinantes, por tal razón, Kume en 1983 presenta una clasificación serológica basada en la detección de hemoaglutininas en células bacterianas que primero se tratan con tiacionato de potasio y luego son sonicadas.

Para detectar la actividad hemoaglutinante se usa glóbulos rojos de pollos fijados con gluteraldehido. El esquema inicial de Kume reconoce tres serogrupos que corresponden a las serovariedades A, B y C de Page. Como

existían diferencias menores que pudieron ser detectados mediante el uso de antisueros adsorbidos, el concepto pasó a reconocer tres serogrupos y siete serovariedades con las denominaciones, HA- 1, HA- 2, HA- 3, HA- 4, HA- 5, HA- 6 y HA- 7.

Actualmente se ha reconocido dos nuevas serovariedades por lo que se ha sugerido una nueva terminología para el esquema de Kume pero considerando la denominación de los serogrupos A, B y C de Page. De este modo las serovariedades dentro de los serogrupos se identifican numéricamente. Hasta ahora las serovariedades reconocidas en el esquema de Kume son: A-1, A-2, A-3, A-4, B-1, C-1, C-2, C-3 y C-4. Esta terminología relaciona las serovariedades de Page y los serogrupos de Kume (Blackall y Terzolo 1995).

Como se mencionó, las cepas muertas no confieren protección cruzada entre las serovariedades. De este modo un ave inmunizada con la serovariedad A quedará protegida contra sucesivas infecciones de cepas distintas pero pertenecientes a esa misma serovariedad A. El mismo principio se aplica para el caso de la serovariedad C. Sin embargo se reporta que algunas bacterinas podrían ejercer algún tipo de protección cruzada parcial especialmente aquellas hechas en cultivo de tejidos y embrión de pollo.

Las bacterinas elaboradas en caldo de cultivo, que son las que se utilizan habitualmente, no producen ningún tipo de inmunización cruzada por lo que de aparecer cepas regionales variantes A como las reportadas en Brasil y Argentina se debe agregar a la formulación tales cepas para evitar ocasionar fallas vacunales. De igual modo, con la evidencia que respalda la posibilidad de una diversidad antigénica dentro de la serovariedad B de Page se hace necesario incluir las cepas regionales en la preparación de las bacterinas. El esquema de Kume permite ahora entender que no todas las cepas de un mismo serogrupo son iguales no existiendo por lo mismo, una protección completa entre ellas. Así, los estudios de protección cruzada realizados en Argentina sugieren la necesidad de incluir más de una C en las bacterinas que se usan en ese país.

Se reporta que estos resultados son comparables con lo descrito en Sudáfrica en donde el aumento de la incidencia del subtipo C- 3 de Kume, causó brotes de la enfermedad en aves vacunadas con bacterinas elaboradas exclusivamente con cepas de los subtipos C-1 o C-2 (Terzolo 2009).

Concentración bacteriana por dosis.

Este es otro factor a tener en cuenta para tener buenos resultados con el uso de bacterinas. La literatura revisada recomienda vacunar con un nivel mínimo de cien millones de bacterias por dosis de cada serotipo (Blackall y Terzolo 1995; Terzolo 2009). Tratándose de bacterias muertas es recomendable tener concentraciones más altas de la indicada. Niveles bajos no confieren una buena protección.

Desafortunadamente no existe forma de cuantificar esta recomendación en las bacterinas comerciales debido a la inactivación de los antígenos bacterianos por tal razón los fabricantes de vacunas deben indicar la concentración por dosis con que ha sido elaborada la bacterina. En el caso de la vacuna bivalente con cepas Kitasato se indica que cada mililitro del biológico contiene 5 billones de *Avibacterium paragallinarum* de cada cepa (Separata Coriza Acuosa Bivalente 2000).

Medios de cultivo.

Está descrito el uso de tres medios de cultivo en la preparación de antígenos para vacunas contra coriza infecciosa: el saco vitelino de huevos embrionados de 5 a 7 días de edad, caldos de cultivo y cultivos de tejidos aviarios. Las vacunas propagadas en huevos, medio que se utilizó inicialmente, no brindan buena protección contra los síntomas clínicos de la coriza infecciosa por lo que en la actualidad se prefiere las vacunas elaboradas en caldos de cultivo que demostraron conferir mejor protección en trabajos posteriores. Los medios más utilizados son la infusión en carne de pollo, el medio Casman y el caldo cerebro – corazón (Blackall y Terzolo, 1995; Terzolo 2009). Se reporta que existe un solo trabajo que describe la producción de vacunas contra coriza infecciosa en cultivo de tejidos aviarios indicando que este medio fue superior a bacterinas producidas en caldos convencionales (Blackall y Terzolo, 1995) pero

en la práctica no se utiliza para la elaboración de bacterinas contra coriza de gallinas y pollos probablemente debido a la falta de mayor investigación.

En la preparación de vacunas es importante considerar también detalles del volumen de inóculo inicial, pH, porcentaje de cloruro de sodio, nivel de hierro libre, atmósfera y tiempo de incubación (Terzolo, 2009).

Agentes inactivantes.

El uso de sustancias para inactivar las bacterias también tiene mucha importancia en la fabricación de bacterinas contra coriza. Es un tema controversial y de mucha discrepancia el efecto de diferentes agentes inactivantes. Varios estudios confirman que el timerosal es un efectivo agente inactivante, pero existen investigadores informando también que el uso de formalina resulta eficiente en términos protectivos de la integridad de las bacterias. Se describe que la inactivación con formalina es más rápida con efectos variables de protección, en cambio la inactivación con timerosal es más lenta pero con resultados consistentes de protección. En general se concluye que, si bien las bacterinas inactivadas con formalina pueden ser protectoras, es posible que vacunas similares conteniendo timerosal puedan ser aún más efectivas (Blackall y Terzolo, 1995; Terzolo, 2009).

Existen bacterinas contra coriza usando como agentes inactivantes de bacterias tanto formalina como timerosal. En el particular caso de vacunas con cepas Kitasto la inactivación se realiza utilizando formalina (Separata Coriza Acuosa Bivalente, Invetsa 2000).

Adyuvantes.

Se han evaluado una variedad de adyuvantes para vacuna inactivadas contra la coriza infecciosa de las aves entre ellos el gel de hidróxido de aluminio, aceite mineral en emulsión única y en emulsión doble, la combinación hidróxido de aluminio y aceite mineral, la saponina "Quil A" y la amina lipoidal avridina. Se reporta que estos dos últimos tienen muy poca eficacia, de modo que los más ensayados y elegibles para ser seleccionados en la elaboración de

vacunas están entre los primeros indicados. La elección del adyuvante idóneo también es un tema polémico ya que la bibliografía reporta resultados divergentes cuando los criterios de evaluación no son precisos. Los adyuvantes deben ser evaluados en términos de eficacia y seguridad (Blackall y Tarzolo, 1995) entendiéndose por eficacia la potenciación de los antígenos de la vacuna así como la duración de la inmunidad y por seguridad la ausencia o presencia mínima de reacciones post vacúnales.

Reid y colaboradores (1987) al comparar bacterinas elaboradas con Hidróxido de aluminio, aceite mineral y saponina "Quil A" reportaron que las vacunas elaboradas con hidróxido de aluminio son mas efectivas en términos de protección (80%) y no producen reacciones granulomatosas de tipo local.

Las elaboradas en aceite mineral solo protegieron el 35% y ocasionaron reacciones granulomatosas en los sitios de aplicación. La combinación de hidróxido de aluminio y aceite mineral fue efectiva en un 90% de protección e indujo mayores niveles de anticuerpos aglutinantes. Su desventaja fue la formación de granulomas en el sitio de inoculación. Como se indicó el uso de saponinas no fue exitosa (Blackall y Terzolo, 1995).

Blackall 1987, evaluó bacterinas preparadas con hidróxido de aluminio, aceite mineral en doble emulsión y la avridina. Concluyó que las bacterinas en hidróxido de aluminio alcanzaron mayor efectividad y altos niveles de protección. Las formulaciones de doble emulsión y la avridina no produjeron resultados relevantes contra la coriza infecciosa aviar.

Existen ofertas de vacunas hechas tanto con hidróxido de aluminio como con aceites minerales teniendo, a éste último, como adyuvante de la mayoría de ellas. La bacterina con cepas Kitasato utiliza más bien hidróxido de aluminio como adyuvante (Separata Coriza Acuosa Bivalente 2000)

Vías de administración.

En la práctica se administran las vacunas contra coriza infecciosa tanto por vía subcutánea detrás del cuello o por la vía intramuscular en la pechuga

sobre todo aquellas hechas en aceites minerales. Sin embargo, la ruta de administración es importante. Kume y Sawata (1990) reportan resultados más efectivos cuando la bacterina hecha en hidróxido de aluminio se aplica por vía intramuscular en el muslo alcanzando un 87% de protección; en la pechuga un 50% de protección y aplicada al cuello vía subcutánea solo un 32% de protección. Blackall y Terzolo (1995) informan que una vacuna que contiene gel de hidróxido de aluminio fue eficaz al ser aplicada tanto por vía subcutánea (en la parte posterior del cuello) como intramuscular (en el músculo de la pechuga).

E. Dávila, utilizando bacterina con cepas Kitasato (hidróxido de aluminio) encontró mejor respuesta serológica cuando el producto se aplicó en el muslo de la pata que por la vía intramuscular de la pechuga. Considerando títulos de HI iguales o mayores a 5 como respuesta protectora se encontró 100% de protección tanto para el serotipo A como para el C en aquellas aves que fueron vacunadas en el muslo de la pierna en comparación con respuestas de 80% (serotipo A) y 60% (serotipo C) de protección en las aves que se vacunaron por la vía intramuscular de la pechuga.

Programa de vacunación.

Las vacunas contra coriza infecciosa han sido diseñadas para ser usadas en pollas de recría hasta antes de las 18 semanas de edad por lo tanto las dosis y la edad de vacunación están orientadas para dar protección duradera a las gallinas en la fase de producción en donde la enfermedad ocasiona las mayores pérdidas económicas. Estos indicadores de uso no han sido evaluados en pollos parrilleros que son de vida mucho mas corta.

Dosis y edad.

El número de dosis de las bacterinas suministradas a las aves está relacionada directamente con la duración de la inmunidad. Dosis única de una bacterina en hidróxido de aluminio confiere protección contra la aparición de signos clínicos hasta diez semanas después de su administración (Matsumoto y Yamamoto, 1975). Esa es la razón por la que se recomienda revacunar pasado ese periodo de tiempo a efecto de evitar interferencia con los

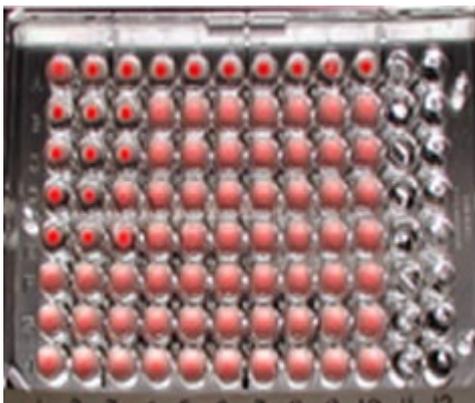
anticuerpos circulantes originados de la primera aplicación. Este esquema de programa de vacunación es indicado por los fabricantes de la bacterina en hidróxido de aluminio con cepas Kitasato (Separata Coriza Acuosa Bivalente 2000). Blackall y Terzolo, (1995) señalan que las bacterinas de este tipo deberían inyectarse en dos dosis separadas entre si por un intervalo mínimo de tres semanas. En el esquema de diez semanas de separación la primera dosis de 0.5cc /ave se recomienda colocar entre la 5ª y 6ª semana de edad vía intramuscular pierna y la revacunación entre la 15 a 16 semanas de edad con dosis de 1cc/ave por la misma vía de aplicación. Tras la segunda dosificación los niveles de protección aumentan hasta las 56 semanas de edad (Blackall y Terzol, 1995). Se reporta la necesidad de colocar algunas veces una tercera dosis de refuerzo de acuerdo con las características geográficas y tipo de explotación.

Dos administraciones también requieren las vacunas en aceite mineral por vía subcutánea detrás del cuello o intramuscular en la pechuga con un intervalo de 3 a 4 semanas, siendo la primera entre la 7 u 8 semanas y la segunda entre las 11 a 12 semanas (Terzolo, 2009). La dosis varía según la concentración de la vacuna. Usualmente la primera es 0.3 cc/ave y la segunda 0.5cc/ave. Terzolo, 2009 indica la posibilidad de vacunar a los pollos parrilleros expuestos a coriza infecciosa con una sola dosis administrada a los 15 o 20 días de edad pero plantea la necesidad de investigar el efecto de esta aplicación en el complejo de enfermedades respiratorias, síndrome de cabeza hinchada y sanidad en general. Señala que las vacunas contra coriza en este tipo de aves debe ser económicamente accesible debiéndose determinar la protección en pollos parrilleros jóvenes con dosis mas baja que las que normalmente se aplican en aves de mayor edad.

Evaluación serológica.

Con la técnica de HI es posible hacer seguimientos a las vacunaciones contra coriza. Se han desarrollado dos tipos de prueba de acuerdo al antígeno usado. En el primero se utilizan células bacterianas jóvenes, que luego de lavarse se usan como antígeno para el tipo HA- 1. Permite la detección de

anticuerpos en aves infectadas o vacunadas hasta por un año. Su limitación es que solo detecta anticuerpos contra el serotipo A de Page (Blackall, 2009). El segundo tipo de prueba de HI utiliza el antígeno HA – L, el cual se extrae con tiacionato de potasio para luego ser zonificado. Actúa sobre eritrocitos de pollos fijados con gluteraldehido. Su aplicación es primordialmente para evaluar la respuesta inmune de aves vacunadas con bacterinas bivalentes. Los títulos obtenidos se pueden relacionar con niveles de protección. Aves cuyos sueros presentan niveles de anticuerpos mayores a 5 se consideran protegidas cuando se exponen al desafío ante cepas homólogas (Blackall, 2009; Terzolo 2009).



TRATAMIENTO Y DESINFECCIÓN.

En el tratamiento de la coriza infecciosa se han empleado varios quimioterapéuticos y antibióticos como: estreptomina, 95 espectinomicina, la combinación estreptomina-espectinomicina 96 o las combinaciones sulfacloropiridazina-trimetoprim 97 y sulfadimetoxina-trimetoprim, 98 entre otras. Las quinolonas nicotinato de norfloxacin⁹⁹ y enrofloxacin¹⁰⁰ han dado excelentes resultados en el tratamiento de esta enfermedad. Se informó del tratamiento de pollos de engorda con coriza infecciosa, de manera experimental, empleando enrofloxacin y clorhidrato de bromhexina. 80 Los resultados obtenidos mostraron que los pollos que recibieron la combinación redujeron el tiempo de signos clínicos, a diferencia de los que recibieron únicamente enrofloxacin. Además, la diferencia en peso del grupo de aves que recibió la combinación estuvo 194 g por arriba del grupo testigo.

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

Tratamiento	En el alimento
Clortetraciclina	200-400 g. de durante 7-10 días.
Oxitetraciclina	200-400 g. de durante 7-10 días.
Eritromicina	185-200 g. de durante 5-8 días.
Cloranfenicol	300-500 g. de durante 5-8 días.

Sulfadimetoxina	500 g.de durante 6 días.
Sulfatiazol sódico	500-1000 g.de durante 3 días.

Tratamiento	En el agua de bebida.
Eritromicina	.1-.2g /litro de agua durante 5-8 días.
Ampicilina	.1g/litro de agua 3-5 días.
Sulfatiazol sódico	1g/litro de agua durante 3 días.
Sulfanometoxina	.1-.2g de/litro de agua durante 5 días.

Tratamiento	Parenteral.
Oxitetraciclina	50-80 mg.de/kg.de peso vivo.
Dihidroestreptomina	80-100 mg. de /kg.de peso vivo.
Eritromicina	30 mg.de /kg.de peso vivo.
Sulfanometoxina	150 mg. de /kg.de peso vivo.

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

CONCLUSIONES.

1. La revisión muestra que *Avibacterium paragallinarum* es una bacteria que tiene varios factores a considerar en la elaboración de vacunas por lo que hasta la actualidad no existe una vacuna ideal que reúna los requisitos para garantizar en todas las circunstancias una óptima inmunidad frente a los desafíos de campo.
2. La elección y la integridad fenotípica de las cepas es importante en la preparación de vacunas para garantizar una buena respuesta inmunológica.
3. No obstante, el actual concepto de vacuna muerta de uso universal debe cambiar ante la aparición de cepas que no son protegidas por las vacunas convencionales teniendo la necesidad de elaborar vacunas con cepas regionales.
4. Por tal razón, hacia adelante es prioritario iniciar investigaciones con vacunas vivas atenuadas que si podrían tener aplicación universal puesto que las bacteria vivas si dan protección cruzada entre las distintas serovariedades.
5. Fallas y diferencias de resultados en la protección contra coriza con el uso de distintas vacunas también puede deberse a falta de ajuste técnico en el momento del cultivo y proceso de las bacterias, la elección de ingredientes y sustancias inactivantes que alteran los antígenos superficiales relacionados con la protección.
6. El hidróxido de aluminio y el aceite mineral han demostrado ser buenos adyuvantes de las bacterinas contra coriza, pero el segundo tiene el riesgo de ocasionar reacciones severas si no está bien formulado.
7. La mejor vía de administración con vacuna de hidróxido de aluminio es en el muslo.
8. Las dosis, edad y programas de vacunación han sido establecidos para gallinas pero no para pollos parrilleros siendo necesario investigar estos indicadores de uso en esta línea de aves.
9. HI es la prueba serológica mas específica y la mas conveniente para monitorear la protección.

Brotes de coriza infecciosa pueden ser ocasionados por *Av. paragallinarum* tanto dependientes como independientes de NAD. Se puede registrar morbilidad alta con incremento en la mortalidad de aves afectadas.

La producción de huevo en gallinas de postura es afectada considerablemente. La bacterinización de parvadas susceptibles con inmunógenos “trivalentes” que incluyan las serovariedades A-1, B-1 y C-2 es la estrategia principal en la prevención de la coriza infecciosa. La inclusión de aislamientos locales en estos productos puede incrementar la protección, particularmente de brotes ocasionados por “variantes” de la serovariedad B. Sin embargo, la caracterización serológica de aislamientos de *Av. paragallinarum* con base en el esquema Blackall es importante para el establecimiento de estudios y prácticas epizootiológicas de la coriza infecciosa tanto en México como en muchas partes del mundo.

Además, los signos de coriza se pueden clasificar en cuatro grados; en un criterio estricto sólo se consideran con coriza (positivas) los grados 2, 3 y 4

Es ampliamente reconocido que los tres serogrupos de Blackall representan tres inmunovariedades diferentes. (89). En general, el dogma aceptado es que no existe protección cruzada entre las serovariedades de estos serogrupos. Recientemente, Soriano *et al.* (45), evaluaron la protección cruzada en aves inmunizadas y desafiadas con las cepas de referencia de *H. paragallinarum* en el esquema de Blackall. Los resultados obtenidos en este trabajo confirmaron que las tres inmunovariedades son diferentes. Sin embargo, se observó cierta protección cruzada entre las serovariedades de los tres serogrupos.

Estos resultados permitirán guiar estrategias en la prevención de la coriza infecciosa, ya que en la actualidad se emplean bacterinas comerciales bivalentes (serovariedades A-1 y C-1) y trivalentes (A-1, B-1 y C-2) contra esta enfermedad en todo el mundo. En este sentido, hasta la fecha existían discrepancias en cuanto a la protección conferida por bacterinas bivalentes contra aislamientos serovariedad B.69,90 Sin embargo, varios trabajos

confirman la necesidad de usar bacterinas trivalentes en todas las áreas donde se han diagnosticado cepas regionales de la serovariedad B. Por ejemplo, en un estudio reciente en el cual se emplearon cepas de referencia, se informó que una bacterina bivalente no confirió protección en aves desafiadas con un aislamiento serovariedad B-1 de México.⁹¹

En Argentina, de manera similar pero empleando cepas regionales, Terzolo *et al.*, (89), mostraron que bacterinas comerciales bivalentes no protegieron a pollos desafiados con un aislamiento de la serovariedad B. En otros ensayos, Yamaguchi *et al.*(93) informaron que las bacterinas bivalentes proporcionaron protección contra la cepa Spross (B), pero fallaron contra otras dos cepas B sudafricanas. De forma análoga, Terzolo *et al.*(89) demostraron que una bacterina trivalente elaborada con una cepa B de referencia falló en pollos inmunizados y posteriormente desafiados con una cepa regional de la serovariedad B. Bowles *et al.*,(94), en un estudio comparativo muy amplio, determinaron la diversidad genética y las relaciones entre 118 cepas provenientes de seis continentes, mediante movilidad electroforética de ocho enzimas metabólicas codificadas por genes cromosomales.

En este trabajo, las cepas de *H. paragallinarum* estudiadas se clasificaron en dos grupos heterogéneos, mientras que nueve cepas regionales de la serovariedad B de Argentina, ocuparon un grupo diferente, lo que demuestra que éstas están genéticamente distantes de las otras cepas estudiadas, independientemente de la serovariedad a la cual pertenecen. Es decir que las cepas B de Argentina fueron incluso diferentes a otras cepas B de diversas regiones del mundo. Recientemente Jacobs *et al.*, (91) informaron que pollos inmunizados con una bacterina comercial trivalente mostraron protección al desafío con un aislamiento de Ecuador serovariedad C, pero no cuando fueron desafiados con aislamientos B procedentes de varios países (Ecuador, Argentina, Estados Unidos de América y Zimbabwe). Los aislamientos fueron reconocidos por antisueros elaborados para las cepas Spross (B) y H-18 (C). La protección contra estos aislamientos B se incrementó cuando un aislamiento B de Ecuador fue incluido en la bacterina trivalente. Con base en estos hallazgos, los autores consideran que estos aislamientos B (“variantes”) representan una nueva inmunovariedad, designando al inmunógeno que

incluye este aislamiento como bacterina tetravalente. El criterio utilizado por estos autores en su investigación no es suficiente para proponer la existencia de una nueva inmunovariedad. Es muy probable que estos aislamientos constituyan una nueva, o nuevas, serovariedades dentro del serogrupo B, de forma similar a los serogrupos A o C que incluyen cuatro serovariedades cada uno. Los resultados obtenidos señalan la necesidad de realizar estudios de caracterización de hemoaglutininas, ya que evidencian que existen notables diferencias inmunológicas entre diferentes cepas de la serovariedad B. Es necesario incluir cepas regionales de la serovariedad B en la formulación de bacterinas locales.

LITERATURA CITADA.

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

- 9.- Blackall PJ, Matsumoto M, Yamamoto R. Infectious Coryza. In: Calnek BW, Barnes HJ, Beard CW, McDougald LR, Saif YM, editors. Diseases of Poultry, 10th ed. Ames: Iowa State University Press, 1997:179-190.
- 10.- Yamamoto R, Clark GT. Intra- and interflock transmisión of *Haemophilus gallinarum*. Am J Vet Res 1966; 27:1419-1425.
- 11.- Yamamoto R. Progress report on infectious coryza research at the University of California. Proceedings of 16th Western Poultry Disease Conference and 1st Poultry Health Symposium; 1967 March 20-21; Davis (California) USA. California (Davis): University of California, 1967:23-24.
12. - Butterweck J, Kerr E. Egg drop from coryza superimposed on M. S. Proceedings of 29th Western Poultry Disease Conference, 5th ANECA & 14th Poultry Health Symposium; 1980 April 22-25; Acapulco (Guerrero) México. California (Davis): University of California, 1980:80.
- 13.- Matsuo K, Kuniyasu C, Yamada S, Susumi S, Yamamoto S. Suppression of immunoresponses to *Haemophilus gallinarum* with *Mycoplasma gallisepticus* in chickens. Avian Dis 1978; 22:552-561.
- 14.- Soriano VE, Fernández RP, Téllez G. *Ornithobacterium rhinotracheale*: un agente patógeno emergente en avicultura. Vet Méx 2000; 31:245-253.
- 15.- Soriano VE, Longinos MG, Navarrete PG, Fernández RP. Identification and characterization of *Ornithobacterium rhinotracheale* isolates from Mexico. Avian Dis 2002; 46:686-690.
16. - Raggi L, Young DC, Sharma JM. Synergism between avian infectious bronchitis virus and *Haemophilus gallinarum*. Avian Dis 1967; 2:309-321.

17. - Sandoval VE, Terzolo HR, Blackall PJ. Complicated infectious coryza in Argentina. *Avian Dis* 1994; 38: 672-678.

18.- Malkinson M, Nachany S, Aronovici A, Davidov K, Weisman Y. Mixed infection with *Chlamydia psittaci*, fowlpox virus and *Haemophilus gallinarum* in broiler breeder chicks. *Vet Rec* 1987; 120:461-462.

19. - Bell D, Ortiz F, Cutler G. The dynamics of an infectious coryza outbreak. Proceedings of 44th Western Poultry Diseases Conference; 1995 March 5-7; Sacramento (California) USA. California (Davis): University of California, 1995:98-99.

20.- Droual R, Bickford AA, Charlton BR, Cooper GL, Channig SE. Infectious coryza in meat chickens in the San Joaquin Valley of California. *Avian Dis* 1990; 34:1009-1016.

21. - Bland MC, Bickford AA, Charlton BR, Cooper GL, Sommer F, Cutler G. Case report: a severe infectious coryza infection in a multiple age layer complex in Central California. Proceedings of XXVII Convención Anual ANECA & 51st Western Poultry Disease Conference; 2002 may 1-4; Puerto Vallarta (Jalisco) México. México (DF): Asociación Nacional de Especialistas en Ciencias Avícolas, AC, 2002:56-57.

22.- Adler HE, Page LA. *Haemophilus* infection in chickens. II. The pathology of the respiratory tract. *Avian Dis* 1962; 6:1-6.

23.- Sawata A, Nakai T, Kume K, Yoshikawa H, Yoshikawa T. Intranasal inoculation of chickens with encapsulated or nonencapsulated variants of *Haemophilus paragallinarum*: Electron microscopic evaluation of the nasal mucosa. *Am J Vet Res* 1985; 46:2346-2353.

24. - Bickford AA, Yamamoto R, Glick-Smith J, Oluwadiya M. Histopathology characterization of experimental infectious coryza in single comb white leghorns chickens. Proceedings of 30th Western Poultry Disease Conference & 15th

Poultry Health Symposia; 1981 March 9-13; Davis (California) USA. California (Davis): University of California, 1981:18-21.

25.- Miflin JK, Horner RF, Blackall PJ, Chen X, Bishop GC, Morrow CJ, et al. Phenotypic and molecular characterization of V-factor (NAD)-independent *Haemophilus paragallinarum*. Avian Dis 1995; 39:304-308.

26.- Miflin JK, Chen X, Blackall PJ. Molecular characterization of isolates of *Haemophilus paragallinarum* from China by ribotyping. Avian Pathol 1997; 26:119-127.

27.- Soriano VE, Blackall PJ. ERIC-PCR: alternativa en la caracterización genómica de *Haemophilus paragallinarum*. Memorias XVII Congreso Latinoamericano de Avicultura, 2001 octubre 9-12; Ciudad de Guatemala (Guatemala) Guatemala. Guatemala (Ciudad de Guatemala): Asociación Latinoamericana de Avicultores, AC, 2001:529-532.

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

29.-Sandoval VE, Terzolo HR. Coriza infecciosa. Segunda parte: reproducción experimental y patogenicidad de las bacterias. Avicult Profes 1997; 15:29-32.

30.-Takagi M, Hirayama N, Simazaki T, Taguchi K, Yamaoka R, Ohta S. Purification of hemagglutinin from *Haemophilus paragallinarum* using monoclonal antibody. Vet Microbiol 1993; 34:191-197.

31.- Takagi M, Hirayama N, Makie H, Ohta S. Production, characterization and protective effect of monoclonal antibodies to *Haemophilus paragallinarum* serotype A. Vet Microbiol 1991; 27:327-338.

32. - Takagi M, Ohmae K, Hirayama N, Ohta S. Expresión of hemagglutinin of *Haemophilus paragallinarum* serotype A in *Escherichia coli*. J Vet Med Sci 1991; 53:917-920.
33. - Jacques M, Paradis SE. Adhesin-receptor interactions in Pasteurellaceae. FEMS Microbiol Rev 1998; 22:45- 59. Ueda S, Nagasawa Y, Suzuki T, Tajima M. Adhesion of *Haemophilus paragallinarum* to cultured chickens cells. Microbiol Immunol 1982; 26:1007-1016.
- 34.- Fernández RP, García-Delgado GA, Ochoa GP, Soriano VE. Adherence of *Haemophilus paragallinarum* to chicken tracheal epithelial cells. Proceedings of 48th Western Poultry Disease Conference; 1999 april 24-27; Vancouver (British Columbia) Canada. California (Davis): University of California, 1999:111-112.
- 35.- Fernández RP, Soriano VE, Longinos GM, Navarrete GP. *In vitro* adherence neutralization of *Haemophilus paragallinarum* to chicken tracheal epithelial cells by hemagglutination-inhibition antibodies. Proceedings Vet. Méx. 35 (3) 2004 277 of 49th Western Poultry Disease Conference; 2000 march 5-7; Sacramento (California) USA. California (Davis): University of California, 2000:52.
36. - Fernandez RP, Sanchez SA, Soriano VE. Carbohydrate cell receptors for adhesins of *Haemophilus paragallinarum*. Proceedings of 50th Western Poultry Disease Conference; 2001 March 24-26; Davis (California) USA. California (Davis): University of California, 2001:130-131.
37. - Terry TD, Zalucki YM, Walsh SL, Blackall PJ, Jennings MP. Genetic analysis of a plasmid encoding haemocin production in *Haemophilus paragallinarum*. Microbiology 2003; 149:3177-3184.

38. - Sawata A, Kume K, Nakase Y. Biologic and serologic relationship between Page's and Sawata's serotypes of *Haemophilus paragallinarum*. *Am J Vet Res* 1980; 41:1901-1904.
39. - Rimler RB, Davis RB. Infectious coryza: In vivo growth of *Haemophilus gallinarum* as a determinant for cross protection. *Am J Vet Res* 1977; 38:1591-1593.
40. - Rimler RB, Davis RB, Page LA. Infectious coryza: Cross-protection studies, using seven strains of *Haemophilus gallinarum*. *Am J Vet Res* 1977; 38:1587-1589.
- 41.- Thornton AM, Blackall PJ. Serological classification of Australian isolates of *Haemophilus paragallinarum*. *Aust Vet J* 1984; 61:251-253.
- 42.- Yamaguchi T, Blackall PJ, Takigami S, Iritani Y, Hayashi Y. Pathogenicity and serovar-specific hemagglutinating antigens of *Haemophilus paragallinarum* serovar B strains. *Avian Dis* 1990; 34:964-968.
- 43.- Bragg RR. Virulence of South African isolates of *Haemophilus paragallinarum*. Part 1: NAD-dependent field isolates. *Onderstepoort J Vet Res* 2002; 69:163-169.
- 44.- Soriano VE, Longinos GM, Fernandez RP, Tellez G, Suarez GF, Blackall PJ. Cross-protection studies among nine serovars of *Haemophilus paragallinarum* in the Blackall scheme. *Proceedings of XIII Congreso of the World Veterinary Poultry Association*; 2003 July 19-23; Denver (Colorado) USA. United Kingdom (Compton): World Veterinary Poultry Association, 2003:121.
- 45.- Horner FR, Bishop GC, Jarvis CJ, Coetzee HT. NAD (V-factor)-independent and typical *Haemophilus paragallinarum* infection in commercial chickens: a five year field study. *Avian Pathol* 1995; 24:453-463.

- 46.- Bragg RR, Greyling JM, Verschoor JA. Isolation and identification of NAD-independent bacteria from chickens with symptoms of infectious coryza. *Avian Pathol* 1997; 26:595-606.
- 47.- Bragg RR. Virulence of South African isolates of *Haemophilus paragallinarum*. Part 2: Naturally occurring NAD-independent field isolates. *Onderstepoort J Vet Res* 2002; 69:171-175.
- 48.- Bragg RR, Coetzee L, Verschoor JA. Plasmid-encoded NAD independence in some South African isolates of *Haemophilus paragallinarum*. *Onderstepoort J Vet Res* 1993; 60:147-152.
49. - Taole M, Albertyn J, Van Heerden E, Virulence of South African isolates of *Haemophilus paragallinarum*. Part 3: experimental produced NADindependent isolate. *Onderstepoort J Vet Res* 2002; 69:189-196.
50. - Bragg RR, Purdan G, Coetzee L, Verschoor JA. Effects of transformation on the hemagglutinins of *Haemophilus paragallinarum*. *Onderstepoort J Vet Res* 1995; 62:261-270.
51. - Gromkova R, Koornhof H. Naturally occurring NADindependent *Haemophilus parainfluenzae*. *J Gen Microbiol* 1990; 136:1031-1035.
- 52.- Terzolo HR. Revisión sobre coriza infecciosa: propuestas de investigación para su diagnóstico y control. *Rev Med Vet* 2000; 81:262-269.
- 53.- Kume K, Sawata A. Factors of *Haemophilus paragallinarum* for infection and protection in chickens. Proceedings of 39th Western Poultry Disease Conference; 1990 march 4-6; Sacramento (California) USA. California (Davis): University of California, 1990:53-60.

- 54.- Sawata A, Kume K. Relationship between virulence and morphological or serological properties of variants dissociated from serotype 1 *Haemophilus paragallinarum* strains. J Clin Microbiol 1983; 18:49-55.
55. - Sawata A, Kume K, Nakai T. Relationship between anticapsular antibody and protective activity of a capsular antigen of *Haemophilus paragallinarum*. Jpn J Vet Sci 1984; 46:475-486.
56. - Sawata A, Nakai T, Kume K, Yoshikawa H, Yoshikawa T. Lesions induced in the respiratory tract of chickens by encapsulated or nonencapsulated variants of *Haemophilus paragallinarum*. Am J Vet Res 1985; 46:1185- 1191.
- 57.- Zhao C, Nguyen T, Liu L, Sacco RE, Brogden KA, Lehrer RI. Gallinacin-3, an inducible epithelial β defensin in the chicken. Infect Immun 2001; 69: 2684-2691.
- 58.-Blackall PJ, Terzolo HR. Coriza infecciosa: revisión de métodos de diagnóstico y vacunas. Rev Asoc. Argent Microbiol 1995; 27:156-174.
- 59.- Horner FR, Bishop GC, Haw C. An upper respiratory disease of commercial chickens resembling infectious coryza, but caused by a V factor-independent bacterium. Avian Pathol 1992; 21:421-427.
- 60.- Mouahid M, Bisgaard M, Morley AJ, Mutters R, Mannheim W. Occurrence of V-factor (NAD) independent strains of *Haemophilus paragallinarum*. Vet Microbiol 1992; 31:363-368.
- 61.- García FA, Blackall PJ, Angulo E. Presencia de *Haemophilus paragallinarum* NAD independiente en México. Memorias de la XXVII Convención Anual ANECA & 51st Western Poultry Disease Conference; 2002 mayo 1-4; Puerto Vallarta (Jalisco) México. México (D.F.): Asociación Nacional de Especialistas en Ciencias Avícolas, AC, 2002:59.

- 62.- Sato S, Shifrine M. Application of the agar gel precipitation test to serologic studies of chickens inoculated with *Haemophilus gallinarum*. Avian Dis 1965; 9:591-598.
63. - Iritani Y, Katagiri K, Tsuji K. Slide-agglutination test of *Haemophilus gallinarum* antigen treated by trypsin to inhibit spontaneous agglutination. Avian Dis 1978; 22:793-797.
64. - Yamaguchi T, Iwaki S, Iritani Y. Latex agglutination test for measurement of type-specific antibody to *Haemophilus paragallinarum* in chickens. Avian Dis 1981; 25:988-995.
65. - Raie N, Hietala SK, Barton JT, Read DH. Preliminary development of an ELISA for infectious coryza (*Haemophilus paragallinarum* infection) in chickens. Proceedings of 41st Western Poultry Disease Conference; 1992 march 1-3; Sacramento (California) USA. California (Davis): University of California, 1992:23.
- 66.- Zhang P, Blackall PJ, Yamaguchi T, Iritani Y. A monoclonal antibody-blocking enzyme-linked immunosorbent assay for the detection of serovar-specific antibodies to *Haemophilus paragallinarum*. Avian Dis 1999; 43:75-82.
- 67.- Miao D, Zhang P, Gong Y, Yamaguchi T, Iritani Y, Blackall PJ. The development and application of a blocking ELISA kit for the diagnosis of infectious coryza. Avian Pathol 2000; 29:219-225.
- 68.- Soriano VE, Fernández RP, García-Delgado GA, Ochoa GP. Evaluación de dos protocolos de bacterinización de gallinas de postura mediante detección de anticuerpos inhibidores de la hemoaglutinación y protección ante un desafío controlado con *Haemophilus paragallinarum*. Vet Méx 2001; 32:145-148.
- 69.- Blackall PJ, Yamaguchi T, Iritani Y, Rogers DG. Evaluation of two monoclonal antibodies for serotyping of *Haemophilus paragallinarum*. Avian Dis 1990; 34:861-864.

70. - Blackall PJ, Zheng Z, Yamaguchi T, Iritani Y, Rogers DG. Evaluation of a panel of monoclonal antibodies in the subtyping of *Haemophilus paragallinarum*. Avian Dis 1991; 35:955-959.
- 71.- Blackall PJ, Zheng Z, Takagi M, Terzolo HR, Sandoval VE, Silva EN. Characterization of two monoclonal antibodies directed against serovar A *Haemophilus paragallinarum*. Avian Dis 1994; 38:361-365.
- 72.- Yamaguchi T, Takigami S, Iritani Y, Hayashi Y. Characterization and use of monoclonal antibodies to identify *Haemophilus paragallinarum* serovars. Avian Dis 1990; 34:52-57.
- 73.- Yamaguchi T, Takigami S, Iritani Y, Hayashi Y. Characterization of two new monoclonal antibodies against *Haemophilus paragallinarum* serovar C hemagglutinating antigen. Avian Dis 1990; 34:922-927.
- 74.- Terzolo HR, Paolicchi FA, Sandoval VE, Blackall PJ, Yamaguchi T, Iritani Y. Characterization of isolates of *Haemophilus paragallinarum* from Argentina. Avian Dis 1993; 37:310-314.
- 75.-Blackall PJ, Silva EN, Yamaguchi T, Iritani Y. Characterization of isolates of avian haemophili from Brazil. Avian Dis 1994; 38:269-274.
76. - Yamaguchi T, Kato K, Takigami S, Iritani Y, Hayashi Y. Serological classification of Japanese isolates of *Haemophilus paragallinarum* using two serovar-specific monoclonal antibodies. Avian Dis 1990; 34:364-368.
77. - Chen X, Mifflin JK, Zhang P, Blackall PJ. Development and application of DNA probes and PCR tests for *Haemophilus paragallinarum*. Avian Dis 1996; 40:398-407.

78. - Mifflin JK, Chen X, Bragg RR, Welgemoed JM, Greling JM, Horner RF, et al. Confirmation that PCR can be used to identify NAD-dependent and NAD-independent *Haemophilus paragallinarum* isolates. Onderstepoort J Vet Res 1999; 66:55-57.
- 79.- Chen X, Chen Q, Zhang P, Feng W, Blackall PJ. Evaluation of a PCR test for the detection of *Haemophilus paragallinarum* in China. Avian Pathol 1998; 27:296-300.
- 80.- Soriano VE. Coriza infecciosa. Memorias IX Jornadas Médico Avícolas; 2003 febrero 18-20; Cd. Universitaria (DF) México. México (DF): Departamento de Producción Animal: Aves Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia, Universidad Nacional Autónoma de México. 2003:88-92.
81. - Chen X, Song C, Gong Y, Blackall PJ. Further studies on the use of a polymerase chain reaction test for the diagnosis of infectious coryza. Avian Pathol 1998; 27:618-624.
82. - Blackall PJ, Eaves LE, Morrow CJ. Comparison of *Haemophilus paragallinarum* isolates by restriction endonuclease analysis of chromosomal DNA. VetMicrobiol 1991; 27:39-47.
83. - Khan MI, Chen X, Blackall PJ. Differentiation of *Haemophilus paragallinarum* isolates using ERICPCR analysis. Proceedings of 47th Western Poultry
84. - Disease Conference; 1998 march 8-10; Sacramento (California) USA. California (Davis): University of California, 1998:8-9.
- 87.- Hobb RI, Tseng HJ, Downes JE, Terry TD, Blackall PJ, Takagi M, et al. Molecular analysis of a haemagglutinin of *Haemophilus paragallinarum*. Microbiology 2002; 148:2171-2179.

- 88.- Sandoval VE, Terzolo HR. Coriza infecciosa. Primera parte: descripción de la enfermedad, el agente y los brotes de campo. *Avicult Profes* 1996; 14:29-35.
- 89.- Blackall PJ, Reid GG. Further efficacy studies on inactivated, aluminum-hydroxide-adsorbed vaccines against infectious coryza. *Avian Dis* 1987; 31:527-532.
90. - Terzolo HR, Sandoval VE, Pondal FG. Evaluation of inactivated infectious coryza vaccines in chickens challenged by serovar B strains of *Haemophilus paragallinarum*. *Avian Pathol* 1997; 26:365-376.
91. - Blackal PJ. Infectious coryza: overview of the disease and new diagnostic options. *Clin Microbiol Rev* 1999; 12:627-632.
92. - Jacobs AAC, Cuenen W, Storm PK. Efficacy of a trivalent *Haemophilus paragallinarum* vaccine compared to bivalent vaccines. *Vet Microbiol* 1992; 32:43-49.
93. - Fernandez RP, Colindres HL, Soriano VE. Protection afforded by bi- and trivalent bacterins of *Haemophilus paragallinarum* against prevalent serovars in Mexico. Proceedings of 52nd Western Poultry Disease Conference; 2003 march 8-11; Sacramento (California) USA. California (Davis): University of California, 2003:49-50.
- 94.- Yamaguchi T, Blackall PJ, Takigami S, Iritani Y, Hayashi Y. Immunogenicity of *Haemophilus paragallinarum* serovar B strains. *Avian Dis* 1991; 35:965-968.
95. - Bowles R, Blackall PJ, Terzolo HR, Sandoval VE. An Yamaguchi T, Iwaki S, Iritani Y. Latex agglutination test for measurement of type-specific antibody to *Haemophilus paragallinarum* in chickens. *Avian Dis* 1981; 25:988-995.
96. - Raie N, Hietala SK, Barton J.T., Read DH. Preliminary development of an ELISA for infectious coryza (*Haemophilus paragallinarum* infection) in chickens.

Proceedings of 41st Western Poultry Disease Conference; 1992 march 1-3; Sacramento (California) USA. California (Davis): University of California, 1992:23.

97.- Zhang P., Blackall P.J., Yamaguchi T, Iritani Y. A monoclonal antibody-blocking enzyme-linked immunosorbent assay for the detection of serovar-specific antibodies to *Haemophilus paragallinarum*. Avian Dis 1999; 43:75-82.

98.- Miao D, Zhang P, Gong Y, Yamaguchi T, Iritani Y, Blackall PJ. The development and application of a blocking ELISA kit for the diagnosis of infectious coryza. Avian Pathol 2000; 29:219-225.

99.- Soriano VE, Fernández RP, García-Delgado GA, Ochoa GP. Evaluación de dos protocolos de bacterinización de gallinas de postura mediante detección de anticuerpos inhibidores de la hemoaglutinación y protección ante un desafío controlado con *Haemophilus paragallinarum*. Vet Méx 2001; 32:145-148.

100.- Blackall PJ, Yamaguchi T, Iritani Y, Rogers DG. Evaluation of two monoclonal antibodies for serotyping of *Haemophilus paragallinarum*. Avian Dis 1990; 34:861-864.

101.- Blackall PJ, Zheng Z, Yamaguchi T, Iritani Y, Rogers DG. Evaluation of a panel of monoclonal antibodies in the subtyping of *Haemophilus paragallinarum*. Avian Dis 1991; 35:955-959.

102.- Blackall PJ, Zheng Z, Takagi M, Terzolo HR, Sandoval VE, Silva EN. Characterization of two monoclonal antibodies directed against serovar A *Haemophilus paragallinarum*. Avian Dis 1994; 38:361-365.

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

104. Yamaguchi T, Takigami S, Iritani Y, Hayashi Y. Characterization of two new monoclonal antibodies against *Haemophilus paragallinarum* serovar C hemagglutinating antigen. Avian Dis 1990; 34:922-927.
- 105.- Terzolo HR, Paolicchi FA, Sandoval VE, Blackall PJ, Yamaguchi T, Iritani Y. Characterization of isolates of *Haemophilus paragallinarum* from Argentina. Avian Dis 1993; 37:310-314.
- 106.- Blackall PJ, Silva EN, Yamaguchi T, Iritani Y. Characterization of isolates of avian haemophili from Brazil. Avian Dis 1994; 38:269-274.
107. - Yamaguchi T, Kato K, Takigami S, Iritani Y, Hayashi Y. Serological classification of Japanese isolates of *Haemophilus paragallinarum* using two serovar-specific monoclonal antibodies. Avian Dis 1990; 34:364-368.
108. - Chen X, Miflin JK, Zhang P, Blackall PJ. Development and application of DNA probes and PCR tests for *Haemophilus paragallinarum*. Avian Dis 1996; 40:398-407.
109. - Miflin JK, Chen X, Bragg RR, Welgemoed JM, Greling JM, Horner RF, et al. Confirmation that PCR can be used to identify NAD-dependent and NAD-independent *Haemophilus paragallinarum* isolates. Onderstepoort J Vet Res 1999; 66:55-57.
- 110.- Chen X, Chen Q, Zhang P, Feng W, Blackall PJ. Evaluation of a PCR test for the detection of *Haemophilus paragallinarum* in China. Avian Pathol 1998; 27:296-300.
- 111.- Soriano VE. Coriza infecciosa. Memorias IX Jornadas Médico Avícolas; 2003 febrero 18-20; Cd. Universitaria (DF) México. México (DF): Departamento de Producción Animal: Aves Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia, Universidad Nacional Autónoma de México. 2003:88-92.

112. - Chen X, Song C, Gong Y, Blackall PJ. Further studies on the use of a polymerase chain reaction test for the diagnosis of infectious coryza. *Avian Pathol* 1998; 27:618-624.
113. - Blackall PJ, Eaves LE, Morrow CJ. Comparison of *Haemophilus paragallinarum* isolates by restriction endonuclease analysis of chromosomal DNA. *VetMicrobiol* 1991; 27:39-47.
- 114.- Khan MI, Chen X, Blackall PJ. Differentiation of *Haemophilus paragallinarum* isolates using ERICPCR analysis. Proceedings of 47th Western Poultry Disease Conference; 1998 march 8-10; Sacramento (California) USA. California (Davis): University of California, 1998:8-9.
- 115.- Hobb RI, Tseng HJ, Downes JE, Terry TD, Blackall PJ, Takagi M, *et al.* Molecular analysis of a haemagglutinin of *Haemophilus paragallinarum*. *Microbiology* 2002; 148:2171-2179.
116. - Sandoval VE, Terzolo HR. Coriza infecciosa. Primera parte: descripción de la enfermedad, el agente y los brotes de campo. *Avicult Profes* 1996; 14:29-35.
117. - Blackall PJ, Reid GG. Further efficacy studies on inactivated, aluminum-hydroxide-adsorbed vaccines against infectious coryza. *Avian Dis* 1987; 31:527-532.
118. - Terzolo HR, Sandoval VE, Pondal FG. Evaluation of inactivated infectious coryza vaccines in chickens challenged by serovar B strains of *Haemophilus paragallinarum*. *Avian Pathol* 1997; 26:365-376.
- 119.- Blackal PJ. Infectious coryza: overview of the disease and new diagnostic options. *Clin Microbiol Rev* 1999; 12:627-632.

120.- Jacobs AAC, Cuenen W, Storm PK. Efficacy of a trivalent *Haemophilus paragallinarum* vaccine compared to bivalent vaccines. Vet Microbiol 1992; 32:43-49.

121.- Fernandez RP, Colindres HL, Soriano VE. Protection afforded by bi- and trivalent bacterins of *Haemophilus paragallinarum* against prevalent serovars in Mexico. Proceedings of 52nd Western Poultry Disease Conference; 2003 march 8-11; Sacramento (California) USA. California (Davis): University of California, 2003:49-50.

122.-Yamaguchi T, Blackall PJ, Takigami S, Iritani Y, Hayashi Y. Immunogenicity of *Haemophilus paragallinarum* serovar B strains. Avian Dis 1991; 35:965-968.

123. - Bowles R, Blackall PJ, Terzolo HR, Sandoval VE. An Sakai T, Nagao S. Experimental infection of chickens with *Haemophilus paragallinarum* and therapeutic efficacy of TA-068W. Bull Coll Vet Med Nihon Univ 1987; 40:228-235.

124.- Lublin A, Mechani S, Malkinson M, Weisman Y. Efficacy of norfloxacin nicotinate treatment of broilers breeders against *Haemophilus paragallinarum*. Avian Dis 1993; 37:673-679.

125. - Vazquez R, Vázquez F. Effectiveness of enrofloxacin against *H. paragallinarum* infection under control and field trials in Mexico. Proceedings of 38th Western Poultry Disease Conference; 1989 march 6-9; Tempe (Arizona) USA. California (Davis): University of California, 1989:128-130.

126.- Bragg RR. The use of a continual disinfection program for the control of infectious diseases in layers and broilers. Proceedings of XIII Congress of the World Veterinary Poultry Association; 2003 july 19-23; Denver (Colorado) USA. United Kingdom (Compton): World Veterinary Poultry Association, 2003:127-128.

127. - Soriano VE, Vera NA, Salado CR, Fernandez RP, Blackall PJ. *In vitro* susceptibility of *Ornithobacterium rhinotracheale* several antimicrobial drugs. Avian Dis 2003; 47:476-480

128. - Blackall PJ, Reid GG. 1987. Further efficacy studies on inactivated aluminium hydroxide adsorbed vaccines against infections coryza. Avian Disease 31: 527 – 532.

129.- Blackall PJ, Terzolo H.R. 1995. Coriza infecciosa: revisión de métodos de diagnóstico y vacunas. Revista Argentina de Microbiología. 27: 156- 174.

130. - Blackall PJ, and Soriano EV. 2008. Infections coriza and related bacterial infections. En: Diseases of Poultry. Saif YM. 12 th edition. P 789 – 803.

131. - Blackall PJ. 2009. Infections coriza. En: A Laboratory Manual for the Isolation, identification and characterization of Avian Pathogens. Fifth edition. American of Avian Pathologist.

132. - Fernandez RP, Soriano VE, Longinos GM, Navarrete GP. 2000. *in Vitro* adherente neutralization of *Haemophilus paragallinarum* to chicken tracheal epithelial cells by hemagglutination – inhibition antibodies. E: 49 reunión de la Western Poultry Disease Conference. Sacramento (California).

133. - Kume K, Sawata A, Nakase Y. 1980. Hamophilus infections in chicken. Immunogenicity of serotypes 1 and 2 of *Haemophilus paragallinarum*. Jpn. Vet Sci. 42: 673 - 680

134. - Kume K, Sawata A. 1990. Factors of *Haemophilus paragallinarum* for infection and protection in chicken. En: WPDC Proceeding.

135. - Matsumoto M, Yamamoto R. 1975. Protective quality of an aluminium hydroxide absorbed broth bacterin against infectious coriza. Am. J. Vet. Res 36: 579 – 582.
136. - Rinler RB, Davis RB, Page RK. 1977. Infections coryza : cross protection studies, using seven strains of *Haemophilus gallinarum*. Am. J. Vet. Res. 38: 1587 – 1589. 10. Reid GG, Blackall PJ. 1987. Comparison of adjuvants for an inactivated infectious coriza vaccine. Avian Disease 31: 59 – 63.
- 137.- Sawata A, Kume K, Nakase Y. 1979. Antigenic structure and relationship between serotypes 1 and 2 of *Haemophilus paragallinarum*. Am. J. Vet. Res. 40: 1450 – 1453. 12.
- 138.- Sawata A, Kume K, Nakase Y. 1980. Biologic and serologic relationship between Page's and Sawata's serotypes of *Haemophilus paragallinarum*. Am. J. Vet. Res. 41: 1901 – 1904.
- 139.- Sawata A, Nakai T, Kume K, Yoshikawa H, Yoshikawa T. 1985. Intranasal inoculation of chickens with encapsulated or nonencapsulated variants of *Haemophilus paragallinarum*: Electron microscopic evaluation of the nasal mucosa. Am. J. Vet. Res Vol: 46. N° 11: 2346 – 2353. 14.
- 140.- Soriano E, Terzolo H. 2004. Epizootiología, prevención y control de la coriza infecciosa [Internet], [febrero 2009]. Disponible en <http://www.fmvz.unam.mx/f.m.v.z/ret>
- 141.- Thorton Am, Blackall PJ. 1984. Serological classification of Australian isolates of *Haemophilus paragallinarum*. Aust. Vet. J 61: 251- 253.
- 142.- Terzolo HR. 2009. Revisión sobre coriza infecciosa. Propuesta de investigación para su diagnóstico y control [Internet], [02 julio 2009]. Disponible en <http://www.inta.gov.ar/balcarce/>.

143.- Yamaguchi T, Blackall PJ, Takagami S, Iritami Y, Hayashi Y. 1990. Pathogenicity and serovar – specific hemagglutinating antigens of *Haemophilus paragallinarum* serovar B strains. *Avian Disease* 34: 964 – 968.