



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL ESTADO DE MÉXICO
MAESTRÍA Y DOCTORADO EN CIENCIAS
AGROPECUARIAS Y RECURSOS NATURALES

**Análisis filogenético de aislamientos de *Avibacterium*
paragallinarum serovariedad C-1 emergentes en Ecuador y
México**

TESIS

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

PRESENTA:

MVZ ALEJANDRA GARCÍA SÁNCHEZ

EL CERRILLO PIEDRAS BLANCAS, MAYO DE 2013



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL ESTADO DE MÉXICO
MAESTRÍA Y DOCTORADO EN CIENCIAS
AGROPECUARIAS Y RECURSOS NATURALES

**Análisis filogenético de aislamientos de *Avibacterium*
paragallinarum serovariedad C-1 emergentes en Ecuador y
México**

TESIS

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

PRESENTA:

MVZ ALEJANDRA GARCÍA SÁNCHEZ

Director de Tesis:

Dr. Edgardo Soriano Vargas

Comité tutorial:

Dr. Martín Talavera Rojas

Dr. Michael Allen

TOLUCA, MÉXICO, Mayo de 2013

CONTENIDO

| | |
|--|------|
| Contenido | iii |
| Índice de cuadros | v |
| Índice de figuras | vi |
| Resumen | viii |
| Abstract | ix |
| I. Introducción | 1 |
| II. Revisión de literatura | 2 |
| A) Coriza infecciosa: Descripción de la enfermedad | 2 |
| B) Clasificación serológica..... | 3 |
| C) Distribución del agente | 4 |
| D) Genotipificación por ERIC-PCR | 6 |
| E) Análisis filogenético en <i>Avibacterium paragallinarum</i> | 7 |
| i. Gen 16S rRNA | 7 |
| ii. Gen <i>hagA</i> | 10 |
| III. Justificación | 12 |
| IV. Hipótesis | 13 |
| V. Objetivos | 14 |
| VI. Límite de espacio y límite de tiempo | 15 |
| VII. Material y Método | 17 |
| VIII. Resultados | 22 |
| A) Artículo enviado a revista a <i>Avian Diseases</i> | 23 |
| B) Artículo aceptado en <i>Veterinaria México</i> | 37 |

| | |
|---|----|
| C) ERIC-PCR | 43 |
| D) Secuenciación y análisis del gen 16S rRNA | 46 |
| E) Secuenciación y análisis del gen <i>hagA</i> | 49 |
| IX. Discusión | 52 |
| X. Conclusiones | 55 |
| XI. Sugerencias | 56 |
| XII. Bibliografía | 57 |

ÍNDICE DE CUADROS

| | |
|---|----|
| Cuadro 1. Resumen de las actividades realizadas durante la maestría por periodo semestral de febrero de 2011 a enero de 2013 | 15 |
| Cuadro 2. Lista de aislamientos de <i>Avibacterium paragallinarum</i> incluidos en el estudio | 17 |
| Cuadro 3. Secuencias contenidas en el GenBank utilizadas en los análisis | 21 |
| Cuadro 4. Genotipos de los aislamientos y cepas de referencia incluidos en el análisis de ERIC-PCR | 45 |
| Cuadro 5. Porcentajes de similitud entre aislamientos seleccionados y secuencias referidas en el GenBank del gen 16S rRNA obtenidos a través de WATER en EMBOSS | 48 |
| Cuadro 6. Porcentajes de similitud entre aislamientos seleccionados y secuencias referidas en el GenBank del gen <i>hagA</i> obtenidos a través de WATER en EMBOSS | 50 |

ÍNDICE DE FIGURAS

| | |
|--|----|
| Figura 1. Colonias de <i>Avibacterium paragallinarum</i> con crecimiento satelital a la colonia nodriza (<i>Staphylococcus epidermidis</i>) en placas de agar sangre | 3 |
| Figura 2. Distribución mundial de las nueve serovariedades reconocidas de <i>A. paragallinarum</i> | 5 |
| Figura 3. Relaciones filogenéticas basadas en un análisis de máxima verosimilitud de secuencias del gen 16S rRNA con miembros del género <i>Avibacterium</i> y miembros representativos de cada género de la familia <i>Pasteurellaceae</i> | 8 |
| Figura 4. Relación filogenética entre <i>A. endocarditidis</i> y miembros representativos de la familia <i>Pasteurellaceae</i> relacionados con aves. Basado en un análisis de máxima verosimilitud con secuencias del gen 16S rRNA | 9 |
| Figura 5. Relación filogenética entre los aislamientos de HP105 y HP107, relacionados a <i>Avibacterium</i> spp. Análisis de máxima verosimilitud de secuencias del gen 16S rRNA | 10 |
| Figura 6. Árbol filogenético mostrando la relación filogenética de las 11 cepas de referencia de <i>A. paragallinarum</i> con base en el análisis de las secuencias del gen <i>hagA</i> | 11 |
| Figura 7. Método de purificación de ADN a partir del producto de PCR del gen <i>hagA</i> por medio del sistema de FlashGel® de Lonza | 20 |
| Figura 8. Genotipos de ERIC-PCR de los aislamientos de <i>Avibacterium paragallinarum</i> serovariedad C-1 incluidos en el estudio | 43 |
| Figura 9. Genotipos de ERIC-PCR de cepas de referencia y aislamientos seleccionados de <i>Avibacterium paragallinarum</i> serovariedad C-1 incluidos en el estudio | 44 |
| Figura 10. Genotipo de ERIC-PCR del aislamiento NAD-independiente de <i>Avibacterium paragallinarum</i> de la serovariedad C-1 en relación a la variante dependiente de la misma serovariedad | 46 |

| | |
|--|----|
| Figura 11. Alineamiento de las secuencias del gen 16S rRNA de los aislamientos de <i>A. paragallinarum</i> serovariedad C-1 y cepas relacionadas previamente reportadas | 47 |
| Figura 12. Relación filogenética basada en el análisis de las secuencias del gen 16S rRNA de los aislamientos de <i>A. paragallinarum</i> serovariedad C-1 y cepas previamente reportadas | 49 |
| Figura 13. Árbol filogenético basado en las secuencias del gen <i>hagA</i> , mostrando las relaciones entre aislamientos mexicanos y ecuatorianos con las cepas de referencia reportadas por Hobb <i>et al.</i> (2002). Construido mediante <i>Neighbor joining</i> | 51 |

RESUMEN

Avibacterium paragallinarum es el agente responsable de la coriza infecciosa en pollos. Este microorganismo provoca una enfermedad aguda del tracto respiratorio superior, que se caracteriza principalmente por la descarga nasal e inflamación facial. La enfermedad tiene significancia económica en la avicultura comercial por las pérdidas que ocasiona en la producción de huevo, una disminución de hasta un 40%, además de retraso en el crecimiento en pollos de engorda. Serológicamente la bacteria se clasifica en tres serogrupos que incluyen nueve serovariedades: A-1 a A-4; B-1 y C-1 a C-4. En Ecuador y México se reportó recientemente la serovariedad C-1. Esta serovariedad se encontraba geográficamente restringida a Japón. De manera particular en México, los aislamientos serovariedad C-1 estudiados muestran una relación clonal. El propósito del presente estudio fue determinar la relación filogenética de 5 aislamientos de campo C-1 de Ecuador y 10 aislamientos de México. Se analizaron los genotipos de los 15 aislamientos mostraron un genotipo ERIC-PCR único, lo cual indicó también una relación clonal. Asimismo, un aislamiento de *A. paragallinarum* NAD-independiente, serovariedad C-1, mostró un genotipo ERIC idéntico al obtenido para los aislamientos NAD-dependientes. El análisis filogenético se realizó a partir de las secuencias de los genes 16S rRNA y *hagA*. En ambos análisis, los resultados mostraron una identidad del 100% entre los 15 aislamientos y no se observó una relación estrecha (97.8%) con la cepa de referencia H-18 (serovariedad C-1) de Japón. Estos resultados indican que existe una relación clonal entre los aislamientos de Ecuador y México estudiados.

ABSTRACT

The bacterium *Avibacterium paragallinarum* is the etiology of infectious coryza of chickens. This microorganism causes an acute upper respiratory disease, mainly characterized by nasal discharge and facial swelling. Infectious coryza is of economic importance in poultry by reducing egg production up to 40%, and retarded growth in broilers. This bacterium is serologically classified into three serogroups that include nine serovars: A-1 to A-4, B-1, and C-1 to C-4. In Ecuador and Mexico, serovar C-1 has been recently identified. Up this reports, this serovar was geographically restricted to Japan. Particularly in Mexico, serovar C-1 isolates have shown a clonal relationship in previous studies. The purpose of the present study was to determine the phylogenetic relationship of five and ten isolates from Ecuador and Mexico. Genotyping results of the 15 isolates showed a clonal relationship. Furthermore, an NAD-independent isolate showed a identical ERIC genotype indicating also a clonal relationship. The phylogenetic analysis was based on both 16S rRNA and *hagA* gene sequences. Results of both analysis showed a 100% identity in all 15 isolates include in the study. All 15 isolates were distantly related (97.8%) to the reference strain H-18 (serovar C-1) from Japan. These results indicate a clonal relationship among *A. paragallinarum* serovar C-1 isolates from Ecuador and Mexico included in the study.

I.- INTRODUCCIÓN

Avibacterium paragallinarum es la bacteria responsable de la coriza infecciosa en pollos. Este microorganismo, antes conocido como *Haemophilus paragallinarum*, provoca una enfermedad respiratoria aguda que se caracteriza principalmente por la inflamación del tracto respiratorio superior y edema facial. La enfermedad tiene significancia económica en la avicultura comercial debido a la disminución de la producción de huevo que va de 10 hasta 40%, además de retraso en el crecimiento en pollos de engorda (Blackall y Soriano, 2008).

Actualmente son reconocidas nueve serovariedades hemoaglutinantes dentro de tres serogrupos: A-1, A-2, A-3, A-4; B-1; C-1, C-2, C-3 y C-4 (Blackall *et al.*, 1990). La coriza infecciosa tiene una distribución mundial, sin embargo en cada país se pueden presentar diferentes serovariedades (Blackall y Soriano, 2008). En Ecuador se han reportado las serovariedades A-3, B-1 y C-1 (Cabrera *et al.*, 2010). En el caso de México se reconocen las serovariedades A-1, A-2, B-1, C-2 (Soriano *et al.*, 2001) y recientemente la serovariedad C-1 (Morales-Erasto *et al.*, 2011). Estos dos estudios reportan por primera vez la presencia de la serovariedad C-1 fuera de Japón, único país dónde se había identificado esta serovariedad. El estudio de Morales-Erasto *et al.* (2011) muestran que existe una posible relación clonal entre aislamientos de la serovariedad C-1 de México. El propósito del presente estudio fue conocer la relación filogenética entre aislamientos de campo C-1 obtenidos recientemente en México y Ecuador y la cepa de referencia H-18 de origen Japonés de la misma serovariedad. El análisis filogenético se realizó a partir de la secuencia parcial de dos genes, el gen 16S rRNA que ha sido ampliamente usado en estudios filogenéticos en miembros de la familia *Pasteurellaceae* y el gen *hagA* que codifica para la hemoaglutinina de esta bacteria. Asimismo, los aislamientos de Ecuador y México fueron genotipificados por medio del ensayo ERIC-PCR.

II. REVISIÓN DE LITERATURA

A. CORIZA INFECCIOSA: DESCRIPCIÓN DE LA ENFERMEDAD

La coriza infecciosa es una enfermedad respiratoria en pollos causada por *Avibacterium paragallinarum*, que afecta principalmente el tracto respiratorio superior. Es de gran importancia económica para la avicultura en todo el mundo ya que impacta de manera significativa en la producción de huevo, ocasionando la disminución hasta en 40%; además de un bajo desarrollo en aves en crecimiento, lo que lleva a un aumento en el número de aves eliminadas (Blackall y Soriano, 2008). En un brote de coriza infecciosa en reproductores pesados de Panamá se registró hasta 45% de disminución en la producción de huevo (Calderón *et al.*, 2010).

Usualmente se caracteriza como una enfermedad de baja mortalidad y alta morbilidad. Sin embargo, cuando se asocia con otros agentes, la mortalidad puede llegar hasta 48%. Se presenta generalmente como una enfermedad aguda, sin embargo hay muchos casos en que la enfermedad toma un curso crónico. Los signos clínicos más comunes son edema facial, descarga nasal serosa o mucosa, lagrimeo y en algunos casos inflamación de barbillas (Blackall y Soriano, 2008).

A. paragallinarum tiene un requerimiento especial para su crecimiento *in vitro*. La mayoría de los cultivos necesitan de NAD (dinucleotido de adenina nicotinamida), el cual se puede obtener de una colonia nodriza como *Staphylococcus epidermidis* si se siembra en placas de agar sangre con 5% de sangre de ovino (Figura 1). La morfología de la colonia es como una diminuta gota de rocío y crece satelitalmente a la colonia nodriza (Blackall y Soriano, 2008).

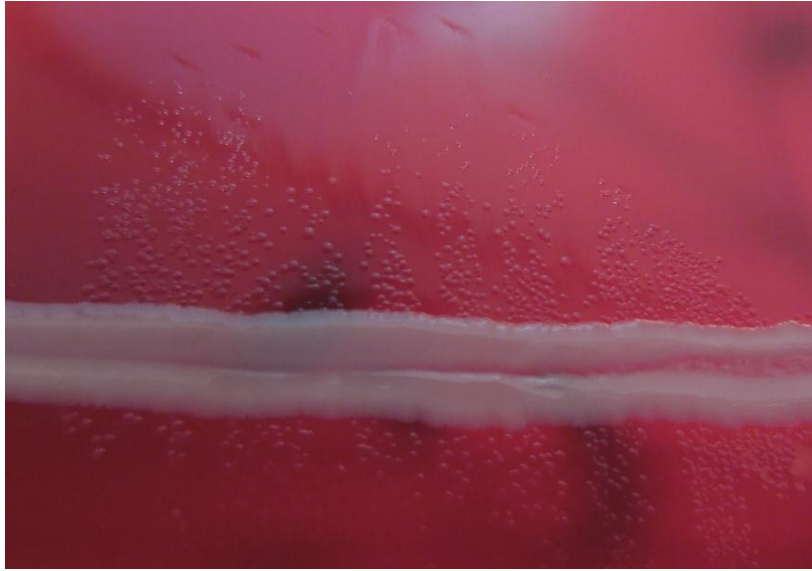


Figura 1. Colonias de *Avibacterium paragallinarum* con crecimiento satelital a la colonia nodriza (*Staphylococcus epidermidis*) en placas de base de agar con 5% de sangre de ovino.

Existe una variante NAD-independiente que fue reportada por primera vez en Sudáfrica. El estudio fue realizado por Bragg *et al.* en 1997 a partir de aves con signos de coriza infecciosa y se analizaron 126 aislamientos, de los cuales 64 fueron identificados como *A. paragallinarum* independientes de NAD y antigénicamente clasificados como serovariedad A y C.

En México se reportó el aislamiento de *A. paragallinarum* NAD-independiente obtenido de gallinas de postura con signos de coriza infecciosa y con una disminución del 20% en la producción de huevo. Los aislamientos fueron identificados como serovariedad B-1 y C-2 (García *et al.*, 2004).

B. CLASIFICACIÓN SEROLÓGICA

La capacidad hemoaglutinante de *A. paragallinarum* está directamente relacionada con la inmunogenicidad y la patogenicidad, por esta razón, una bacterina protectora debe estar elaborada con cepas hemoaglutinantes. La prueba de inhibición de la hemoaglutinación es de gran importancia para clasificar

aislamientos de *A. paragallinarum*, esta capacidad hemoaglutinante está dada por la hemoaglutinina de la bacteria, la cual es crucial en la protección (Soriano y Terzolo, 2004b).

Por medio de una prueba de aglutinación en placa, Page reconoció tres tipos serológicos distintos en doce aislamientos de *A. paragallinarum* y los denominó A, B y C (Page, 1962). Posteriormente Kume *et al.* (1983) clasificaron 17 cepas en tres grupos distintos utilizando la prueba de inhibición de la hemoaglutinación y propusieron que dos de los grupos podían ser subdivididos en tres serotipos cada uno, resultando en 7 serovariedades: H-1 a H-7.

Blackall y colaboradores (1990a) serotipificaron aislamientos australianos de *A. paragallinarum* utilizando dos técnicas: aglutinación en placa e inhibición de la hemoaglutinación, y concluyen que la segunda técnica es la más eficiente para serotipificar aislamientos.

Posteriormente Blackall *et al.* (1990b), propusieron una nueva clasificación serológica que actualmente sigue siendo reconocida y utilizada. Ésta consiste en una modificación del esquema de Kume en el que se reconocen nueve serovariedades hemoaglutinantes distribuidas en tres serogrupos de la siguiente manera: A-1, A-2, A-3 y A-4; B-1; C-1, C-2, C-3 y C-4.

C. DISTRIBUCIÓN DEL AGENTE

A. paragallinarum tiene una distribución mundial y basados en la clasificación serológica propuesta por Blackall *et al.* (1990b) se han identificado diferentes serovariedades en varios países (Figura 2).

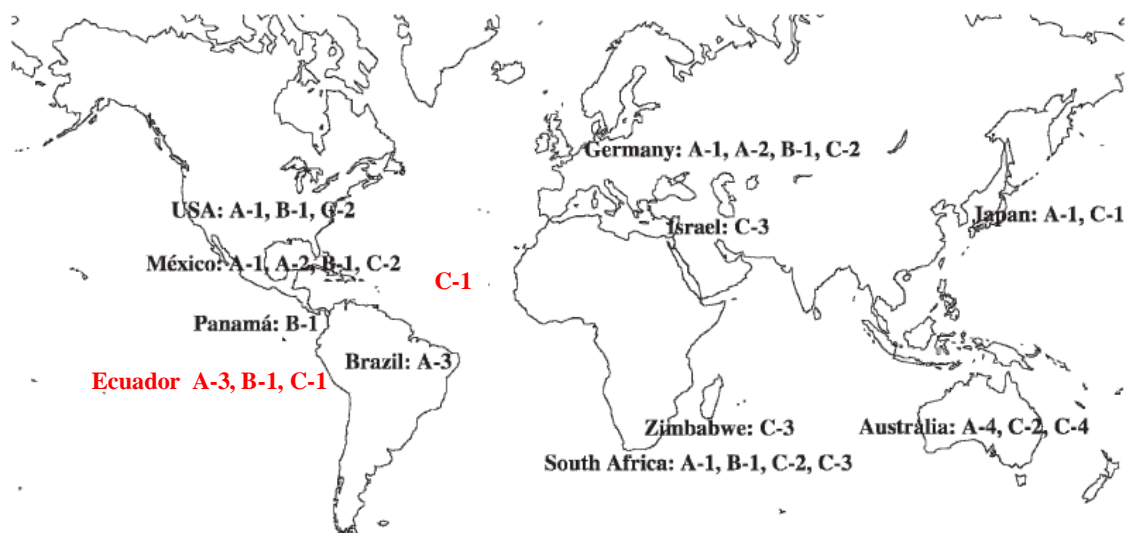


Figura 2. Distribución mundial de las nueve serovariedades de *A. paragallinarum* (tomado de Calderón *et al.*, 2010). Las letras marcadas en rojo indican la reciente identificación de la serovariedad C-1 fuera de Japón por Cabrera *et al.* (2011) y Morales-Erasto *et al.* (2011).

En Ecuador, 28 aislamientos fueron serotipificados en el esquema de hemoaglutininas de Kume y se identificaron las siguientes serovariedades: 17 se clasificaron como serovariedad A-3, 5 como B-1, 5 como C-1 y uno no fue tipificable (Cabrera *et al.*, 2011).

Hasta entonces, la serovariedad C-1 se encontraba restringida geográficamente a Japón, sin embargo con estos dos estudios se reconoce por primera vez fuera de ese país (Cabrera *et al.*, 2011; Morales-Erasto *et al.*, 2011).

En México se identificaron por primera vez en el año 2000 los tres serogrupos de *A. paragallinarum* del esquema de Page (Fernández *et al.*, 2000). Posteriormente se identificaron las serovariedades A-1, A-2, B-1 y C-2 en 42 aislamientos de los estados de Jalisco, Puebla, Michoacán, Morelos, México y Sonora (Soriano *et al.*, 2001).

Aislamientos recientes de *A. paragallinarum* obtenidos de brotes de coriza infecciosa en gallinas inmunizadas procedentes de dos estados de Jalisco y Puebla, fueron identificados como serovariedad C-1 (Morales-Erasto *et al.*, 2011).

D. Genotipificación por ERIC-PCR

La prueba de ERIC-PCR (*enterobacterial repetitive intergenic consensus sequence-based polymerase chain reaction*) está basada en el uso de iniciadores con una secuencia de 22 bases de longitud. Estos hibridan fragmentos de ADN cromosomal a bajas temperaturas y pueden ser usados para la amplificación de regiones del genoma bacteriano. Las secuencias ERIC son altamente conservadas pero sus localizaciones cromosómicas difieren entre especies o cepas. Por lo tanto después de la separación por electroforesis de los productos amplificados se obtienen patrones con bandas características de la cepa bacteriana particular (Olive y Bean, 1999).

Las secuencias ERIC están presentes en muchas especies bacterianas y pueden ser utilizadas como iniciadores eficientes para producir patrones genéticos de diferentes tipos bacterianos (Appuhamy *et al.*, 1997).

En la mayoría de los estudios realizados por ERIC-PCR se puede registrar diversidad genética entre los aislamientos (Olvera *et al.*, 2006). También se hace mención que es una herramienta con poder de discriminación (Appuhamy *et al.*, 1997). Cada estudio donde se ha empleado el ensayo ERIC-PCR es un caso particular de acuerdo a la especie bacteriana estudiada.

La técnica ha sido utilizada como una herramienta molecular útil para analizar perfiles genotípicos intra-especie en diversos agentes bacterianos de interés veterinario, como es el caso de *Haemophilus somnus* (Appuhamy *et al.*, 1997) *Pasteurella multocida* (Loubinox *et al.*, 1999), *Haemophilus parasuis* (Olvera *et al.*, 2006), entre otros.

De manera particular, la prueba ERIC-PCR ha sido usada ampliamente para la genotipificación de aislamientos de *Avibacterium paragallinarum* (Soriano

et al., 2004b; Calderón *et al.*, 2010; Morales-Erasto *et al.*, 2011). En México, en un estudio que incluyó aislamientos de las serovariedades A-1, A-2, B-1 y C-2, se registró diversidad genética en los aislamientos de una misma serovariedad (Soriano *et al.*, 2004b). Sin embargo, en un estudio reciente que incluyó 14 aislamientos de la serovariedad C-1, no se encontró diversidad genética, concluyendo que los aislamientos podrían tener una relación clonal. Los aislamientos fueron obtenidos a partir de aves bacterinizadas en granjas de gallinas de postura comerciales de los estados de Jalisco y Puebla, a partir de 2008 (Morales-Erasto *et al.*, 2011). Se desconocen las características genéticas de aislamientos de esta serovariedad de Ecuador.

E. Análisis filogenético en *Avibacterium paragallinarum*

Los estudios filogenéticos se han convertido en el objetivo de muchas investigaciones, con el propósito de conocer la diversidad genética inter-especie e intra-especie de los miembros de la familia *Pasteurellaceae* de importancia veterinaria. Es necesario comprender las relaciones entre aislamientos de campo obtenidos de diferentes hospederos, zonas geográficas y año de aislamiento (Christensen y Bisgaard, 2010).

i. GEN 16S rRNA

Los cambios taxonómicos más recientes en la familia *Pasteurellaceae* tienen origen en la información obtenida a partir de la comparación de secuencias del gen 16S rRNA. Todo el taxón de la familia *Pasteurellaceae* ha sido caracterizado por la secuenciación del gen 16S rRNA, el cual ha sido el punto de inicio para la clasificación y nombramiento de la mayoría de sus miembros (Christensen y Bisgaard, 2010).

El género *Avibacterium* fue propuesto por Blackall *et al.* en 2005, reclasificando las bacterias antes conocidas como *Haemophilus paragallinarum*, *Pasteurella avium*, *Pasteurella volantium* y *Pasteurella gallinarum* en este nuevo

género, ya que forman un grupo monofilético con un mínimo de 96.8 % de identidad en las secuencias del gen 16S rRNA (Figura 3).

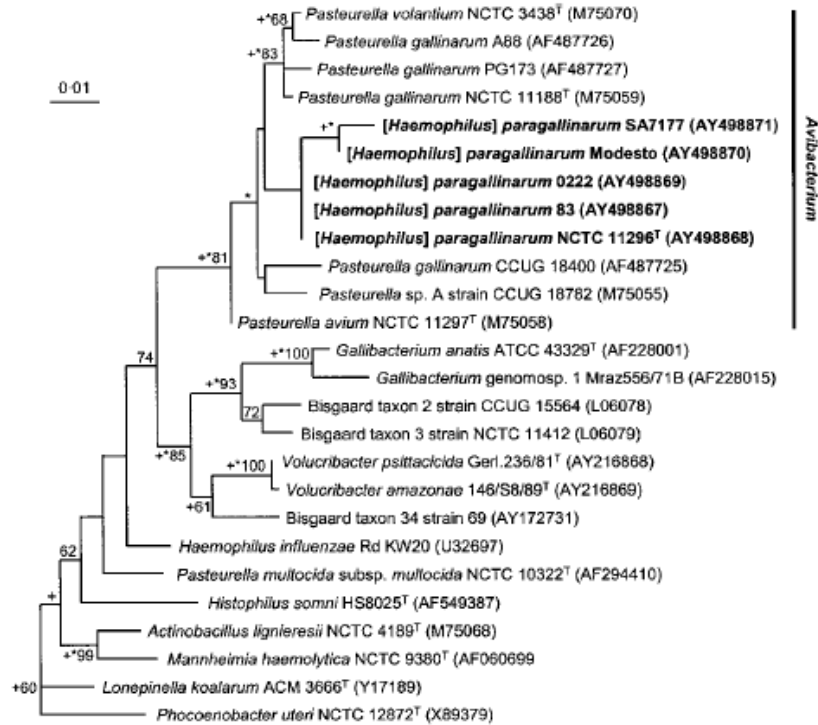


Figura 3. Relaciones filogenéticas basadas en un análisis de máxima verosimilitud de secuencias del gen 16S rRNA con miembros del género *Avibacterium* y miembros representativos de cada género de la familia *Pasteurellaceae* (tomado de Blackall *et al.*, 2005.)

Por otra parte Bisgaard *et al.* (2007) utilizaron esta misma herramienta molecular para clasificar una nueva especie del género *Avibacterium*, *A. endocarditidis*. El estudio incluyó una colección de 27 aislamientos obtenidos de aves con endocarditis valvular. Dichos aislamientos compartieron características fenotípicas del género *Avibacterium* y el análisis del gen 16S rRNA mostró que la cepa tipo de *A. endocarditidis* 20186H4H1 tuvo mayor identidad en sus secuencias

con el género *Avibacterium* que con otros taxones de la familia *Pasteurellaceae* (Figura 4).

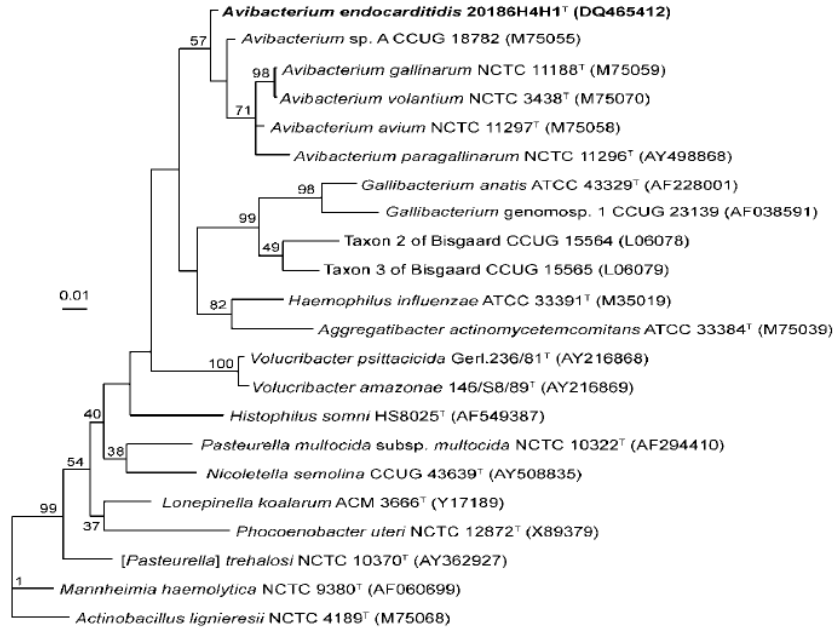


Figura 4. Relación filogenética entre *A. endocarditidis* y miembros representativos de la familia *Pasteurellaceae* obtenidos a partir de aves. Basado en un análisis de máxima verosimilitud con secuencias del gen 16S rRNA.

Blackall *et al.* (2011) reexaminaron dos aislamientos atípicos obtenidos a principios de los años ochentas en Australia. Los aislamientos HP105 y HP107, fueron obtenidos de gallinas con enfermedad respiratoria crónica, pero su crecimiento era muy escaso y en su momento no permitió la identificación del agente. Confirmaron que los aislamientos eran *A. paragallinarum*, serovariedad A y C respectivamente y el análisis filogenético a través de las secuencias de un fragmento del gen 16S rRNA (Figura 5) permitió la confirmación de la especie, además de comparar la relación entre ellas y secuencias reportadas previamente.

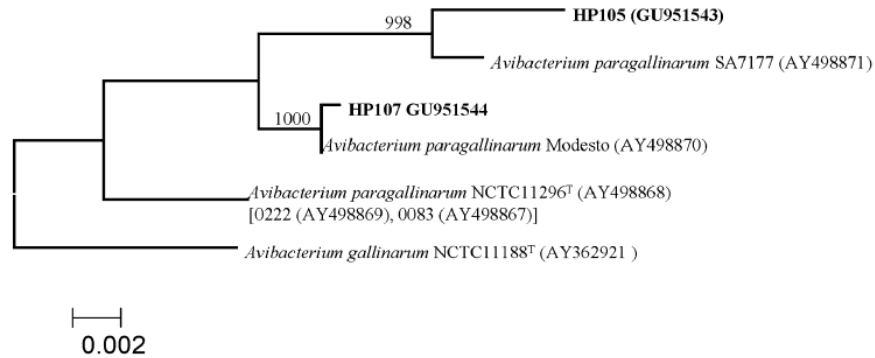


Figura 5. Relación filogenética entre los aislamientos de HP105 y HP107, relacionados a *Avibacterium* spp. (en negritas). Análisis de máxima verosimilitud de secuencias del gen 16S rRNA (tomado de Blackall *et al.*, 2011).

ii. Gen *hagA*

Es el gen que codifica para la hemoaglutinina de *A. paragallinarum* (Hobb *et al.*, 2002). El antígeno hemoaglutinina juega un papel clave en la antigenicidad, inmunogenicidad y patogenicidad (Blackall y Soriano, 2008).

Hobb *et al.* (2002) obtuvieron la secuencia completa del gen *hagA* de las 11 cepas de referencia reconocidas (Figura 6) y concluyeron que es un gen conservado entre serovariedades y que no tiene relación con la serovariedad de las cepas, lo que sugiere que las diferencias inmunológicas que subyacen en los esquemas de serotipificación de Page y Kume no necesariamente están basados exclusivamente en este gen.

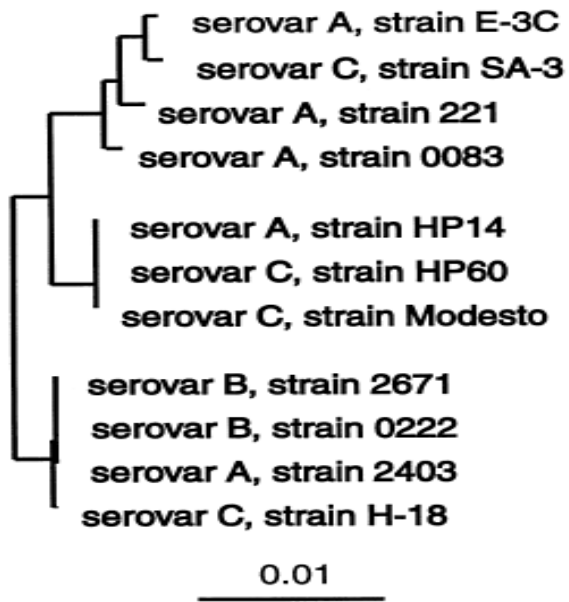


Figura 6. Árbol filogenético mostrando la relación filogenética de las 11 cepas de referencia de *A. paragallinarum* con base en el análisis de las secuencias del gen *hagA* (tomado de Hobb *et al.*, 2002).

III. JUSTIFICACIÓN

La serovariedad C-1 de *A. paragallinarum* había sido identificada únicamente en aislamientos de Japón. Sin embargo, recientemente se identificó esta serovariedad en aislamientos de Ecuador y México, obtenidos particularmente de aves bacterinizadas. Hasta el momento se sabe que los aislamientos C-1 de México, obtenidos de Jalisco y Puebla desde 2008, tienen una relación clonal. Por lo tanto es necesario conocer el genotipo de los aislamientos de Ecuador y la relación filogenética que existe entre éstos y los aislamientos de México, así como su relación filogenética con la cepa de referencia H-18 de Japón. Esta información será de gran valor para comprender la epidemiología de los aislamientos serovariedad C-1 de *A. paragallinarum* emergentes en América.

IV. HIPÓTESIS

Con base en la diversidad genética registrada previamente en aislamientos de *A. paragallinarum* de México, es posible que los aislamientos serovariedad C-1 de Ecuador y México muestren también una diversidad genética.

Con base en la localización geográfica de la serovariedad C-1 restringida a Japón, es posible que los aislamientos de Ecuador y México de esta serovariedad tengan una relación filogenética estrecha con la cepa de referencia H-18 de la serovariedad C-1.

V. OBJETIVOS

- General
 - Analizar la relación filogenética de aislamientos de *Avibacterium paragallinarum* de la serovariedad C-1.
- Particulares
 - Determinar la diversidad genética de aislamientos de *A. paragallinarum* serovariedad C-1 de Ecuador y aislamientos recientes de México.
 - Analizar filogenéticamente los aislamientos serovariedad C-1 de *A. paragallinarum* con base en las secuencia de los genes 16S rRNA y *hagA*.

VI. LÍMITE DE ESPACIO Y LÍMITE DE TIEMPO

La parte práctica de la tesis se realizó en dos espacios, la primera etapa que corresponde a la propagación y conservación de aislamientos de *A. paragallinarum* así como la extracción de ADN genómico y las pruebas de ERIC-PCR se realizó en el área de Microbiología Aviar del Centro de Investigación y Estudios Avanzados en Salud Animal, Universidad Autónoma del Estado de México durante los dos primeros periodos de la maestría (2011a y 2011b) (Cuadro 1).

Cuadro 1. Resumen de las actividades realizadas durante la maestría por periodo semestral de febrero de 2011 a enero de 2013.

| ACTIVIDAD | LUGAR | 1º Semestre | | 2º Semestre | | 3º Semestre | | 4º Semestre | |
|---|--|--|---|-------------|---|-------------|---|-------------|---|
| | | 1 | 2 | 1 | 2 | 1 | 2 | 1 | 2 |
| | | Investigación documental y marco teórico | | ■ | ■ | | | | |
| Registro del protocolo | | | ■ | | | | | | |
| Propagación y conservación de cepas de referencia y aislamientos de <i>A. paragallinarum</i> serovariedad C-1 | Area de Microbiología Aviar, CIESA-UAEMéx. | ■ | ■ | ■ | ■ | | | | |
| Desarrollo experimental | Area de Microbiología Aviar, CIESA-UAEMéx. Departamento de Ciencias Biológicas de la UNT. | | | ■ | ■ | ■ | ■ | | |
| Análisis de resultados y redacción del documento de tesis | Area de Microbiología Aviar, CIESA-UAEMéx. | | | | | | | ■ | ■ |

La segunda etapa del proyecto que incluyó la estandarización, amplificación y purificación del producto de PCR para los dos genes, secuenciación y parte del análisis de secuencias se realizó en el Departamento de Ciencias Biológicas de la Universidad del Norte de Texas bajo la tutoría del Dr. Michael Allen durante el tercer periodo de la maestría (2012b).

Durante el último periodo semestral se analizaron los resultados, se redactó el documento de tesis y se preparó el manuscrito para la revista *Avian Diseases* (indizada en el *Journal Citation Reports*, factor de impacto 2011, 1.462).

VII. MATERIAL Y MÉTODO

Aislamientos Bacterianos. Se incluyeron 5 aislamientos obtenidos de dos regiones de Ecuador en un periodo de 7 años (2000 a 2007) y 10 aislamientos de México obtenidos de los estados de Jalisco y Puebla de 2008 a 2011. En total se incluyeron 15 aislamientos serovariedad C-1 (Cuadro 2). Las cepas de referencia H-18 (C-1), SA-3 (C-3) y HP60 (C-4) cuyas secuencias no estaban incluidas en el GenBank fueron donadas por el Dr. Patrick J. Blackall, *University of Queensland*, Australia. Las bacterias fueron incubadas durante 24 horas en placas de agar sangre con 10% de sangre de ovino a 37° C y posteriormente inoculadas en tubos con 5ml de caldo BHI (infusión cerebro corazón) adicionado con 25 µg/ml de NAD.

Cuadro 2. Aislamientos de *A. paragallinarum* incluidos en el estudio.

| Aislamiento | Serovariedad | Origen | Año de aislamiento |
|-------------|--------------|--------------------|--------------------|
| ESV-129 | C-1 | Jalisco, Mexico | 2008 |
| ESV -135 | C-1 | Jalisco, Mexico | 2008 |
| ESV-218 | C-1 | Jalisco, Mexico | 2010 |
| ESV-227 | C-1 | Jalisco, Mexico | 2011 |
| ESV-231 | C-1 | Jalisco, Mexico | 2011 |
| ESV-241 | C-1 | Puebla, Mexico | 2011 |
| ESV-242 | C-1 | Puebla, Mexico | 2010 |
| ESV-243 | C-1 | Jalisco, Mexico | 2011 |
| ESV-246 | C-1 | Puebla, Mexico | 2010 |
| ESV-249 | C-1 | Jalisco, Mexico | 2011 |
| Lavetec 03 | C-1 | Ecuador, Cotopaxi | 2005 |
| Lavetec 07 | C-1 | Ecuador, Pichincha | 2000 |
| Lavetec 27 | C-1 | Ecuador, Pichincha | 2002 |
| Lavetec 31 | C-1 | Ecuador, Pichincha | 2004 |
| Lavetec 55 | C-1 | Ecuador, Pichincha | 2007 |

Preparación del ADN genómico. Se realizó la extracción a partir del paquete bacteriano cultivado en caldo BHI, por medio del kit de QiaGen® que sirve para extracción de ADN total a partir de sangre, tejidos, células bacterianas y virus. El proceso se realizó de acuerdo a las instrucciones del fabricante.

Genotipificación por ERIC-PCR. Se realizó la prueba de reacción en cadena de la polimerasa de secuencias repetitivas intergénicas del consenso de enterobacterias (ERIC-PCR, por sus siglas en inglés). Esta técnica se empleó para obtener el genotipo de cada aislamiento, mediante los patrones de bandas que presenta cada uno y al final compararlos entre sí. Se utilizó el informado por Soriano *et al.* (2004). Se utilizaron los oligonucleótidos ERIC-1R (5'-ATGTAAGCTCCTGGGGATTAC-3') y ERIC-2 (5'-AAGTAAGTGACTGGG-GTGAGCG-3'). La mezcla de la reacción contuvo un total 25 µl y se utilizó el kit de Promega®. Este volumen total contuvo 1.5 mM de MgCl₂, 0.2 mM de la mezcla de dNTP's Promega® U1515, 2.5U de Go Taq® Flexi DNA Polymerase (Promega®), 10mM de cada uno de los oligonucleótidos y 50 ng de la muestra de ADN. Las condiciones de temperatura de la PCR fueron un periodo de desnaturalización inicial a 94° C por 5 minutos, seguido de 35 ciclos de desnaturalización a 94° C por 1 minuto, un periodo de alineación a 52° C por 1 minuto y un periodo de extensión a 74° C por 6 minutos; se finalizó con un periodo de extensión a 74° C por 6 minutos.

Los productos ERIC-PCR junto con el marcador de peso molecular (Promega® 100 bp DNA ladder) se separaron por electroforesis en un gel de agarosa al 1.5% con bromuro de etidio (0.5 µg/ml) a 80V durante una hora en solución TB-EDTA. El gel fue visualizado y fotografiado bajo luz ultravioleta. El marcador de peso molecular consiste de 11 fragmentos, desde 100 pares de bases hasta 1500. La banda de 500 pares de bases es de dos a tres veces más brillante que las demás para proporcionar orientación al visualizar el gel.

En este estudio de genotipificación, se incluyeron también dos aislamientos de *A. paragallinarum* obtenidos en 2011 a partir de gallinas de reemplazo de una

una granja comercial ubicada en el estado de Jalisco, uno de ellos NAD-independiente y el otro NAD-dependiente, ambos de la serovariedad C-1.

Amplificación de los genes 16S rRNA y *hagA*. Las PCR's se realizaron en el departamento de Ciencias Biológicas de la Universidad del Norte de Texas, en el laboratorio del Dr. Michael Allen durante una estancia realizada de febrero a mayo de 2012. Las condiciones de la reacción fueron las mismas para la amplificación de los dos genes, *hagA* y 16Sr RNA. Se utilizó PuReTaq Ready-To-Go PCR Beads de GE® que es una mezcla comercial para PCR. El producto amplificado fue observado en un sistema de electroforesis en tiempo real llamado FlashGel® System. Por medio de este sistema se recolectó el fragmento de ADN de interés.

Gen 16S rRNA. Se amplificó el gen 16S rRNA en las posiciones 27 a 1492 con los iniciadores universales 27f 5'AGAGTTTGATCMTGGCTCAG 3' y 1492r 5'ACGGCTACCTTGTTACGACTT 3', los cuales están referidos en el "*Nucleic Acid Techniques in Bacterial Systematics*" (Lane, 1991). Las condiciones de temperatura en el termociclador fueron las siguientes: un periodo inicial de desnaturalización a 96° C durante 5 minutos, 35 ciclos de 94° C durante 3 minutos, seguido de 35 ciclos de desnaturalización a 94° C por 1 minuto, alineación a 56° C por un minuto y extensión a 72° C por minuto y medio, finalizando con un periodo de extensión a 72° C por un minuto.

Gen *hagA*. Para amplificar el gen de la hemoaglutinina (*hagA*) se utilizaron los iniciadores HA8 5'AAGCTTTTATTTTAGATTTATTG 3' y H-11 5'CGCACGGCATTGATATTGTG 3' los cuales amplifican el gen completo. Se utilizó el protocolo descrito por Hobb *et al.* (2002), que consta de un periodo inicial de desnaturalización a 94° C durante 3 minutos, seguido de 35 ciclos de desnaturalización a 94° C por 30 segundos, alineación a 53.4° C por 30 segundos y extensión a 72° C por 1 minuto, finalizando con un periodo de extensión a 72° C por un minuto.

Purificación de ADN del producto amplificado. El ADN de cada producto amplificado se obtuvo mediante el sistema de recolección FlashGel® System, de acuerdo al protocolo de manufactura. Primero las muestras se colocaron en el *cassette* que contenía un gel de agarosa, se observaron las bandas migraron a lo largo del gel hasta llegar a un pozo de recolección, cada pozo contenía 20 µl de búfer de recolección, de aquí se recuperó el ADN que fue enviado para secuenciación (Figura 7).

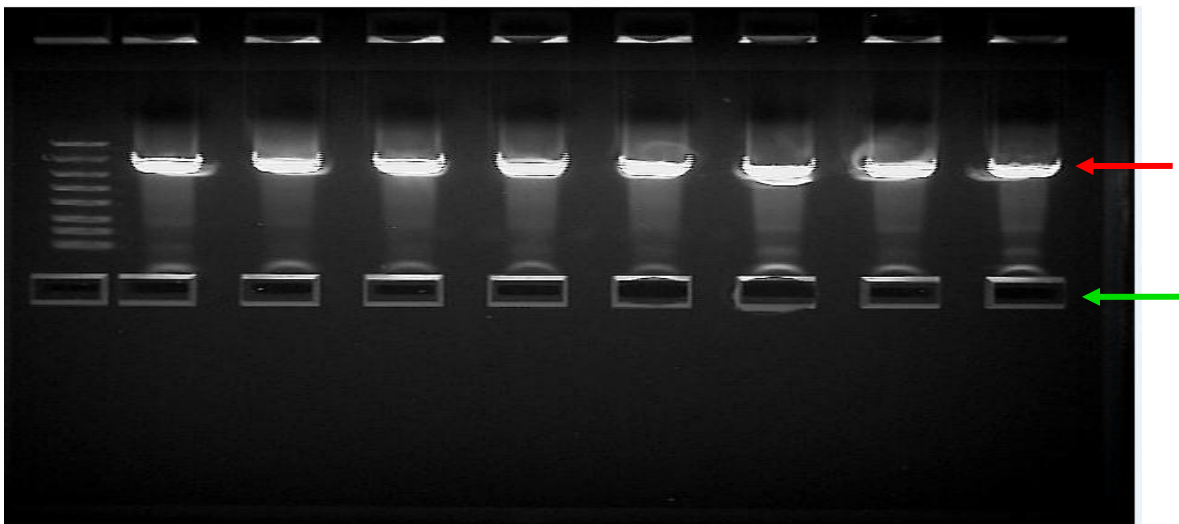


Figura 7. Método de purificación de ADN a partir del producto de PCR del gen *hagA* por medio del sistema de FlashGel® de Lonza. Lo indicado con flecha roja es la banda de ADN migrando hacia el pozo de recolección (Flecha verde).

Secuenciación. Se secuenciaron los productos amplificados utilizando el método de Sanger a través de la empresa Eurofins®, la cual utiliza de manera rutinaria el método de próxima generación o método 454. Cada muestra se secuenció en ambos sentidos. Se realizó una réplica de secuenciación en la empresa Macrogen.

Construcción de árboles filogenéticos: Para el alineamiento de las secuencias obtenidas se utilizó el programa *Clustal IX2* y posteriormente se realizó

la construcción de los árboles filogenéticos con ayuda del programa MEGA 5.05. Además se utilizó el programa WATER de EMBOSS para determinar el porcentaje de identidad entre los aislamientos y secuencias incluidas en GenBank (Cuadro 3).

Cuadro 3. Secuencias incluidas en GenBank utilizadas en los análisis.

| Cepa | Serovariedad | Número de Acceso | |
|---------------------|--------------|------------------|-----------------|
| | | Gen 16S rRNA | Gen <i>hagA</i> |
| 0083 | A-1 | AY498867 | AF491820 |
| 221 | A-1 | | AF491826 |
| 2403 | A-2 | | AF491817 |
| E-3C | A-3 | | AF491825 |
| HP14 | A-4 | | AF491821 |
| 0222 | B-1 | AY498869 | AF491819 |
| 2671 | B-1 | | AF491822 |
| H-18 | C-1 | En proceso | AF491823 |
| Modesto | C-2 | AY498870 | AF491827 |
| SA-3 | C-3 | En proceso | AF491824 |
| HP60 | C-4 | En proceso | AF491818 |
| SA7177 | NAD-indep | AY498871 | |
| HP105 | Serogrupo A | GU951543 | |
| HP107 | Serogrupo C | GU951544 | |
| <i>P. multocida</i> | | NR041809 | |

VIII. RESULTADOS

Los resultados de genotipificación y análisis filogenético de los aislamientos de *A. paragallinarum* serovariedad C-1 incluidos en el presente estudio, han sido sometidos a publicación en un artículo enviado a la revista *Avian Diseases* (A).

Los resultados de genotipificación del aislamiento NAD-independiente de *A. paragallinarum* fueron publicados en la revista *Veterinaria México* (B).

Los resultados de la genotipificación mediante ERIC-PCR, la secuenciación y análisis del gen 16S rRNA y del gen *hagA* se muestran en los incisos C, D y E respectivamente.

A) Artículo enviado a *Avian Diseases*

De: avian.diseases@aaap.info
Asunto: **10572-051413-ResNote Receipt of New Paper by Avian Diseases**
Fecha: 14 de mayo de 2013 12:59:53 CDT
Para: Edgardo Soriano Vargas <soriano@uaemex.mx>
Cc: Edgardo Soriano-Vargas

Dear Dr. Soriano,

Your manuscript titled: "Phylogenetic relationship of serovar C-1 isolates of *Avibacterium paragallinarum*", with the tracking number MS# 10572-051413-ResNote has successfully passed the quality control stage for *Avian Diseases*. It is now in the peer review process.

You can review the status of your manuscript at any time by following the instructions below.

You can use the link below to go directly to your homepage within The Avian Diseases website. From your homepage click the "Live Manuscripts" link and then click on "Check Status # 10572-051413-ResNote" to view the status of this manuscript.

<<http://aviandiseases.allentrack.net/cgi-bin/main.plex?el=A6BB1DGO7A4YG4J7A92N0fqluCKvBSBhO7fnzEAZ>>

If you need any further assistance, please contact us with the manuscript tracking number at: avian.diseases@aaap.info.

Janece Bevans-Kerr
Office Manager
Avian Diseases
avian.diseases@aaap.info

RESEARCH NOTE

Phylogenetic relationship of serovar C-1 isolates of *Avibacterium paragallinarum*

A. García-Sánchez,^A V. Morales-Erasto,^A M. Talavera-Rojas,^A F. Robles-González,^B M. S. Allen,^C P. J. Blackall,^D and E. Soriano-Vargas^{AE}

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

^BBoehringer Ingelheim Vetmedica S.A. de C.V., Guadalajara 44940, Jalisco, México.

^CCenter for Biosafety and Biosecurity, Department of Forensic and Investigative Genetics, University of North Texas Health Science Center, Fort Worth 76107-2644, Texas, USA.

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

Running title: Phylogeny of *Avibacterium paragallinarum* serovar C-1

^ECorresponding author

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

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

SUMMARY. The bacterium *Avibacterium paragallinarum* is the etiological agent of infectious coryza of chickens. Serovar C-1 has emerged in infectious coryza outbreaks in layer hens of Ecuador and Mexico. In the current study, genotyping and phylogenetic analysis of five Ecuadorian and ten Mexican isolates of *Av. paragallinarum* serovar C-1 was performed. All 15 isolates share a unique ERIC-PCR fingerprint, and have identical 16S rRNA and *hagA* gene sequences. Results indicate that Ecuadorian and Mexican isolates of serovar C-1 of *Av. paragallinarum* have a clonal relationship.

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

Abbreviations: ERIC-PCR = enterobacterial repetitive intergenic consensus-based polymerase chain reaction; NAD = nicotinamide adenine dinucleotide.

The bacterium *Avibacterium paragallinarum*, a member of the *Pasteurellaceae* family, is the etiological agent of infectious coryza (2). Infectious coryza is an upper, acute respiratory disease of chickens that causes serious economic impacts by dropping egg production (up to 40%) in layers and growth retardation in growing birds (2).

In terms of serological classification, two main schemes, Page and Kume, have been used and both recognize three serogroups A, B, and C (2). In the Kume scheme, nine serovars have been recognized up to now: A-1 to A-4; B-1; C-1 to C-4 (5). The Kume serovars of *Av. paragallinarum* can be geographically restricted, for example, serovars A-4 and C-4 have been recognized only in Australia (5). Although previously believed to be restricted to Japan, serovar C-1 was recently identified in *Av. paragallinarum* isolates from Ecuador and Mexico (6,10).

The phylogenetic relationships of Ecuadorian and Mexican isolates of *Av. paragallinarum* serovar C-1 were unknown. Hence, the aim of the present study was to perform a genotypic and phylogenetic analysis of *Av. paragallinarum* isolates of serovar C-1 from Ecuador and Mexico.

MATERIALS AND METHODS

Bacteria. A total of five isolates from Ecuador and ten from Mexico of *Av. paragallinarum* serovar C-1 were included in the study. Reference strains H-18, Modesto, SA-3, and HP60 of serovars C-1, C-2, C-3, and C-4 of *Av. paragallinarum* respectively,

were included in the study. The five Ecuadorian isolates and ten Mexican isolates have been previously serotyped (6,10).

Media. Brain-heart infusion broth and agar, both supplemented with 1% (w/v) sodium chloride, 0.0025% (w/v) reduced reduced nicotinamide adenine dinucleotide (NAD), and 1% (v/v) filter-sterilized, heat-inactivated horse serum, were used for propagation and maintenance of bacterial cultures (13).

Genotyping. The genomic typing of isolates was performed by an enterobacterial repetitive intergenic consensus-based polymerase chain reaction (ERIC-PCR) as previously described (10,13).

DNA sequencing and phylogenetic analysis. The sequencing of 16S rRNA and *hagA* genes was performed as reported elsewhere (3,4,7). A BLAST search was performed in GenBank (1). Pairwise comparisons for similarity were performed by the program WATER included in EMBOSS (11). The 16S rRNA gene sequences were obtained in the region covering *Escherichia coli* positions 27-1427. The *hagA* gene sequences were obtained by using primers H8 and H11 binding outside the *hagA* ORF to amplify the full-length gene (7). Similarly, a BLAST search was performed in GenBank and pairwise comparisons for similarity performed by the program WATER included in EMBOSS. The phylogenetic analysis was performed by construction of a multiple alignment by ClustalX, removal of gapped columns and analysis by the Neighbour Joining method (12) conducted using the MEGA 5.1 (8).

RESULTS

Reference strains H-18, Modesto, SA-3, and HP60 each gave a unique ERIC fingerprint. One ERIC-PCR pattern was shared among all five Ecuadorian and ten Mexican serovar C-1 field isolates (Table 1). The ERIC-PCR pattern of Mexican isolates ESV-129 and ESV-135 was the same as previously reported (10).

Sequences for the 16S rRNA gene of reference strains H-18, SA-3, and HP60 and all 15 isolates were obtained and deposited in GenBank (accession numbers in process). Similarly, the *hagA* sequences of all 15 isolates were obtained and deposited in GenBank (accession numbers in process).

All 15 field isolates of serovar C-1 gave identical (100% similarity) 16S rRNA gene sequences. A deletion of TTTTT in positions 181-185 of the Modesto reference strain was observed in all 15 isolates. This same deletion was present in the Genbank sequences of strains HP105 and SA7177 of *Av. paragallinarum*. All serovar C-1 isolates included in the study were most closely related to strain HP105 (GU951543) of *Av. paragallinarum*, with 99.3% similarity. All serovar C-1 isolates included in the study were most distantly related to reference strains 0222 (AY498869) and 0083 (AY498867) of *Av. paragallinarum*, with 96.9% similarity. The phylogenetic analysis (Figure 1) was obtained with the sequences determined in the current study. Selected available sequences of reference strains (0222, 0083, and Modesto) and strains HP105 (GU951543), HP107 (GU951544), NCTC11296 (AY498868), and SA7177 (AY498871) were included in the analysis. *Pasteurella multocida* subs. *multocida* was used as an outgroup.

All 15 field isolates of serovar C-1 gave identical (100% similarity) *hagA* gene sequences. All isolates included in the study were most closely related to reference strains 0083 (AF491820), 221 (AF491826), and E-3C (AF491825) of *Av. paragallinarum*, with 96.6% similarity. The isolates included in the study were most distantly related to reference strains HP14 (AF491821), HP60 (AF491818), and Modesto (AF491827) of *Av. paragallinarum*, with 95.8% similarity. The phylogenetic analysis (Figure 2) was obtained with the sequences determined in the current study. Selected available sequences of the 11 reference strains were included in the analysis.

DISCUSSION

Isolates of *Av. paragallinarum* serovar C-1 have emerged in commercial layer hens, first in Ecuador and secondly in Mexico (6,10). The ERIC-PCR technique has been widely used in typing *Av. paragallinarum* isolates, and is regarded as a repeatable and robust technique for genotyping of this bacterium (10,13). In the current study, an identical ERIC-PCR genotype was obtained among Ecuadorian and Mexican serovar C-1 isolates, suggesting a clonal relationship. This clonal relationship was not expected, since genetic variation has been observed among isolates of *Av. paragallinarum* of other serovars in the same country (13).

In the phylogenetic analysis of 16S rRNA gene, all 15 Ecuadorian and Mexican isolates were clustered into a separate genetic lineage (Figure 1). The deletion of TTTTT in positions 181-185 shared by all 15 field isolates was also identified in strains HP105 and

SA7177 (3). Similarly, in the phylogenetic analysis of *hagA* gene, all 15 Ecuadorian and Mexican isolates were clustered into a new genetic lineage (Figure 2).

In conclusion, the genotypic and phylogenetic analysis carried out in this study indicates that the five Ecuadorian and ten Mexican isolates of *Av. paragallinarum* serovar C-1 have a clonal relationship. The phylogenetic and immunogenic relationships of *Av. paragallinarum* serovar C-1 to other serovars around the world will facilitate study of the etiology and spread of this economically important pathogen in the Americas

REFERENCES

1. Altschul, S. F., T. L. Madden, A. A. Schäffer, J. Zhang, Z. Zheng, W. Miller, and D. J. Lipman. Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. *Nucleic Acids Res.* 25:3389-3402. 1997.
2. Blackall, P. J., and E. V. Soriano. Infectious coryza and related bacterial infections. In: *Diseases of Poultry*, 12th ed. Y. M. Saif, A. M. Fadly, J. R. Glisson, L. R. McDougald, L. K. Nolan, and D. E. Swayne, eds. Blackwell Publishing, Ames, IA. pp. 789-803. 2008.
3. Blackall, P. J., H. Christensen, and M. Bisgaard. Unusual growth variants of *Avibacterium paragallinarum*. *Aust. Vet J.* 89:273-275. 2011.

4. Blackall, P. J., H. Christensen, T. Beckenham, L. L. Blackall, and M. Bisgaard. Reclassification of *Pasteurella gallinarum*, [*Haemophilus*] *paragallinarum*, *Pasteurella avium*, and *Pasteurella volantium* as *Avibacterium gallinarum* gen. nov., comb. nov., *Avibacterium paragallinarum* comb. nov., *Avibacterium avium* comb. nov. and *Avibacterium volantium* comb. nov. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 55:353-362. 2005.
5. Blackall, P. J., L. E. Eaves, and D. G. Rogers. Proposal of a new serovar and altered nomenclature for *Haemophilus paragallinarum* in the Kume hemagglutinin scheme. *J. Clin. Microbiol.* 28:1185-1187. 1990.
6. Cabrera, A., V. Morales-Erasto, C. Salgado-Miarnda, P. J. Blackall, and E. Soriano-Vargas. Hemagglutinin serotyping of *Avibacterium paragallinarum* isolates from Ecuador. *Trop. Anim. Health Prod.* 43:549-551. 2011.
7. Hobb, R. I., H.-J. Tseng, J. E. Downes, T. D. Terry, P. J. Blackall, M. Takagi, and M. P. Jennings. Molecular analysis of a haemagglutinin of *Haemophilus paragallinarum*. *Microbiology* 148:2171-2179. 2002.
8. Kumar, S., K. Tamura, and M. Nei. MEGA3: integrated software for molecular evolutionary analysis and sequence alignment. *Brief. Bioinform.* 5:150-163. 2004.

9. Kume, K., A. Sawata, T. Nakai, and M. Matsumoto. Serological classification of *Haemophilus paragallinarum* with a hemagglutinin system. *J. Clin. Microbiol.* 17:958-964. 1983.
10. Morales-Erasto, V., A. García-Sánchez, C. Salgado-Miranda, M. Talavera-Rojas, F. Robles-González, P. J. Blackall, and E. Soriano-Vargas. ERIC-PCR genotyping of emergent serovar C-1 isolates of *Avibacterium paragallinarum* from Mexico. *Avian Dis.* 55:686-688. 2011.
11. Rice, P., I. Longden, and A. Bleasby. EMBOSS: the European Molecular Biology Open Software suite. *Trends Genet.* 16:276-277. 2000.
12. Saitou, N., and M. Nei. The neighbor-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees. *Mo. Biol. Evol.* 4:406-425. 1987.
13. Soriano, V. E., G. Téllez, B. H. Hargis, L. Newberry, C. Salgado-Miranda, and J. C. Vázquez. Typing of *Haemophilus paragallinarum* strains by using enterobacterial repetitive intergenic consensus-based polymerase chain reaction. *Avian Dis.* 48:890-895. 2004.

ACKNOWLEDGEMENTS

This work was funded by the Universidad Autónoma del Estado de México, project 3102/2011. Alejandra García-Sánchez was supported by Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT), México. We gratefully acknowledge Dr. Arturo Cabrera, LAVETEC CIA LTDA., Ecuador, for providing Ecuadorian isolates of *Avibacterium paragallinarum*.

Table 1. Origin and ERIC genotype of *Avibacterium paragallinarum* strains included in the study.

| Strain | Year of isolation | Origin | Serovar | Reference of strains | ERIC-PCR genotype |
|------------|-------------------|--------------------|---------|----------------------|-------------------|
| H-18 | 1978 | Japan | C-1 | 8 | I |
| Modesto | 1975 | USA | C-2 | " | II |
| SA-3 | Before 1983 | South Africa | C-3 | " | III |
| HP60 | Before 1990 | Australia | C-4 | 5 | IV |
| ESV-129 | 2008 | Jalisco, Mexico | C-1 | 10 | V |
| ESV-135 | 2008 | " | C-1 | " | V |
| ESV-218 | 2010 | " | C-1 | This study | V |
| ESV-227 | 2011 | " | C-1 | " | V |
| ESV-231 | 2011 | " | C-1 | " | V |
| ESV-241 | 2011 | Puebla, Mexico | C-1 | " | V |
| ESV-242 | 2011 | " | C-1 | " | V |
| ESV-243 | 2011 | Jalisco, Mexico | C-1 | " | V |
| ESV-246 | 2011 | Puebla, Mexico | C-1 | " | V |
| ESV-249 | 2011 | Jalisco, Mexico | C-1 | " | V |
| Lavetec 03 | 2000 | Pichincha, Ecuador | C-1 | 6 | V |
| Lavetec 07 | 2005 | Cotopaxi, Ecuador | C-1 | " | V |
| Lavetec 27 | 2002 | Pichincha, Ecuador | C-1 | " | V |
| Lavetec 31 | 2004 | " | C-1 | " | V |
| Lavetec 55 | 2007 | " | C-1 | " | V |

Figure 1. Phylogenetic relationship of *Avibacterium paragallinarum* reference strains and isolates included in this study based on maximum likelihood analysis of 16S rRNA gene sequences. The numbers at nodes indicate bootstrap values obtained from 1000 resamplings. The scale bar represents sequence variation.

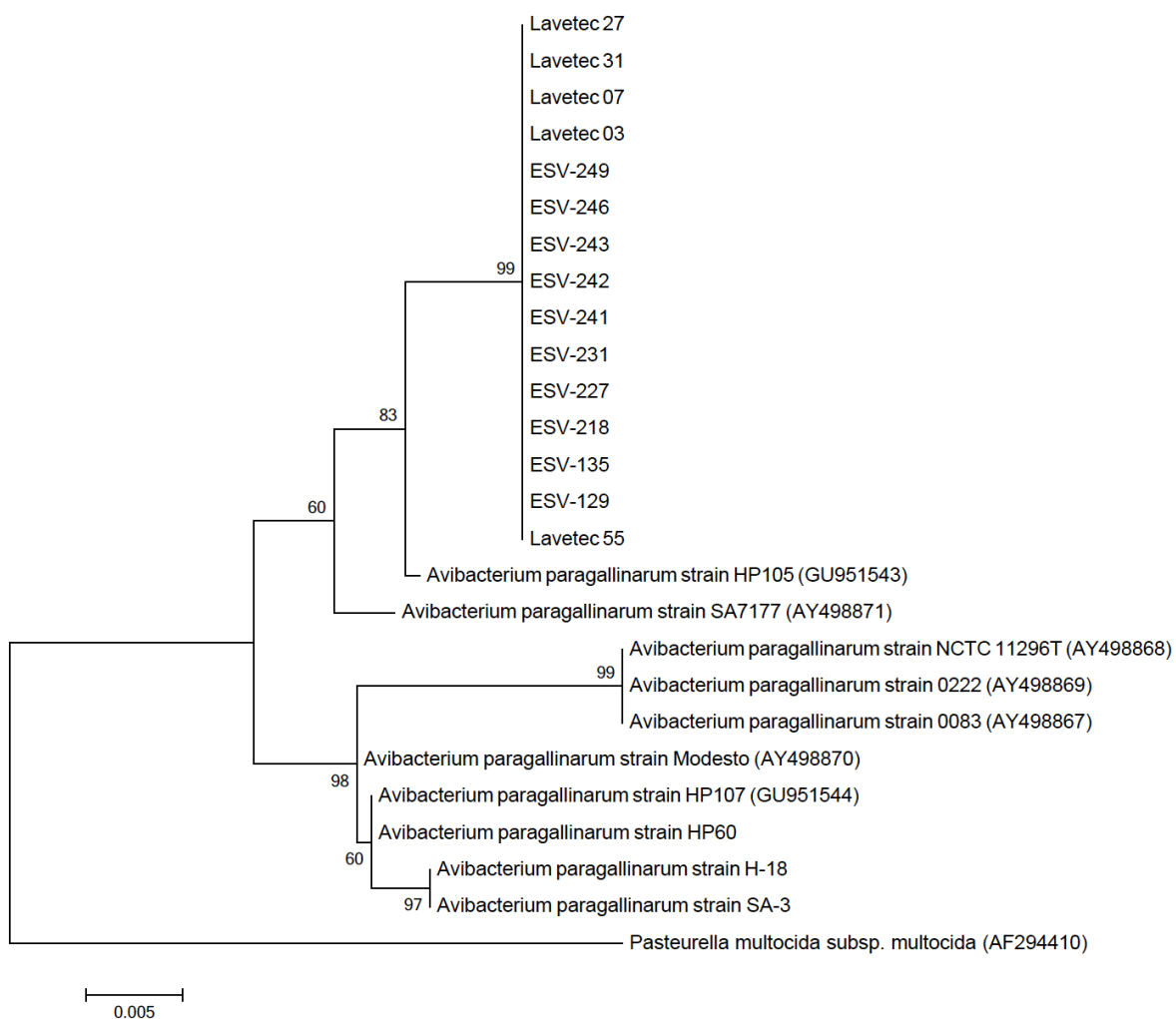
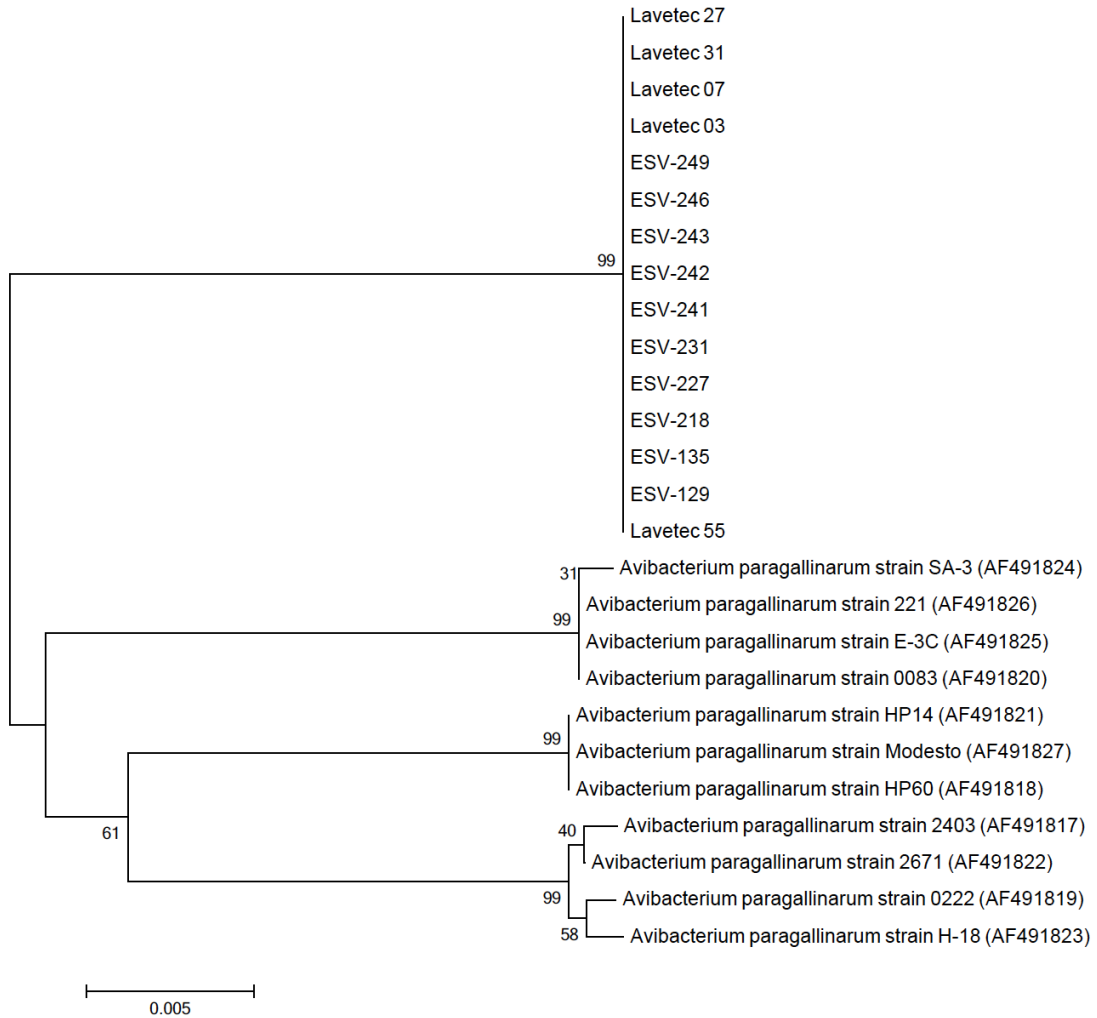
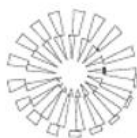


Figure 2. Phylogenetic relationship of *Avibacterium paragallinarum* reference strains and isolates included in this study based on neighbor-joining analysis of *hagA* gene sequences. The numbers at nodes indicate bootstrap value obtained from 1000 resamplings. The scale bar represents sequence variation.





Aislamiento e identificación de *Avibacterium paragallinarum* NAD independiente (serovariedad C-1) en gallinas de reemplazo con coriza infecciosa

Isolation and identification of NAD-independent *Avibacterium paragallinarum* (serovar C-1) from growing layer hens with infectious coryza

Edgardo Soriano-Vargas* Jesús Cabriales-Jiménez** Josué Sánchez-Morales**
Vladimir Morales-Erasto** Francisco Robles-González** Alejandra García-Sánchez*

Abstract

The isolation of V-factor (NAD)-independent, serovar C-1 of *Avibacterium paragallinarum* from growing layer hens with infectious coryza, is reported for the first time. *Av. paragallinarum* serovar C-1 isolates were PCR confirmed and shared a unique genetic profile. Isolation of *Av. paragallinarum* NAD-independent biovar, serotyping and genotyping of isolates at the avian diagnostic laboratories are discussed.

Key words: AVIBACTERIUM PARAGALLINARUM, SEROVAR C-1, V-FACTOR, MEXICO.

Resumen

Se informa por primera ocasión el aislamiento de *Avibacterium paragallinarum*, serovariedad C-1, independiente del factor V de crecimiento (NAD), a partir de gallinas de reemplazo con coriza infecciosa. Los aislamientos de *Av. paragallinarum* serovariedad C-1 incluidos en el estudio fueron confirmados por PCR y compartieron un perfil genético único. Se discute considerar en los laboratorios de diagnóstico aviar el aislamiento de *Av. paragallinarum* de la biovariedad independiente de NAD, así como la necesidad de serotipificación y tipificación genética de los aislamientos.

Palabras clave: AVIBACTERIUM PARAGALLINARUM, SEROVARIEDAD C-1, FACTOR V, MÉXICO.

Recibido el 26 de marzo de 2012 y aceptado el 17 de septiembre de 2012.

*Centro de Investigación y Estudios Avanzados en Salud Animal, Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia, Universidad Autónoma del Estado de México, Carretera Panamericana Toluca-Atlacomulco, Km 15.5, Toluca, 50200, Estado de México, México.

**Boehringer Ingelheim Vetmedica, S.A. de C.V., Calle 30, núm. 2614, Guadalajara, 44940, Jalisco, México.

Responsable de correspondencia: Edgardo Soriano-Vargas, Tel./fax: (722) 2965555, correo electrónico: soriano@uaemex.mx

Introduction

The bacterium *Avibacterium paragallinarum* is the etiologic agent of infectious coryza, an upper respiratory disease of chickens. The disease is characterized by sneezing, nasal discharge and swelling of infraorbital sinuses. Economic impact of infectious coryza is due to egg drop production, increased culling rate and poor growth performance of chickens.¹

Most of the isolates of *Av. paragallinarum* agglutinate chicken red blood cells and the antigens are known as hemagglutinins. Currently, nine serovars distributed into three serogroups are recognized by using a hemagglutination-inhibition test as follows: A-1, A-2, A-3, A-4; B-1; C-1, C-2, C-3, and C-4.¹ Some serovars are worldwide distributed, while others are restricted to some geographic areas. For example, serovar A-3 has been identified in isolates from Brazil and Ecuador,² and serovars A-4 and C-4 have been identified only in isolates from Australia.³ Serovar C-1 has only been identified in isolates from Japan.⁴ However, recent serotyping studies showed serovar C-1 in isolates from Ecuador² and Mexico.⁵ Up to date, serovars A-1, A-2, B-1, C-1, and C-2 have been identified in Mexico,^{5,6} being the country with the greater number of hemagglutinin serovars of this bacterium.

In most bacterial species, synthesis of nicotinamide adenine dinucleotide (NAD; V-factor) occurs from quinolinic acid or a pathway that involves nicotinic acid.⁷ Some members of the bacterial Pasteurellaceae family, which *Av. paragallinarum* belongs, lack either of these NAD biosynthesis pathways and must obtain it directly from the environment or from precursors. NAD-supplemented culture media or a *Staphylococcus epidermidis* nurse colony as precursor are used for culturing *Av. paragallinarum*.³ However, NAD-independent *Av. paragallinarum* isolates have been identified since 1989.⁸ Based on NAD requirement, two different biovars are currently recognized in this bacterium: 1) NAD-dependent, and 2) NAD-independent isolates. To date, NAD-independent *Av. paragallinarum* isolates have been identified in South Africa^{8,9} and Mexico.¹⁰ Serovars A-1 and C-3 have been identified among the South African NAD-independent isolates,¹¹ while serovars B-1 and C-2 among NAD-independent isolates from Mexico.¹⁰

In the present work, the isolation, identification, and genotypic characterization of a NAD-independent *Av. paragallinarum* isolate, serovar C-1, obtained from growing layer hens with infectious coryza are reported.

In August 2011, an infectious coryza outbreak involving a house with 12500, 12-wk-old, growing layer hens occurred in a farm located at Los Altos, Jalisco, Mexico. The affected chicken house was under natu-

Introducción

La bacteria *Avibacterium paragallinarum* es el agente causal de la coriza infecciosa, una enfermedad del tracto respiratorio superior de pollos y gallinas. La enfermedad se caracteriza por estornudo, descarga nasal e inflamación de senos infraorbitarios. El impacto económico de la coriza infecciosa se refleja en la reducción en la producción de huevo, incremento del número de aves desechadas y retraso del crecimiento.¹

La mayoría de los aislamientos de *Av. paragallinarum* aglutinan eritrocitos de pollo y los antígenos son conocidos como hemoagglutininas. Empleando la prueba de inhibición de la hemoagglutinación, actualmente se reconocen tres serogrupos con nueve serovariedades distribuidas de la siguiente manera: A-1, A-2, A-3, A-4; B-1; C-1, C-2, C-3 y C-4.¹ Algunas serovariedades tienen una distribución amplia en el mundo, mientras que otras se encuentran limitadas a ciertas áreas geográficas. Por ejemplo, la serovariedad A-3 se ha identificado en aislamientos de Brasil y Ecuador,² y las serovariedades A-4 y C-4 se han identificado únicamente en aislamientos de Australia.³ La serovariedad C-1 se había identificado únicamente en aislamientos de Japón.⁴ Sin embargo, estudios recientes de serotipificación de *Av. paragallinarum* revelaron la existencia de la serovariedad C-1 en aislamientos de Ecuador² y México.⁵ A la fecha, en México se han identificado las serovariedades A-1, A-2, B-1, C-1 y C-2,^{5,6} siendo el país con mayor número de serovariedades de hemoagglutina de esta bacteria.

En muchas especies bacterianas la síntesis de dinucleótido de adenina nicotinamida (NAD, por sus siglas en inglés, *nicotinamide adenine dinucleotide*, factor V) ocurre inicialmente a partir del ácido quinolínico o por la vía del ácido nicotínico.⁷ Algunos miembros de la familia Pasteurellaceae, familia bacteriana a la cual pertenece *Av. paragallinarum*, no tienen estas vías de biosíntesis de NAD y deben obtenerlo directamente del medio o a partir de precursores. Para el cultivo de *Av. paragallinarum*, los medios son complementados con NAD o se emplea una colonia nodriza de *Staphylococcus epidermidis* como precursor.³ Sin embargo, desde 1989 se han identificado aislamientos de *Av. paragallinarum* independientes de NAD⁸ y con base en el requerimiento de este factor de crecimiento, actualmente se reconocen dos biovariedades diferentes en esta bacteria: 1) dependientes de NAD y 2) independientes de NAD.¹ A la fecha, se han identificado aislamientos de la biovariedad independiente de NAD únicamente en Sudáfrica^{8,9} y México.¹⁰ Con respecto a las serovariedades de estos aislamientos, se han identificado A-1 y C-3 en los aislamientos NAD independientes de Sudá-

ral climate conditions according to the conventional production system carried out at the area. During a week, 20% morbidity and an increased mortality rate (0.1%) was recorded. Clinical signs included sneezing, cough, lacrimation, periophthalmitis, and swelling of infraorbital sinuses. For bacteriological diagnosis, a total of ten, swollen-infraorbital sinuses, chicken heads were submitted to the Centro de Investigación y Estudios Avanzados en Salud Animal. The vaccination program included one-dose of an infectious coryza bacterin administered at 5-wk-old chickens. This program also included vaccines against the following agents: Gumboro disease virus, Newcastle disease virus, and infectious bronchitis virus. Negative results for *Mycoplasma* spp and influenza virus in serological tests were obtained. In the bacteriology study, samples from infraorbital sinuses were streaked onto 10% sheep blood agar plate with *Staphylococcus epidermidis* as a feeder colony. The plates were incubated overnight into a candle jar at 37°C. Bacterial growth was observed in all plated samples and two colony types were recorded: 1) typical tiny, translucent, dewdrop, nurse colony-satellitic growth *Av. paragallinarum* colonies; and 2) grayish, up to 2-mm diameter, no satellitic growth colonies (Figure 1a and 1b, respectively). Both colony types were Gram-negative, coccobacillar, and filamentous bacteria. Also, both colony types were oxidase-positive and catalase-negative. One separated colony from the feeder colony was incubated overnight at 37°C on a medium without blood, feeder colony, or NAD. Tiny, grayish, coalescent colonies were observed (Figure 2). Both bacterial culture types were PCR confirmed as previously described (Figure 3).¹² Briefly, primer used were N1 (5'-TGAGGGTAGTCTTGCACGCGAAT-3') and R1 (CAAGGTATCGATCGTCTCTACT-3'). The reaction mixture (50 µl) contained 0.4 µM of each primer, 45 µl of AccuPrime Supermix I (1.25 U Taq polymerase)* and 2 µl of extracted DNA. The PCR protocol was initiated with 30 seconds denaturation period at 98°C, followed by 25 cycles of denaturation (1 minute at 94°C), annealing (1 minute at 72°C), and enzymatic chain extension (2 minutes at 94°C), with a final extension at 72°C for 10 minutes. Also, antigens for hemagglutinin serotyping were produced as previously reported.^{5,9} Both *Av. paragallinarum* isolates were recognized as serogroup C, serovar C-1. Furthermore, REP-PCR¹³ and ERIC-PCR¹⁴ genotype profiles of isolates were performed as elsewhere described. Briefly, primers REP 1R (5'-NNNCGNCGNCATCNGGC-3') and REP 2 (5'-NCGNCTTATCNGGCCTAC-3') were used for REP-PCR. The reaction mixture (25 µl) contained 5 µl of 10X buffered solution, 1.5 mM of MgCl₂, 0.2 mM of each deoxynucleoside triphosphate, 0.5 U Taq polymerase* and 2 µl of extracted DNA. The PCR protocol was initiated with 5 minutes denaturation

frica,¹¹ mientras que en los aislamientos de México se han identificado las serovariedades B-1 y C-2.¹⁰

En este trabajo se informa el aislamiento, identificación y características genotípicas de *Av. paragallinarum* independiente de NAD, serovariedad C-1, obtenido de gallinas de reemplazo con coriza infecciosa.

En agosto de 2011, en una granja localizada en Los Altos, Jalisco, México, se presentó un brote de coriza infecciosa en una caseta de 12,500 gallinas de postura de 12 semanas de edad. Dicha caseta era de ambiente natural bajo el sistema de producción convencional en la zona. Se registró hasta 20% de morbilidad e incremento de la mortalidad (0.1%) en el lapso de una semana. Los signos clínicos incluyeron estornudo, tos, lagrimeo, perioftalmítis e inflamación de senos infraorbitarios. Un total de 10 cabezas de gallina con senos infraorbitarios inflamados fueron remitidas al Centro de Investigación y Estudios Avanzados en Salud Animal para diagnóstico bacteriológico. El calendario de inmunización implementado en la granja incluía una bacterina contra la coriza infecciosa administrada a las 5 semanas de edad, así como vacunas contra la enfermedad de Gumboro, enfermedad de Newcastle y bronquitis infecciosa. Los estudios serológicos fueron negativos para *Mycoplasma* spp e influenza aviar. En el estudio bacteriológico se sembraron muestras de senos infraorbitarios en placas de base de agar con 10% de sangre de ovino con *S. epidermidis* como colonia nodriza, cultivadas a 37°C en un frasco con vela durante toda la noche. Se obtuvo crecimiento bacteriano de todas las muestras y se observaron dos tipos de colonias: 1) colonias típicas de *Av. paragallinarum*, pequeñas, translúcidas, en forma de gotas de rocío, satelitales a la colonia nodriza; y 2) colonias grisáceas, de hasta 2 mm de diámetro y relativamente alejadas de la colonia nodriza (Figuras 1a y 1b, respectivamente). La tinción de Gram reveló bacilos negativos, coccobacilares y filamentosos en los dos tipos de colonias. Ambos tipos de colonias fueron oxidasa positivo y catalasa negativo. Una colonia grande alejada de la nodriza se cultivó, toda la noche, a 37°C en un medio sin sangre, sin colonia nodriza y sin NAD. Las colonias se observaron grisáceas, pequeñas y coalescentes (Figura 2). Los dos tipos de cultivos fueron confirmados por medio de un PCR específico de *Av. paragallinarum* de acuerdo con lo descrito previamente (Figura 3).¹² Brevemente, se emplearon los iniciadores N1 (5'-TGAGGGTAGTCTTGCACGCGAAT-3') y R1 (CAAGGTATCGATCGTCTCTACT-3'). La reacción (50 µl) incluyó 0.4 µM de cada iniciador, 45 µl de AccuPrime Supermix I (1.25 U Taq ADN polimerasa* y 2 µl de muestra de ADN. El protocolo de PCR inició con 30 segundos de desnaturalización a 98°C, seguido de 25 ciclos de desnaturalización (1 minuto a 94°C), ali-

*Invitrogen, Carlsbad, CA, Estados Unidos de América.

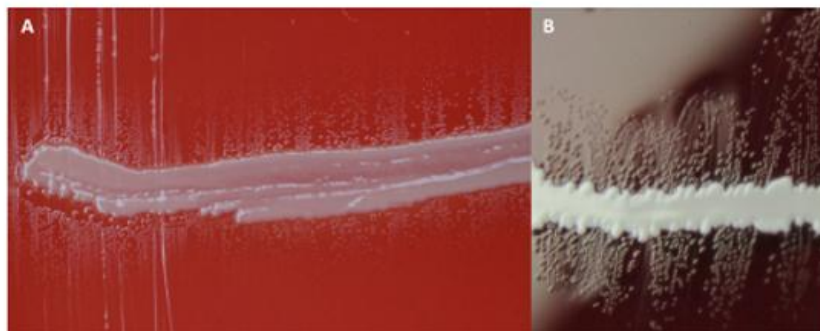


FIGURA 1. Cultivos de *Avibacterium paragallinarum* en base de agar con 10% de sangre de ovino con colonia nodriza de *Staphylococcus epidermidis*. Colonias dependientes de NAD (a) o independientes de NAD (b).

FIGURE 1. *Avibacterium paragallinarum* cultures on 10% sheep blood agar plates with a *Staphylococcus epidermidis* nurse colony. NAD-dependent colonies (a) or NAD-independent colonies (b).

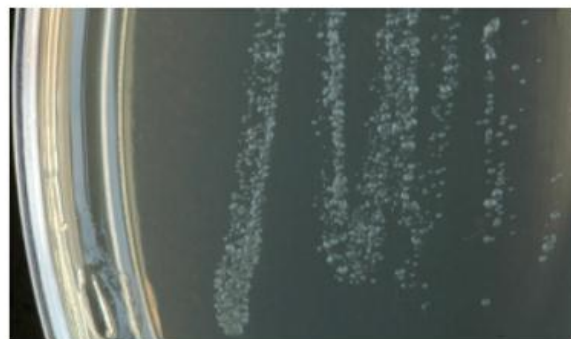


FIGURA 2. *Avibacterium paragallinarum* independiente de NAD. Cultivo en placa de agar Balcrace sin sangre, colonia nodriza o NAD.

FIGURE 2. NAD-independent *Avibacterium paragallinarum*. Culture on Balcrace agar plates without blood, nurse colony or NAD.

period at 94°C, followed by 30 cycles of denaturation (1 minute at 94°C), annealing (1 minute at 45°C), and enzymatic chain extension (3 minutes at 72°C), with a final extension at 72°C for 10 minutes. Primers ERIC-1R (5'-ATGTAAGCTCCTGGGGATTCAC-3') and ERIC-2 (5'-AAGTAAGTGACTGGGGTGAGCG-3') were used for ERIC-PCR. The reaction mixture (50 µl) contained 10 mM of TrisHCl (pH 8.4), 50 mM of KCl, 3 mM of MgCl₂, 0.2 mM of each deoxynucleoside triphosphate, 0.5 U *Taq* DNA polymerase* and 4 µl of DNA sample. The PCR was initiated with a 5 minutes denaturation period at 94°C, followed by 35 cycles of denaturation (1 minute at 94°C), annealing (1 minute at 52°C, and enzymatic chain extension (6 minutes at 94°C) with a final extension at 74°C for 6 minutes. Two NAD-dependent and one NAD-independent isolates obtained in the present study and two previously typed NAD-dependent, serovar C-1 isolates (ESV-129 y ESV-135),⁵ shared a unique genetic pattern (Figure 4).

Results of the present work, confirm infectious coryza outbreaks by *Av. Paragallinarum* serovar C-1 in Mexico. Furthermore, this work appears to be first report of isolation and identification of *Av. Paragallinarum* serovar C-1. As similar as some Pasteurellaceae members, in the case of the South African iso-

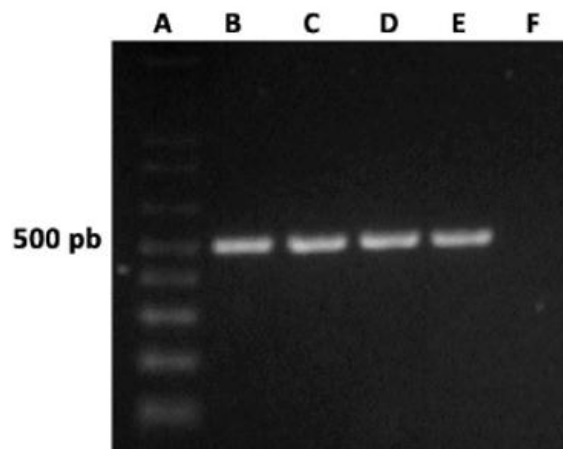


FIGURA 3. Productos de PCR específico (aproximadamente 500 pb) de *Avibacterium paragallinarum* incluidos en el estudio. A) marcador de peso molecular (1 kb); B) *Avibacterium paragallinarum* cepa de referencia 0083 (serovariedad A-1); C) y D) aislamientos NAD dependientes (serovariedad C-1); E) aislamiento NAD independiente (serovariedad C-1); y F) testigo negativo.

FIGURE 3. Species-specific-PCR products (500 bp approximately) of *Avibacterium paragallinarum* isolates included in the study. A) 1-kb ladder; B) *Avibacterium paragallinarum* 0083 (serovar A-1) reference strain; C) and D) NAD-dependent (serovar C-1) isolates; E) NAD-independent (serovar C-1) isolate; and F) negative control.

neación (1 minuto a 72°C) y extensión (2 minutos a 94°C) con una extensión final a 72°C por 10 minutos. Asimismo, se produjeron antígenos hemoaglutinantes para serotipificación de acuerdo con lo señalado previamente.^{5,6} Ambos aislamientos fueron identificados en el serogrupo C, serovariedad C-1 de *Av. paragallinarum*. Asimismo, se determinó el perfil genético de los cultivos mediante los protocolos REP-PCR¹⁵ y ERIC-PCR¹⁴ de acuerdo con lo descrito. Brevemente, para el protocolo REP-PCR se emplearon los iniciadores REP 1R (5'-NNNNCGNCGNCATCNGGC-3') y REP 2 (5'-NCGNCITATCNGGCCTAC-3'). La reacción (25 µl) incluyó 5 µl de solución amortiguadora 10X, 1.5 mM de MgCl₂, 0.2 mM de cada dinucleótido trifosfatado, 0.5 U *Taq* ADN polimerasa* y 2 µl de

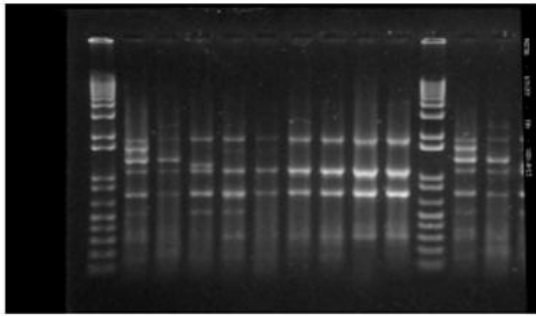


FIGURA 4. Perfiles REP-PCR y ERIC-PCR de *Avibacterium paragallinarum* incluidos en el estudio. A) marcador de peso molecular (1 kb); B) cepa de referencia 0083 (serovariedad A-1); C) cepa de referencia Spross (serovariedad B-1); D) cepa de referencia Modesto (serovariedad C-2); E) cepa de referencia H-18 (serovariedad C-1); F) y G) aislamientos NAD dependientes (serovariedad C-1); H) aislamiento NAD independiente (serovariedad C-1); I) y J) aislamientos ESV-129 y ESV-135, NAD dependientes (serovariedad C-1).

FIGURE 4. REP-PCR and ERIC-PCR patterns of *Avibacterium paragallinarum* isolates included in the study. A) 1-kb ladder; B) 0083 (serovar A-1) reference strain; C) Spross (serovar B-1) reference strain; D) Modesto (serovar C-2) reference strain; E) H-18 (serovar C-1) reference strain; F) and G) NAD-dependent (serovar C-1) isolates; H) NAD-independent (serovar C-1) isolate; I) and J) NAD-dependent ESV-129 and ESV-135 (serovar C-1) isolates.

lates, NAD-independence was linked to a plasmid.¹⁵ It is unknown if the Mexican, NAD-independent isolates have plasmids. A clonal relationship between the *Av. paragallinarum* NAD-independent isolate and the typical serovar C-1 strains identified in Mexico is suggested by the obtained genetic pattern. It is very possible that the NAD-independent isolate obtained the NAD-independence-encoding plasmid, and that plasmid has no ERIC sequences. Based on pathogenicity studies of South African isolates,¹¹ it is regarded that NAD-independent variants are less virulent than typical NAD-dependent strains. Pathogenic and immunogenic properties of this NAD-independent serovar C-1 isolate of *Av. paragallinarum* identified are unknown. Those properties may explain presence of this bacterium in immunized chickens suffering infectious coryza.

In conclusion, isolation of NAD-independent *Av. paragallinarum* from infectious coryza outbreaks need to be regarded by avian diagnostic laboratories. Hemagglutinin serovar of both NAD, -dependent and -independent isolates, from infectious coryza outbreaks need to be known. Furthermore, genotyping of isolates contributes to infectious coryza epidemiology.

Acknowledgements

Dr. Francisco Robles-Gonzalez and Dr. Jesus Cabriales-Jimenez are greatly acknowledged by their technical assistance. Dr. Pat Blackall, University of Queensland,

muestra de ADN. El protocolo de PCR inició con 5 minutos de desnaturalización a 94°C, seguido de 30 ciclos de desnaturalización (1 minuto a 94°C), alineación (1 minuto a 45°C) y extensión (3 minutos a 72°C) con una extensión final a 72°C por 10 minutos. Para el protocolo ERIC-PCR se emplearon los iniciadores ERIC-1R (5'-ATGTAAGCTCCTGGGGATTAC-3') y ERIC-2 (5'-AAGTAAGTACTGGGGTGAGCG-3'). La reacción (50 µl) incluyó 10 mM de TrisHCl (pH 8.4), 50 mM de KCl, 3 mM de MgCl₂, 0.2 mM de cada dinucleótido trifosfato, 0.5 U *Taq* DNA polimerasa* y 4 µl de muestra de ADN. El protocolo de PCR inició con 5 minutos de desnaturalización a 94°C, seguido de 35 ciclos de desnaturalización (1 minuto a 94°C), alineación (1 minuto a 52°C) y extensión (6 minutos a 74°C) con una extensión final a 72°C por 6 minutos. Dos aislamientos dependientes de NAD y un aislamiento independiente de NAD obtenidos de las muestras incluidas en este estudio, así como dos aislamientos dependientes de NAD, serovariedad C-1, previamente tipificados (ESV-129 y ESV-135),⁵ compartieron un perfil genético único (Figura 4).

Los resultados del presente trabajo confirman la presencia de la serovariedad C-1 de *Av. paragallinarum* en brotes de coriza infecciosa en México. Asimismo, este trabajo parece ser el primer informe del aislamiento e identificación de *Av. paragallinarum* independiente de NAD de la serovariedad C-1. Como en otros miembros de la familia Pasteurellaceae, en el caso de los aislamientos de Sudáfrica, la independencia de NAD estuvo asociada con un plásmido.¹⁵ Se desconoce si los aislamientos NAD independientes de México contienen plásmidos. El perfil genético obtenido sugiere una relación clonal entre el aislamiento independiente de NAD y las cepas típicas de *Av. paragallinarum* de la serovariedad C-1 identificadas en México. Es muy posible que el aislamiento NAD independiente haya adquirido el plásmido asociado con la independencia y que éste no incluya secuencias ERIC. Con base en estudios de patogenicidad de aislamientos de Sudáfrica,¹¹ se considera que las variedades independientes de NAD son menos virulentas que las variedades típicas dependientes de NAD. Se desconocen las propiedades patogénicas e inmunogénicas de esta variedad independiente de NAD, serovariedad C-1 de *Av. paragallinarum* identificada, que podrían explicar la presencia de esta variedad en aves inmunizadas y con coriza infecciosa.

En conclusión, en los laboratorios de diagnóstico aviar es necesario considerar las biovariedades NAD independientes de *Av. paragallinarum* en casos de coriza infecciosa. Es necesario conocer la serovariedad de hemoaglutinina de los aislamientos, tanto dependientes como independientes de NAD, implicados en los brotes de coriza infecciosa. Asimismo, la tipificación

*Invitrogen, Carlsbad, CA, Estados Unidos de América.

Australia, is greatly acknowledged by providing *Avibacterium paragallinarum* reference strains. This work was funded by Universidad Autónoma del Estado de México, project UAEM 3102/2011.

Referencias

1. BLACKALL PJ, SORIANO EV. Infectious coryza and related bacterial infections. In: SAIF YM, FADLY AM, GLISSON JR, MCDUGALD LR, NOLAN LK, SWAYNE DE, editors. Diseases of Poultry. 12th ed. Ames:Blackwell Publishing, 2008:789-803.
2. CABRERA A, MORALES-ERASTO V, SALGADO-MIRANDA C, BLACKALL PJ, SORIANO-VARGAS E. Hemagglutinin serotyping of *Avibacterium paragallinarum* isolates from Ecuador. Trop Anim Health Prod 2011; 43:549-551.
3. BLACKALL PJ, EAVES LE, ROGERS DG. Proposal of a new serovar and altered nomenclature for *Haemophilus paragallinarum* in the Kume hemagglutinin scheme. J Clin Microbiol 1990; 28:1185-1187.
4. KUME K, SAWATA A, NAKAI T, MATSUMOTO M. Serological classification of *Haemophilus paragallinarum* with a hemagglutinin system. J Clin Microbiol 1983; 17:958-964.
5. MORALES-ERASTO V, GARCIA-SANCHEZ A, SALGADO-MIRANDA C, TALAVERA-ROJAS M, ROBLES-GONZALEZ F, BLACKALL PJ *et al.* ERIC-PCR genotyping of emergent serovar C-1 isolates of *Avibacterium paragallinarum* from Mexico. Avian Dis 2011; 55:686-688.
6. SORIANO VE, BLACKALL PJ, DABO SM, TELLEZ G, GARCIA-DELGADO GA, FERNANDEZ RP. Serotyping of *Haemophilus paragallinarum* isolates from Mexico by the Kume hemagglutinin scheme. Avian Dis 2001; 45:680-683.
7. FOSTER JW, MOAT AG. Nicotinamide adenine dinucleotide biosynthesis and pyridine nucleotide cycle metabolism in microbial systems. Microbiol Rev 1980; 44:83-105.
8. HORNER RF, 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.

genética de estos aislamientos contribuye a la epidemiología de los brotes de coriza infecciosa.

Agradecimientos

Se agradece al Dr. Francisco Robles-González y al Dr. Jesús Cabriales-Jiménez por su asistencia técnica en el desarrollo de este trabajo, al Dr. Pat Blackall de la *University of Queensland*, Australia, por la donación de las cepas de referencia de *Avibacterium paragallinarum*, y a la Universidad Autónoma del Estado de México, proyecto UAEM 3102/2011, por el financiamiento para la realización de este trabajo de investigación.

9. MOUAHID M, BISGAARD M, MORLEYAJ, MUTTERS R, MANNHEIM W. Occurrence of V-factor (NAD) independent strains of *Haemophilus paragallinarum*. Vet Microbiol 1992; 31:363-368.
10. GARCIA AJ, ANGULO E, BLACKALL PJ, ORTIZ AM. The presence of nicotinamide adenine dinucleotide-independent *Haemophilus paragallinarum* in Mexico. Avian Dis 2004; 48:425-429.
11. 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.
12. 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.
13. SAXENA MK, SINGH VP, KUMAR AA, CHAUDHURI P, SINGH VP, SHIVACHANDRA SB *et al.* REP-PCR analysis of *Pasteurella multocida* isolates from wild and domestic animals in India. Vet Res Commun 2006; 30:851-861.
14. SORIANO VE, TELLEZ G, HARGIS BM, NEWBERRY L, SALGADO-MIRANDA C, VAZQUEZ JC. Typing of *Haemophilus paragallinarum* strains by using enterobacterial repetitive intergenic consensus-based polymerase chain reaction. Avian Dis 2004; 48:890-895.
15. 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.

C) Genotipificación mediante ERIC-PCR: Se analizó el genotipo de los aislamientos serovariedad C-1 de Ecuador y México, así como cepas de referencia del serogrupo C (Cuadro 3). Los aislamientos mostraron un mismo patrón ERIC (Figura 8).

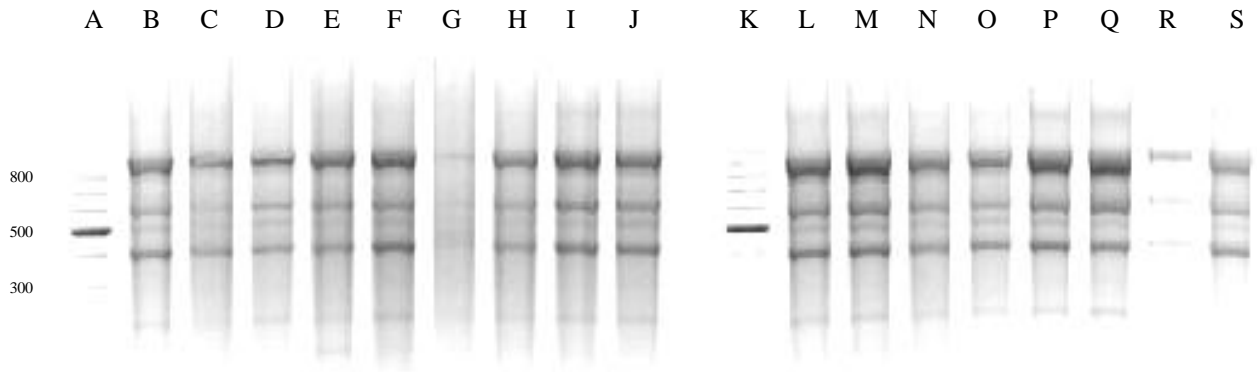


Figura 8. Genotipos ERIC-PCR de los aislamientos de *Avibacterium paragallinarum* serovariedad C-1 incluidos en el estudio. A, marcador de peso molecular de 1kb; B, ESV-109; C, ESV-129; D, ESV-218; E, ESV-227; F, ESV-231; G, ESV-241; H, ESV-242; I, ESV-243; J, ESV-246; K, marcador de peso molecular de 1kb; L, ESV-247; M, ESV-249; N, Lavetec 55; O, Lavetec 27; P, Lavetec 31; Q, Lavetec 07; R, Lavetec 03; S, ESV-135.

También se incluyeron las cuatro cepas de referencia del serogrupo C, H-18 (serovariedad C-1), Modesto (serovariedad C-2), SA-3 (serovariedad C-3), HP60 (Serovariedad C-4). Cada una mostró un patrón ERIC diferente (Cuadro 4).

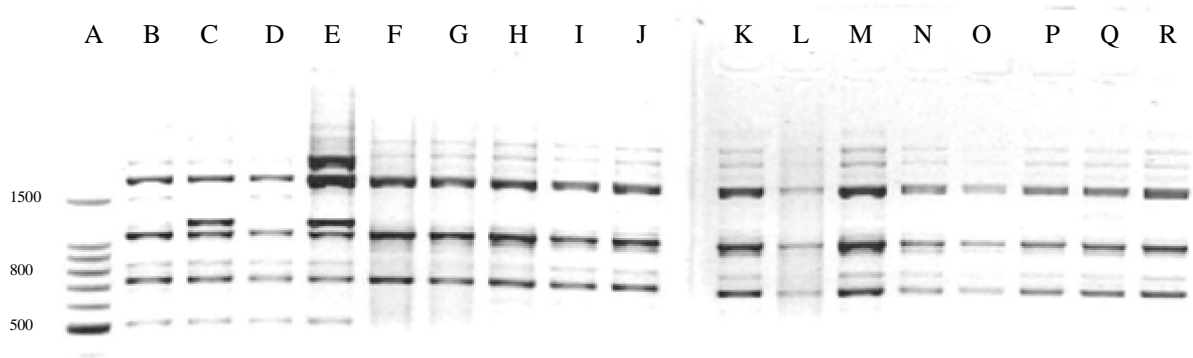


Figura 9. Genotipos ERIC-PCR de cepas de referencia y aislamientos de *Avibacterium paragallinarum* serovariedad C-1 incluidos en el estudio. A, marcador de peso molecular de 1kb; B, H-18 (serovariedad C-1); C, Modesto (Serovariedad C-2); D, SA-3 (Serovariedad C-3); E, HP60 serovariedad C-4; F, ESV-109; G, ESV-129; H, ESV-135; I, Lavetec 55; J, Lavetec 27; K, ESV-218; L, ESV-227; M, ESV-231; N, ESV-241; O, ESV-242; P, Lavetec 31; Q, Lavetec 07; R, Lavetec 03.

Cuadro 4. Genotipos de los aislamientos y cepas de referencia de *A. paragallinarum* incluidos en el análisis de ERIC-PCR.

| Aislamiento | Año de aislamiento | Origen | Serovariedad | Genotipo |
|--------------------|---------------------------|--------------------|---------------------|-----------------|
| H-18 | 1978 | Japón | C-1 | I |
| Modesto | 1975 | E.U.A | C-2 | II |
| SA-3 | Antes de 1983 | Sudáfrica | C-3 | III |
| HP60 | Antes de 1990 | Australia | C-4 | IV |
| ESV-109 | 2008 | Puebla, Mexico | C-1 | V |
| ESV-129 | 2008 | Jalisco, Mexico | C-1 | V |
| ESV -135 | 2008 | Jalisco, Mexico | C-1 | V |
| ESV-218 | 2010 | Jalisco, Mexico | C-1 | V |
| ESV-227 | 2011 | Jalisco, Mexico | C-1 | V |
| ESV-231 | 2011 | Jalisco, Mexico | C-1 | V |
| ESV-241 | 2011 | Puebla, Mexico | C-1 | V |
| ESV-242 | 2010 | Puebla, Mexico | C-1 | V |
| ESV-243 | 2011 | Jalisco, Mexico | C-1 | V |
| ESV-246 | 2010 | Puebla, Mexico | C-1 | V |
| ESV-247 | 2011 | Jalisco, Mexico | C-1 | V |
| ESV-249 | 2011 | Jalisco, Mexico | C-1 | V |
| Lavetec 03 | 2005 | Ecuador, Cotopaxi | C-1 | V |
| Lavetec 07 | 2000 | Ecuador, Pichincha | C-1 | V |
| Lavetec 27 | 2002 | Ecuador, Pichincha | C-1 | V |
| Lavetec 31 | 2004 | Ecuador, Pichincha | C-1 | V |
| Lavetec 55 | 2007 | Ecuador, Pichincha | C-1 | V |

El aislamiento NAD-independiente serovariedad C-1 mostró un patrón ERIC idéntico al de aislamientos C-1 de la variante NAD-dependiente (Figura 10). Los aislamientos ESV-129 y ESV-135 previamente genotificados por Morales-Erasto *et al.* (2011), mostraron el mismo patrón ERIC previamente registrado. Las cepas de referencia H-18 y Modesto mostraron un patrón ERIC diferente, también diferente a los aislamientos incluidos en el estudio (Figura 10).

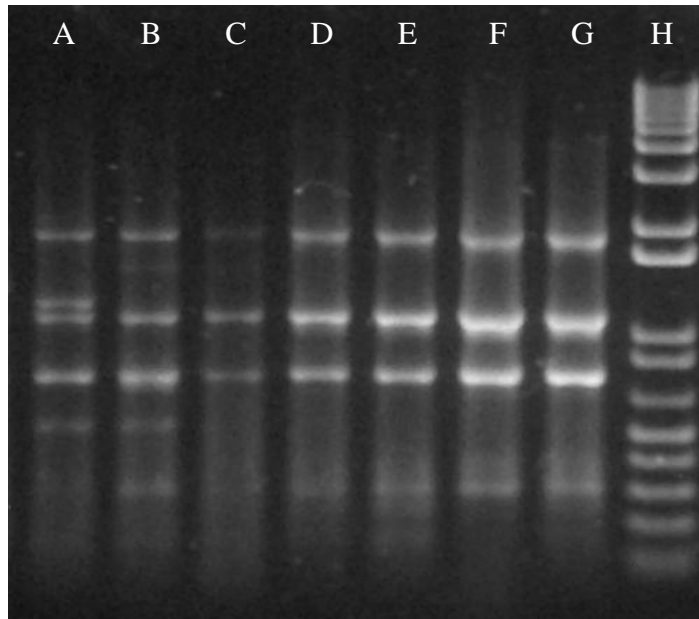


Figura 10. Genotipo de ERIC-PCR del aislamiento NAD-independiente de *Avibacterium paragallinarum* de la serovariedad C-1 en relación a la variante dependiente de la misma serovariedad. A, Modesto (Serovariedad C-2); B, H-18 (serovariedad C-1); C y D, NAD-dependientes; E, NAD-independiente; F, ESV-129; G, ESV-135, H, Marcador de peso molecular (1kb).

D) Secuenciación y análisis del gen 16S rRNA. Las secuencias obtenidas de la amplificación parcial del gen 16S rRNA agruparon a todos los aislamientos en un mismo grupo monofilético. Al realizar el alineamiento no se observaron cambios en las bases entre los aislamientos seleccionados sin embargo sí se observaron sitios polimórficos al compararlos con aislamientos y cepas de referencia relacionadas, uno de estos es la delección de TTTT que se presenta únicamente en el aislamiento Australiano HP105, la cepa Sudafricana SA7177 y los aislamientos de Ecuador y México al comparar las cepas de referencia del mismo serogrupo (H-18, Modesto, SA-3 y HP60) (Figura 11).

```

Lavetec_31      TATCGGGAGATGAAAGGGGGCGAA-----AGCACCTGCCATAAGATGAGCCCAAGTGGGA 175
Lavetec_55      TATCGGGAGATGAAAGGGGGCGAA-----AGCACCTGCCATAAGATGAGCCCAAGTGGGA 175
Lavetec_27      TATCGGGAGATGAAAGGGGGCGAA-----AGCACCTGCCATAAGATGAGCCCAAGTGGGA 175
Lavetec_07      TATCGGGAGATGAAAGGGGGCGAA-----AGCACCTGCCATAAGATGAGCCCAAGTGGGA 175
Lavetec_03      TATCGGGAGATGAAAGGGGGCGAA-----AGCACCTGCCATAAGATGAGCCCAAGTGGGA 175
ESV-249         TATCGGGAGATGAAAGGGGGCGAA-----AGCACCTGCCATAAGATGAGCCCAAGTGGGA 175
ESV-246         TATCGGGAGATGAAAGGGGGCGAA-----AGCACCTGCCATAAGATGAGCCCAAGTGGGA 175
ESV-243         TATCGGGAGATGAAAGGGGGCGAA-----AGCACCTGCCATAAGATGAGCCCAAGTGGGA 175
ESV-242         TATCGGGAGATGAAAGGGGGCGAA-----AGCACCTGCCATAAGATGAGCCCAAGTGGGA 175
ESV-241         TATCGGGAGATGAAAGGGGGCGAA-----AGCACCTGCCATAAGATGAGCCCAAGTGGGA 175
ESV-231         TATCGGGAGATGAAAGGGGGCGAA-----AGCACCTGCCATAAGATGAGCCCAAGTGGGA 175
ESV-227         TATCGGGAGATGAAAGGGGGCGAA-----AGCACCTGCCATAAGATGAGCCCAAGTGGGA 175
ESV-218         TATCGGGAGATGAAAGGGGGCGAA-----AGCACCTGCCATAAGATGAGCCCAAGTGGGA 175
ESV-135         TATCGGGAGATGAAAGGGGGCGAA-----AGCACCTGCCATAAGATGAGCCCAAGTGGGA 175
ESV-129         TATCGGGAGATGAAAGGGGGCGAA-----AGCACCTGCCATAAGATGAGCCCAAGTGGGA 175
HP105           TATCGGGAGATGAAAGGGTGC GAA-----AGCACCTGCCATAAGATGAGCCCAAGTGGGA 175
SA7177          TATCGGGAGATGAAAGGGTGC GAA-----AGCACCTGCCATAAGATGAGCCCAAGTGGGA 175
H-18            AATCGGAAGATTAAGGGTGGGAC TTTTGGCCACCTGCCATAAGATGAGCCCAAGTGGGA 180
SA-3            AATCGGAAGATTAAGGGTGGGAC TTTTGGCCACCTGCCATAAGATGAGCCCAAGTGGGA 180
HP60            AATCGGAAGATTAAGGGTGGGAC TTTTGGCCACCTGCCATAAGATGAGCCCAAGTGGGA 180
Modesto         AATCGGAAGATTAAGGGTGGGAC TTTTGGCCACCTGCCATAAGATGAGCCCAAGTGGGA 180
:*****.*** ***** * *. . *****

```

Figura 11. Alineamiento de las secuencias del gen 16S rRNA de los aislamientos de *A. paragallinarum* serovariedad C-1 y cepas de referencia.

Al calcular los porcentajes de identidad con el programa WATER de EMBOSS (Rice *et al.*, 2000), todos los aislamientos de Ecuador y México mostraron 100% de identidad. Y al comparar a todos los aislamientos con secuencias previamente reportadas se encontró un porcentaje de identidad mayor con el aislamiento HP105 referido por Blackall *et al.* (2011), con 99.3%, seguido por un 98.7% con la cepa Sudafricana independiente de NAD, en el caso de la cepa H-18 mostraron 97.8% de identidad (Cuadro 5).

Cuadro 5. Porcentajes de identidad entre aislamientos seleccionados y secuencias referidas en el GenBank del gen 16S rRNA obtenidos a través de WATER en EMBOSS.

| Aislamiento | ESV-129 | ESV-135 | ESV-218 | ESV-227 | ESV-231 | ESV-241 | ESV-242 | ESV-243 | ESV-246 | ESV-249 | LAVETEC 03 | LAVETEC 07 | LAVETEC 27 | LAVETEC 31 | LAVETEC 33 | H-18 | SA-3 | Modesto | HP60 | SA7177 | 0222 | 0083 | HP105 | HP107 |
|-------------|---------|---------|---------|---------|---------|---------|---------|---------|---------|---------|------------|------------|------------|------------|------------|------|------|---------|------|--------|------|------|-------|-------|
| ESV-129 | - | 100 | 100 | 100 | 100 | 100 | 100 | 100 | 100 | 100 | 100 | 100 | 100 | 100 | 100 | 97.8 | 97.7 | 98.1 | 98.0 | 98.7 | 96.9 | 96.9 | 99.3 | 98.1 |
| ESV-135 | | - | 100 | 100 | 100 | 100 | 100 | 100 | 100 | 100 | 100 | 100 | 100 | 100 | 100 | 97.8 | 97.7 | 98.1 | 98.0 | 98.7 | 96.9 | 96.9 | 99.3 | 98.1 |
| ESV-218 | | | - | 100 | 100 | 100 | 100 | 100 | 100 | 100 | 100 | 100 | 100 | 100 | 100 | 97.8 | 97.7 | 98.1 | 98.0 | 98.7 | 96.9 | 96.9 | 99.3 | 98.1 |
| ESV-227 | | | | - | 100 | 100 | 100 | 100 | 100 | 100 | 100 | 100 | 100 | 100 | 100 | 97.8 | 97.7 | 98.1 | 98.0 | 98.7 | 96.9 | 96.9 | 99.3 | 98.1 |
| ESV-231 | | | | | - | 100 | 100 | 100 | 100 | 100 | 100 | 100 | 100 | 100 | 100 | 97.8 | 97.7 | 98.1 | 98.0 | 98.7 | 96.9 | 96.9 | 99.3 | 98.1 |
| ESV-241 | | | | | | - | 100 | 100 | 100 | 100 | 100 | 100 | 100 | 100 | 100 | 97.8 | 97.7 | 98.1 | 98.0 | 98.7 | 96.9 | 96.9 | 99.3 | 98.1 |
| ESV-242 | | | | | | | - | 100 | 100 | 100 | 100 | 100 | 100 | 100 | 100 | 97.8 | 97.7 | 98.1 | 98.0 | 98.7 | 96.9 | 96.9 | 99.3 | 98.1 |
| ESV-243 | | | | | | | | - | 100 | 100 | 100 | 100 | 100 | 100 | 100 | 97.8 | 97.7 | 98.1 | 98.0 | 98.7 | 96.9 | 96.9 | 99.3 | 98.1 |
| ESV-246 | | | | | | | | | - | 100 | 100 | 100 | 100 | 100 | 100 | 97.8 | 97.7 | 98.1 | 98.0 | 98.7 | 96.9 | 96.9 | 99.3 | 98.1 |
| ESV-249 | | | | | | | | | | - | 100 | 100 | 100 | 100 | 100 | 97.8 | 97.7 | 98.1 | 98.0 | 98.7 | 96.9 | 96.9 | 99.3 | 98.1 |
| LAVETEC 03 | | | | | | | | | | | - | 100 | 100 | 100 | 100 | 97.8 | 97.7 | 98.1 | 98.0 | 98.7 | 96.9 | 96.9 | 99.3 | 98.1 |
| LAVETEC 07 | | | | | | | | | | | | - | 100 | 100 | 100 | 97.8 | 97.7 | 98.1 | 98.0 | 98.7 | 96.9 | 96.9 | 99.3 | 98.1 |
| LAVETEC 27 | | | | | | | | | | | | | - | 100 | 100 | 97.8 | 97.7 | 98.1 | 98.0 | 98.7 | 96.9 | 96.9 | 99.3 | 98.1 |
| LAVETEC 31 | | | | | | | | | | | | | | - | 100 | 97.8 | 97.7 | 98.1 | 98.0 | 98.7 | 96.9 | 96.9 | 99.3 | 98.1 |
| LAVETEC 33 | | | | | | | | | | | | | | | - | 97.8 | 97.7 | 98.1 | 98.0 | 98.7 | 96.9 | 96.9 | 99.3 | 98.1 |
| H-18 | | | | | | | | | | | | | | | | - | 99.7 | 99.3 | 99.4 | 98.2 | 97.9 | 97.9 | 97.8 | 99.4 |
| SA-3 | | | | | | | | | | | | | | | | | - | 99.6 | 99.6 | 98.0 | 98.0 | 98.0 | 97.9 | 99.7 |
| Modesto | | | | | | | | | | | | | | | | | | - | 99.6 | 98.3 | 98.4 | 98.4 | 98.4 | 99.9 |
| HP60 | | | | | | | | | | | | | | | | | | | - | 98.2 | 98.0 | 98.0 | 98.0 | 99.7 |
| SA7177 | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | - | 96.9 | 96.9 | 99.2 | 98.4 |
| 0222 | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | - | 100 | 96.9 | 98.4 |
| 0083 | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | - | 96.9 | 98.4 |
| HP105 | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | - | 98.3 |
| HP107 | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | - |

Los aislamientos de Ecuador y México se ubicaron en un grupo monofilético (Figura 12). La cepa de referencia H-18 de la serovariedad C-1 se separó y agrupó con la cepa de referencia Modesto (C-2) y con la cepa Australiana HP107 (serogrupo C). Como grupo externo se utilizó la secuencia de *Pasteurella multocida* CCUG 17976 (NR041809).

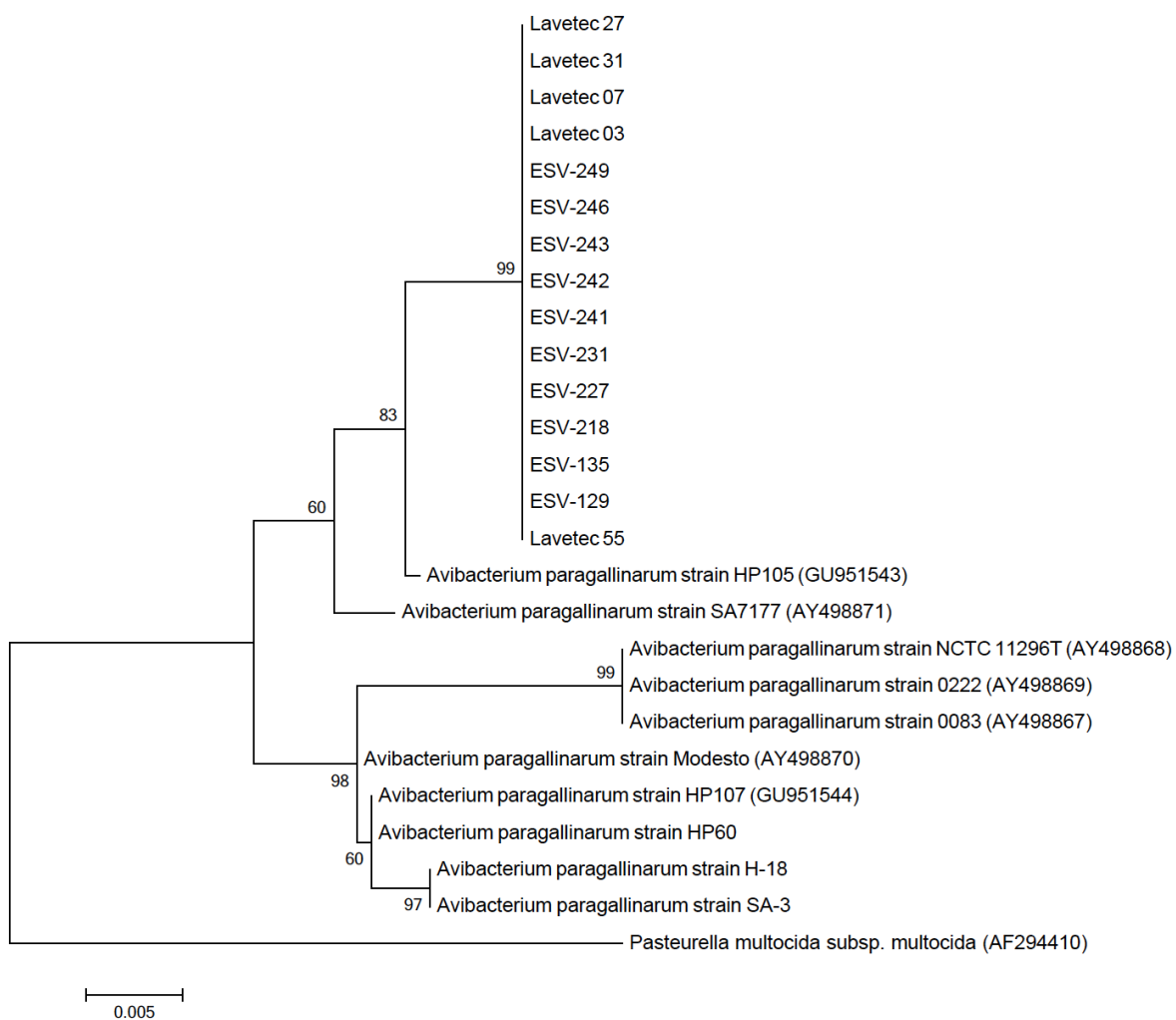


Figura 12. Relación filogenética basada en el análisis de las secuencias del gen 16S rRNA de los aislamientos de *A. paragallinarum* serovariedad C-1 y cepas previamente reportadas.

E) Secuenciación y análisis del gen *hagA*. Al analizar las secuencias obtenidas de los aislamientos de Ecuador y México con el programa WATER de EMBOSS se logró identificar una identidad del 100% entre ellos. Al compararlos con las secuencias previamente reportadas por Hobb *et al.* (2002), solamente se observa un valor máximo de identidad de 96.6% con las cepas 0083 (A-1), 221 (A-1) y E-3C (A-4). Con la cepa H-18 (C-1) se obtuvo 96.2% (Cuadro 6).

Cuadro 6. Porcentajes de identidad entre aislamientos seleccionados y secuencias referidas en el GenBank del gen *hagA* obtenidos a través de WATER en EMBOSS.

| Aislamiento | ES V-129 | ES V-135 | ES V-218 | ES V-227 | ES V-231 | ES V-241 | ESV-242 | ESV-243 | ESV-246 | ESV-249 | LAV ETEC 03 | LAV ETE C 07 | LAV ETE C 27 | LAV ETE C 31 | LAV ETE C 55 | H-18 | Mod esto | SA-3 | HP60 | 0083 | 221 | 2403 | E-3C | HP14 | 0222 | 2671 |
|-------------|----------|----------|----------|----------|----------|----------|---------|---------|---------|---------|-------------|--------------|--------------|--------------|--------------|------|----------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|
| ESV-129 | - | 100 | 100 | 100 | 100 | 100 | 100 | 100 | 100 | 100 | 100 | 100 | 100 | 100 | 100 | 96.2 | 95.8 | 96.5 | 95.8 | 96.6 | 96.6 | 96.3 | 96.6 | 95.8 | 96.3 | 96.4 |
| ESV-135 | - | - | 100 | 100 | 100 | 100 | 100 | 100 | 100 | 100 | 100 | 100 | 100 | 100 | 100 | 96.2 | 95.8 | 96.5 | 95.2 | 96.6 | 96.6 | 96.3 | 96.6 | 95.8 | 96.3 | 96.4 |
| ESV-218 | - | - | - | 100 | 100 | 100 | 100 | 100 | 100 | 100 | 100 | 100 | 100 | 100 | 100 | 96.2 | 95.8 | 96.5 | 95.2 | 96.6 | 96.6 | 96.3 | 96.6 | 95.8 | 96.3 | 96.4 |
| ESV-227 | - | - | - | - | 100 | 100 | 100 | 100 | 100 | 100 | 100 | 100 | 100 | 100 | 100 | 96.2 | 95.8 | 96.5 | 95.2 | 96.6 | 96.6 | 96.3 | 96.6 | 95.8 | 96.3 | 96.4 |
| ESV-231 | - | - | - | - | - | 100 | 100 | 100 | 100 | 100 | 100 | 100 | 100 | 100 | 100 | 96.2 | 95.8 | 96.5 | 95.2 | 96.6 | 96.6 | 96.3 | 96.6 | 95.8 | 96.3 | 96.4 |
| ESV-241 | - | - | - | - | - | - | 100 | 100 | 100 | 100 | 100 | 100 | 100 | 100 | 100 | 96.2 | 95.8 | 96.5 | 95.2 | 96.6 | 96.6 | 96.3 | 96.6 | 95.8 | 96.3 | 96.4 |
| ESV-242 | - | - | - | - | - | - | - | 100 | 100 | 100 | 100 | 100 | 100 | 100 | 100 | 96.2 | 95.8 | 96.5 | 95.2 | 96.6 | 96.6 | 96.3 | 96.6 | 95.8 | 96.3 | 96.4 |
| ESV-243 | - | - | - | - | - | - | - | - | 100 | 100 | 100 | 100 | 100 | 100 | 100 | 96.2 | 95.8 | 96.5 | 95.2 | 96.6 | 96.6 | 96.3 | 96.6 | 95.8 | 96.3 | 96.4 |
| ESV-246 | - | - | - | - | - | - | - | - | - | 100 | 100 | 100 | 100 | 100 | 100 | 96.2 | 95.8 | 96.5 | 95.2 | 96.6 | 96.6 | 96.3 | 96.6 | 95.8 | 96.3 | 96.4 |
| ESV-249 | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | 100 | 100 | 100 | 100 | 100 | 96.2 | 95.8 | 96.5 | 95.2 | 96.6 | 96.6 | 96.3 | 96.6 | 95.8 | 96.3 | 96.4 |
| LAVETEC 03 | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | 100 | 100 | 100 | 100 | 96.2 | 95.8 | 96.5 | 95.2 | 96.6 | 96.6 | 96.3 | 96.6 | 95.8 | 96.3 | 96.4 |
| LAVETEC 07 | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | 100 | 100 | 100 | 96.2 | 95.8 | 96.5 | 95.2 | 96.6 | 96.6 | 96.3 | 96.6 | 95.8 | 96.3 | 96.4 |
| LAVETEC 27 | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | 100 | 100 | 96.2 | 95.8 | 96.5 | 95.2 | 96.6 | 96.6 | 96.3 | 96.6 | 95.8 | 96.3 | 96.4 |
| LAVETEC 31 | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | 100 | 96.2 | 95.8 | 96.5 | 95.2 | 96.6 | 96.6 | 96.3 | 96.6 | 95.8 | 96.3 | 96.4 |
| LAVETEC 55 | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | 96.2 | 95.8 | 96.5 | 95.2 | 96.6 | 96.6 | 96.3 | 96.6 | 95.8 | 96.3 | 96.4 |
| H-18 | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | 96.3 | 96.1 | 96.3 | 96.6 | 96.2 | 99.5 | 96.2 | 96.3 | 99.7 | 99.6 |
| Modesto | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | 96.3 | 100 | 96.6 | 96.4 | 96.5 | 100 | 96.4 | 96.5 | |
| SA-3 | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | 96.3 | 96.6 | 99.9 | 96.2 | 99.9 | 96.3 | 96.2 | 96.3 |
| HP60 | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | 96.6 | 96.4 | 96.5 | 96.4 | 100 | 96.4 | 96.5 |
| 0083 | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | 100 | 96.3 | 100 | 96.4 | 96.3 | 96.4 |
| 221 | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | 96.3 | 100 | 96.4 | 96.3 | 96.4 |
| 2403 | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | 96.3 | 96.5 | 99.8 | 99.9 |
| E-3C | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | 96.4 | 96.3 | 96.4 |
| HP14 | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | 96.4 | 96.5 |
| 0222 | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | 99.9 |
| 2671 | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - |

El análisis filogenético mostró cuatro grupos definidos, uno conformado por los aislamientos de Ecuador y México, el segundo por las cepas de referencia SA-3, 221, 0083 y E3-C de las serovariedades C-3, A-1, A-1 y A-3, respectivamente (Figura 13). El tercer grupo incluyó las cepas de referencia HP14, Modesto y HP60 de las serovariedades A-4, C-2 y C-4 respectivamente. El último grupo incluyó las cepas de referencia 2403 (A-2), 2671 (B-1), 0222 (B-1) y H-18 (C-1) (Figura 13).

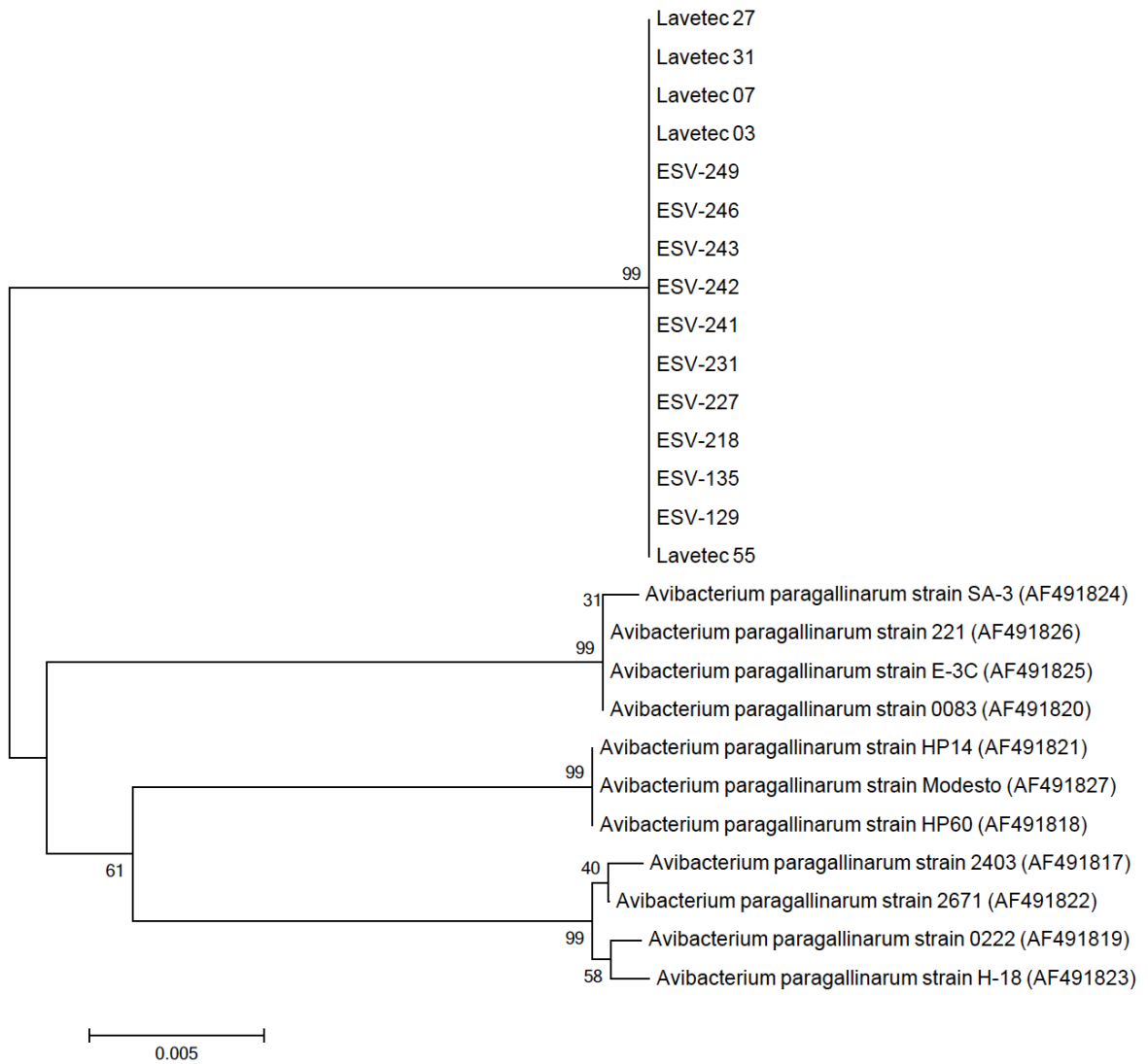


Figura 13. Árbol filogenético basado en las secuencias del gen *hagA*, mostrando las relaciones entre aislamientos mexicanos y ecuatorianos con las cepas de referencia reportadas por Hobb *et al.* (2002). Construido mediante *Neighbor joining*.

IX. DISCUSIÓN

Los aislamientos de la serovariedad C-1 emergentes en Ecuador y México, tienen una relación muy estrecha aún cuando han sido aislados de diferente lugar y en diferente año. Los genotipos ERIC identificados fueron reproducibles y se observó que todos los aislamientos incluidos en el estudio mostraron un patrón ERIC, diferente al de las cepas de referencia del mismo serogrupo. Estos resultados indican una posible relación clonal entre estos aislamientos, obtenidos en diferente país y año (Ecuador y México de 2000 a 2011).

En estudios previos, se observó diversidad genética en 29 aislamientos de las serovariedades A-1, A-2, B-1, y C-2 de *A. paragallinarum* de México (Soriano *et al.*, 2004). Se identificaron 17 patrones ERIC en los aislamientos y cada una de las 11 cepas de referencia mostraron patrones ERIC diferentes y distinguibles entre serovariedad. En el caso particular de aislamientos del serogrupo C, se reconocieron 3 genotipos ERIC diferentes en 5 aislamientos de la serovariedad C-2 obtenidos de 3 estados (Jalisco, Puebla y Morelos), lo cual indica una diversidad genética significativa entre los aislamientos.

Por otra parte, en el reporte de Calderón *et al.* (2010), 2 aislamientos de la serovariedad B-1 obtenidos de brotes de coriza en 8 granjas de Panamá se identificó un solo genotipo, diferente al de la cepa de referencia 2671 (B-1), los brotes fueron producidos en un mismo tiempo y en un lugar determinado, donde nunca se habían presentado brotes de coriza infecciosa.

Morales-Erasto *et al.* (2011) identificaron un genotipo único en 14 aislamientos serovariedad C-1 de México. El genotipo es idéntico al identificado en los aislamientos de Ecuador y México incluidos en el presente estudio. El genotipo ERIC es diferente al de aislamientos de otras serovariedades encontrados en ambos estudios.

El aislamiento de *A. paragallinarum* independiente de NAD de la serovariedad C-1, mostró un genotipo idéntico al de los aislamientos reportados

por Morales-Erasto *et al.* (2011), lo cual indica también una posible relación clonal entre este aislamiento y los aislamientos serovariedad C-1 de México. El análisis filogenético del aislamiento NAD-independiente serovariedad C-1 se realizará en estudios futuros.

Las secuencias del gen 16S rRNA obtenidas confirman los aislamientos incluidos en el presente estudio como *Avibacterium paragallinarum*. Se encontró que los aislamientos tienen 100% de identidad entre ellos, pero al compararlos con la cepa de referencia H-18 de Japón, se observa que no existe relación filogenética estrecha (97.8% de identidad), independientemente de pertenecer a la misma serovariedad. En cambio se observó que con el aislamiento HP105 (serogrupo A) reportado por Blackall *et al.* (2011) tuvieron una identidad del 99.3%. El aislamiento HP105 fue aislado en 1982 a partir de aves de 23 semanas de edad en una caseta con una historia de enfermedad respiratoria recurrente desde la semana 12 de edad. Asimismo, los aislamientos presentan un porcentaje alto de identidad (98.7%) con la cepa sudafricana SA7177 NAD-independiente. Una deleción de TTTTT en las cepas HP105, SA7177 y en las secuencias de los aislamientos incluidos en el presente estudio, fue detectada entre las posiciones 181-185. Esta característica agrupó a los aislamientos en un solo clado, siendo la topología similar a la informada por Blackall *et al.* (2011).

Al analizar las secuencias obtenidas de los aislamientos incluidos en el presente estudio, a partir de la secuenciación parcial del gen *hagA*, se observó que son idénticas, con una identidad del 100% entre los 15 aislamientos. En el árbol filogenético se observa la misma topología informada por Hobb *et al.* (2002) entre las once cepas de referencia pero con la peculiaridad de que los aislamientos de Ecuador y México se agrupan en un clado separado, sugiriendo un nuevo linaje genético.

En conclusión, los resultados de genotipificación indican que los aislamientos serovariedad C-1 incluidos en el presente estudio tienen una relación clonal. De forma similar, los resultados filogenéticos indican que todos los

aislamientos incluidos en el estudio tienen una estrecha relación. Con la cepa de referencia H-18 de esta serovariedad, los resultados filogenéticos muestran una relación distante con los aislamientos. Los resultados del presente estudio rechazan las hipótesis planteadas. El conocimiento de la relación entre aislamientos de *A. paragallinarum* nos ayuda a comprender la dinámica de la enfermedad. La presencia de una serovariedad que no se había presentado antes en estos dos países podría tener impacto negativo en la avicultura. Como se mencionó anteriormente, los aislamientos incluidos en el presente estudio fueron obtenidos de aves inmunizadas contra la coriza infecciosa. En este caso la relación clonal observada entre aislamientos que pertenecen a la misma serovariedad emergente, puede ser de alguna manera más favorable que si existiera diversidad, ya que el control de brotes y la formulación de bacterinas comerciales podrían ser más sencillos.

X. CONCLUSIONES

- Los aislamientos de *A. paragallinarum* de la serovariedad C-1 obtenidos recientemente en México (2010-2011), muestran un genotipo ERIC idéntico al informado previamente, indicando también clonalidad.
- El aislamiento NAD-independiente, serovariedad C-1, de *A. paragallinarum* aislado recientemente en México, muestra un genotipo ERIC idéntico al obtenido con otros aislamientos C-1, indicando también clonalidad.
- Los resultados de la genotipificación y los análisis filogenéticos indican una relación clonal entre aislamientos de la serovariedad C-1 de Ecuador y México.
- No hay relación filogenética estrecha entre los aislamientos C-1 incluidos en el estudio y la cepa de referencia H-18.

XI. SUGERENCIAS

- Realizar un estudio global que incluya aislamientos de *A. paragallinarum* de otras áreas geográficas y diferentes serovariedades.
- Demostrar la posible relación clonal de los aislamientos incluidos en el estudio mediante el uso de otros marcadores genéticos o idealmente mediante secuenciación del genoma completo.

XII. BIBLIOGRAFÍA

- Appuhamy S., Parton R., Coote T. J., Gibbs H. A. (1997). Genomic fingerprinting *Haemophilus somnus* by a combination of PCR methods. *J Clin Microbiol.* 35:288-291.
- Bisgaard M., Christensen J. P., Bojesen A. M., Christensen H. (2007). *Avibacterium endocarditidis* sp. nov., isolated from valvular endocarditis in chickens. *Int J Syst Evol Microbiol.* 55:353-362.
- Blackall P., Christensen H., Beckenham T., Blackall L., Bisgaard M. (2005). Reclassification of *Pasteurella gallinarum*, [*Haemophilus*] *paragallinarum*, *Pasteurella avium* and *Pasteurella volantium* as *Avibacterium gallinarum* gen. nov., comb. nov., *Avibacterium paragallinarum* comb. nov., *Avibacterium avium* comb. nov. and *Avibacterium volantium* comb. nov. *Int J Syst Evol Microbiol.* 55:353-362.
- Blackall P.J., Eaves L. E., Aus G. (1990a). Serotyping of *Haemophilus paragallinarum* by the Page scheme: comparison of the use of agglutination and hemagglutination-inhibition tests. *Avian Dis.* 34:643-645.
- Blackall P.J., Eaves L.E., Rogers, D.G. (1990b). Proposal of a new serovar and altered nomenclature for *Haemophilus paragallinarum* in the Kume hemagglutinin scheme. *J Clin Microbiol.* 28:1185-1187.
- Blackall P.J., Soriano, V.E. (2008). Infectious coryza and related bacterial infections. En: Saif Y.M., Barnes H.J., Glisson J.R., Fadly A.M.,

McDougald L.R., Swayne D.E. Diseases of Poultry, 12th ed., Blackwell Publishing. Estados Unidos de America. 20:789-803.

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

Bragg R. R., Greyling J. M., Verschoor J.A. (1997). Isolation and identification of NAD- independent bacteria from chickens with symptoms of infectious coryza. *Avian Pathol.* 26:595-606.

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

Calderón E. N., Thomas K., Morales-Erasto V., Salgado-Miranda C., Soriano-Vargas E. (2010). Identification of *Avibacterium paragallinarum* serovar B-1 from several infectious coryza outbreaks in Panama. *Avian Dis.* 54:1095-1097.

Christensen H., Bisgaard M. (2010). Molecular classification and its impact on diagnostics and understanding the phylogeny and epidemiology of selected members of *Pasteurellaceae* of veterinary importance. *Berl Munch Tierarztl Wochenschr.* 123:20-30.

Fernández R. P., García D. G. A., Ochoa P., Soriano V. E. (2000). Characterization of *Haemophilus paragallinarum* isolates from Mexico. *Avian Pathol.* 29:473-476.

- García A. J., Angulo E., Blackall P.J., Ortiz A. M. (2004). The presence of nicotinamide adenine dinucleotide-independent *Haemophilus paragallinarum* in Mexico. *Avian Dis.* 48: 425-429.
- Hobb R. I., Teng H. J., Downes J. E., Terry T. D., Blackall P.J., Takagi M., Jennings M.P. (2002). Molecular analysis of a haemagglutinin of *Haemophilus paragallinarum*. *Microbiology.* 148: 2171-2179.
- Kume K., Sawata A., Nakai T., Matsumoto M. (1983). Serological classification of *Haemophilus paragallinarum* with a hemagglutinin system. *J Clin Microbiol.* 17:958-964.
- Lane D. J. (1991). 16S/23S rRNA Sequencing. En: Stackebrandt M.G. Nucleid Acid Techniques in Bacterial Systematics. John Wiley and Sons, New York. NJ. pp 115.175.
- Loubinox J., Lozniewski A., Lion C., Garin D., Weber M., Le Faou A.E. (1999). Value of enterobacterial repetitive intergenic concensus PCR for study of *Pasteurella multocida* strains isolated from mouths of dogs. *J Clin Microbiol.* 37:2488-2492.
- Morales-Erasto V., García-Sánchez A., Salgado-Miranda C., Talavera-Rojas M., Robles-González F., Blackall P. J., Soriano-Vargas E. (2011). ERIC-PCR genotyping of emergent serovar C-1 isolates of *Avibacterium paragallinarum* from Mexico. *Avian Dis.* 55:686-688.
- Olive D. M., Bean P. (1999). Principles and applications of methods of DNA-based typing of microbial organism. *J Clin Microbiol.* 37:1661-1669.

- Olvera A., Calsamiglia M., Aragón V. (2006). Genotyping diversity of *Haemophilus parasuis* field strains. *Appl Environ Microbiol.* 72:3984-3992.
- Page L. A. (1962). *Haemophilus* infections in chickens. I. Characteristics of 12 haemophilus isolates recovered from diseased chickens. *Am J Vet Res.* 23: 85-95.
- Soriano V. E., Blackall P.J., Dabo S.M., Téllez G., García D.G.A., Fernández R. P., (2001). Serotyping of *Haemophilus paragallinarum* isolates from Mexico by the Kume hemagglutinin scheme. *Avian Dis.* 45:680-683.
- Soriano V. E., Téllez G., Hargis B. M., Newberry L., Salgado M. C., Vázquez J. C. (2004a). Typing of *Haemophilus paragallinarum* strains by using enterobacterial repetitive intergenic consensus-based polymerase chain reaction. *Avian Dis.* 48:890-895.
- Soriano V. E., Terzolo H. R. (2004b). *Haemophilus paragallinarum*: etiología de la coriza infecciosa. *Vet Méx.* 35:245-259.