

# Evaluación de dos protocolos de bacterinización de gallinas de postura, mediante detección de anticuerpos inhibidores de la hemoaglutinación y protección ante un desafío controlado con *Haemophilus paragallinarum*

Edgardo Soriano Vargas\*  
Pomposo Fernández Rosas\*  
Gustavo A. García-Delgado\*\*  
Pedro Ochoa Galván†

## Abstract

Two bacterinization programs of field-immunized layer-hens with bivalent or trivalent infectious coryza bacterins were evaluated by the detection of titers of hemagglutination-inhibition antibodies, and protection against controlled-challenge with A, B and C *H. paragallinarum* serovars. Bivalent-immunized layer-hens showed lower protection against clinical signs of infectious coryza when serovar A was challenged. Nevertheless, bivalent-immunized layer-hens showed protection and hemagglutination-inhibition antibodies against serovar B. Trivalent-immunized layer-hens showed protection against all three *H. paragallinarum* serovars. No statistical differences were observed in the hemagglutination-inhibition antibody titers against the same serovar conferred by bivalent or trivalent bacterins. These results indicate that higher hemagglutination-inhibition antibody titers conferred by bivalent or trivalent infectious coryza bacterins could predict protection against a challenge with A, B or C *H. paragallinarum* serovars.

**Key words:** *HAEMOPHILUS PARAGALLINARUM*, INFECTIOUS CORYZA, BACTERINS, HEMAGGLUTINATION-INHIBITION ANTIBODIES, CHALLENGE TEST.

## Resumen

Se evaluaron dos protocolos de bacterinización de gallinas de postura inmunizadas en campo, de forma bivalente o trivalente, contra la coriza infecciosa, mediante detección de anticuerpos circulantes inhibidores de la hemoaglutinación y protección ante desafío controlado con los serovares A, B y C de *H. paragallinarum*. Gallinas inmunizadas de forma bivalente mostraron la más baja protección contra signos clínicos de coriza infecciosa cuando fueron desafiadas con el serovar A. No obstante, gallinas inmunizadas de forma bivalente mostraron protección al desafío y anticuerpos circulantes inhibidores de la hemoaglutinación para el serovar B. Gallinas inmunizadas de forma trivalente mostraron protección contra signos de coriza infecciosa para los tres serovares. No se observaron diferencias estadísticas entre los títulos de anticuerpos circulantes inhibidores de la hemoaglutinación contra un mismo serovar conferidos por bacterinas bivalentes o trivalentes. Los resultados indican que títulos elevados de anticuerpos inhibidores de la hemoaglutinación conferidos por

---

Recibido el 4 de enero de 2000 y aceptado el 21 de junio de 2000.

\* Departamento de Investigación y Desarrollo Avícola, Biosíntesis Laboratorios, S. A., Toluca, Estado de México, 50130, México. E-mail: esv@mail.uaemex.mx

\*\* Centro de Investigación y Estudios Avanzados en Salud Animal, Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia, Universidad Autónoma del Estado de México, Toluca, Estado de México, 50000, México.

\*\*\* Departamento de Microbiología e Inmunología, Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia, Universidad Nacional Autónoma de México, 04510, México, D. F.

† Departamento de Bioestadística y Genética, Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia, Universidad Nacional Autónoma de México, 04510, México, D. F.

bacterinas bivalentes o trivalentes pueden predecir protección frente a un desafío con los serovares A, B y C de *H. paragallinarum*.

**Palabras clave:** *HAEMOPHILUS PARAGALLINARUM*, CORIZA INFECCIOSA, BACTERINAS, ANTICUERPOS INHIBIDORES DE LA HEMOAGLUTINACIÓN, PRUEBA DE DESAFÍO.

La bacteria *Haemophilus paragallinarum* constituye el agente causal de la coriza infecciosa, una enfermedad del tracto respiratorio superior de pollos y gallinas (*Gallus gallus*), que se caracteriza por producir descarga nasal, estornudo e inflamación de los senos infraorbitarios. El impacto económico de la enfermedad radica en las pérdidas que ocasiona a la avicultura, debido al incremento del número de aves de desecho y pérdida de peso, así como una disminución en la producción de huevo (10% a 40%).<sup>1</sup>

El esquema de clasificación serológica de Page<sup>2</sup> reconoce los serovares A, B y C en *H. paragallinarum*. De acuerdo con Rimler *et al.*,<sup>3</sup> los tres serovares representan inmunotipos diferentes, ya que la inmunización de aves con bacterinas inactivadas de un serovar no confieren protección contra los otros dos serovares. Recientemente, los serovares A, B y C de Page fueron reconocidos en aislamientos de *H. paragallinarum* procedentes de varios estados de la República mexicana.<sup>4</sup>

La bacterinización de parvadas susceptibles a coriza infecciosa es la práctica más eficaz en la prevención del impacto de esta enfermedad.<sup>1</sup> En el mercado existen bacterinas comerciales que contienen los tres serovares (bacterinas trivalentes) y bacterinas que contienen los serovares A y C (bacterinas bivalentes).<sup>5</sup> En la actualidad existen discrepancias en cuanto a la protección cruzada conferida por bacterinas bivalentes de *H. paragallinarum*.<sup>6</sup> Sin embargo, estudios realizados en aves inmunizadas de forma bivalente mostraron una protección de 50% contra signos respiratorios de coriza infecciosa, cuando las aves fueron desafiadas con un aislamiento serovar B.<sup>3,7</sup>

En el presente trabajo de investigación se evaluaron dos protocolos de bacterinización de gallinas de postura inmunizadas en campo contra la coriza infecciosa, mediante detección de anticuerpos inhibidores de la hemoaglutinación y protección contra signos respiratorios ante desafíos controlados con los serovares A, B y C de *H. paragallinarum*.

Se utilizaron 90 gallinas de postura de la línea Hy-Line, procedentes de Tepatitlán, Jalisco, México. El grupo I se integró con 30 gallinas de 35 semanas de edad inmunizadas en campo de forma bivalente. Las aves fueron primobacterinizadas a las 17 semanas de edad y

rebacterinizadas a las 20 semanas edad con la dosis recomendada por el laboratorio. El grupo II se integró con 30 gallinas de 25 semanas de edad inmunizadas en campo de forma trivalente. Las aves fueron primobacterinizadas a las cuatro semanas de edad y rebacterinizadas a las 14 semanas de edad con la dosis recomendada por el laboratorio. Para cada grupo se incluyeron gallinas sin inmunizar contra la coriza infecciosa (grupo testigo) de 15 semanas de edad, las cuales estaban libres de coriza infecciosa, clínicamente sanas y seronegativas a *Mycoplasma* spp. Todas las aves fueron identificadas de forma individual y remitidas al Centro de Investigación y Estudios Avanzados en Salud Animal, de la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia de la Universidad Autónoma del Estado de México, para obtener la muestra de suero y desafiarlas, junto con el grupo testigo, con aislamientos de *H. paragallinarum* obtenidos en la región de Tepatitlán, correspondientes a los serovares A, B y C del esquema de Page.<sup>2</sup>

A la llegada de las aves se obtuvo muestra de sangre de las 90 aves para determinar los títulos de anticuerpos circulantes mediante pruebas de inhibición de la hemoaglutinación. Todos los sueros fueron absorbidos con una suspensión al 10% de eritrocitos de pollo fijados con glutaraldehído, a una dilución final 1:10 (vol/vol), para eliminar hemoaglutininas inespecíficas. Para cada suero se realizaron diluciones dobles seriadas por triplicado de 50 µl en microplacas de fondo redondeado con solución amortiguadora de fosfatos (pH 7.2). Asimismo, se determinaron anticuerpos inhibidores de la hemoaglutinación con hemoaglutininas de las cepas de referencia 0083, 0222 y Modesto, correspondientes a los serovares A, B y C del esquema de Page. Brevemente se realizaron cultivos de las cepas de referencia en caldo infusión cerebro corazón a 37° C durante 24 h. Los cultivos fueron inactivados con 0.01% (peso/vol) de timerosal. Cada cultivo fue lavado por centrifugación a 3 000 gy ajustado a cuatro unidades hemoaglutinantes empleando eritrocitos de pollo fijados con glutaraldehído al 1% (peso/vol). Posterior a una incubación de 20 minutos de cada suero con 50 µl de la correspondiente hemoaglutinina, se adicionaron 100 µl de una suspensión al 0.75% de eritrocitos de pollo fijados con glutaraldehído.<sup>8</sup> El título de anticuerpos

circulantes fue registrado como la máxima dilución mostrando completa inhibición de la hemoaglutinación. A los datos obtenidos se les realizó una transformación a Log 10. Para determinar el efecto del tipo de bacterina, se aplicó el análisis de varianza no paramétrico mediante la prueba de Kruskal-Wallis a los títulos de anticuerpos inhibidores de la hemoaglutinación, donde la variable de respuesta fue el título de anticuerpos detectados, mientras que la variable explicativa fue el tipo de bacterina utilizada. La diferencia estadística entre los grupos se determinó mediante la prueba de Nemenyi.<sup>9</sup> Se obtuvieron títulos de anticuerpos inhibidores de la hemoaglutinación desde < 1:10 hasta 1:640 en sueros de las aves de los grupos I y II, mientras que todas las aves del grupo testigo no mostraron (< 1:10) títulos de anticuerpos inhibidores de la hemoaglutinación. Los títulos de anticuerpos circulantes de las aves inmunizadas de los grupos I y II mostraron diferencia estadística significativa ( $P <$

0.05) comparados con las aves no inmunizadas (grupo testigo). Asimismo, se observó que sueros de las aves inmunizadas de forma bivalente (grupo I) mostraron títulos de anticuerpos circulantes para el serovar B (Cuadro 1). No se encontraron diferencias estadísticas significativas en los títulos de anticuerpos circulantes inhibidores de la hemoaglutinación para el mismo serovar conferido por bacterinas bivalentes o trivalentes (Cuadro 1).

Una semana después de la llegada de las aves, diez aves de cada grupo fueron alojadas y desafiadas bajo condiciones de laboratorio con cultivos vivos de los aislamientos A, B y C de *H. paragallinarum*. Se administró 0.2 ml del respectivo cultivo con  $5 \times 10^8$  UFC/ml, por instilación nasal. Se registraron los signos clínicos de coriza infecciosa durante siete días mediante una escala de valores asignados de la siguiente manera: 0, ausencia de signos; 1, únicamente exudado nasal o inflamación facial leve; 2, exudado nasal e inflamación facial leve; 3,

Cuadro 1

TÍTULOS DE ANTICUERPOS CIRCULANTES INHIBIDORES DE LA HEMOAGLUTINACIÓN (IH) Y SIGNOS DE CORIZA INFECCIOSA, MOSTRADOS POR GALLINAS DE POSTURA INMUNIZADAS EN CAMPO CON BACTERINAS BIVALENTES O TRIVALENTES A DIFERENTES EDADES, EMPLEADAS EN EL EXPERIMENTO, CON SU CORRESPONDIENTE PROTECCIÓN AL DESAFÍO CONTRA LOS SEROVARES A, B Y C DE *Haemophilus paragallinarum*.

Grupo de aves	Tipo de bacterina	Edad a la bacterinización/ rebacterinización (semanas)	Edad al desafío (semanas)	Hemoaglutinina de cepa de referencia para serología / serovar de desafío	Título de anticuerpos IH (media Log 10)*	Signos (Número de aves/severidad**) al desafío (%)
I	Bivalente (A y C)	17/20	35	0083 / A	1.28 <sup>b</sup>	4/0
				0222 / B	1.69 <sup>b</sup>	10/0
				Modesto / C	1.95 <sup>b</sup>	9/0
				0083 / A	1.83 <sup>b</sup>	1/1
II	Trivalente (A, B y C)	4/14	25	0222 / B	1.58 <sup>b</sup>	9/0
				Modesto / C	2.22 <sup>b</sup>	1/1
				0083 / A	0 <sup>a</sup>	5/1
				0222 / B	0 <sup>a</sup>	0
Testigo	NB	NB	15	Modesto / C	0 <sup>a</sup>	3/2
						2/3
						10/1
						0

\* Literales diferentes para el mismo serovar tienen diferencia estadística significativa ( $P < 0.05$ ).

\*\* Escala de valores de signos clínicos de coriza infecciosa: 0, ausencia de signos; 1, únicamente exudado nasal o inflamación facial leve; 2, exudado nasal e inflamación facial leve; 3, exudado e inflamación facial moderada.<sup>10</sup>

NB: No bacterinizados.

exudado e inflamación facial moderada.<sup>10</sup> Los resultados de la prueba de desafío fueron expresados en porcentaje de aves que no mostraron signos de coriza infecciosa durante la prueba. Al desafío, algunas aves de los grupos I y II mostraron signos clínicos de coriza infecciosa (datos no mostrados). Todas las aves del grupo testigo mostraron signos de coriza infecciosa (Cuadro 1).

Los resultados obtenidos muestran que aves inmunizadas de forma bivalente (grupo I) y desafiadas con el aislamiento serovar A, tuvieron el porcentaje (40%) y media de anticuerpos circulantes más bajos. No obstante, aves de este mismo grupo mostraron títulos circulantes y protección al desafío contra el serovar B. Jacobs *et al.*<sup>5</sup> no encontraron protección cruzada en aves bacterinizadas de forma bivalente y desafiadas con el serovar B. Por el contrario, Kume *et al.*<sup>11</sup> hallaron que aves inmunizadas con los serovares A y C estuvieron protegidas al desafío con cepas del serovar B. Respecto de la baja protección al desafío con el serovar A, estudios realizados en Argentina y Brasil han mostrado que anticuerpos monoclonales contra el serovar A, han fallado en el reconocimiento de aislamientos de *H. paragallinarum* de este serovar. Los autores mencionan que parecen existir diferencias antigenicas entre los aislamientos procedentes de estos países y los procedentes de Australia, Japón y Sudáfrica.<sup>12,13</sup> En este estudio todas las aves inmunizadas de forma trivalente mostraron títulos de anticuerpos circulantes y protección al desafío contra los tres serovares. No se observaron diferencias estadísticas significativas en cuanto al título de anticuerpos circulantes (Cuadro 1). Kume *et al.*<sup>14</sup> relacionaron el tiempo de eliminación de *H. paragallinarum* de senos infraorbitarios en aves inmunizadas y desafiadas con la cepa 221, serovar A. Los autores mencionan que aves con títulos de anticuerpos circulantes inhibidores de la hemoaglutinación mayores o iguales a 1:20 estuvieron protegidas contra signos de coriza infecciosa, concluyendo que se desconoce si la protección se debe al título de anticuerpos circulantes o al mecanismo de acción de los mismos. En el presente trabajo se observó que aves con títulos de anticuerpos circulantes mayores o iguales a 1:40, no mostraron signos clínicos de coriza infecciosa (datos no mostrados).

Los resultados obtenidos indican que títulos de anticuerpos circulantes inhibidores de la hemoaglutinación de 1:40 (1.6 Log 10) para un serovar, pueden significar protección al desafío para ese serovar. Por lo tanto, la medición de los anticuerpos circulantes inhibidores de la hemoaglutinación para los tres serovares de *H. paragallinarum* en el esquema de Page, es necesaria para predecir el nivel de protección de una parvada de gallinas inmunizadas de forma bivalente o trivalente contra la coriza infecciosa. En conclusión, los resultados sugieren que los anticuerpos inhibidores de la hemoaglutinación conferidos por bacterinas bivalentes o trivalentes en gallinas inmunizadas son importantes en la protección contra

signos clínicos de coriza infecciosa, por lo que lograr títulos elevados puede disminuir el impacto económico de la enfermedad. Asimismo, la prueba de inhibición de la hemoaglutinación puede ser una herramienta serológica para predecir el grado de protección conferido por bacterinas contra esta enfermedad.

Las diferencias de patogenicidad observadas en las aves del grupo testigo entre aislamientos de los tres serovares sugieren la realización de estudios futuros detallados al respecto, así como los respectivos estudios antigenicos.

## Referencias

1. Blackall PJ, Matsumoto M, Yamamoto R. Infectious coryza. In: Calnek BW, Barnes HJ, Beard CW, McDougald LR, Saif YM, editors. Poultry diseases. 10th ed. Ames (Ia): Iowa State University Press, 1997:179-190.
2. Page LA. *Haemophilus* infections in chickens. I. Characteristics of 12 *Haemophilus* isolates recovered from diseased chickens. Am J Vet Res 1962;23:85-95.
3. Rimler RB, Davis RB, Page LA. Infectious coryza: *in vivo* growth of *Haemophilus gallinarum* as a determinant for cross-protection. Am J Vet Res 1977;38:1591-1593.
4. Fernandez RP, Garcia-Delgado GA, Ochoa P, Soriano VE. Characterization of *Haemophilus paragallinarum* isolates from Mexico. Avian Pathol 2000;29:473-476.
5. Jacobs AAC, Cuenen W, Storm PK. Efficacy of a trivalent *Haemophilus paragallinarum* vaccine compared to bivalent vaccines. Vet Microbiol 1992;32:43-49.
6. Blackall PJ. Infectious coryza: overview of the disease and new diagnostic options. Clin Microbiol Rev 1999;12:627-632.
7. Rimler RB, Davis RB, Page LA. Infectious coryza: cross-protection studies, using seven strains of *Haemophilus gallinarum*. Am J Vet Res 1977;38:1587-1589.
8. Blackall PJ, Eaves LE, Aus G. Serotyping of *Haemophilus paragallinarum* by the Page scheme: comparison of the use of agglutination and hemagglutination-inhibition tests. Avian Dis 1990;34:643-645.
9. Zar J. Biostatistical analysis. 3rd ed. Englewood Cliffs (NJ): Prentice Hall, 1996.
10. Oluwadiya MO, Yamamoto R, Bickford AA, Glick J, Ortmayer BH. Evaluation of some commercially infectious coryza (*Haemophilus gallinarum*) bacterins in chickens. Proceedings of the 13<sup>th</sup> Western Poultry Diseases Conference; 1979 March 5-7; Sacramento (Ca). Kenneth Square (Pe): American Association of Avian Pathologists, 1979:10-11.
11. Kume K, Sawata A, Nakase Y. Immunologic relationship between Page's and Sawata's strains of *Haemophilus paragallinarum*. Am J Vet Res 1980;41:757-760.
12. Terzolo HR, Paolichi FA, Sandoval VE, Blackall PJ, Yamaguchi T, Iritani Y. Characterization of isolates of *Haemophilus paragallinarum* from Argentina. Avian Dis 1993;37:310-314.
13. Blackall PJ, Silva EN, Yamaguchi T, Iritani Y. Characterization of isolates of avian haemophili from Brazil. Avian Dis 1994;38:269-274.
14. Kume K, Sawata A, Nakai T. Clearance of the challenge organisms from the upper respiratory tract of chickens injected with an inactivated *Haemophilus paragallinarum* vaccine. Jpn J Vet Sci 1984;46:843-850.