

Veterinaria México

Volumen 35
Volume

Número 3
Number

Julio-Septiembre 2004
July-September

Artículo:

Epizootiología, prevención y control de la coriza infecciosa

Derechos reservados, Copyright © 2004:
Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia, UNAM

**Otras secciones de
este sitio:**

-  [Índice de este número](#)
-  [Más revistas](#)
-  [Búsqueda](#)

***Others sections in
this web site:***

-  [Contents of this number](#)
-  [More journals](#)
-  [Search](#)



www.Medigraphic.com

Epizootiología, prevención y control de la coriza infecciosa

Epizootiology, prevention and control of infectious coryza

Edgardo Soriano Vargas*
Horacio Raúl Terzolo**

Abstract

In the present paper, the epizootiology of infectious coryza, an upper respiratory tract disease of poultry is reviewed. The disease is characterized by sneezing, nasal discharge and facial swelling. However, very virulent strains have also been described as causing lesions of pneumonia, airsacculitis and arthritis. Pathogenic mechanisms and virulence factors of etiologic agent, *Haemophilus paragallinarum*, identified at the date, are described. Furthermore, particular emphasis is made concerning the diagnosis of the disease and identification of the causal agent. Also, prevention and control strategies of the disease are reviewed.

Key words: INFECTIOUS CORYZA, *HAEMOPHILUS PARAGALLINARUM*, POULTRY DISEASES, CHICKENS.

Resumen

Aquí se revisa la epizootiología de la coriza infecciosa, enfermedad del tracto respiratorio superior de los pollos, que se caracteriza por estornudo, descarga nasal e inflamación facial. Se han descrito cepas muy virulentas que causan lesiones de neumonía, aerosaculitis y artritis. Se describen los mecanismos de patogenicidad y virulencia de *Haemophilus paragallinarum*. Además, se enfatiza el diagnóstico de la enfermedad e identificación del agente causal, y se revisan estrategias de prevención y control de la enfermedad.

Palabras clave: CORIZA INFECCIOSA, *HAEMOPHILUS PARAGALLINARUM*, ENFERMEDADES DE LAS AVES, POLLOS.

Recibido para su publicación el 11 de diciembre de 2003 y aceptado el 3 de junio del 2004.

*Programa de Doctorado en Ciencias de la Producción y de la Salud Animal, Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia, Universidad Nacional Autónoma de México, 04510, México, D. F. Dirección actual: Centro de Investigación y Estudios Avanzados en Salud Animal, Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia, Universidad Autónoma del Estado de México, 50000, Toluca, Estado de México, México. E-mail: soriano@uaemex.mx

** Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria, CC 276, 7620, Balcarce, Argentina. E-mail: terzolo@balcarce.inta.gov.ar

Introduction

Infectious coryza is an upper respiratory tract disease of chickens, characterized by producing nasal discharge, sneezing, and facial swelling. The bacterium *Haemophilus paragallinarum* is the etiologic agent of the disease. Economic impact of disease result from losses in poultry, due to growth retardation, increased number of culls and predisposing to chronic complicated disease. Egg production is considerably drops in laying flocks.¹

Epizootiology

Natural and experimental hosts

Chicken (*Gallus gallus*) is the natural host for *H. paragallinarum* and birds of all ages are susceptible.¹ It has been reported that this bacterium was isolated from quail^{2,3} and some psittacines.^{4,5} In addition signs of coryza and sinusitis were observed in three experimentally infected turkeys, these lesions were similar to the ones observed in chickens inoculated with the same bacterial culture.⁶ However, other bacteriological conclusive studies showing evidence the presence and susceptibility to *Haemophilus paragallinarum* in other avian species have not been carried out. Rabbits, guinea pigs, mice, sparrows, ducks⁷ and pigeons⁶ are refractory to experimental infection.

Transmission, carriers, and vectors

The main reservoir of infection is the chicken itself, chronic or healthy carrier birds are both involved.⁸ Infectious coryza outbreaks are more frequent during the fall and winter.⁹ Sparrows (*Paser paser*) have implicating as vectors. Some epidemiological studies suggest air-borne transmission as a possible mechanism for introducing this microorganism into isolated farms.¹⁰

Incubation period

The incubation period of infectious coryza varies between 24 to 48 h after experimental inoculation of susceptible birds with an live culture of *H. paragallinarum* or infectious exudates. The incubation period may be variable according to each particular experimental exposure condition: 24 h, intrasinasal inoculation; 48 h, nasal instillation; 72 h, birds in cages; 4 days, infected-water contact, and 6 to 14 days by air-borne transmission.¹¹

Introducción

La coriza infecciosa es una enfermedad del tracto respiratorio superior de los pollos, se caracteriza por producir descarga nasal, estornudo e inflamación facial. El agente etiológico de esta enfermedad es la bacteria *Haemophilus paragallinarum*. El impacto económico de esta enfermedad radica en las pérdidas que ocasiona a la avicultura, debido a retraso del crecimiento, pérdida de peso, incremento en el número de aves eliminadas y predisposición a la enfermedad respiratoria crónica complicada. En gallinas de postura, la producción de huevo puede reducirse considerablemente.¹

Epizootiología

Hospederos naturales y experimentales

Los pollos y gallinas (*Gallus gallus*) son hospederos naturales de *H. paragallinarum*, susceptibles en todas las edades.¹ No obstante, existen informes del aislamiento de esta bacteria en codornices^{2,3} y psitácidos.^{4,5} Tres pavos mostraron signos de coriza y sinusitis similares a los observados en pollos desafiados experimentalmente con el mismo cultivo.⁶ Sin embargo, no se han efectuado estudios bacteriológicos definitivos que evidencien presencia y susceptibilidad de otras especies aviares a *H. paragallinarum*. Los conejos, cobayos, ratones, gorriones, patos⁷ y palomas⁶ son refractarios a la infección experimental.

Transmisión, portadores y vectores

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

Periodo de incubación

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

Signs

Characteristic signs of infectious coryza include serous or mucous nasal exudates, sneezing, swelling of infraorbital sinuses, facial edema, and conjunctivitis.¹ The swelling of wattles is mainly evident in males (Figure 1). Also, tracheal rales may be listened when the lower respiratory tract is affected.

In some cases, when *H. paragallinarum* causes respiratory disease together with other infectious agents, a severe clinical outcome may be produced. The most common agents are: *Mycoplasma sinoviae*,¹² *M. gallisepticum*,¹³ *Ornithobacterium rhinotracheale*,^{14,15} *Escherichia coli*, *Salmonella* spp, *Pasteurella* spp and infectious bronchitis virus,^{16,17} among others. Malkinson *et al.*¹⁸ reported cases of *H. gallinarum* associated with *Chlamydia psittaci* and smallpox virus in broiler breeders. However, association with *Pasteurella gallinarum* may be frequently found, a bacterium that may appear after the acute phase of infectious coryza, causing a severe purulent panophthalmia and caseous material contents into the paranasal sinuses.¹⁷

Chickens may have diarrhea, and feed and water consumption are usually decreased. A bad growing performance in broiler flocks may be registered. More commonly found is a marked egg production drop in laying hen flocks; in very severe cases a decreased of up to 58.7% have been reported.¹⁹

Morbidity and mortality

Clinically, classic infectious coryza is usually characterized by high morbidity and low mortality rates.¹ In addition, non-classic clinical outbreaks with high mortality caused by *H. paragallinarum* *per se* have also been reported. Losses due to persistent mortality and culling were up to 2%-5% in both growing and layer flocks.¹⁷ In these cases, *H. paragallinarum* was isolated from liver, kidney, and particularly from tarsus and internal contents



Signos

Los signos característicos de la coriza infecciosa incluyen exudado nasal seroso o mucoso, estornudo, inflamación de senos infraorbitarios, edema facial y conjuntivitis.¹ La inflamación de barbillas puede ser particularmente evidente en machos (Figura 1). También se puede escuchar estertor traqueal cuando las aves tienen afectado el tracto respiratorio inferior.

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

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

Morbilidad y mortalidad

La coriza infecciosa clásica está generalmente caracterizada por alta morbilidad y baja mortalidad.¹ Sin embargo, se ha informado de cuadros clínicos atípicos donde *H. paragallinarum* *per se* ha causado mortalidad. En parvadas de pollos de engorda y gallinas de postura, las pérdidas debidas a mortalidad persistente y eliminación de aves fue de 2%-5%.¹⁷ En estos casos, *H. paragallinarum* fue aislado a partir de hígado, riñón y especialmente de la articulación del tarso y globos oculares, ello indica septicemia. Droual *et al.*²⁰ descri-

Figura 1. Pollo infectado artificialmente con *Haemophilus paragallinarum*. Se observa coriza, inflamación de seno infraorbitario y edema de barbilla

Artificially infected chicken *Haemophilus paragallinarum*. Coryza, swelling of infraorbital sinus, and wattle edema are observed.

of eyeballs indicatinga septicemia. Droual *et al.*²⁰ described condemnations of broilers in the slaughterhouse, mainly due to fibrinopurulent cellulitis lesions of the head and wattles together with airsacculitis. Bland *et al.*²¹ informed the most severe infectious coryza outbreak recorded until now in a laying complex located the California area. During a period of 13 weeks, mortality varied from 8% up to 64% and egg production dropped from an average of 77% to only 15%.

Macroscopic and microscopic findings

Chickens affected with *H. paragallinarum* have serous or mucous exudates in their nasal cavity and infraorbital sinuses.²² In the mucosal membranes of these tissues, hydropic or edematous inflammation (acute catarrhal inflammation) is observed. Also, subcutaneous edema in the periorbital area and wattles is observed (Figure 2).²³ Microscopic changes are limited to mucosal surfaces of nasal passages and infraorbital sinuses. The primary lesion consist of a citotoxic effect in the epithelium and a marked stimulation of intraepithelial goblet cells activity.²⁴ Also, a marked mast cell infiltration into the mucosal membranes of the nasal cavity is observed. The secreted products from mast cells, heterophils and macrophages are responsible for the severe vascular changes and cellular damage that lead to coryza.²³ However, it is still not well understood the pathogenesis of *H. paragallinarum* in the infectious coryza.

Molecular epizootiology

In addition to serotyping and biotyping, Blackall *et al.*⁸ included restriction endonucleases to study 16 cases of infectious coryza from northern New South Wales, Australia. These endonuclease patterns allo-

bieron descartes en matadero de pollos de engorda por lesiones de celulitis fibrinopurulenta de la cabeza y barbillas y aerosaculitis. Bland *et al.*²¹ informaron que en un complejo de gallinas de postura en California, durante un periodo de 13 semanas, la mortalidad varió del 8% al 64% y la producción de huevo cayó de un promedio de 77% a tan sólo 15%, en el brote de coriza infecciosa más severo registrado a la fecha en esta área.

Hallazgos macroscópicos y microscópicos

En pollos infectados con *H. paragallinarum*, la cavidad nasal y senos infraorbitarios presentan exudado seroso o mucoso.²² Las membranas mucosas de estos sitios se observan congestionados con inflamación hídrica o edematosa (inflamación catarral aguda). También se observa edema en el tejido subcutáneo de la región periorbital y de las barbillas.²³ Los cambios microscópicos se limitan principalmente a la mucosa de los pasajes nasales y senos infraorbitarios. La lesión básica observada es un infiltrado inflamatorio de la mucosa respiratoria con indicación de un efecto citotóxico en el epitelio y marcada estimulación de las glándulas mucosas intraepiteliales.²⁴ También se observa infiltración marcada de mastocitos en la lámina propia de las membranas mucosas de la cavidad nasal. Los productos de los mastocitos, heterófilos y macrófagos pueden ser responsables de los cambios vasculares severos y el daño celular que conduce a coriza.²³ Sin embargo, aún no se comprende bien la patogenia de *H. paragallinarum* en la coriza infecciosa.

Epizootiología molecular

De forma adicional a pruebas de serotipificación y biotipificación, Blackall *et al.*⁸ incluyeron endo-

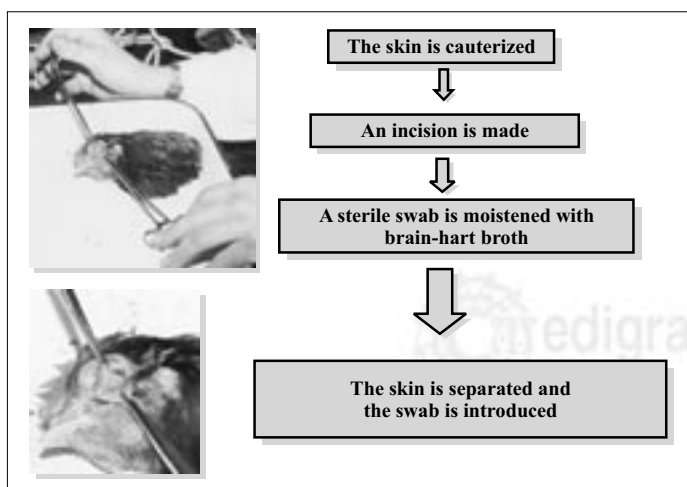


Figura 2. Descripción del procedimiento para la obtención de *Haemophilus paragallinarum* a partir de senos infraorbitarios de aves con coriza infecciosa. Detailed *Haemophilus paragallinarum* isolation procedure from an infraorbital sinus of infectious coryza diseased chicken.

wed the recognition of three groups of related outbreaks. These results showed that the farms may have a chronic infection caused by an unique *H. paragallinarum* strain, which intermittently appears. This study also showed that replacement pullets are the main source of infectious coryza.

Similarly Mifflin *et al.*,²⁵ characterized a total of 15 NAD-independent *H. paragallinarum*, isolated since 1989 in South Africa by means of serotyping, biotyping, restriction endonuclease analysis and ribotyping. All isolates were serovar A and showed an unique restriction endonuclease and ribotyping pattern, which was different from the ones obtained when NAD-dependent isolates were analyzed before 1989. Based on these results, the authors suggested that the NAD-independent isolates belong to a classical strain clon. Similarly, the molecular epidemiological ribotyping was performed for 12 serovar A *H. paragallinarum* strains, isolated from five infectious coryza outbreaks in the Chinese Province of Hebei.²⁶ The results showed four ribotyping patterns, which were matched to the epidemiological history of these isolates, confirming the existence of *H. paragallinarum* genetic diversity in China.

A total of 15 Blackall serovar isolates of *H. paragallinarum* were studied by means of the ERIC-PCR technique in Mexico by Soriano and Blackall.²⁷ Two ERIC profiles were showed for the serovar A-1 isolates; one for the serovar A-2 isolate; three for serovar B-1 isolates, and two for the serovar C-2 isolates. A relationship between the serovar and the ERIC profile was established based on the origin of isolates. The authors concluded that the ERIC-PCR technique could be a rapid laboratory tool for epidemiological characterization of *H. paragallinarum*.

Pathogenicity and virulence

As previously mentioned, the hemagglutinating antigens, or hemagglutinins, are structures that are mainly related to the antigenicity, pathogenicity, and immunogenicity of *H. paragallinarum*. In this way, a non-hemagglutinating variant strain, which is unable to hemagglutinate (even after laboratory treatments or aging) is also unable to produce infectious coryza after instillation or inoculation of susceptible birds.^{28,29} Takagi *et al.*³⁰ purified this hemagglutinin, using affinity chromatography and monoclonal antibodies, and demonstrated its crucial immunogenic role when they achieved protection in susceptible birds challenged with a pathogenic strain by previously immunizing the birds with the purified hemagglutinin by intramuscular route. Furthermore, this active protection was completely dependent on the hemagglutination-inhibition antibodies present in

nucleasas de restricción en el estudio epidemiológico de 16 casos de coriza infecciosa en el norte de New South Wales, Australia. El perfil obtenido permitió reconocer tres grupos de brotes relacionados. Los resultados indicaron que las granjas pueden tener infección crónica causada por una sola cepa de *H. paragallinarum* que reaparece a intervalos. Este estudio también mostró la primera evidencia detallada de que las aves de reemplazo son la mayor fuente de coriza infecciosa.

De forma similar, Mifflin *et al.*²⁵ caracterizaron 15 aislamientos de *H. paragallinarum* independientes de NAD obtenidos a partir de 1989 en Sudáfrica, mediante serotipificación, biotipificación, análisis con endonucleasas de restricción y ribotipificación. Todos los aislamientos fueron serovariedad A y mostraron un único patrón en el análisis con endonucleasas de restricción y ribotipificación, que fue diferente a los patrones de aislamientos dependientes de NAD obtenidos antes de 1989. Basados en lo anterior, los autores sugirieron que los aislamientos independientes de NAD corresponden a clones de las cepas clásicas. En un estudio similar, mediante perfiles de ribotipificación se estableció la epidemiología molecular de 12 aislamientos (serovariedad A) de *H. paragallinarum* obtenidos en cinco brotes de coriza infecciosa en Hebei, China.²⁶ Los resultados obtenidos mostraron cuatro perfiles de ribotipificación, los cuales se correspondieron con la historia epidemiológica de los aislamientos, confirmando que existe diversidad genética en la población de *H. paragallinarum* de ese país.

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

Patogenicidad y virulencia

Los antígenos hemoagglutinantes, o hemoagglutininas, son las estructuras principalmente relacionadas con la antigenicidad, patogenicidad e inmunogenicidad de *H. paragallinarum*. Así, una cepa variante que no hemoaglutina, aun después de tratamientos o envejecimiento, tampoco produce coriza cuando se instila o inocula en aves susceptibles.^{28,29} Takagi *et al.*³⁰ purificaron esta hemoaglutina mediante el uso de cromatografía de afinidad y anticuerpos monoclonales, y demostraron su rol inmunogénico crucial cuando lograron protección en aves susceptibles desafiadas con una cepa patógena previamente inmunizando a las aves con la hemoaglutina purificada por vía intramuscular. Además, esta protección activa fue completamente dependiente de los anticuerpos anti-hemoagglutinación presentes en

the blood serum. Takagi *et al.*^{31,32} demonstrated a solid passive protection against challenges with the homologous strain when specifically against, mouse monoclonal antibodies hemagglutinin were administered into the peritoneal cavity of chickens. Despite all these studies were carried out using 221 (A-1) strain, it is very likely that these results could be extended and applied to the hemagglutinins of most *H. paragallinarum* strains.

Bacterial adherence to epithelial cells is regarded as the first step of infection of the mucosal surfaces. Adhesins are structures that mediate adhesion to the complementary cellular structures, the receptors.³³ Both *in vivo* and *in vitro* positive adherence of *H. paragallinarum* to chicken tracheal epithelial cells have been shown.^{34,35} The treatment by an homologous or heterologous adsorption of *H. paragallinarum* bacterial cells, either with rabbit or chicken antisera or with tracheal washings from immunized chickens, produce the complete loss of the hemagglutinating activity and adherence ability of this bacterium to chicken epithelial cells.³⁶ These results showed that the hemagglutinin antigens truly are the adhesins of *H. paragallinarum* and the hemagglutination-inhibition antibodies that exist in the tracheal washings really act as neutralizing antibodies. This fact indicates that the specific hemagglutinin receptors located in both the erythrocytes and the respiratory epithelial cells are the same, or very similar, confirming the importance of these hemagglutination tests which indirectly detect the pathogenic ability of a particular strain of *H. paragallinarum* to adhere to epithelial target cells. Following the same methodology it was showed that the main cellular receptor may be related to the carbohydrate D-mannose.³⁷ Among several Pasteurellaceae members, this carbohydrate has also been identified as the main cellular receptor.³¹

Recently, Terry *et al.*³⁸ reported haemocin production, a bacteriocin, from *H. paragallinarum*. Furthermore, a chromosomal gene encoding for this haemocin, as well as a plasmid carrying this gene in an Australian isolate was identified. As pointed out by these authors, haemocin production by *H. paragallinarum* could be an important colonization factor of the chicken respiratory sinuses. They showed that isolates of *Pasteurella avium*, *P. volantium* and "P. species A", are all of them regarded as non-pathogenic bacteria found in the respiratory tract of chickens, were all sensitive to this haemocin.

H. paragallinarum is regarded as a primary pathogenic agent for susceptible chickens.¹ However, specific discrepancies about the pathogenicity of the 0222 (serovar B-1) strain have subsisted. A lack of agglutinin antigens and a non-pathogenic outcome in challenged chickens were reported by Sawata *et*

tografía de afinidad y anticuerpos monoclonales y demostraron su importancia crucial en la inmunogenicidad al inocular con la hemoaglutinina purificada aves susceptibles por vía intramuscular. De este modo se logró protección frente a desafíos con una cepa patógena. Es más, esta protección activa depende totalmente de la presencia de anticuerpos humorales inhibidores de la hemoaglutinación en el suero sanguíneo. Además, Takagi *et al.*^{31,32} demostraron que se puede conferir una sólida protección frente al desafío con la misma cepa, administrando por vía intraperitoneal anticuerpos monoclonales de ratón, específicamente dirigidos contra las hemoaglutininas; esta vez, mediante un mecanismo de inmunidad pasiva. Si bien estos últimos estudios se realizaron con la cepa 221 (A-1), estos resultados son, con certeza, generales y por extensión pueden ser aplicados a las hemoaglutininas de la mayoría de las cepas de *H. paragallinarum*.

Se considera que la adherencia bacteriana a las células epiteliales es el primer paso en el proceso de infección de las superficies mucosas. Las adhesinas son las estructuras bacterianas que median la adherencia a estructuras celulares complementarias, los receptores.³³ Con base en lo anterior, se ha mostrado adherencia *in vivo* e *in vitro* de *H. paragallinarum* a células epiteliales traqueales de pollo.^{34,35} De forma similar, se ha mostrado que bacterias de *H. paragallinarum*, adsorbidas de manera homóloga o heteróloga con antiseros de conejo o pollo y lavados traqueales de aves inmunizadas, perdieron la actividad hemoaglutinante y capacidad de adherencia a las células epiteliales.³⁶ Los resultados obtenidos en este estudio indican que los antígenos hemoaglutinantes son las adhesinas de *H. paragallinarum* y que los anticuerpos inhibidores de la hemoaglutinación presentes en los lavados traqueales actúan también como anticuerpos neutralizantes. Este hecho indica que seguramente los receptores específicos para las hemoaglutininas de los eritrocitos y las células epiteliales del tracto respiratorio son los mismos, o muy similares, lo cual una vez más confirma la importancia de las pruebas de hemoaglutinación, las cuales, indirectamente, detectan la capacidad de una determinada cepa para adherirse a las células blanco sobre las que *H. paragallinarum* específicamente dirige su acción patógena. Siguiendo esta metodología, también se mostró que el receptor celular puede ser principalmente del tipo D-manosa.³⁷ Se ha comprobado que este carbohidrato es también el receptor celular para algunos miembros de la familia Pasteurellaceae.³¹

Recientemente, Terry *et al.*³⁸ informaron de la producción de hemocina, una bacteriocina, por parte de *H. paragallinarum*. Adicionalmente identificaron el

*al.*³⁹ Conversely, Rimler *et al.*^{40,41} showed that 0222 and Spross (B-1) strains were both pathogenic in challenged chickens, representing one of the three serovar-related, immunovars identified by the slide agglutination tests. Similarly, Thornton and Blackall⁴² found that 0222 strain produced serovar-specific, agglutination antibodies. The pathogenicity of five serovar B strains that included strains 0222 and Spross, was investigated by Yamaguchi *et al.*⁴³ Contrasting to the pathogenicity observed with the other three strains, they found that 0222 strain did not produce any clinical signs of infectious coryza. Nevertheless, lesions in the infraorbital sinuses (thickness of mucosal membranes with yellowish exudate) and isolation of the challenged microorganism were observed. These results show that 0222 strain is able to produce infection and also point out that it is probably a low virulent strain. However, definitive studies have not been carried out.

Bragg *et al.*⁴⁴ recorded several virulence degrees in chickens challenged with South African isolates of serovars A-1, B-1, C-2, and C-3. The most severe disease signs in challenged chickens were produced by the serovar C-3. In a similar way, Soriano *et al.*⁴⁵ independently challenged chickens with each of the nine Blackall's serovar reference strains and showed that the most severe clinical signs of infectious coryza were observed when the chickens were inoculated with the serovars C-1 and C-3.

Sandoval and Terzolo²⁹ developed different experimental disease models to study the pathogenicity, horizontal spread and invasiveness of several isolates from Argentina, belonging to serovars A, B, and C. They showed that the serovar B strains were consistently very pathogenic causing serious acute coryza lesions with a high degree of spread and invasiveness. On the other hand, serovar A and C strains showed a different pattern: some of them were very virulent, spreading and invasive; others were pathogenic but diffuse slowly; some strains showed low pathogenicity and even a few field strains were found to be completely non-pathogenic.

Horner *et al.*⁴⁶ suggested that NAD-independent isolates may more frequently cause airsacculitis than typical *H. paragallinarum* isolates. Furthermore, it is thought that these field NAD-independent isolates are so different from typical strains included in the standard vaccines that they may produce failures.⁴⁷

Virulence of NAD-independent isolates of *H. paragallinarum* has been also investigated. Bragg⁴⁸ challenged groups of chickens with NAD-independent isolates and evidenced its pathogenicity. However, the clinical signs observed in these chickens were less severe than the ones produced when chickens were challenged with NAD-dependent strains.

gen cromosómico que codifica para esta hemocina, así como un plásmido que porta este gen un aislamiento de Australia. Los autores mencionan que la hemocina producida por *H. paragallinarum* puede ser importante en la colonización de los senos respiratorios de los pollos, ya que encontraron que aislamientos de *Pasteurella avium*, *P. volantium* y *P. especie A*, todos ellos considerados bacterias gramnegativas no patógenas y que se encuentran en el tracto respiratorio superior de pollos que sufren enfermedad respiratoria debida a otros agentes, fueron sensibles a esta hemocina.

Se considera que *H. paragallinarum* es un agente patógeno primario en aves susceptibles.¹ Sin embargo, de manera específica han existido discrepancias en cuanto a la patogenicidad de la cepa 0222 (serovariedad B-1). Sawata *et al.*³⁹ informaron que esta cepa carecía de antígenos aglutinantes y que no era patógena en pollos desafiados. Sin embargo, Rimler *et al.*^{40,41} mostraron que las cepas 0222 y Spross (B-1) fueron patógenas en pollos desafiados y que representaba una de las tres inmunovariedades relacionadas con las serovariedades identificadas por pruebas de aglutinación en placa. De forma similar, Thornton y Blackall⁴² encontraron que la cepa 0222 había producido anticuerpos aglutinantes específicos de serovariedad. Yamaguchi *et al.*⁴³ investigaron la patogenicidad de cinco cepas serovariedad B, las cuales incluyeron las cepas 0222 y Spross. A diferencia de las otras tres cepas, la cepa 0222 no produjo signos clínicos de coriza infecciosa. Sin embargo, se observaron lesiones (engrosamiento de membranas mucosas y exudado amarillento) en senos infraorbitarios y aislamiento del microorganismo de desafío. Estos resultados evidencian que la cepa 0222 es capaz de producir infección e indican, probablemente, que es una cepa de baja virulencia. Sin embargo, no se han conducido los estudios definitivos al respecto.

Bragg *et al.*⁴⁴ registraron diferentes grados de virulencia en pollos desafiados con aislamientos sudfricanos de las serovariedades A-1, B-1, C-2 y C-3. El aislamiento serovariedad C-3 produjo los signos más graves en las aves desafiadas. De forma similar, Soriano *et al.*⁴⁵ desafiaron grupos de pollos de manera independiente con las nueve cepas de referencia del esquema de Blackall, e informaron que los signos más graves de coriza infecciosa se observaron en aves desafiadas con las cepas de las serovariedades C-1 y C-3.

Sandoval y Terzolo²⁹ estudiaron diferentes cepas regionales de las serovariedades A, B y C de Argentina, mediante el desarrollo de modelos de reproducción de la enfermedad para evaluar su patogenicidad, difusión horizontal e invasividad. Se demostró que las cepas B fueron consistentemente patógenas y causan lesiones de coriza muy aguda, siempre con alto grado

It is important to point out that NAD-independency could be acquired by transformation by means of a plasmid, as reported by Bragg *et al.*⁴⁹ Similarly, a NAD-dependent C-3 strain was transformed into a NAD-independent strain by means of electroporation technique carried out by Taole *et al.*⁵⁰ Less severe infectious coryza signs were observed when chickens were challenged with the transformed strain. The mechanism by which virulence is affected in this process was not explained. An interesting practical application of this transformation could be a possible reduction in the vaccine production costs by the use of NAD-independent strains in industrial cultures. In fact, as was demonstrated by Bragg *et al.*,⁵¹ these transformed strains maintain unchangeable the production of hemagglutinins, basic antigens to achieve a good vaccine protection. However, the introduction of infective plasmids into countries free from NAD-independent strains arise serious biosecurity problems, particularly taking into account that in South Africa also exist NAD-independent strains of *P. avium*, *P. volantium* and “*Pasteurella* species A” in chickens,⁴⁷ and even in *H. parainfluenzae* strains isolated from human beings,⁵² indicating that in this country it may have occurred a widespread infection of this plasmid.⁵³

It has been reported that the capsule of *H. paragallinarum* could be involved in pathogenicity and virulence of this bacterium.⁵⁴⁻⁵⁷ Nevertheless, definitive studies showing the role of the capsule in the pathogenesis of *H. paragallinarum* have not been carried out.

Increased gallinacin-3 expression in experimentally *H. paragallinarum* infected chickens was recently reported.⁵⁸ Gallinacin-3 is an epithelial β -defensin involved in the innate immunity by means of antimicrobial properties of the epithelial cells and tracheal secretions. It could be a limiting factor for tissue dispersion of *H. paragallinarum* in the respiratory tract and for the colonization processes in chickens.

Diagnosis

Isolation and identification of the agent

Three to five birds with acute coryza signs are recommended for bacteriological isolation. In addition, strict sterility is recommended for sampling. Once the bird has been euthanatized, the skin of the infraorbital area is cauterized and an incision is made onto the corresponding infraorbital sinus. The skin is separated and a sterile swab is introduced, previously moistened into nutritive broth or phosphate buffer solution at neutral pH (Figure 2). Due to the reduced viability of *H. paragallinarum*, it is recommended to

de contagio e invasividad. En cambio las cepas A y C mostraron distinto comportamiento: algunas fueron muy virulentas, difusoras e invasivas; otras fueron patógenas, pero sólo difundían muy lentamente, y otras fueron poco patógenas e inclusive se encontraron unas pocas cepas de campo que mostraron ser totalmente apatógenas.

Horner *et al.*⁴⁶ sugirieron que los aislamientos independientes de NAD pueden causar aerosaculitis de manera más frecuente que los *H. paragallinarum* típicos. Además, se especula que los aislamientos independientes de NAD pueden ser diferentes como para producir fallas de las bacterinas actualmente empleadas.⁴⁷

La virulencia de aislamientos de *H. paragallinarum* independientes de NAD también ha sido investigada. Bragg⁴⁸ desafió grupos de aves con aislamientos independientes de NAD en los cuales su patogenicidad fue evidente. Sin embargo, los signos de coriza infecciosa fueron menores que los observados en aves desafiadas con cepas dependientes de NAD. Es importante destacar que Bragg *et al.*⁴⁹ han demostrado que la independencia de NAD puede ser adquirida por transformación mediante la adquisición de un plásmido. De forma similar, Taole *et al.*⁵⁰ transformaron una cepa serovariedad C-3 dependiente de NAD en independiente de este factor, mediante la técnica de electroporación. Los signos de coriza infecciosa fueron menos graves en las aves que fueron desafiadas con la cepa transformada. No se pudo explicar el mecanismo por el cual la virulencia es afectada por este proceso. Lo interesante de esta transformación es su posible aplicación práctica, ya que sería factible reducir el costo de producción de las bacterinas al usar cepas que no requieren de la adición de NAD en los cultivos industriales. De hecho, Bragg *et al.*⁵¹ demostraron que estas cepas transformadas mantienen inalterables su capacidad de producir hemoagglutininas, antígenos fundamentales para lograr una buena protección en la bacterinización. Sin embargo, la posible introducción de plásmidos infectivos en países carentes de cepas independientes de NAD, plantea muy serios problemas de bioseguridad, sobre todo si se toma en cuenta que en Sudáfrica, por ejemplo, además de *H. paragallinarum*, también existen cepas NAD independientes de *P. avium*, *P. volantium* y “*Pasteurella especie A*” en las aves,⁴⁷ e inclusive de *H. parainfluenzae* en seres humanos,⁵² lo que indica que podría existir una posible infección por este plásmido.⁵³

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

perform the culture within five hours of the euthanasia. Both agar base or Columbia agar base plates plus 7% bovine or sheep blood with the addition of *Staphylococcus* spp as nurse colony could be used for culturing the swabs. Chocolate agar or any of the aforementioned base agar plus haemolyzed blood may be used instead of the nurse colony. As we have previously mentioned, bigger colonies are obtained using this method. A procedure that allows differentiation and isolation of pure *H. paragallinarum* cultures, even when the accompanying bacterial flora is complex, is the use of a selective media with added antibiotics and incubated at 37°C for 48 h into a microaerophilic atmosphere. The microaerophilic atmosphere may be obtained by means of the classical candle jar, consuming part of oxygen contained into a hermetic closed container, or by the usage of different available commercial products, to generate either CO₂ or the commercial atmospheres for isolating bacteria of the *Campylobacter* genus.⁵³ Biochemical and enzymatic tests have to be performed to identify *H. paragallinarum*. NAD-dependency or independency does not allow the differentiation of *H. paragallinarum* from other microorganisms of the *Pasteurella* genus, particularly in places where NAD-independent bacteria also exist.⁵⁹ Up to now, NAD-independent strains of *H. paragallinarum* from South Africa (serovars A-1 and C-3)^{60,61} and from Mexico (serovars B-1 and C-2) have only been reported.⁶²

Serological identification

A number of serological tests have been reported for the detection of antibodies in chickens against *H. paragallinarum*: gel precipitation,⁶³ slide agglutination,⁶⁴ latex agglutination⁶⁵ and ELISA.⁶⁶⁻⁶⁸ However the hemagglutination-inhibition test is the most widely used.⁶⁹

Several monoclonal antibody panels have been used for the identification of *H. paragallinarum*, mainly by hemagglutination-inhibition and ELISA tests.⁷⁰⁻⁷⁴ Monoclonal antibodies that recognized 49 serovar A isolates from Japan⁷⁷ and more than 20 serovar A^{71,72} isolates from several parts of the world, failed to recognize 4 out of 10 serovar A75 isolates from Argentina and 6 out of 14 serovar A76 isolates from Brazil, showing that these Latin American strains have certain antigenic differences.

Molecular identification

A specific polymerase chain reaction (PCR) for *H. paragallinarum* was developed by Chen *et al.*⁷⁸ This is a rapid test and results could be obtained in approximately 6 h. Also, both NAD dependent or independent

Un estudio reciente mostró que pollos infectados de manera experimental con *H. paragallinarum*, incrementaron la expresión de gallinacina-3, una β -defensina epitelial que contribuye a la inmunidad innata mediante propiedades antimicrobianas propias de las células epiteliales y secreciones traqueales.⁵⁸ Los autores mencionan que es probable que éste sea un factor limitante de la distribución tisular de *H. paragallinarum* en el proceso de infección y colonización del tracto respiratorio de los pollos.

Diagnóstico

Aislamiento e identificación del agente

Para el aislamiento bacteriológico se recomienda el estudio de tres o cinco aves con signos agudos de coriza. El procedimiento de toma de muestras se debe efectuar con estricta esterilidad. Para ello, una vez sacrificada el ave, se cauteriza la piel de la región infraorbital y se practica una incisión sobre el seno infraorbitario correspondiente, se separa la piel en la incisión y se introduce un hisopo estéril humedecido en un caldo nutritivo o solución tamponada de fosfatos a pH neutro (Figura 2). Lo más recomendable es el cultivo antes de las 5 h debido a la reducida viabilidad de *H. paragallinarum*. Para la siembra de los hisopos pueden utilizarse placas en base de agar, o agar Columbia con 7% de sangre de bovino u ovino con el agregado de cepas nodriza de *Staphylococcus* spp, las cuales eliminan el factor V, o bien usar agar chocolate o agar con sangre hemolizada, en vez de las cepas nodriza. Como se refirió anteriormente, con este último procedimiento se obtienen colonias mucho más grandes. El uso de medios de cultivo selectivos con antibióticos e incubados a 37°C durante 48 h en una atmósfera microaerofílica, es un procedimiento que permite diferenciar y aislar a *H. paragallinarum* en cultivo puro, aun cuando la flora bacteriana sea compleja. La atmósfera microaerofílica puede obtenerse mediante el clásico método de incubación de las placas en un recipiente con vela, la cual se apaga al consumirse parte del oxígeno contenido en un recipiente herméticamente cerrado, o bien usando los distintos productos comerciales disponibles, tanto para generar CO₂ como para las atmósferas destinadas al género *Campylobacter*.⁵³ La identificación de *H. paragallinarum* debe efectuarse mediante pruebas bioquímicas y enzimáticas diferenciales. La dependencia o independencia de NAD no permite inferir si se trata de *H. paragallinarum* o de otros microorganismos del género *Pasteurella*, sobre todo en los lugares donde existen cepas independientes de NAD.⁵⁹ A la fecha, únicamente se ha informado el aislamiento de *H. paragallinarum* independientes de NAD en Sudá-

isolates can be identified.⁷⁹ This test is called HP-2 PCR and use the following primers that amplify a 0.5 kb fragment: N1, 5' TGA GGG TAG TCT TGC ACG CGA AT 3' and R1, 5' CAA GGT ATC GAT CGT CTC TCT ACT 3'. This technique was developed in Australia and have been successfully transferred to South Africa,⁷⁹ China⁸⁰ and Mexico.⁸¹ Samples directly obtained from the infraorbital sinuses of experimentally infected chickens have shown excellent results in further studies.⁷⁸ Similarly, positive results are obtained when samples are stored at 4° or -20°C for 180 days.⁸²

Molecular characterization

The restriction endonucleases BamHI, EcoRI HindIII and SmaI were evaluated for DNA characterization of *H. paragallinarum* by Blackall *et al.*⁸³ More fragments and discrimination ability among the studied isolates were obtained when the enzyme HindIII was used.

The PCR development for *H. paragallinarum* was based on the creation of a genomic library for Modesto (serovar C-2) strain.⁷⁸ Based on the study of this genomic library, four probes that specifically reacted with *H. paragallinarum* were identified. None of these probes reacted neither with bacteria of the *Pasteurella* and *Actinobacillus* genus, nor with *M. gallisepticum* and *M. synoviae*. PCR primers were designed by using the partial sequence of the smallest probe (P601, 1.8 kb). An enterobacterial repetitive intergenic consensus-based PCR (ERIC-PCR) that identified 18 ERIC patterns among 39 isolates and reference strains of *H. paragallinarum* was reported by Khan *et al.*⁸⁴ With exception of the Australian HP14 (A-4) and HP60 (C-4) reference strains that shared the same pattern, each isolate or reference strain gave an unique ERIC pattern. However, in a similar study that included both aforementioned Australian reference strains, Soriano and Blackall²⁷ found differences in the ERIC patterns of these two strains.

Recently, the gene encoding for a hemagglutinin of *H. paragallinarum*, HagA, was identified and sequenced by Hobb *et al.*⁸⁵ A little variation of the sequence of 11 reference strains was shown. A higher variation in the amino acids sequence was expected because the hemagglutinin is the main antigen involved in serotyping. However, no correlation was observed between these variations and the serological groups of the strains. As will be mentioned afterwards, probably the HagA gene encodes for a common hemagglutinin identified in *H. paragallinarum* strains.

Differential diagnosis

A confident diagnosis of infectious coryza is being

frica (serovariedades A-1 y C-3)^{60,61} y México (serovariedades B-1 y C-2).⁶²

Identificación serológica

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

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

Identificación molecular

Chen *et al.*⁷⁸ desarrollaron una prueba de reacción en cadena de la polimerasa (PCR, por sus siglas en inglés, *polymerase chain reaction*), específica para *H. paragallinarum*. Esta prueba es rápida y los resultados se obtienen aproximadamente en 6 h. Asimismo, identifica aislamientos tanto dependientes como independientes de NAD.⁷⁹ Esta prueba es llamada HP-2 PCR y utiliza los siguientes iniciadores: N1, 5' TGA GGG TAG TCT TGC ACG CGA AT 3' y R1, 5' CAA GGT ATC GAT CGT CTC TCT ACT 3', que amplifican un fragmento de 0.5 kb.⁷⁸ Esta prueba fue desarrollada en Australia y ha sido transferida con éxito a Sudáfrica,⁷⁹ China⁸⁰ y México.⁸¹ Estudios posteriores han mostrado excelentes resultados cuando las muestras incluidas en la prueba son tomadas directamente de senos infraorbitarios de aves infectadas de manera experimental.⁷⁸ De forma similar, se obtienen resultados positivos en muestras mantenidas a 4°C o -20°C durante 180 días.⁸²

Caracterización molecular

Blackall *et al.*⁸³ evaluaron las endonucleasas de restricción BamHI, EcoRI HindIII y SmaI en la caracterización de ADN cromosómico de *H. paragallinarum*. La enzima HindIII produjo el mayor número de fragmentos y mostró un mayor grado de discriminación entre los aislamientos estudiados.

more difficult because new bacteria or variants have been identified in the recent years. One of these microorganisms is *O. rhinotracheale*, bacterium identified in Mexico and other countries.^{14,15} A coryza-like disease, characterized by growth retardation, increased mortality and a significant drop in egg production are produced by this Gram negative bacterium. Airsacculitis and pneumonia are the main observed lesions. In most of the countries, differentiation of *O. rhinotracheale* and *H. paragallinarum* it is not difficult. However, in places like South Africa^{40,60,61} and Mexico,⁶² where NAD-independent *H. paragallinarum* coexist together with *O. rhinotracheale*, biochemical tests and carbohydrate fermentation patterns are required to distinguish both causal agents in coryza-like outbreaks. In addition, NAD-dependent and independent strains of *P. volantium*, *P. avium* and *Pasteurella* sp taxon A are also involved in respiratory disease suggestive of infectious coryza.⁴⁷ The swollen head syndrome caused by turkey rhinotracheitis (TRT) virus in broiler chickens have also to be differentiated. It has been occasionally described that hypovitaminosis A and chicken smallpox may produce coryza-like clinical signs.⁷

Arthritis of tarsus caused by *H. paragallinarum* is rarely found, but nevertheless in such cases differential diagnosis from other bacteria or viruses is required.⁸⁶

Prevention and control

Immunity and vaccines

Vaccination of susceptible chicken flocks is the most efficacious preventive practice against infectious coryza. Experimental models using susceptible chickens have been developed to evaluate cross-protection among different serovars and the protection afforded by either experimental or commercial vaccination programs. In these models the chickens are first vaccinated with the commercial vaccines to be tested and/or with monovalent vaccines prepared with the same challenge strains to be studied and then, after allowing a period for developing active immunity, different flocks of vaccinated and unvaccinated chickens are challenged by intrasynusal or nasal instillation. Protection is regarded as the percentage of chickens without disease, according to an established criterion, and is evaluated at the second or third day post-challenge. Evaluation is based on a strict criterion, a chicken is regarded as diseased if the following features are found: clinical signs of infectious coryza, mucus in one or both infraorbital sinuses, and isolation of *H. paragallinarum* in one or two sinuses.^{87,88} Regarding the clinical signs of coryza they are classified into four degrees of which degrees

La creación de una genoteca de la cepa Modesto (serovariedad C-2) sentó las bases del desarrollo de la prueba de PCR.⁷⁸ El estudio de esta genoteca identificó cuatro sondas que reaccionaron de manera específica con *H. paragallinarum*. Ninguna de las sondas reaccionó con bacterias de los géneros *Pasteurella* y *Actinobacillus*, o *M. gallisepticum* y *M. synoviae*. Se obtuvo la secuencia de la sonda más pequeña (P601, 1.8 kb) que permitió el diseño de los iniciadores para la prueba de PCR. Basada en el empleo de esta técnica para el consenso intergénico repetitivo de enterobacterias (ERIC-PCR, por sus siglas en inglés, *enterobacterial repetitive intergenic consensus*), Khan *et al.*⁸⁴ identificaron 18 patrones ERIC en 39 aislamientos y cepas de referencia de *H. paragallinarum*. Mencionan que todas las cepas de referencia mostraron un patrón ERIC único, excepto las cepas HP14 (A-4) y HP60 (C-4), procedentes de Australia. Sin embargo, en un estudio similar, Soriano y Blackall²⁷ encontraron diferencias en los patrones ERIC obtenidos para estas cepas.

Recientemente, Hobb *et al.*⁸⁵ aislaron, identificaron y obtuvieron la secuencia del gen HagA que codifica para una hemoaglutinina de *H. paragallinarum*. La secuencia de 11 cepas de referencia reveló un pequeño grado de variación entre las cepas. Como la hemoaglutinina es el principal antígeno de serotipificación, se esperaba encontrar variaciones en la secuencia de aminoácidos. Sin embargo, ninguna de las variaciones se correlacionó con los grupos serológicos de las cepas. Como se hará mención posteriormente, es probable que el gen HagA codifique para una hemoaglutinina común identificada en cepas de *H. paragallinarum*.

Diagnóstico diferencial

En años recientes se han identificado nuevas bacterias o variantes en las aves, lo que hace más difícil el diagnóstico confiable de coriza infecciosa. Uno de estos microorganismos es la bacteria *O. rhinotracheale*, que ha sido identificada en México y otros países.^{14,15} Esta bacteria gramnegativa produce un cuadro corizoide caracterizado por retraso del crecimiento, incremento en la mortalidad y disminución considerable de la producción de huevo. Las lesiones principalmente observadas son aerosacculitis y neumonía. La diferenciación entre *O. rhinotracheale* y *H. paragallinarum* no es difícil en la mayoría de los países. Sin embargo, en Sudáfrica^{40,60,61} y México,⁶² donde están presentes *H. paragallinarum* independientes de NAD, se requieren pruebas bioquímicas y patrones de fermentación de carbohidratos para establecer el agente causal en cuadros corizoides. Otros microorganismos implicados en pollos con enfermedad sugestiva de coriza infecciosa son: *P. volantium*, tanto dependiente

2, 3, and 4 are considered to be coryza (positive) in sensu estricto, whereas degrees 0 and 1 are both considered to be negative (Figures 3 and 4).

It is widely accepted that the three Blackall serogroups represent three different immunovars.⁸⁹ The accepted dogma is that there is no cross-protection between serovars of these serogroups. Recently, the cross-protection among all the nine reference strains of *H. paragallinarum* of Blackall's scheme was evaluated in vaccination/challenge trials by Soriano *et al.*⁴⁵ These results confirmed that the three recognized immunovars are different. However, partial cross-protection among serovars of the three serogroups was observed. These results allow the obtainment of preventive strategies against infectious coryza. Nowadays bivalent (A-1 and C-1) and trivalent (A-1, B-1, and C-2) infectious coryza vaccines are universally used. Nevertheless up to now, some discrepancies about serovar B protection conferred by bivalent vaccines still subsist.^{69,90} However, the need to use trivalent vaccines in areas where serovar B isolates are

como independiente de NAD, *P. avium*, tanto dependiente como independiente de NAD y *Pasteurella* sp taxon A, tanto dependiente como independiente de NAD.⁴⁷ En pollos de engorda la coriza debería ser diferenciada del síndrome de cabeza hinchada por virus de la rinotraqueítis infecciosa del pavo (TRT). También se cita que la hipovitaminosis A y la viruela, en ocasiones, pueden producir signos clínicos similares a coriza infecciosa.⁷

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

Prevención y control

Inmunidad e inmunógenos

La bacterinización de parvadas susceptibles es la estrategia más eficaz en la prevención de la coriza infecciosa. Se han desarrollado modelos experimen-

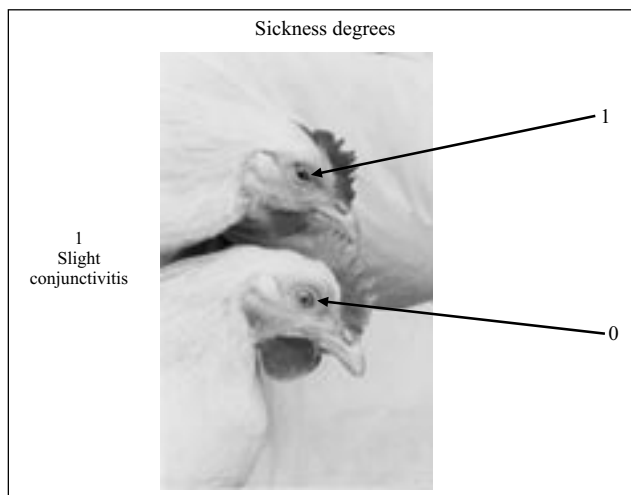


Figura 3. Grados de coriza infecciosa. Interpretación de pruebas de protección al segundo día después del desafío de aves inmunizadas. Grado 0: Aves inoculadas sin síntomas. Considerada negativa. Grado 1: Leve conjuntivitis. Considerada negativa

Sickness degrees of infectious coryza. Regarded as negative. Protection trial interpretation at second day post challenge of vaccinated chickens. 0, challenged chicken with no clinical signs. 1, Slight conjunctivitis.

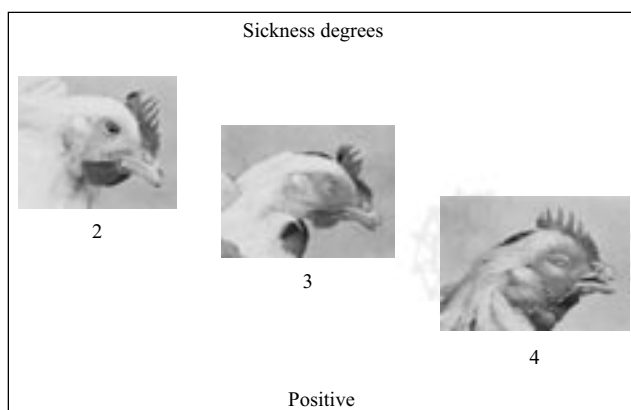


Figura 4. Grados de coriza infecciosa. Interpretación de pruebas de protección al segundo día después del desafío de aves inmunizadas. Grado 2: Conjuntivitis con el ojo parcialmente cerrado e hinchazón de zona periorbital y senos paranasales. Considerada positiva. Grado 3: Conjuntivitis con el ojo totalmente cerrado, párpados no adheridos e hinchazón notable de zona la periorbital y senos paranasales. Considerada positiva. Grado 4: Conjuntivitis con ojo totalmente cerrado, párpados adheridos e hinchazón muy severa de zona la periorbital y senos paranasales. Considerada positiva.

Degrees of infectious coryza. Regarded as positive. Protection trial interpretation at second day post challenge of vaccinated chickens. 2, Partial-closed eye with conjunctivitis and swelling of periorbital area and infraorbital sinus. 3, Conjunctivitis with totally closed eye, non adhered eyelids and notorious swelling of periorbital area and paranasal sinus. 4, Conjunctivitis with totally closed eye, adhered eyelids and severe swelling of periorbital area and paranasal sinus.

present have been established by a number of studies. For example, it has recently been reported that a bivalent, reference strain-based vaccine does not protect chickens challenged with a regional serovar B-1 isolate in Mexico.⁹¹ In other trials, Yamaguchi *et al.*⁹² reported that bivalent vaccines conferred good protection against Spross (B) strain, but failed to protect the chickens when they were challenged with regional South African B isolates. Furthermore, Terzolo *et al.*⁸⁸ demonstrated that even a trivalent vaccine, which have included a reference serovar B strain in the formulation, have failed to protect the immunized chickens when they were challenged with a local serovar B strain. In a comparative study, Bowles *et al.*⁹³ determined the genetic diversity and relationships of 118 strains from six continents by electrophoretic mobilization of eight metabolic, chromosomal gene-encoded enzymes. It is interesting to highlight that all the *H. paragallinarum* studied strains were classified into two heterogeneous clusters, while nine local, Argentinean serovar B strains, occupied a different cluster. These results demonstrated that the serovar B Argentinean strains are genetically distant from any of the other studied strains, regardless the serovar to which they belong. It means that the Argentinean regional serovar B strains are indeed quite different from any other serovar B strains isolated from several parts of the world. Recently, Jacobs *et al.*⁹⁴ reported that trivalent-commercial vaccinated chickens were protected against an Ecuadorian serovar C strain but not against serovar B strains isolated from several countries (Ecuador, Argentina, United States of America, and Zimbabwe). Nevertheless all these serovar B isolates were wholly recognized by antisera raised against Spross (B) and H-18 (C-1) strains. Furthermore in these trials, serovar B protection was increased when an Ecuadorian serovar B strain was included in the trivalent vaccine. Based on all these independent studies, serovar B isolates ("variants") may be considered to be different from the standard B strains. Therefore characterized "variant" B strains should be included in all formulation of vaccines to be used in the geographical areas in which "B variant outbreaks" occur. As up to now all these "variant" B strains are serologically indistinguishable from standard B reference strains, they are not yet regarded as a new immunovar. Anyway, the vaccine that included these "variant" B strains has been provisionally designated as a "tetravalent vaccines". It is very likely that many of these reported B isolates may constitute a new serovar (or serovars) into the serogroup B, in a similar way as the serogroups A or C include four serovars each. These results point out the necessity of performing new serovar hemagglutinin characterization of B isolates, as notorious antigenic differences

tales con aves susceptibles para evaluar la protección cruzada entre distintas serovariedades, o bien el grado de protección conferido por diferentes bacterinas experimentales o comerciales combinadas en planes de bacterinización. Estas pruebas consisten en inmunizar a las aves con las bacterinas comerciales a probar o bien con las bacterinas monovalentes elaboradas con las cepas a estudiar y transcurrido un periodo necesario para que las aves desarrollen inmunidad activa, éstas se desafían por vía intrasínusal o por instilación nasal. Al segundo o tercer días posdesafío se evalúa el grado de protección como el porcentaje de aves que no se enferman según un criterio establecido. Un criterio estricto es considerar que un ave está enferma cuando presenta signos clínicos de coriza infecciosa, mucus en uno o ambos senos paranasales y aislamiento de *H. paragallinarum* de uno o ambos senos paranasales.^{87,88} Además, los signos de coriza se pueden clasificar en cuatro grados; en un criterio estricto sólo se consideran con coriza (positivas) los grados 2, 3 y 4 (Figuras 3 y 4).

Es ampliamente reconocido que los tres serogrupos de Blackall representan tres inmunovariedades diferentes.⁸⁹ En general, el dogma aceptado es que no existe protección cruzada entre las serovariedades de estos serogrupos. Recientemente, Soriano *et al.*⁴⁵ evaluaron la protección cruzada en aves inmunizadas y desafiadas con las cepas de referencia de *H. paragallinarum* en el esquema de Blackall. Los resultados obtenidos en este trabajo confirmaron que las tres inmunovariedades son diferentes. Sin embargo, se observó cierta protección cruzada entre las serovariedades de los tres serogrupos. Estos resultados permitirán guiar estrategias en la prevención de la coriza infecciosa, ya que en la actualidad se emplean bacterinas comerciales bivalentes (serovariedades A-1 y C-1) y trivalentes (A-1, B-1 y C-2) contra esta enfermedad en todo el mundo. En este sentido, hasta la fecha existían discrepancias en cuanto a la protección conferida por bacterinas bivalentes contra aislamientos serovariedad B.^{69,90} Sin embargo, varios trabajos confirman la necesidad de usar bacterinas trivalentes en todas las áreas donde se han diagnosticado cepas regionales de la serovariedad B. Por ejemplo, en un estudio reciente en el cual se emplearon cepas de referencia, se informó que una bacteria bivalente no confirió protección en aves desafiadas con un aislamiento serovariedad B-1 de México.⁹¹ En Argentina, de manera similar pero empleando cepas regionales, Terzolo *et al.*⁸⁸ mostraron que bacterinas comerciales bivalentes no protegieron a pollos desafiados con un aislamiento de la serovariedad B. En otros ensayos, Yamaguchi *et al.*⁹² informaron que las bacterinas bivalentes proporcionaron protección contra la cepa Spross (B),

among B serovar strains exists.

Treatment and disinfection

Several chemotherapeutics and antibiotics have been used for the treatment of infectious coryza: streptomycin,⁹⁵ spectinomycin, streptomycin-spectino-mycin⁹⁶ or sulphachloropyridazine-trimetoprim⁹⁷ and sulphadimetoxin-trimetoprim,⁹⁸ among other combinations. Norfloxacin nicotinate⁹⁹ and enrofloxacin¹⁰⁰ quinolones have showed excellent results in the treatment of this disease. Broilers experimentally infected with infectious coryza were treated with enrofloxacin and bromhexine chlorhydrate or with enrofloxacin alone.⁸⁰ A reduction in clinical signs was observed in chickens that received the combined treatment but not with enrofloxacin alone. Furthermore, in comparison to an untreated control group, a higher weight mean difference of 194 g was obtained in chickens that have received the combined treatment.

A reduction of the infectious coryza impact was reported by Bragg,¹⁰¹ who used didecildimethylammonium chloride as part of disinfection programs in both layer and broiler farms. Application of this disinfectant procedure provoked less severe clinical signs and shorter disease course in both vaccinated and non-vaccinated chickens challenged with A-1, B-1, C-2, and C-3 isolates of *H. paragallinarum*. Other disinfectants for controlling infectious coryza have not been studied yet.

Antimicrobial resistance of *H. paragallinarum* to currently used antibiotics and chemotherapeutics may be rapidly acquired and this phenomenon has to be cautiously followed up. For this reason, sensitivity tests for the selection of the most suitable antimicrobial agents, must included the regional isolates involved in each outbreak.¹⁰² In addition it has to be remembered that any treatment may partially control an infection but is unable to completely eliminate it from a diseased flock, therefore associated disinfection programs are very important to be accomplished. As any bird which recovers from the disease may act as a healthy carrier, it is highly recommended, in every exposed farms, first to treat the affected animals and afterwards vaccinate all new incoming birds immediately after arrival into the infected hen house.

Conclusion

Infectious coryza outbreaks could be produced by both NAD- dependent or independent isolates of *H. paragallinarum*. High morbidity with increased mortality of affected birds could be recorded. Vaccination

pero fallaron contra otras dos cepas B sudafricanas. De forma análoga, Terzolo *et al.*⁸⁸ demostraron que una bacterina trivalente elaborada con una cepa B de referencia falló en pollos inmunizados y posteriormente desafiados con una cepa regional de la serovariedad B. Bowles *et al.*,⁹³ en un estudio comparativo muy amplio, determinaron la diversidad genética y las relaciones entre 118 cepas provenientes de seis continentes, mediante movilidad electroforética de ocho enzimas metabólicas codificadas por genes cromosomales. Es interesante destacar que en este trabajo, las cepas de *H. paragallinarum* estudiadas se clasificaron en dos grupos heterogéneos, mientras que nueve cepas regionales de la serovariedad B de Argentina, ocuparon un grupo diferente, lo que demuestra que éstas están genéticamente distantes de las otras cepas estudiadas, independientemente de la serovariedad a la cual pertenecen. Es decir que las cepas B de Argentina fueron incluso diferentes a otras cepas B de diversas regiones del mundo. Recientemente Jacobs *et al.*⁹⁴ informaron que pollos inmunizados con una bacterina comercial trivalente mostraron protección al desafío con un aislamiento de Ecuador serovariedad C, pero no cuando fueron desafiados con aislamientos B procedentes de varios países (Ecuador, Argentina, Estados Unidos de América y Zimbabwe). Los aislamientos fueron reconocidos por antisueros elaborados para las cepas Spross (B) y H-18 (C). La protección contra estos aislamientos B se incrementó cuando un aislamiento B de Ecuador fue incluido en la bacterina trivalente. Con base en estos hallazgos, los autores consideran que estos aislamientos B ("variantes") representan una nueva inmunovariedad, designando al inmunógeno que incluye este aislamiento como bacterina tetravalente. El criterio utilizado por estos autores en su investigación no es suficiente para proponer la existencia de una nueva inmunovariedad. Es muy probable que estos aislamientos constituyan una nueva, o nuevas, serovariedades dentro del serogrupo B, de forma similar a los serogrupos A o C que incluyen cuatro serovariedades cada uno. Los resultados obtenidos señalan la necesidad de realizar estudios de caracterización de hemoaglutininas, ya que evidencian que existen notables diferencias inmunológicas entre diferentes cepas de la serovariedad B. Es necesario incluir cepas regionales de la serovariedad B en la formulación de bacterinas locales.

Tratamiento y desinfección

En el tratamiento de la coriza infecciosa se han empleado varios quimioterapéuticos y antibióticos como: estreptomicina,⁹⁵ espectinomicina, la com-

of susceptible chicken flocks has to be performed with "trivalent" vaccines including serovars A-1, B-1 and C-2, being the main preventive strategy against infectious coryza. New independent studies advises the usage of "tetraivalent" vaccines, particularly in such geographical areas in which "variant" serovar B outbreaks are prevalent. In some cases, local isolates included into any these vaccines could greatly increase protection. Serological classification of *H. paragallinarum* isolates based on the Blackall's scheme is of paramount importance. The results summarized in this review could be used as a guide to standardize, both epizootiological studies and prophylactic practices against infectious coryza, carried either in Mexico or elsewhere.

Referencias

1. Blackall PJ, Matsumoto M. Infectious Coryza. In: Saif YM, Barnes HJ, Glisson JR, Fadly AM, McDougald LR, Swayne DE, editors. Diseases of Poultry, 11th ed. Ames: Iowa State Press, 2003:691-703.
2. Cundy KR. Susceptibility of Japanese quail (*Coturnix coturnix japonica*) to experimental infection with *Haemophilus gallinarum*. Avian Dis 1965; 10:272-283.
3. Reece RL, Barr DA, Owen AC. The isolation of *Haemophilus paragallinarum* from Japanese quail. Aust Vet J 1981; 57:350-351.
4. Dolphin RE, Olsen DE. Bacteriology of companion birds. Vet Med Small Anim Clin 1978; 73:359-361.
5. Devriese LA, Viaene N, Uytendaele E, Froyman R, Hemmez J. Three cases of infection *Haemophilus*-like bacteria in psittacines. Avian Pathol 1988; 17:741-744.
6. Beach JR, Schalm OW. Studies of the clinical manifestations and transmissibility of infectious coryza of chickens. Poult Sci 1936; 15:466-472.
7. Yamamoto R. Infectious coryza. In: Calnek BW, Barnes HJ, Beard CW, Reid WH, Yoder HW, editors. Diseases of Poultry, Ames: Iowa State University Press, 1991:186-195.
8. Blackall PJ, Morrow CJ, McInnes A, Eaves LE, Rogers DG. Epidemiologic studies on infectious coryza outbreaks in Northern New South Wales, Australia, using serotyping, biotyping and chromosomal DNA restriction endonuclease analysis. Avian Dis 1990; 34:267-276.
9. Blackall PJ, Matsumoto M, Yamamoto R. Infectious Coryza. In: Calnek BW, Barnes HJ, Beard CW, McDougald LR, Saif YM, editors. Diseases of Poultry, 10th ed. Ames: Iowa State University Press, 1997:179-190.
10. Yamamoto R, Clark GT. Intra- and interflock transmission of *Haemophilus gallinarum*. Am J Vet Res 1966; 27:1419-1425.
11. Yamamoto R. Progress report on infectious coryza research at the University of California. Proceedings of 16th Western Poultry Disease Conference and 1st Poultry Health Symposium; 1967 March 20-21; Davis

binación estreptomicina-espectinomicina⁹⁶ o las combinaciones sulfaclopiridazina-trimetoprim⁹⁷ y sulfadimetoxina-trimetoprim,⁹⁸ entre otras. Las quinolonas nicotinato de norfloxacin⁹⁹ y enrofloxacin¹⁰⁰ han dado excelentes resultados en el tratamiento de esta enfermedad. Se informó del tratamiento de pollos de engorda con coriza infecciosa, de manera experimental, empleando enrofloxacin y clorhidrato de bromhexina.⁸⁰ Los resultados obtenidos mostraron que los pollos que recibieron la combinación redujeron el tiempo de signos clínicos, a diferencia de los que recibieron únicamente enrofloxacin. Además, la diferencia en peso del grupo de aves que recibió la combinación estuvo 194 g por arriba del grupo testigo.

Bragg¹⁰¹ informó del uso de cloruro de didécildimetilamonio en programas de desinfección continuos en granjas de gallinas de postura y pollos de engorda, reduciendo el impacto de la coriza infecciosa. Menciona que pollos inmunizados y no inmunizados contra la coriza infecciosa, y desafiados con *H. paragallinarum* de las serovariedades A-1, B-1, C-2 y C-3, mostraron signos menos severos y un curso más corto de la enfermedad. Se desconoce el efecto de otros desinfectantes en el control de la coriza infecciosa.

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

Conclusiones

Brotes de coriza infecciosa pueden ser ocasionados por *H. paragallinarum* tanto dependientes como independientes de NAD. Se puede registrar morbilidad alta con incremento en la mortalidad de aves afectadas. La producción de huevo en gallinas de postura es afectada considerablemente. La bacterinización de parvadas susceptibles con inmunógenos "trivalentes" que incluyan las serovariedades A-1, B-1 y C-2 es la estrategia principal en la prevención de la coriza infecciosa. La inclusión de aislamientos locales en estos productos puede incrementar la protección,

- (California) USA. California (Davis): University of California, 1967:23-24.
12. Butterweck J, Kerr E. Egg drop from coryza superimposed on M. S. Proceedings of 29th Western Poultry Disease Conference, 5th ANECA & 14th Poultry Health Symposium; 1980 April 22-25; Acapulco (Guerrero) México. California (Davis): University of California, 1980:80.
 13. Matsuo K, Kuniyasu C, Yamada S, Susumi S, Yamamoto S. Suppression of immunoresponses to *Haemophilus gallinarum* with *Mycoplasma gallisepticum* in chickens. Avian Dis 1978; 22:552-561.
 14. Soriano VE, Fernandez RP, Tellez G. *Ornithobacterium rhinotracheale*: un agente patógeno emergente en avicultura. Vet Méx 2000; 31:245-253.
 15. Soriano VE, Longinos MG, Navarrete PG, Fernandez RP. Identification and characterization of *Ornithobacterium rhinotracheale* isolates from Mexico. Avian Dis 2002; 46:686-690.
 16. Raggi L, Young DC, Sharma JM. Synergism between avian infectious bronchitis virus and *Haemophilus gallinarum*. Avian Dis 1967; 2:309-321.
 17. Sandoval VE, Terzolo HR, Blackall PJ. Complicated infectious coryza in Argentina. Avian Dis 1994; 38: 672-678.
 18. Malkinson M, Nachany S, Aronovici A, Davidov K, Weisman Y. Mixed infection with *Chlamydia psittaci*, fowlpox virus and *Haemophilus gallinarum* in broiler breeder chicks. Vet Rec 1987; 120:461-462.
 19. Bell D, Ortiz F, Cutler G. The dynamics of an infectious coryza outbreak. Proceedings of 44th Western Poultry Diseases Conference; 1995 March 5-7; Sacramento (California) USA. California (Davis): University of California, 1995:98-99.
 20. Droual R, Bickford AA, Charlton BR, Cooper GL, Channig SE. Infectious coryza in meat chickens in the San Joaquin Valley of California. Avian Dis 1990; 34: 1009-1016.
 21. Bland MC, Bickford AA, Charlton BR, Cooper GL, Sommer F, Cutler G. Case report: a severe infectious coryza infection in a multiple age layer complex in Central California. Proceedings of XXVII Convención Anual ANECA & 51st Western Poultry Disease Conference; 2002 may 1-4; Puerto Vallarta (Jalisco) México. México (DF): Asociación Nacional de Especialistas en Ciencias Avícolas, AC, 2002:56-57.
 22. Adler HE, Page LA. *Haemophilus* infection in chickens. II. The pathology of the respiratory tract. Avian Dis 1962; 6:1-6.
 23. Sawata A, Nakai T, Kume K, Yoshikawa H, Yoshikawa T. Intranasal inoculation of chickens with encapsulated or nonencapsulated variants of *Haemophilus paragallinarum*: Electron microscopic evaluation of the nasal mucosa. Am J Vet Res 1985; 46:2346-2353.
 24. Bickford AA, Yamamoto R, Glick-Smith J, Oluwadiya M. Histopatologic characterization of experimental infectious coryza in single comb white leghorns chickens. Proceedings of 30th Western Poultry Disease Conference & 15th Poultry Health Symposia; 1981 March 9-13; Davis (California) USA. California

particularmente de brotes ocasionados por “variantes” de la serovariedad B. Sin embargo, la caracterización serológica de aislamientos de *H. paragallinarum* con base en el esquema Blackall es importante para el establecimiento de estudios y prácticas epizootiológicas de la coriza infecciosa tanto en México como en muchas partes del mundo.

-
- (Davis): University of California, 1981:18-21.
25. Mifflin JK, Horner RF, Blackall PJ, Chen X, Bishop GC, Morrow CJ, et al. Phenotypic and molecular characterization of V-factor (NAD)-independent *Haemophilus paragallinarum*. Avian Dis 1995; 39:304-308.
 - Mifflin JK, Chen X, Blackall PJ. Molecular characterization of isolates of *Haemophilus paragallinarum* from China by ribotyping. Avian Pathol 1997; 26:119-127.
 26. Soriano VE, Blackall PJ. ERIC-PCR: alternativa en la caracterización genómica de *Haemophilus paragallinarum*. Memorias XVII Congreso Latinoamericano de Avicultura, 2001 octubre 9-12; Ciudad de Guatemala (Guatemala) Guatemala (Ciudad de Guatemala): Asociación Latinoamericana de Avicultores, AC, 2001:529-532.
 - Yamaguchi T, Kobayashi M, Masaki S, Iritani Y. Isolation and characterization of a *Haemophilus paragallinarum* mutant that lacks a hemagglutinating antigen. Avian Dis 1993; 37:970-976.
 28. Sandoval VE, Terzolo HR. Coriza infecciosa. Segunda parte: reproducción experimental y patogenicidad de las bacterias. Avicult Profes 1997; 15:29-32.
 29. Takagi M, Hirayama N, Simazaki T, Taguchi K, Yamaoka R, Ohta S. Purification of hemagglutinin from *Haemophilus paragallinarum* using monoclonal antibody. Vet Microbiol 1993; 34:191-197.
 - Takagi M, Hirayama N, Makie H, Ohta S. Production, characterization and protective effect of monoclonal antibodies to *Haemophilus paragallinarum* serotype A. Vet Microbiol 1991; 27:327-338.
 31. Takagi M, Ohmae K, Hirayama N, Ohta S. Expression of hemagglutinin of *Haemophilus paragallinarum* serotype A in *Escherichia coli*. J Vet Med Sci 1991; 53:917-920.
 32. Jacques M, Paradis SE. Adhesin-receptor interactions in Pasteurellaceae. FEMS Microbiol Rev 1998; 22:45-59.
 33. Ueda S, Nagasawa Y, Suzuki T, Tajima M. Adhesion of *Haemophilus paragallinarum* to cultured chickens cells. Microbiol Immunol 1982; 26:1007-1016.
 34. Fernandez RP, Garcia-Delgado GA, Ochoa GP, Soriano VE. Adherence of *Haemophilus paragallinarum* to chicken tracheal epithelial cells. Proceedings of 48th Western Poultry Disease Conference; 1999 april 24-27; Vancouver (British Columbia) Canada. California (Davis): University of California, 1999:111-112.
 35. Fernandez RP, Soriano VE, Longinos GM, Navarrete GP. *In vitro* adherence neutralization of *Haemophilus paragallinarum* to chicken tracheal epithelial cells by hemagglutination-inhibition antibodies. Proceedings

- of 49th Western Poultry Disease Conference; 2000 march 5-7; Sacramento (California) USA. California (Davis): University of California, 2000:52.
37. Fernandez RP, Sanchez SA, Soriano VE. Carbohydrate cell receptors for adhesins of *Haemophilus paragallinarum*. Proceedings of 50th Western Poultry Disease Conference; 2001 March 24-26; Davis (California) USA. California (Davis): University of California, 2001:130-131.
 38. Terry TD, Zalucki YM, Walsh SL, Blackall PJ, Jennings MP. Genetic analysis of a plasmid encoding haemocin production in *Haemophilus paragallinarum*. Microbiology 2003; 149:3177-3184.
 39. Sawata A, Kume K, Nakase Y. Biologic and serologic relationship between Page's and Sawata's serotypes of *Haemophilus paragallinarum*. Am J Vet Res 1980; 41:1901-1904.
 40. Rimler RB, Davis RB. Infectious coryza: In vivo growth of *Haemophilus gallinarum* as a determinant for cross protection. Am J Vet Res 1977; 38:1591-1593.
 41. 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.
 42. Thornton AM, Blackall PJ. Serological classification of Australian isolates of *Haemophilus paragallinarum*. Aust Vet J 1984; 61:251-253.
 43. Yamaguchi T, Blackall PJ, Takigami S, Iritani Y, Hayashi Y. Pathogenicity and serovar-specific hemagglutinating antigens of *Haemophilus paragallinarum* serovar B strains. Avian Dis 1990; 34:964-968.
 44. Bragg RR. Virulence of South African isolates of *Haemophilus paragallinarum*. Part 1: NAD-dependent field isolates. Onderstepoort J Vet Res 2002; 69:163-169.
 45. Soriano VE, Longinos GM, Fernandez RP, Tellez G, Suarez GF, Blackall PJ. Cross-protection studies among nine serovars of *Haemophilus paragallinarum* in the Blackall scheme. Proceedings of XIII Congress of the World Veterinary Poultry Association; 2003 July 19-23; Denver (Colorado) USA. United Kingdom (Compton): World Veterinary Poultry Association, 2003:121.
 46. Horner FR, Bishop GC, Jarvis CJ, Coetzee HT. NAD (V-factor)-independent and typical *Haemophilus paragallinarum* infection in commercial chickens: a five year field study. Avian Pathol 1995; 24:453-463.
 47. Bragg RR, Greyling JM, Verschoor JA. Isolation and identification of NAD-independent bacteria from chickens with symptoms of infectious coryza. Avian Pathol 1997; 26:595-606.
 48. 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.
 49. 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.
 50. Taole M, Albertyn J, Van Heerden E, Bragg RR. Virulence of South African isolates of *Haemophilus paragallinarum*. Part 3: experimental produced NAD-independent isolate. Onderstepoort J Vet Res 2002; 69:189-196.
 51. Bragg RR, Purdan G, Coetzee L, Verschoor JA. Effects of transformation on the hemagglutinins of *Haemophilus paragallinarum*. Onderstepoort J Vet Res 1995; 62:261-270.
 52. Gromkova R, Koornhof H. Naturally occurring NAD-independent *Haemophilus parainfluenzae*. J Gen Microbiol 1990; 136:1031-1035.
 53. Terzolo HR. Revisión sobre coriza infecciosa: propuestas de investigación para su diagnóstico y control. Rev Med Vet 2000; 81:262-269.
 54. Kume K, Sawata A. Factors of *Haemophilus paragallinarum* for infection and protection in chickens. Proceedings of 39th Western Poultry Disease Conference; 1990 March 4-6; Sacramento (California) USA. California (Davis): University of California, 1990:53-60.
 55. Sawata A, Kume K. Relationship between virulence and morphological or serological properties of variants dissociated from serotype 1 *Haemophilus paragallinarum* strains. J Clin Microbiol 1983; 18:49-55.
 56. Sawata A, Kume K, Nakai T. Relationship between anticapsular antibody and protective activity of a capsular antigen of *Haemophilus paragallinarum*. Jpn J Vet Sci 1984; 46:475-486.
 57. Sawata A, Nakai T, Kume K, Yoshikawa H, Yoshikawa T. Lesions induced in the respiratory tract of chickens by encapsulated or nonencapsulated variants of *Haemophilus paragallinarum*. Am J Vet Res 1985; 46:1185-1191.
 58. Zhao C, Nguyen T, Liu L, Sacco RE, Brogden KA, Lehrer RI. Gallinacin-3, an inducible epithelial β -defensin in the chicken. Infect Immun 2001; 69:2684-2691.
 59. Blackall PJ, Terzolo HR. Coriza infecciosa: revisión de métodos de diagnóstico y vacunas. Rev Asoc Argent Microbiol 1995; 27:156-174.
 60. Horner FR, Bishop GC, Haw C. An upper respiratory disease of commercial chickens resembling infectious coryza, but caused by a V factor-independent bacterium. Avian Pathol 1992; 21:421-427.
 61. Mouahid M, Bisgaard M, Morley AJ, Mutters R, Mannheim W. Occurrence of V-factor (NAD) independent strains of *Haemophilus paragallinarum*. Vet Microbiol 1992; 31:363-368.
 62. García FA, Blackall PJ, Angulo E. Presencia de *Haemophilus paragallinarum* NAD independiente en México. Memorias de la XXVII Convención Anual ANECA & 51st Western Poultry Disease Conference; 2002 Mayo 1-4; Puerto Vallarta (Jalisco) México. México (D.F.): Asociación Nacional de Especialistas en Ciencias Avícolas, AC, 2002:59.
 63. Sato S, Shifrine M. Application of the agar gel precipitation test to serologic studies of chickens inoculated with *Haemophilus gallinarum*. Avian Dis 1965; 9:591-598.
 64. Iritani Y, Katagiri K, Tsuji K. Slide-agglutination test of *Haemophilus gallinarum* antigen treated by trypsin to inhibit spontaneous agglutination. Avian Dis 1978; 22:793-797.

65. Yamaguchi T, Iwaki S, Iritani Y. Latex agglutination test for measurement of type-specific antibody to *Haemophilus paragallinarum* in chickens. *Avian Dis* 1981; 25:988-995.
66. Raie N, Hietala SK, Barton JT, Read DH. Preliminary development of an ELISA for infectious coryza (*Haemophilus paragallinarum* infection) in chickens. Proceedings of 41st Western Poultry Disease Conference; 1992 march 1-3; Sacramento (California) USA. California (Davis): University of California, 1992:23.
67. Zhang P, Blackall PJ, Yamaguchi T, Iritani Y. A monoclonal antibody-blocking enzyme-linked immunosorbent assay for the detection of serovar-specific antibodies to *Haemophilus paragallinarum*. *Avian Dis* 1999; 43:75-82.
68. Miao D, Zhang P, Gong Y, Yamaguchi T, Iritani Y, Blackall PJ. The development and application of a blocking ELISA kit for the diagnosis of infectious coryza. *Avian Pathol* 2000; 29:219-225.
69. Soriano VE, Fernández RP, García-Delgado GA, Ochoa GP. Evaluación de dos protocolos de bacterinización de gallinas de postura mediante detección de anticuerpos inhibidores de la hemoaglutinación y protección ante un desafío controlado con *Haemophilus paragallinarum*. *Vet Méx* 2001; 32:145-148.
70. Blackall PJ, Yamaguchi T, Iritani Y, Rogers DG. Evaluation of two monoclonal antibodies for serotyping of *Haemophilus paragallinarum*. *Avian Dis* 1990; 34:861-864.
71. Blackall PJ, Zheng Z, Yamaguchi T, Iritani Y, Rogers DG. Evaluation of a panel of monoclonal antibodies in the subtyping of *Haemophilus paragallinarum*. *Avian Dis* 1991; 35:955-959.
72. Blackall PJ, Zheng Z, Takagi M, Terzolo HR, Sandoval VE, Silva EN. Characterization of two monoclonal antibodies directed against serovar A *Haemophilus paragallinarum*. *Avian Dis* 1994; 38:361-365.
73. Yamaguchi T, Takigami S, Iritani Y, Hayashi Y. Characterization and use of monoclonal antibodies to identify *Haemophilus paragallinarum* serovars. *Avian Dis* 1990; 34:52-57.
74. Yamaguchi T, Takigami S, Iritani Y, Hayashi Y. Characterization of two new monoclonal antibodies against *Haemophilus paragallinarum* serovar C hemagglutinating antigen. *Avian Dis* 1990; 34:922-927.
75. Terzolo HR, Paolicchi FA, Sandoval VE, Blackall PJ, Yamaguchi T, Iritani Y. Characterization of isolates of *Haemophilus paragallinarum* from Argentina. *Avian Dis* 1993; 37:310-314.
76. Blackall PJ, Silva EN, Yamaguchi T, Iritani Y. Characterization of isolates of avian haemophilii from Brazil. *Avian Dis* 1994; 38:269-274.
77. Yamaguchi T, Kato K, Takigami S, Iritani Y, Hayashi Y. Serological classification of Japanese isolates of *Haemophilus paragallinarum* using two serovar-specific monoclonal antibodies. *Avian Dis* 1990; 34:364-368.
78. Chen X, Mifflin JK, Zhang P, Blackall PJ. Development and application of DNA probes and PCR tests for *Haemophilus paragallinarum*. *Avian Dis* 1996; 40:398-407.
79. Mifflin JK, Chen X, Bragg RR, Welgemoed JM, Greling JM, Horner RF, et al. Confirmation that PCR can be used to identify NAD-dependent and NAD-independent *Haemophilus paragallinarum* isolates. *Onderstepoort J Vet Res* 1999; 66:55-57.
80. Chen X, Chen Q, Zhang P, Feng W, Blackall PJ. Evaluation of a PCR test for the detection of *Haemophilus paragallinarum* in China. *Avian Pathol* 1998; 27:296-300.
81. Soriano VE. Coriza infecciosa. *Memorias IX Jornadas Médico Avícolas*; 2003 febrero 18-20; Cd. Universitaria (DF) México. México (DF): Departamento de Producción Animal: Aves Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia, Universidad Nacional Autónoma de México. 2003:88-92.
82. Chen X, Song C, Gong Y, Blackall PJ. Further studies on the use of a polymerase chain reaction test for the diagnosis of infectious coryza. *Avian Pathol* 1998; 27:618-624.
83. Blackall PJ, Eaves LE, Morrow CJ. Comparison of *Haemophilus paragallinarum* isolates by restriction endonuclease analysis of chromosomal DNA. *Vet Microbiol* 1991; 27:39-47.
84. Khan MI, Chen X, Blackall PJ. Differentiation of *Haemophilus paragallinarum* isolates using ERIC-PCR analysis. Proceedings of 47th Western Poultry Disease Conference; 1998 march 8-10; Sacramento (California) USA. California (Davis): University of California, 1998:8-9.
85. Hobb RI, Tseng HJ, Downes JE, Terry TD, Blackall PJ, Takagi M, et al. Molecular analysis of a haemagglutinin of *Haemophilus paragallinarum*. *Microbiology* 2002; 148:2171-2179.
86. Sandoval VE, Terzolo HR. Coriza infecciosa. Primera parte: descripción de la enfermedad, el agente y los brotes de campo. *Avicult Profes* 1996; 14:29-35.
87. Blackall PJ, Reid GG. Further efficacy studies on inactivated, aluminum-hydroxide-adsorbed vaccines against infectious coryza. *Avian Dis* 1987; 31:527-532.
88. Terzolo HR, Sandoval VE, Pondal FG. Evaluation of inactivated infectious coryza vaccines in chickens challenged by serovar B strains of *Haemophilus paragallinarum*. *Avian Pathol* 1997; 26:365-376.
89. Blackall PJ. Infectious coryza: overview of the disease and new diagnostic options. *Clin Microbiol Rev* 1999; 12:627-632.
90. Jacobs AAC, Cuenen W, Storm PK. Efficacy of a trivalent *Haemophilus paragallinarum* vaccine compared to bivalent vaccines. *Vet Microbiol* 1992; 32:43-49.
91. Fernandez RP, Colindres HL, Soriano VE. Protection afforded by bi- and trivalent bacterins of *Haemophilus paragallinarum* against prevalent serovars in Mexico. Proceedings of 52nd Western Poultry Disease Conference; 2003 march 8-11; Sacramento (California) USA. California (Davis): University of California, 2003:49-50.
92. Yamaguchi T, Blackall PJ, Takigami S, Iritani Y, Hayashi Y. Immunogenicity of *Haemophilus paragallinarum* serovar B strains. *Avian Dis* 1991; 35:965-968.
93. Bowles R, Blackall PJ, Terzolo HR, Sandoval VE. An

- assesment of the genetic diversity of Australian and overseas isolates of *Haemophilus paragallinarum* by multilocus enzyme electrophoresis. Proceedings of Xth World Veterinary Poultry Association Congress; 1993 august 16-19; Sydney (Queensland) Australia. United Kingdom (Compton): World Veterinary Poultry Association, 1993:146.
94. Jacobs AAC, van der Berg K, Malo A. Efficacy of a new tetravalent coryza vaccine against emerging variant type B strains. *Avian Pathol* 2003; 32:265-269.
 95. Bornstein S, Samberg Y. The therapeutic effect of streptomycin on infectious coryza of chickens caused by *Haemophilus gallinarum*. II. Isolation and culture of *Haemophilus gallinarum*, and some of its biochemical reactions. *Am J Vet Res* 1954; 15:612-616.
 96. Hanley JE, Davis RB, Sunka EM. An evaluation and comparison of spectinomycin and spectinomycin-erythromycin combinations for infectious coryza. *Avian Dis* 1968; 12:1-3.
 97. Sumano LH, Ocampo CL. Estudio cinético comparativo de tres combinaciones de sulfonamida-trimetoprim en gallinas White Leghorn sanas y enfermas de coriza infecciosa (*Haemophilus gallinarum*). *Vet Méx* 1987; 18:21-26.
 98. Sakai T, Nagao S. Experimental infection of chickens with *Haemophilus paragallinarum* and therapeutic efficacy of TA-068W. *Bull Coll Vet Med Nihon Univ* 1987; 40:228-235.
 99. Lublin A, Mechani S, Malkinson M, Weisman Y. Efficacy of norfloxacin nicotinate treatment of broilers breeders against *Haemophilus paragallinarum*. *Avian Dis* 1993; 37:673-679.
 100. Vazquez R, Vázquez F. Effectiveness of enrofloxacin against *H. paragallinarum* infection under control and field trials in Mexico. Proceedings of 38th Western Poultry Disease Conference; 1989 march 6-9; Tempe (Arizona) USA. California (Davis): University of California, 1989:128-130.
 101. Bragg RR. The use of a continual disinfection program for the control of infectious diseases in layers and broilers. Proceedings of XIII Congress of the World Veterinary Poultry Association; 2003 july 19-23; Denver (Colorado) USA. United Kingdom (Compton): World Veterinary Poultry Association, 2003:127-128.
 102. Soriano VE, Vera NA, Salado CR, Fernández RP, Blackall PJ. *In vitro* susceptibility of *Ornithobacterium rhinotracheale* several antimicrobial drugs. *Avian Dis* 2003;47:476-480

