

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

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

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

Abstract

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

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

Resumen

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

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

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

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

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

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

Introduction

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

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

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

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

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

Introducción

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

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

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

ral climate conditions according to the conventional production system carried out at the area. During a week, 20% morbidity and an increased mortality rate (0.1%) was recorded. Clinical signs included sneezing, cough, lacrimation, periophthalmitis, and swelling of infraorbital sinuses. For bacteriological diagnosis, a total of ten, swollen-infraorbital sinuses, chicken heads were submitted to the Centro de Investigación y Estudios Avanzados en Salud Animal. The vaccination program included one-dose of an infectious coryza bacterin administered at 5-wk-old chickens. This program also included vaccines against the following agents: Gumboro disease virus, Newcastle disease virus, and infectious bronchitis virus. Negative results for *Mycoplasma* spp and influenza virus in serological tests were obtained. In the bacteriology study, samples from infraorbital sinuses were streaked onto 10% sheep blood agar plate with *Staphylococcus epidermidis* as a feeder colony. The plates were incubated overnight into a candle jar at 37°C. Bacterial growth was observed in all plated samples and two colony types were recorded: 1) typical tiny, translucent, dewdrop, nurse colony-satellitric growth *Av. paragallinarum* colonies; and 2) grayish, up-to 2-mm diameter, no satellitric growth colonies (Figure 1a and 1b, respectively). Both colony types were Gram-negative, cocobacillar, and filamentous bacteria. Also, both colony types were oxidase-positive and catalase-negative. One separated colony from the feeder colony was incubated overnight at 37°C on a medium without blood, feeder colony, or NAD. Tiny, grayish, coalescent colonies were observed (Figure 2). Both bacterial culture types were PCR confirmed as previously described (Figure 3).¹² Briefly, primer used were N1 (5'-TGAGGGTAGTCTTGCACGCGAAT-3') and R1 (CAAGGTATCGATCGTCTCTCTACT-3'). The reaction mixture (50 µl) contained 0.4 µM of each primer, 45 µl of AccuPrime Supermix I (1.25 U *Taq* polymerase);* and 2 µl of extracted DNA. The PCR protocol was initiated with 30 seconds denaturation period at 98°C, followed by 25 cycles of denaturation (1 minute at 94°C), annealing (1 minute at 72°C), and enzymatic chain extension (2 minutes at 94°C), with a final extension at 72°C for 10 minutes. Also, antigens for hemagglutinin serotyping were produced as previously reported.^{5,6} Both *Av. paragallinarum* isolates were recognized as serogroup C, serovar C-1. Furthermore, REP-PCR¹³ and ERIC-PCR¹⁴ genotype profiles of isolates were performed as elsewhere described. Briefly, primers REP 1R (5'-NNNNCGNCGNCATCNGGC-3') and REP 2 (5'-NCGNCTTATCNGGCCTAC-3') were used for REP-PCR. The reaction mixture (25 µl) contained 5 µl of 10X buffered solution, 1.5 mM of MgCl₂, 0.2 mM of each deoxynucleoside triphosphate, 0.5 U *Taq* polymerase* and 2 µl of extracted DNA. The PCR protocol was initiated with 5 minutes denaturation

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

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

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

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

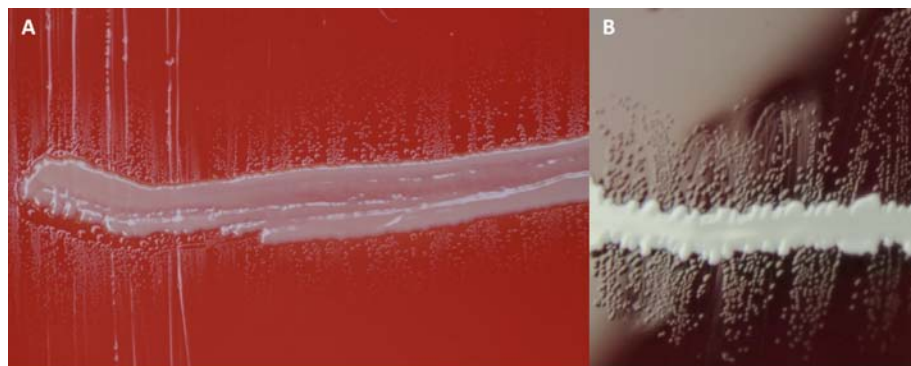


FIGURA 1. Cultivos de *Avibacterium paragallinarum* en base de agar con 10% de sangre de ovino con colonia nodriza de *Staphylococcus epidermidis*. Colonias dependientes de NAD (a) o independientes de NAD (b).

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



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

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

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

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

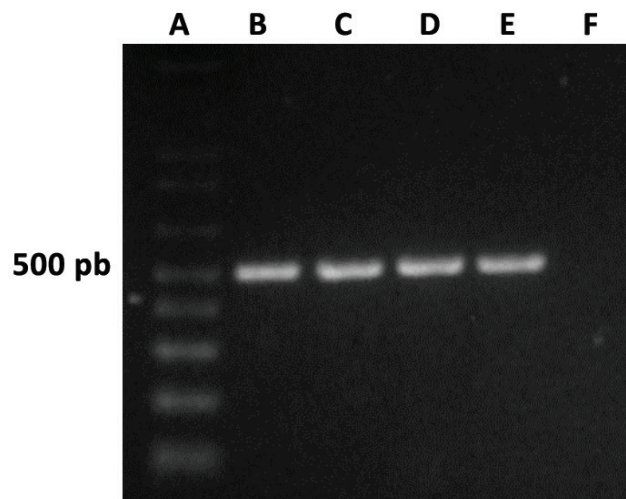


FIGURA 3. Productos de PCR específico (aproximadamente 500 pb) de *Avibacterium paragallinarum* incluidos en el estudio. A) marcador de peso molecular (1 kb); B) *Avibacterium paragallinarum* cepa de referencia 0083 (serovariedad A-1); C) y D) aislamientos NAD dependientes (serovariedad C-1); E) aislamiento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

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

neación (1 minuto a 72°C) y extensión (2 minutos a 94°C) con una extensión final a 72°C por 10 minutos. Asimismo, se produjeron antígenos hemoaglutinantes para serotipificación de acuerdo con lo señalado previamente.^{5,6} Ambos aislamientos fueron identificados en el serogrupo C, serovariedad C-1 de *Av. paragallinarum*. Asimismo, se determinó el perfil genético de los cultivos mediante los protocolos REP-PCR¹³ y ERIC-PCR¹⁴ de acuerdo con lo descrito. Brevemente, para el protocolo REP-PCR se emplearon los iniciadores REP 1R (5'-NNNNCGNCGNCATCNGGC-3') y REP 2 (5'-NCGNCTTATCNGGCCTAC-3'). La reacción (25 µl) incluyó 5 µl de solución amortiguadora 10X, 1.5 mM de MgCl₂, 0.2 mM de cada dinucleótido trifosfatado, 0.5 U *Taq* ADN polimerasa* y 2 µl de

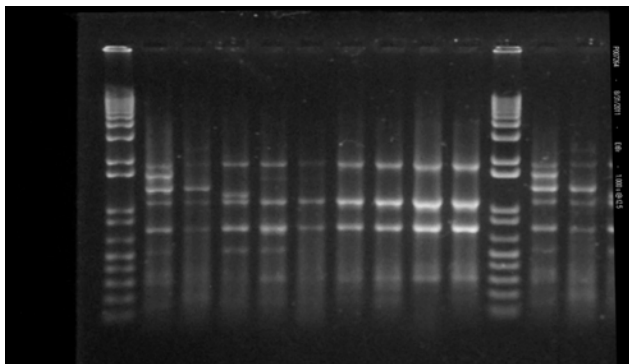


FIGURA 4. Perfiles REP-PCR y ERIC-PCR de *Avibacterium paragallinarum* incluidos en el estudio. A) marcador de peso molecular (1 kb); B) cepa de referencia 0083 (serovariedad A-1); C) cepa de referencia Spross (serovariedad B-1); D) cepa de referencia Modesto (serovariedad C-2); E) cepa de referencia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

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

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

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

Acknowledgements

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

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

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

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

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

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

Referencias

1. BLACKALL PJ, SORIANO EV. Infectious coryza and related bacterial infections. In: SAIF YM, FADLY AM, GLISSON JR, MCDUGALD LR, NOLAN LK, SWAYNE DE, editors. Diseases of Poultry. 12th ed. Ames:Blackwell Publishing, 2008:789-803.
2. CABRERA A, MORALES-ERASTO V, SALGADO-MIRANDA C, BLACKALL PJ, SORIANO-VARGAS E. Hemagglutinin serotyping of *Avibacterium paragallinarum* isolates from Ecuador. Trop Anim Health Prod 2011; 43:549-551.
3. BLACKALL PJ, EAVES LE, ROGERS DG. Proposal of a new serovar and altered nomenclature for *Haemophilus paragallinarum* in the Kume hemagglutinin scheme. J Clin Microbiol 1990; 28:1185-1187.
4. KUME K, SAWATA A, NAKAI T, MATSUMOTO M. Serological classification of *Haemophilus paragallinarum* with a hemagglutinin system. J Clin Microbiol 1983; 17:958-964.
5. MORALES-ERASTO V, GARCIA-SANCHEZ A, SALGADO-MIRANDA C, TALAVERA-ROJAS M, ROBLES-GONZALEZ F, BLACKALL PJ *et al.* ERIC-PCR genotyping of emergent serovar C-1 isolates of *Avibacterium paragallinarum* from Mexico. Avian Dis 2011; 55:686-688.
6. SORIANO VE, BLACKALL PJ, DABO SM, TELLEZ G, GARCIA-DELGADO GA, FERNANDEZ RP. Serotyping of *Haemophilus paragallinarum* isolates from Mexico by the Kume hemagglutinin scheme. Avian Dis 2001; 45:680-683.
7. FOSTER JW, MOAT AG. Nicotinamide adenine dinucleotide biosynthesis and pyridine nucleotide cycle metabolism in microbial systems. Microbiol Rev 1980; 44:83-105.
8. HORNER RF, BISHOP GC, HAW C. An upper respiratory disease of commercial chickens resembling infectious coryza, but caused by a V factor-independent bacterium. Avian Pathol 1992; 21:421-427.

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

Agradecimientos

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

9. MOUAHID M, BISGAARD M, MORLEYAJ, MUTTERS R, MANNHEIM W. Occurrence of V-factor (NAD) independent strains of *Haemophilus paragallinarum*. Vet Microbiol 1992; 31:363-368.
10. GARCIA AJ, ANGULO E, BLACKALL PJ, ORTIZ AM. The presence of nicotinamide adenine dinucleotide-independent *Haemophilus paragallinarum* in Mexico. Avian Dis 2004; 48:425-429.
11. BRAGG RR. Virulence of South African isolates of *Haemophilus paragallinarum*. Part 2: Naturally occurring NAD-independent field isolates. Onderstepoort J Vet Res 2002; 69:171-175.
12. CHEN X, MIFLIN JK, ZHANG P, BLACKALL PJ. Development and application of DNA probes and PCR tests for *Haemophilus paragallinarum*. Avian Dis 1996; 40:398-407.
13. SAXENA MK, SINGH VP, KUMAR AA, CHAUDHURI P, SINGH VP, SHIVACHANDRA SB *et al.* REP-PCR analysis of *Pasteurella multocida* isolates from wild and domestic animals in India. Vet Res Commun 2006; 30:851-861.
14. SORIANO VE, TELLEZ G, HARGIS BM, NEWBERRY L, SALGADO-MIRANDA C, VAZQUEZ JC. Typing of *Haemophilus paragallinarum* strains by using enterobacterial repetitive intergenic consensus-based polymerase chain reaction. Avian Dis 2004; 48:890-895.
15. BRAGG RR, COETZEE L, VERSCHOOR JA. Plasmid-encoded NAD independence in some South African isolates of *Haemophilus paragallinarum*. Onderstepoort J Vet Res 1993; 60:147-152.