

Coriza infecciosa: revisión de métodos de diagnóstico y vacunas

P. J. BLACKALL¹, H. R. TERZOLO²

¹ Animal Research Institute (ARI), Queensland, Australia y ² Departamento de Producción Animal, INTA EEA Balcarce, Balcarce, Argentina

INTRODUCCION

La coriza infecciosa es una enfermedad respiratoria aguda de las gallinas domésticas causada por la bacteria *Haemophilus paragallinarum*. Excepcionalmente pueden enfermarse también los faisanes y gallinas de Guinea. El *H. paragallinarum* infecta al ave por vía respiratoria y luego de un corto período de incubación, que varía entre 1 a 3 días, produce una enfermedad que se manifiesta por inflamación catarral de los senos paranasales. Este cuadro puede estar asociado a inflamación de los barbillones, conjuntivitis o queratitis. Los casos de neumonía y aerosaculitis son menos frecuentes pero también suelen ocurrir en las infecciones puras por estos hemófilos.

En las gallinas en producción causa alta morbilidad, baja o nula mortalidad y una importante pérdida en la producción de huevos, la que generalmente oscila entre 10% y 40%. En pollos parrilleros puede causar un cuadro descrito como «cabeza hin-

chada» y ocasionalmente también producir septicemia y muerte (48). Esta bacteria generalmente se asocia con otros agentes bacterianos, víricos o parasitarios y cuando esto ocurre se agrava el curso de la enfermedad. Entre los agentes bacterianos más comunes deben mencionarse los mycoplasmas y las pasteurelas. Cuando *H. paragallinarum* se asocia con otros agentes esta enfermedad se denomina «coriza infecciosa complicada» (48).

En esta recopilación se aportarán detalles sobre la clasificación, identificación y serotipificación del agente causal. También se resumirá la información disponible sobre nuevos métodos de diagnóstico y programas de vacunación para prevenir esta enfermedad. A lo largo de esta revisión se hará referencia a los hemófilos aviarios que, para el propósito de este trabajo, serán definidos como organismos gram negativos aislados de aves y que necesariamente requieren factores de crecimiento *in vitro*. Los dos factores que pueden ser requeridos por los

DIRECCION POSTAL: Dr. Horacio Raúl Terzolo, Departamento de Producción Animal, INTA EEA Balcarce, Casilla de Correos 276, 7620 Balcarce.

PALABRAS CLAVES: coriza infecciosa, producción avícola, diagnóstico, vacunas aviarias.

Recibido: 30/5/95. Revisado: 4/7/95.

hemófilos para su crecimiento *in vitro* son hemina (factor X) y/o nicotín-adenín-dinucleótido (NAD o factor V).

CLASIFICACION

En 1931 se logró registrar el primer aislamiento en las aves de un microorganismo con requerimientos de factores de crecimiento que se encuentran en la sangre. Desde entonces y hasta comienzos de la década del 60, el único microorganismo hemofílico de origen aviario formalmente reconocido era una especie denominada *Haemophilus gallinarum*. El *H. gallinarum* fue considerado como el agente causal de la coriza infecciosa y se demostró que requería los dos factores de crecimiento, X y V (52). Sin embargo a partir de la década del 60, los únicos hemófilos que habían sido recuperados de aves sólo requerían del factor V. Recientemente, se ha alegado que las primitivas descripciones de los hemófilos aviarios como dependientes de los factores X y V fueron incorrectas. Ello fue debido a que los medios de cultivo disponibles para las pruebas desde la década de los años 30 hasta la de los 60 tenían serias deficiencias (15). Por ello actualmente se cuestiona la existencia de *H. gallinarum*.

Actualmente está ampliamente aceptado que, por lo menos, existen dos especies de hemófilos aviarios. Con algunas excepciones detalladas más adelante, ambas especies sólo requieren el factor V. Una especie se conocía como *H. paragallinarum* y se considera el agente etiológico de la coriza infecciosa. La otra es conocida como *H. avium* y se estima que es apatógena (26).

El uso reciente de la tecnología de hibridación del ácido desoxirribonucleico (DNA) ha demostrado que el grupo *H.*

avium está compuesto como mínimo por tres grupos semejantes (41). Los tres grupos han sido denominados: *Pasteurella avium*, *P. volantium* y un tercer grupo conocido como «*Pasteurella* especie A». Sin embargo, no todos los aislamientos de *H. avium* pueden ser asignados a alguno de estos tres nuevos grupos taxonómicos exclusivamente por sus propiedades fenotípicas. Por ejemplo solamente 25 de las 39 cepas de *H. avium* que habían sido examinadas en un estudio (2), pudieron ser identificadas como *P. avium*, *P. volantium* o el tercer grupo conocido como *Pasteurella* «especie A». Todavía se desconoce si las restantes 14 cepas que no se pudieron clasificar representan nuevas especies o, si en realidad, son variantes previamente no identificadas de las tres nuevas especies de *Pasteurella*.

Evidentemente, la clasificación de los hemófilos aviarios todavía no puede ser considerada como un tema concluido. Dado que la propuesta para efectuar una reorganización taxonómica de los hemófilos aviarios no patógenos es muy reciente, en esta revisión se usará el nombre *H. avium* para designar a todos estos organismos, excepto donde los nombres *P. avium*, *P. volantium* y «*Pasteurella* especie A» sean, con seguridad, más apropiados.

AISLAMIENTO

Para obtener cepas de los senos paranasales de las aves enfermas es recomendable el uso de medios de cultivo selectivos, para evitar de este modo el sobrecrecimiento de *H. paragallinarum* por otras bacterias que normalmente habitan los senos y la cavidad nasal. En el INTA de Balcarce ha dado buen resultado el empleo

del medio Columbia agar base con el agregado de 5 a 7% de sangre equina lisada, bacitracina (5 U/ml), cloxacilina (5 µg/ml) y vancomicina (20 µg/ml) (54). La sangre equina hemolizada se prepara manteniéndola en baño maría a 56°C durante 40 min con agitación a intervalos de 4 min. La sangre hemolizada se conserva congelada a -20°C (54). Es conveniente sembrar por duplicado en el citado medio con y sin el agregado de los antibióticos, para asegurar el aislamiento de cepas de *H. paragallinarum* que pudieran ser sensibles a los antibióticos. En trabajos realizados en INTA sólo una de 80 cepas examinadas creció levemente inhibida por este medio selectivo.

Si bien estas bacterias desarrollan aeróbicamente en caldo, es conveniente la incubación con 5 a 10% de CO₂ cuando se cultivan en medios sólidos. En el INTA de Balcarce se ha usado con buenos resultados para primo-aislamiento una atmósfera microaerofílica rica en hidrógeno, preparada en jarras anaeróbicas con manómetro incorporado como sigue: las jarras se evacúan con una bomba de vacío hasta 0,7 atmósferas (Atm.), se adiciona H₂ hasta 0,2 Atm. y se agrega CO₂ hasta 0,1 Atm. dejando un vacío residual para asegurar el sellado completo (54). El empleo de la citada atmósfera disminuye el crecimiento del grupo *H. avium* y otras pasteurelas V dependientes que son más aeróbicas y que podrían confundirse con el agente de la coriza infecciosa.

IDENTIFICACION

Requerimientos nutricionales

Todos los hemófilos aviarios, con algunas excepciones detalladas más adelante, re-

quieran del factor V pero no del X. No es fácil establecer los exactos requerimientos de factores de crecimiento que tienen estos hemófilos. El uso de discos comerciales con factores de crecimiento para medios de cultivo tales como el agar de infusión cerebrocorazón o el agar para pruebas de susceptibilidad pueden producir un porcentaje alto de cultivos que falsamente parecen ser dependientes de ambos factores, X y V (9). Tanto la marca comercial del disco como la del medio a emplear deberían ser cuidadosamente controladas para seleccionar el artículo más adecuado. Para laboratorios bien equipados la prueba de porfirina (32) se recomienda para determinar la dependencia del factor X. Tales laboratorios bien equipados podrían también considerar el uso de hemina purificada y de NAD para suplementar medios de cultivo enriquecidos.

Recientemente se ha reconocido que algunas cepas de *H. paragallinarum* aisladas de aves en Sudáfrica aparentemente son independientes del requerimiento del NAD (19, 27, 40). Se ha demostrado que estas cepas son idénticas a *H. paragallinarum* en todas sus propiedades excepto por su capacidad de crecer en un medio de cultivo complejo sin la adición de factor V (27, 40).

Propiedades bioquímicas

La habilidad para reducir nitratos a nitritos y fermentar la glucosa sin la formación de gas es común a todos los hemófilos aviarios. La actividad oxidasa positiva, la presencia de la enzima fosfatasa alcalina y la falta de producción de indol o hidrólisis de la urea o gelatina son también características uniformes.

Existe considerable confusión en la interpretación de los resultados de la fermenta-

ción de carbohidratos por los hemófilos aviarios. En general, la variabilidad registrada en la bibliografía puede deberse al uso de diferentes medios basales. Los resultados falsos negativos se asocian principalmente con crecimiento pobre y pueden ser un problema significativo (1). En la mayoría de los estudios recientes se ha usado un medio compuesto por caldo rojo fenol con la adición de 1% (p/v) de ClNa, 25 µg/ml de NADH (NAD reducido), 1% (v/v) de suero de pollo y 1% (p/v) del correspondiente carbohidrato. El uso de este caldo y la precaución de efectuar un inóculo denso es la elección metodológica más conveniente para

poder interpretar correctamente los resultados de la fermentación de los carbohidratos. Para estudios más extensos la selección de la técnica de cultivos en placa duplicada (1) es lo más apropiado.

El Cuadro 1 presenta aquellas propiedades que permiten una identificación completa de los hemófilos aviarios. Se muestran las propiedades del complejo grupo de *H. avium* y las nuevas especies de *Pasteurella*. La falta de producción de catalasa y la ausencia de fermentación de la galactosa y trehalosa por el *H. paragallinarum* son propiedades que claramente separan a esta especie del resto de los otros hemófilos aviarios.

CUADRO 1
Diferenciación de los hemófilos aviarios

Pruebas	<i>Haemophilus paragallinarum</i>	<i>Haemophilus avium</i>	<i>Pasteurella avium</i>	<i>Pasteurella volantium</i>	<i>Pasteurella especie A</i>
Pigmento	—	V (amarillo)	V (amarillo)	V (amarillo)	V (amarillo)
Catalasa	—	+	+	+	+
Crecimiento aerobio	No	Sí	Sí	Sí	Sí
ONPG	+	V	—	+	V
Producción de ácido de:					
Arabinosa	—	V	—	—	+
Galactosa	—	+	+	+	+
Maltosa	+	V	—	+	V
Manitol	+	V	—	+	V
Sorbitol	V	V	—	V	—
Sacarosa	V	+	+	+	+
Trehalosa	—	+	+	+	+

Con la excepción de algunos aislamientos de *H. paragallinarum*, todas las especies son bacilos Gram negativos que requieren factor V pero no X. Todas las especies producen ácido de la glucosa y crecen con 5% de anhídrido carbónico. + = Positivo (> 90%). — = Negativo (> 90%). V = Reacción variable

ESQUEMAS DE SEROTIPIFICACION

Esquema de Page

El primer estudio serológico de *H. paragallinarum* fue realizado en los EE.UU. por Page (42) quien usó una prueba de aglutinación para identificar tres serovariedades (A, B y C). El esquema de Page es el método más comúnmente empleado para serotipificar a *H. paragallinarum*. Clásicamente esta técnica se implementa utilizando antisueros de conejo contra las tres cepas de referencia (serovariedad A - cepa 0083, serovariedad B - cepa 0222 y serovariedad C - cepa Modesto). Para efectuar la prueba se realizan diluciones de los correspondientes sueros y se enfrentan con cultivos de las cepas a clasificar en una prueba de aglutinación en placa o portaobjetos. Las cepas de las tres serovariedades tienen antígenos comunes y ello se evidencia con abundantes reacciones serológicas cruzadas. Por lo tanto una cepa se identifica como perteneciente a una determinada serovariedad si comparativamente aglutina a la dilución más alta del suero correspondiente a la serovariedad asignada.

Una gran desventaja del esquema de Page es la alta incidencia de cepas no serotipificables, tanto por ser autoaglutinantes como no aglutinantes; así se encontraron hasta un 38% de cepas inclasificables en uno de los estudios (5). Se ha demostrado que todas las cepas de *H. paragallinarum*, independientemente de la serovariedad de Page a la cual pertenecen, tienen actividad hemoaglutinante (HA) siempre que se utilicen glóbulos rojos de pollo fijados con glutaraldehído. Esta actividad HA ha sido empleada como punto de partida para la realización de una prueba de inhibición de la hemoaglutinación (HI) usando antisueros de conejo contra las

serovariedades de referencia A, B y C. En el Animal Research Institute (ARI) de Australia se ha aplicado la metodología de HI en el esquema de Page logrando de ese modo serotipificar a 70 de los 72 aislamientos de *H. paragallinarum* que se estudiaron (6). Debería señalarse que algunos de los aislamientos requieren tratamiento previo con hialuronidasa para que la actividad HA pueda ser evidenciada, por ejemplo este tratamiento se tuvo que aplicar a 9 de los 72 aislamientos del citado estudio (6).

Los anticuerpos monoclonales (AcMs) son útiles para clasificar a los aislamientos de *H. paragallinarum* dentro de las serovariedades de Page. Se ha demostrado que cuatro AcMs pueden ser usados tanto en pruebas de HI como de «dot-blot» para serotipificar los aislamientos de campo (17). El uso de los cuatro AcMs dio mejores resultados que un estudio anterior en el cual sólo se disponía de dos AcMs (14). Sin embargo existen diferencias regionales entre las cepas, por ejemplo los aislamientos de la serovariedad A de Argentina y Brasil son antigénicamente diferentes a las cepas del resto del mundo (16).

Esquema de Kume

Este esquema es un método alternativo al de Page (34). Se basa en la detección de hemoaglutininas en células bacterianas que primeramente se tratan con tiocianato de potasio y son luego sonicadas. La actividad de HA también se detecta usando glóbulos rojos de pollo fijados con glutaraldehído. De acuerdo a lo demostrado recientemente (7), el esquema de Kume reconoce tres serogrupos que corresponden a las serovariedades A, B y C de Page. Además existen diferencias menores que pueden ser detectadas

mediante el uso de antisueros adsorbidos, por ello el esquema que originalmente se propuso reconoció tres serogrupos y siete serovariedades. Ultimamente el esquema de Kume ha sido utilizado con bastante frecuencia en el ARI, permitiendo el reconocimiento de dos nuevas serovariedades (7). Debido a la aparición de nuevas serovariedades se ha sugerido una nueva terminología para el esquema de Kume. Actualmente nos referimos a los serogrupos A, B y C al esquema de Kume. Las serovariedades dentro de los serogrupos se identifican numéricamente. Hasta ahora las serovariedades reconocidas en el esquema de Kume son: A-1, A-2, A-3, A-4, B-1, C-1, C-2, C-3 y C-4 (7). En la nueva terminología se enfatiza la equivalencia que existe entre las serovariedades de Page y los serogrupos de Kume.

El esquema de Kume tiene la ventaja de no requerir aglutinación de células bacterianas y por lo tanto, evita el problema de la autoaglutinación o inaglutinabilidad que ocurre cuando el esquema de Page se efectúa mediante una prueba de aglutinación. A pesar de ello el esquema de Kume continúa siendo una técnica difícil y poco utilizada, principalmente debido a la necesidad de preparar antisueros específicos mediante adsorción.

Esquema de Hinz

Un esquema de serotipificación basado en la detección de antígenos termoestables ha sido propuesto para identificar seis serovariedades por medio de una prueba de difusión en gel (25). Este esquema no parece haber sido utilizado en ningún otro estudio distinto al de la publicación original.

¿Cuál es el mejor esquema de serotipificación?

Evidentemente no existe un esquema de serotipificación en particular que se adapte a las necesidades de cada laboratorio. El esquema de Page adaptado a una prueba de HI (6), parecería ser la opción más simple que está disponible para la mayoría de los laboratorios. Cuando se usa la prueba de HI con el esquema de Page es importante que los antígenos hemoaglutinantes se preparen de un modo similar al descrito en el estudio original (6). Este particular método de producción evita la necesidad de un tratamiento adicional de los antígenos en la mayoría de los aislamientos. El hecho de que las serovariedades de Page también se correspondan con el tipo de inmunidad específica que confieren las vacunas inactivadas es otro poderoso motivo para adoptar el empleo de este método.

El esquema de Kume es el que confiere el mayor grado de subtípificación, pero dado que es una prueba técnicamente muy exigente no es posible adoptarla en muchos laboratorios. Por otro lado aún permanece confuso el significado de las serovariedades de Kume con relación al tipo específico de inmunidad adquirida.

Puesto que los anticuerpos monoclonales no están disponibles comercialmente su utilización está restringida a aquellos laboratorios que tienen acceso directo a estos reactivos.

RECIENTES RESULTADOS DE SEROTIPIFICACION

Durante los últimos diez años se han efectuado una serie de estudios sobre la prevalencia de varias serovariedades de

Page en diferentes países. Los resultados de diversas investigaciones se resumen en el Cuadro 2. Estos estudios de serotipificación tienen importancia para los programas de vacunación a implementar y serán discutidos más adelante en la sección sobre vacunación. Sin embargo se debe comprender que la mayoría de los estudios realizados no son relevamientos sistemáticos y por lo tanto estos resultados no constituyen necesariamente un reflejo exacto de la situación general de cada país.

Dos temas deben ser considerados como los más importantes en los estudios realizados en Sudamérica. En primer lugar se destaca la alta incidencia de la serovariedad B de Page en la República Argentina puesto que 17 de 41 aislamientos han sido cla-

sificados dentro de esta variedad (48). Es importante destacar que durante muchos años la serovariedad B de Page no fue aislada y algunos reportes científicos habían hecho dudar de su existencia, sugiriendo que las cepas que originalmente fueron descritas por Page serían variantes de las serovariedades A o C (51). En un reciente estudio, se ha demostrado que la serovariedad B de Page realmente existe (58). Los nuevos estudios realizados en Argentina (48, 54) y en el exterior (30) han demostrado la importancia de esta serovariedad afirmando la necesidad de incluirla en las vacunas comerciales.

En segundo lugar se debe destacar que en Sudamérica algunas cepas de la serovariedad A de Page son antigénicamente dis-

CUADRO 2

Resultados de los estudios de serotipificación de *Haemophilus paragallinarum* en varios países

País	Número de aislamientos	Serovariedad de Page:				Referencia N°
		A	B	C	NT	
Argentina	41	21	17	1	2	48
Australia	39	5	0	28	6	55
«	43	2	0	24	17	5
«	65	15	0	49	1	24
Brasil	27	14	1	11	1	13
China	11	11	0	0	0	20
Japón	88	62	0	24	2	50
«	106	49	0	22	2	59
Malasia	10	10	0	0	0	62
Sud Africa	13	4	0	4	5	5
«	12	5	2	5	0	24

La mayoría de los estudios de este cuadro fueron realizados usando el esquema de Page. El estudio de Eaves y col. (24) fue llevado a cabo empleando el esquema de Kume y los resultados han sido «convertidos» al esquema de Page.

ntas de los aislamientos típicos de esta serovariedad que está distribuida en otras regiones del mundo. Así en Argentina, 4 de 10 aislamientos de la serovariedad A, y en Brasil, 6 de 14 aislamientos de la misma serovariedad, no reaccionaron con los anticuerpos monoclonales específicos (13, 14). No se conoce con exactitud el significado de estos aislamientos sudamericanos de la serovariedad A que no reaccionan con los anticuerpos monoclonales; este tema será discutido con detalle en la próxima sección sobre vacunación.

INVESTIGACION DE NUEVOS METODOS DE DIAGNOSTICO

Se han producido AcMs en Japón (53, 60, 61) y Sudáfrica (56). Los AcMs japoneses han sido caracterizados en términos de su habilidad para reconocer a las diferentes serovarietades de *H. paragallinarum* (14, 15, 17) y son, por lo tanto, herramientas potencialmente útiles. Desafortunadamente, los AcMs de Sudáfrica nunca han sido caracterizados totalmente y por ese motivo tienen un uso limitado. Una gran desventaja de todos los AcMs es que ninguno está comercialmente disponible y por ello sólo pueden ser empleados por los grupos de investigación que los producen.

El trabajo que actualmente se realiza en ARI se orienta hacia una nueva generación de herramientas para el diagnóstico. En este proyecto se seleccionaron dos orientaciones o líneas de trabajo. La primera involucra el desarrollo de pruebas basadas en la detección del DNA bacteriano para la identificación rápida y específica de *H. paragallinarum*. Hasta el momento se han desarrollado pruebas de búsqueda de DNA («DNA-probe») obteniéndose dos pruebas de

reacción en cadena de polimerasa («polymerase chain reaction» o PCR) para *H. paragallinarum*. Una de ellas se basa en la detección de fragmentos de DNA al azar y la otra está dirigida hacia el DNA que codifica para los rRNA 23S del microorganismo. Ninguna de las dos pruebas es hasta ahora infalible: con la primera se obtienen algunos resultados falsos positivos mientras que con el segundo PCR se detectan algunos resultados falsos negativos (datos no publicados). Con el perfeccionamiento de estas pruebas se espera obtener un diagnóstico rápido a partir de hisopados sinusales de las aves enfermas. Estas pruebas moleculares de nueva generación han demostrado ser útiles para identificar a cepas sudafricanas de *H. paragallinarum* independientes del factor V (NADH).

La otra línea de trabajo se orienta hacia la producción de AcMs. Se intenta elaborar una gran cantidad de AcMs que, de este modo, estarían eventualmente disponibles en las fuentes comerciales. Esto eliminaría la seria limitación que tienen los equipos de AcMs que se producen mediante el enfoque tradicional. Posteriormente se investigará el empleo de estos anticuerpos en pruebas de ELISA para la detección directa de los antígenos correspondientes a las serovarietades específicas y así efectuar diagnósticos rápidos y precisos.

PROTECCION CRUZADA DESPUES DE LA INFECCION O VACUNACION

Existe evidencia de que luego de una infección natural se produce inmunidad subsecuente que ofrece protección contra serovarietades de Page tanto homólogas como heterólogas (45, 49).

Al analizar la literatura científica referida al grado de protección cruzada entre serovariedades que confieren las vacunas a células enteras muertas, son dos los tópicos que pueden confundir la interpretación de los resultados de estas investigaciones. Primero debe tenerse en cuenta que diferentes estudios han definido a la «protección» de distintas maneras. Algunos investigadores han evaluado a la misma sólo en términos referidos a la presencia o ausencia de síntomas clínicos. Otros, incluyendo los estudios llevados a cabo en el ARI y en el INTA, han definido que un ave vacunada está protegida si luego del desafío con una cepa virulenta presenta tres características: 1) ausencia de síntomas clínicos, 2) falta de mucus en los senos paranasales en la necropsia y 3) imposibilidad de aislar al microorganismo inoculado de estos mismos senos. Sin duda, la última definición es mucho más exigente que la simple ausencia de síntomas clínicos.

La otra cuestión que debe ser considerada cuando se examina la protección cruzada entre serovariedades es el esquema de serotipificación utilizado. La mayoría de los estudios realizados sobre protección cruzada incluyeron aislamientos que se serotipificaron por el esquema de Page. El nuevo esquema de Kume ha permitido serotipificar con mayor precisión a *H. paragallinarum*. Ahora se sabe que los serogrupos de Kume se corresponden con las serovariedades de Page. Sin embargo debe recordarse que es posible que aislamientos de la misma serovariedad de Page (equivalente a expresar el mismo serogrupo de Kume) pertenezcan a diferentes serovariedades de Kume. Por ejemplo las cepas HP31 y HP60 (cepas australianas del

ARI) pertenecen ambas a la serovariedad C de Page (equivalente al serogrupo C de Kume) aunque son respectivamente serovariedades C-2 y C-4 de Kume (7).

Teniendo en cuenta las limitaciones citadas más arriba puede concluirse que, en general, existe coincidencia en la literatura científica sobre las vacunas muertas contra la coriza infecciosa y la protección cruzada que las mismas confieren. Los investigadores que han utilizado vacunas basadas en cultivos de tejidos o vitelo de huevos embrionados han reportado algún grado de protección cruzada entre las serovariedades de Page (43, 57). En contraste, se ha demostrado que las vacunas muertas preparadas con antígenos desarrollados en caldos de cultivo brindan muy poca protección cruzada entre las serovariedades de Page (12, 36, 46). En lo que respecta a protección cruzada, la diferencia entre las vacunas elaboradas con huevo o caldo, podría estar relacionada con la estructura antigénica. Puesto que la infección natural produce protección cruzada entre estas serovariedades, es posible que el antígeno bacteriano producido en el vitelo de los huevos tenga una estructura antigénica similar a la que presenta originalmente el microorganismo en el ave, siendo probablemente distinta a la obtenida cuando este germen crece en los caldos de cultivo. El hecho de que las vacunas producidas en huevos provean cierto grado de protección cruzada entre las serovariedades de Page, no debería ser tomado como una recomendación general para decidir la utilización de este tipo de vacunas. Cuando se considera exclusivamente a la protección homóloga entre las serovariedades de Page, son varios los estudios que han demostrado que

las vacunas basadas en caldos de cultivos son más efectivas que las elaboradas en huevos (23, 39).

Puesto que el esquema de Kume todavía no ha sido ampliamente utilizado, resulta difícil realizar una evaluación de la literatura científica referida a la protección cruzada entre estas serovariedades. A pesar de ello, los datos disponibles indican que, en general, los serogrupos de Kume no presentan protección cruzada entre sí. En cambio, parece ser que dentro de un mismo serogrupo de Kume existe un grado significativo de protección cruzada entre las serovariedades que lo integran. Hasta el momento, los resultados obtenidos en estudios de protección con combinaciones de serovariedades de Kume (4, 12, 36) son los siguientes: a) ensayos donde se demostró protección cruzada entre C-1 con C-2 y C-2 con C-4; y b) ensayos donde no existió protección cruzada entre A-1 con C-1, A-1 con C-2, A-4 con C-2 y A-4 con C-4.

En general, la evidencia disponible señala que las vacunas inactivadas o bacterinas contra la coriza infecciosa, preparadas con células enteras muertas que han sido desarrolladas en caldos de cultivo, únicamente proveen protección contra aquellas serovariedades de Page que se incluyen en la formulación de las mismas. La confirmación de la existencia de la serovariedad B de Page como una auténtica serovariedad con patogenicidad completa (58) y su existencia en Argentina (48, 54), Brasil (13) y quizás también en otros países de Sudamérica, indica que la misma debe ser incluida en la formulación de las bacterinas, si se considera que la población avícola a inmunizar se encuentra en un área geográfica donde predomina la mencionada serovariedad. Actualmente se reconoce la importancia de

proteger contra la serovariedad B y ya existen algunas vacunas comerciales inactivadas (30) que contienen cepas virulentas de la serovariedad B.

Otro factor que debe ser considerado es la posibilidad de variaciones antigénicas en determinadas áreas geográficas. Ahora se sabe que algunos aislamientos de la serovariedad A de Page de la Argentina (54) y del Brasil (13) son antigénicamente diferentes a las cepas tradicionales, puesto que no reaccionan con los AcMs específicos para esta serovariedad. ¿Significa que los mencionados aislamientos son también diferentes en sus propiedades inmunológicas? ¿Protegerán las vacunas preparadas con cepas A tradicionales contra una descarga efectuada con aislamientos de la serovariedad A que no reaccionan con los anticuerpos monoclonales? Por el momento no conocemos la respuesta a ambas preguntas. Existe, por lo tanto, la necesidad de realizar estudios sobre protección que incluyan a estos aislamientos sudamericanos de *H. paragallinarum*.

VACUNAS INACTIVADAS O BACTERINAS

Medios de cultivo

Se ha informado sobre una variedad de diferentes métodos de preparación de antígenos para vacunas contra la coriza infecciosa usando sacos vitelinos de embriones de pollo, caldos de cultivo y cultivos celulares de tejidos aviarios. La propagación en huevo fue el método usado a comienzos de la década del 60 para la producción de las primeras vacunas contra la coriza infecciosa (43). Si bien estas vacunas no brindaron buena protección contra los signos clínicos de la enfermedad, lograron

en cambio prevenir el desarrollo de las lesiones secundarias de los sacos aéreos y redujeron las pérdidas de la producción de huevos por caídas de postura asociadas a los brotes de coriza infecciosa. Investigaciones posteriores han demostrado que las vacunas elaboradas con caldos de cultivo confieren mejor protección que los productos fabricados en huevos embrionados (23, 39).

Sólo existe un trabajo que describe la producción de vacunas contra la coriza infecciosa en cultivos de tejidos aviarios (57). Este único estudio informa que una vacuna elaborada en cultivos de tejidos fue superior a bacterinas producidas en caldos convencionales (57). Dado que la reciente bibliografía sobre la producción de vacunas contra la coriza infecciosa sólo involucra el empleo de caldos de cultivo, el resto de la presente revisión se referirá exclusivamente a la eficacia de las bacterinas producidas en caldos.

En la producción de vacunas contra la coriza infecciosa se han utilizado diferentes medios de cultivos. Entre los caldos que han demostrado dar buen resultado para la fabricación de bacterinas efectivas, se incluyen varios tipos de infusiones de carne de pollo (37, 38) y un caldo de Casman modificado (12, 47). Aparentemente no se han publicado comparaciones directas entre los resultados obtenidos mediante el empleo de bacterinas producidas en distintos medios de cultivo; debido a ello la eficacia relativa de estos medios no puede ser evaluada.

Niveles de antígeno

Se ha demostrado que 10^8 unidades formadoras de colonias por dosis de vacuna es la dosis mínima de antígeno que brinda adecuada protección (39).

Agentes inactivantes

Existe cierta discrepancia sobre el efecto de diferentes agentes inactivantes. Varios estudios han confirmado que el timerosal es un efectivo agente inactivante (12, 23, 39). Otros investigadores han informado que las vacunas en las cuales se usó formalina como agente inactivante fueron también efectivas (22, 47).

Se han realizado tres estudios comparativos directos utilizando vacunas que difirieron sólo en la formulación del agente inactivante; así por ejemplo, en estos trabajos las fases de antígeno y adyuvante fueron exactamente las mismas y solamente se varió la composición del agente inactivante utilizado. En una de estas comparaciones directas, se determinó que el uso de la formalina, en vez del timerosal, produjo una reducción de la eficacia de vacunas que contienen gel de hidróxido de aluminio como adyuvante (12). Matsumoto y Yamamoto (38) encontraron que la formalina, comparada con el timerosal, disminuye la eficacia de una vacuna que contenía como adyuvante alumbre de cromo. Sin embargo, estos mismos autores no encontraron diferencias entre el timerosal y la formalina en otras vacunas que contenían gel de hidróxido de aluminio. En el estudio restante, la adición de formalina, comparada con el tradicional uso del timerosal, redujo la eficacia de vacunas conteniendo tanto geles de aceite mineral como de hidróxido de aluminio (23). En general se concluye que, si bien las bacterinas inactivadas con formalina pueden ser protectoras, es posible que vacunas similares conteniendo timerosal podrían ser aún más eficaces.

Adyuvantes

Se ha evaluado una variedad de adyuvantes para vacunas inactivadas contra la coriza infecciosa de las aves. Nuevamente es importante recordar que diferentes investigadores han usado distintos criterios para evaluar la «protección». De este modo, algunos de los resultados divergentes que se han registrado en la bibliografía pueden provenir del uso de diferentes definiciones del término «protección». Las vacunas ensayadas, elegibles o candidatas para ser seleccionadas, deberán ser revisadas en dos aspectos: eficacia y seguridad. Este último ítem se refiere a la ausencia o presencia de mínimas reacciones post-vacunales.

El tema de las reacciones colaterales adversas debe ser seriamente considerado en las vacunas contra la coriza infecciosa. En varios estudios se han registrado reacciones colaterales relacionadas con la aplicación de estas vacunas. Se ha sugerido que estas reacciones pueden estar asociadas tanto con el adyuvante como con el lipopolisacárido (LPS) que se encuentra en las células de *H. paragallinarum* (28). Se ha demostrado que el LPS del *H. paragallinarum* ha sido letal para huevos embrionados de pollo y resultó positivo en una prueba para la detección de pirógenos (33). Iritani y col. (28) también han demostrado que un extracto de polisacárido poco purificado contiene un componente que es tóxico y causa hidropericardio cuando se inyecta intravenosamente a pollos. Cualquier antecedente de reacciones colaterales adversas será descrito en las siguientes secciones, anotando su relación con los variados sistemas de adyuvantes que pueden emplearse.

1) *Geles de hidróxido de aluminio y alumbre de cromo*: Se efectuaron una cantidad de estudios que confirman la eficacia del gel de hidróxido de aluminio (23, 37, 38, 44). También se ha encontrado que el alumbre de cromo es un adyuvante efectivo (38). Se evaluaron dos marcas comerciales distintas de geles de hidróxido de aluminio y se encontraron diferencias apreciables entre las mismas (12). Varios estudios han informado sobre la aparición de reacciones muy leves en el lugar de vacunación (18, 38). En todos estos trabajos se consideró que las reacciones adversas encontradas en aves vacunadas con bacterinas que contenían gel de hidróxido de aluminio fueron mínimas. En los estudios realizados en el ARI o bien no se pudo detectar ninguna reacción adversa o sólo se encontraron reacciones menores en el sitio de inoculación (8, 12, 44).

2) *Aceite mineral (tipo emulsión única)*: Con respecto a la eficacia de las vacunas con emulsiones del tipo aceite mineral han existido algunos desacuerdos. La revisión de esta sección se centrará en aquellas vacunas que contienen aceite mineral en un sistema de emulsión única, como por ejemplo del tipo de emulsión «agua en aceite». Clark y Godfrey (21) realizaron uno de los primeros estudios en el cual se examinó la eficacia de las vacunas propagadas en huevo y elaboradas con aceite mineral. En este estudio se informó que estas vacunas realmente conferían algún grado de protección cuando fueron comparadas con aves controles sin vacunar. Las pollas vacunadas desarrollaron signos clínicos de coriza aunque la severidad de los mismos fue reducida en comparación con los síntomas de las aves controles que no fueron vacunadas. Asimis-

mo, la recuperación de las pollas vacunadas fue más rápida y la incidencia de complicaciones fue más baja que en los controles sin vacunar (21). Probablemente la baja eficacia obtenida con esta vacuna en particular puede haberse debido a otros factores, además del sistema adyuvante, como por ejemplo el uso de antígeno propagado en huevo o la adición de formalina como agente inactivante. En un estudio posterior, efectuado por Matsumoto y Yamamoto (38), también se encontraron resultados poco satisfactorios mediante el empleo de una vacuna comercial similar, propagada en huevo y con el agregado de aceite mineral.

Con referencia a las bacterinas propagadas en caldo, todavía existe desacuerdo sobre la eficacia que tienen esas vacunas cuando se utiliza al aceite mineral como adyuvante. En el ARI se han comparado directamente vacunas elaboradas con el mismo antígeno pero empleando diferentes sistemas de adyuvantes. De ese modo se comprobó que, si bien las vacunas elaboradas con aceite mineral conferían cierta protección, ésta era mucho menor que la brindada por una vacuna conteniendo adyuvante de gel de hidróxido de aluminio (44). En estos trabajos se probaron dos concentraciones diferentes de aceite en el componente del adyuvante pero no se logró mejorar la eficacia de los productos. En contraste, Davis y col. (23) no encontraron diferencias notables en un trabajo en el que se efectuó una comparación directa entre vacunas elaboradas con adyuvantes de aceite mineral e hidróxido de aluminio. En un estudio realizado en Sudáfrica (22) se ha informado que vacunas con aceite mineral superaron la eficacia de una vacuna que contenía hidróxido de aluminio. Sin embar-

go, los resultados de este trabajo deben ser considerados con precaución. En este caso las vacunas con aceite mineral contenían cepas de la serovariedades A y B de Page mientras que la vacuna con gel de hidróxido de aluminio contenía cepas de las serovariedades A y C. En estos ensayos fue utilizada una mezcla de cepas de las serovariedades A y B de Page para desafiar a las aves vacunadas y testigos en la descarga para la reproducción experimental; claramente la vacuna con gel de hidróxido de aluminio no contenía la serovariedad B de Page que sería la apropiada para proteger a los animales. Recientemente se ha informado la eficacia de una vacuna trivalente elaborada con aceite mineral que brinda adecuada protección contra las serovariedades de Page (30).

Otro aspecto importante que debe tenerse en cuenta cuando se utilizan vacunas que contienen aceite mineral es la seguridad del producto. En un estudio realizado en el ARI se encontró que vacunas experimentales preparadas con aceite mineral causaron hinchazones localizadas en el área de vacunación en 15 de las 20 aves vacunadas y granulomas en 18 de las mismas (44). Debe admitirse que la severidad de estas reacciones es inaceptable para las operaciones avícolas en escala comercial. Por otro lado, se señala que todos los otros estudios que han examinado el uso de vacunas contra la coriza infecciosa con aceite mineral, no han indicado la realización de análisis específicos para detectar cualquier posible reacción adversa asociada a la vacunación. Dado que los LPS de *H. paragallinarum* han demostrado ser pirogénicos (33) la ausencia de registros sobre la ocurrencia de fiebre en las aves experimen-

talmente vacunadas constituye una importante deficiencia de todos estos ensayos. Todas las vacunas examinadas que contengan aceite mineral y que podrían ser candidatas a ser seleccionadas para su empleo contra la coriza infecciosa, deberían ser siempre cuidadosamente evaluadas para detectar cualquier evidencia de reacciones colaterales adversas a la vacuna.

3) *Hidróxido de aluminio y aceite mineral (tipo emulsión única)*: En un intento para aumentar la eficacia de las vacunas con aceite mineral, se han evaluado bacterinas que contienen ambos adyuvantes a la vez, hidróxido de aluminio y aceite mineral. Se demostró que tales vacunas son realmente muy efectivas. Sin embargo, estas bacterinas combinadas producen reacciones adversas aún más severas que las de los productos preparados únicamente con aceite mineral (44).

4) *Aceite mineral (tipo emulsión doble)*: Un adyuvante de emulsión doble es un sistema alternativo para combinar las fases de antígeno y adyuvante. Una emulsión doble se logra re-emulsionando una emulsión simple «agua en aceite» en una fase externa de agua. En una evaluación inicial de emulsiones dobles (3), se demostró que estas vacunas brindan niveles muy pobres de protección. Sin embargo, no se evidenció ninguna reacción adversa vacunal. El aceite empleado en las vacunas del tipo de emulsión doble pertenecía al mismo lote que había sido utilizado en un estudio previo de vacunas del tipo de emulsión simple «agua en aceite». La presencia de aceite mineral en las vacunas con este tipo de emulsiones simples fue asociada con reacciones adversas bastante severas (44). Sin embargo, estas reacciones estuvieron au-

mentes cuando se usó el mismo aceite en un sistema de emulsiones dobles. Esto sugiere que el método de preparación de una vacuna de emulsión doble ejerce algún tipo de moderación sobre la toxicidad de las bacterinas elaboradas con aceite mineral y células inactivadas de *H. paragallinarum*.

En un reciente estudio se han obtenido resultados mucho más alentadores empleando sistemas de emulsión doble. Al realizar trabajos en colaboración con un fabricante australiano, muy experimentado en la producción comercial de este tipo de vacunas basadas en emulsiones dobles, se obtuvieron elevados niveles de protección y se demostró que este tipo de bacterinas son altamente efectivas (8). También se ha observado que estas vacunas de emulsión doble, causan muy pocas reacciones adversas en el sitio de la vacunación (músculo de la pechuga). Estos resultados indican que, siempre que sea correctamente formulado, el sistema de emulsión doble aplicado a las vacunas contra la coriza infecciosa es al mismo tiempo seguro y efectivo.

5) *Sistemas alternativos de adyuvantes*: Se han efectuado pocos estudios sobre la adaptación de adyuvantes diferentes del hidróxido de aluminio y del aceite mineral para las bacterinas contra la coriza infecciosa. En trabajos realizados en el ARI, se examinaron algunos sistemas alternativos de adyuvantes modernos (3, 44). Así se encontró que las vacunas elaboradas con la saponina «Quil A» tienen muy poca eficacia. Es posible que un adyuvante mixto que se prepare combinando el gel de hidróxido de aluminio con «Quil A» pueda ser más efectivo que cualquiera de los dos componentes por separado.

Del mismo modo, la amina lipoidal avridina no parece tener ningún rol como adyuvante efectivo en vacunas inactivadas contra la coriza infecciosa. La avridina es un potente estimulador del interferón y está considerada como un adyuvante eficaz para la estimulación de la inmunidad en las mucosas (31). Por ello, en el ARI se evaluó a la avridina como adyuvante único y en dos combinaciones diferentes: asociada con gel de hidróxido de aluminio y con un adyuvante del tipo emulsión doble en aceite mineral. En estos ensayos se usaron dos vías de inyección: intramuscular e intranasal. Cuando la avridina fue empleada como adyuvante único la vacuna no fue efectiva por ninguna de las dos vías utilizadas. Por otro lado no se pudo demostrar que la inclusión de la avridina mejorara la eficacia de las vacunas elaboradas tanto con gel de hidróxido de aluminio como con el sistema de la emulsión doble de aceite mineral. Puesto que los mismos tres métodos usados para incorporar la avridina a las vacunas ya han sido probados por otros investigadores en distintas enfermedades y éstos han comprobado su eficacia, parece poco probable que la explicación del pobre rendimiento de la avridina pueda ser debida a problemas en la formulación. Más bien parecería que la actividad adyuvante de la avridina no es relevante para las vacunas contra la coriza infecciosa en particular.

Vías de administración

La mayoría de la bibliografía sobre las vacunas inactivadas contra la coriza infecciosa indica que en casi todos los estudios se ha usado tanto la vía intramuscular como la subcutánea (23, 39). Hay pocas comparaciones directas sobre el efecto de

administrar la misma vacuna por diferentes vías. En un estudio realizado en el ARI, se demostró que una vacuna que contiene gel de hidróxido de aluminio fue eficaz al ser aplicada tanto por vía subcutánea (en la parte posterior del cuello) como intramuscular (en el músculo de la pechuga) (12). Sin embargo, la misma vacuna fue totalmente ineficaz cuando fue suministrada por vía intranasal. Se ha informado (29) que si se inyecta intramuscularmente una vacuna inactivada, elaborada con gel de hidróxido de aluminio, en el músculo de la pata, se induce mejor protección que si la misma vacuna se aplica en el músculo de la pechuga. No se han descrito las causas de esta distinta protección y tampoco se han reportado trabajos similares.

Importancia de la revacunación y duración de la inmunidad

La duración de la inmunidad inducida por las vacunas contra la coriza infecciosa ha sido examinada en numerosos estudios. Matsumoto y Yamamoto (39) demostraron que una dosis única de bacterina conteniendo gel de hidróxido de aluminio brindaba protección significativa hasta nueve meses después de la inyección. Kume y col. (35) pudieron lograr protección significativa hasta 30 semanas después de la vacunación usando dos dosis de la vacuna inactivada conteniendo gel de hidróxido de aluminio. En el ARI se demostró que las bacterinas elaboradas con gel de hidróxido de aluminio pueden brindar algún grado de protección hasta 56 semanas después de la vacunación. El nivel de protección siempre es más alto si se suministran dos dosis de la bacterina (12).

Analizando en general la bibliografía disponible, puede concluirse que si las evalua-

ciones de las vacunas inactivadas o bacterinas se efectúan durante períodos cortos de tiempo, una dosis única de bacterina elaborada con gel de hidróxido de aluminio es suficiente y resulta tan eficaz como la aplicación de dos dosis. Sin embargo, es muy probable que para obtener una protección más prolongada, las bacterinas elaboradas con gel de hidróxido de aluminio deberían inyectarse en dos dosis separadas entre sí por un intervalo mínimo de tres semanas.

VACUNAS VIVAS

En el ARI se han realizado estudios para el desarrollo de vacunas vivas contra la coriza infecciosa durante los tres últimos años. Este trabajo se basa en el conocimiento de que las aves naturalmente infectadas desarrollan inmunidad cruzada entre las serovariedades de Page (45). Esto sugiere la hipótesis de que una cepa vivía y no patógena de *H. paragallinarum* teóricamente debería conferir protección contra las tres serovariedades Page.

El trabajo efectuado ha confirmado que la infección con una cepa completamente virulenta de serovariedad C proporciona protección tanto contra una cepa diferente de serovariedad C de Kume como contra una cepa serovariedad A de Page (10). Habiéndose confirmado la hipótesis fundamental del proyecto, se decidió continuarlo y a partir de las cepas parentales de las serovariedades A y C se obtuvieron una serie de bacterias mutantes (10). Las mutaciones han sido llevadas a cabo por tratamiento químico. Si bien en los trabajos iniciales se ha podido demostrar que casi todas estas mutantes no fueron patógenas (10), en trabajos más recientes se ha evi-

denciado que una de las cepas resultó ser virulenta (Blackall, datos no publicados.) Mientras que esta cepa no fue patógena cuando se suministró por vía ocular y produjo un nivel de protección adecuado frente a una descarga de cepas virulentas de las serovariedades A y C (11), en cambio, resultó completamente virulenta cuando se inoculó por vía intrasínusal. Por ello investigaciones con otras técnicas, como por ejemplo mutaciones dirigidas y basadas en técnicas moleculares de inserción de transposones, quizás podrían ser mejores métodos para la producción de cepas vacunales vivas atenuadas contra la coriza infecciosa.

BIBLIOGRAFIA

1. Blackall PJ. An evaluation of methods for the detection of carbohydrate fermentation patterns in avian *Haemophilus* species. *J. Microbiol. Methods* 1: 275-281, 1983.
2. Blackall PJ. Biochemical properties of catalase-positive avian haemophili. *J. Gen. Microbiol.* 134: 2801-2805, 1988.
3. Blackall PJ. Further comparison of adjuvants for an inactivated infectious coryza vaccine. *Avian Dis.* 32: 831-835, 1988.
4. Blackall PJ. An evaluation of the cross protection afforded by inactivated infectious coryza vaccines. *Aust. Vet. J.* 68: 266-267, 1991.
5. Blackall PJ, Eaves LE. Serological classification of Australian and South African isolates of *Haemophilus paragallinarum*. *Aust. Vet. J.* 65: 362-363, 1988.
6. Blackall PJ, Eaves LE, Aus G. Serotyping of *Haemophilus paragallinarum* by the Page scheme: comparison of the use of agglutination and hemagglutination-inhibition tests. *Avian Dis.* 34: 643-645, 1990.
7. Blackall PJ, Eaves LE, Rogers DG. Proposal for a new serovar and altered nomenclature for *Haemophilus paragallinarum* in the Kume hemagglutination scheme. *J. Clin. Microbiol.* 28: 1185-1187, 1990.

8. Blackall PJ, Eaves LE, Rogers DG, Firth G. An evaluation of inactivated infectious coryza vaccines containing a double-emulsion adjuvant system. *Avian Dis.* 36: 632-636, 1992.
9. Blackall PJ, Farrah JG. An evaluation of commercial discs for the determination of the growth factor requirements of the avian haemophili. *Vet. Microbiol.* 10: 125-131, 1985.
10. Blackall PJ, Rafiee M, Graydon RJ, Tinworth D. Towards a live infectious coryza vaccine. *Proc. XIIIth. World Vet. Poult. Assoc. Conf.*, p. 99, Australia, 1993.
11. Blackall PJ, Rafiee M, Graydon MJ, Tinworth D. Progress towards a live infectious coryza vaccine. *Proc. West. Poult. Dis. Conf.*, Australia, 1994.
12. Blackall PJ, Reid DG. Further efficacy studies on inactivated, aluminum-hydroxide-adsorbed vaccines against infectious coryza. *Avian Dis.* 31: 527-532, 1987.
13. Blackall PJ, Silva EN, Yamaguchi T, Iritani Y. Characterization of isolates of avian hemophili from Brazil. *Avian Dis.* 38: 269-274, 1994.
14. Blackall PJ, Yamaguchi T, Iritani Y, Rogers DG. Evaluation of two monoclonal antibodies for serotyping *Haemophilus paragallinarum*. *Avian Dis.* 34: 861-864, 1990.
15. Blackall PJ, Yamamoto R. «*Haemophilus gallinarum*» — a reexamination. *J. Gen. Microbiol.* 135: 469-474, 1989.
16. Blackall PJ, Zheng YZ, Takagi M, Terzolo HR, Sandoval VE, Silva EN. Characterization of two monoclonal antibodies directed against serovar A *Haemophilus paragallinarum*. *Avian Dis.* 38: 361-365, 1994.
17. Blackall PJ, Zheng YZ, Yamaguchi T, Iritani Y, Rogers DG. Evaluation of a panel of monoclonal antibodies in the subtyping of *Haemophilus paragallinarum*. *Avian Dis.* 35: 955-959, 1991.
18. Boycott BR, Rimler RB, Davis RB. Experimental coryza in broiler chicks. I. Effects of vaccination with a *Haemophilus gallinarum* bacterin and its components on weight gains and resistance to infection. *Avian Dis.* 21: 364-369, 1977.
19. Bragg RR, Coetzee L, Verschoor JA. Plasmid- encoded NAD independence in some South African isolates of *Haemophilus paragallinarum*. *Onderstepoort J. Vet. Res.* 60: 147-152, 1993.
20. Chen X, Zhang P, Blackall PJ, Feng W. Characterization of *Haemophilus paragallinarum* isolates from China. *Avian Dis.* 37: 574-576, 1993.
21. Clark DS, Godfrey JF. Studies of an inactivated *Hemophilus gallinarum* vaccine for immunization of chickens against infectious coryza. *Avian Dis.* 5: 37-47, 1961.
22. Coetzee L, Strydom GS, Rogers EJ. The value of oil-adjuvant vaccines in the control of *Haemophilus paragallinarum* infection (infectious coryza) in egg producing birds in South Africa. *Devleop. Biol. Standard* 51: 169-180, 1982.
23. Davis RB, Rimler RB, Shotts Jr. RB. Efficacy studies on *Haemophilus gallinarum* bacterin preparations. *Am. J. Vet. Res.* 37: 219-222, 1976.
24. Eaves LE, Rogers DG, Blackall PJ. Comparison of hemagglutinin and agglutinin schemes for the serological classification of *Haemophilus paragallinarum* and proposal of a new hemagglutinin serovar. *J. Clin. Microbiol.* 27: 1510-1513, 1989.
25. Hinz KH. Heat-stable antigenic determinants of *Haemophilus paragallinarum*. *Zbl. Vet. Med. B* 27: 668-676, 1980.
26. Hinz KH, Kunjara C. *Haemophilus avium*, a new species from chickens. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 27: 324-329, 1977.
27. 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.* 21: 421-427, 1992.
28. Iritani Y, Iwaki S, Yamaguchi T. Biological activity of crude polysaccharide extracted from two different immunotype strains of *Haemophilus gallinarum* in chickens. *Avian Dis.* 25: 29-37, 1981.
29. Iritani Y, Kunihiro K, Yamaguchi T, Tomii T, and Hayashi Y. Difference of immune efficacy of infectious coryza vaccine by different site of injection in chickens. *J.*

- Jpn. Soc. Poult. 20: 182-185, 1984.
30. Jacobs AAC, Cuenen W, Storm PK. Efficacy of a trivalent *Haemophilus paragallinarum* vaccine compared to bivalent vaccines. Vet. Microbiol. 32: 43-49, 1992.
 31. Jensen KE. Synthetic adjuvants: avridine and other interferon inducers. En: Advances in carriers and adjuvants for veterinary biologics, p. 79-90, ed. R. M. Nervig, P. M. Gough, M. L. Kaerberle, and C. A. Whetstone, Iowa State University Press, Ames, Iowa, 1986.
 32. Kilian M. A rapid method for the differentiation of *Haemophilus* strains. Acta Pathol. Microbiol. Immunol. Scand. Sect. B 82: 835-842, 1974.
 33. Konno Y, Nakase Y. Purification of endotoxin of *Haemophilus gallinarum* and their biological activity. Jpn. J. Bacteriol. 32: 212, 1977.
 34. Kume K, Sawata A, Nakai T, Matsumoto M. Serological classification of *Haemophilus paragallinarum* with a hemagglutinin system. J. Clin. Microbiol. 17: 958-964, 1983.
 35. Kume K, Sawata A, Nakase Y. *Haemophilus* infections in chickens. 3. Immunogenicity of serotypes 1 and 2 strains of *Haemophilus paragallinarum*. Jpn. J. Vet. Sci. 42: 673-680, 1980.
 36. Kume K, Sawata A, Nakase Y. Immunological relationship between Page's and Sawata's serotype strains of *Haemophilus paragallinarum*. Am. J. Vet. Res. 41: 757-760, 1980.
 37. Kume K, Sawata A, Nakase Y. Relationship between protective activity and antigen structure of *Haemophilus paragallinarum* serotypes 1 and 2. Am. J. Vet. Res. 41: 97-100, 1980.
 38. Matsumoto M, Yamamoto R. A broth bacterin against infectious coryza: immunogenicity of various preparations. Avian Dis. 15: 109-117, 1971.
 39. Matsumoto M, Yamamoto R. Protective quality of an aluminum hydroxide-absorbed broth bacterin against infectious coryza. Am. J. Vet. Res. 36: 579-582, 1975.
 0. Mouahid M, Bisgaard M, Morley AJ, Mutters R, Mannheim W. Occurrence of V-factor (NAD) independent strains of *Haemophilus paragallinarum*. Vet. Microbiol. 31: 363-368, 1992.
 41. Mutters R, Piechulla K, Hinz KH, Mannheim W. *Pasteurella avium* (Hinz and Kunjara 1977) comb. nov. and *Pasteurella volantium* sp. nov. Int. J. Syst. Bacteriol. 35: 5-9, 1985.
 42. Page LA. *Haemophilus* infections in chickens. 1. Characteristics of 12 *Haemophilus* isolates recovered from diseased chickens. Am. J. Vet. Res. 23: 85-95, 1962.
 43. Page LA, Rosenwald AS, Price FC. *Haemophilus* infections in chickens. IV. Results of laboratory and field trials of formalinized bacterins for the prevention of disease caused by *Haemophilus gallinarum*. Avian Dis. 7: 239-256, 1963.
 44. Reid GG, Blackall PJ. Comparison of adjuvants for an inactivated infectious coryza vaccine. Avian Dis. 31: 59-63, 1987.
 45. Rimler RB, Davis RB. Infectious coryza: In vivo growth of *Haemophilus gallinarum* as a determinant for cross protection. Am. J. Vet. Res. 38: 1591-1593, 1977.
 46. Rimler RB, Davis RB, Page RK. Infectious coryza: cross-protection studies, using seven strains of *Haemophilus gallinarum*. Am. J. Vet. Res. 38: 1587-1589, 1977.
 47. Rimoler RB, Shotts Jr. EB, Davis RB. A growth medium for the production of a bacterin for immunization against infectious coryza. Avian Dis. 19: 318-322, 1975.
 48. Sandoval VE, Terzolo HR, Blackall RJ. Complicated infectious coryza outbreaks in Argentina. Avian Dis. 38: 672-678, 1994.
 49. Sato S, Shifrine M. Serologic response of chickens to experimental infection with *Haemophilus gallinarum*, and their immunity to challenge. Poult. Sci. 43: 1199-1204, 1964.
 50. Sawata A, Kume K, Nakase Y. *Haemophilus* infections in chickens. 2. Types of *Haemophilus paragallinarum* isolates from chickens with infectious coryza, in relation to *Haemophilus gallinarum* strain N. 221. Jpn. J. Vet. Sci. 40: 645-652, 1978.
 51. Sawata A, Kume K, Nakase Y. Biologic and serologic relationships between Page's and Sawata's serotypes of *Haemophilus paragallinarum*. Am. J. Vet. Res. 41: 1901-1904,

- 1980.
52. Schalm OW, Beach JR. Studies on infectious coryza of chickens with special reference to its aetiology. *Poult. Sci.* 15: 473-482, 1936.
53. Takagi M, Hirayama N, Makie H, Ohta S. Production, characterization and protective effect of monoclonal antibodies to *Haemophilus paragallinarum* serotype A. *Vet. Microbiol.* 27: 327-338, 1991.
54. Terzolo HR, Paolicchi FA, Sandoval VE, Blackall PJ, Yamaguchi T, Iritani Y. Characterization of isolates of *Haemophilus paragallinarum* from Argentina. *Avian Dis.* 37: 310-314, 1993.
55. Thorton AM, Blackall PJ. Serological classification of Australian isolates of *Haemophilus paragallinarum*. *Aust. Vet. J.* 61: 251-253, 1984.
56. Versehoor JA, Coetzee L, Visser L. Monoclonal antibody characterization of two field strains of *Haemophilus paragallinarum* isolated from vaccinated layer hens. *Avian Dis.* 33: 219-225, 1989.
57. Wichmann RW, Wichmann AC. The cultivation of *Haemophilus gallinarum* in tissue culture and the use of these cultures in the preparation of a bacterin for the prevention of infectious coryza. *Proc. West. Poult. Dis. Conf.* 32: 7-10, 1983.
58. Yamaguchi T, Blackall PJ, Takigami S, Iritani Y, Hayashi Y. Pathogenicity and serovar-specific hemagglutinating antigens of *Haemophilus paragallinarum* serovar B strains. *Avian Dis.* 34: 964-968, 1990.
59. Yamaguchi T, Kato K, Takigami S, Iritani Y, and Hayashi Y. Serological classification of Japanese isolates of *Haemophilus paragallinarum* using two serovar-specific monoclonal antibodies. *Avian Dis.* 34: 364-368, 1990.
60. Yamaguchi T, Takigami S, Iritani Y, Hayashi Y. Characterization of two new monoclonal antibodies against *Haemophilus paragallinarum* serovar C hemagglutinating antigen. *Avian Dis.* 34: 922-927, 1990.
61. Yamaguchi T, Takigami S, Iritani Y, Hayashi Y. Characterization and use of monoclonal antibodies to identify *Haemophilus paragallinarum* serovars. *Avian Dis.* 34: 52-57, 1990.
62. Zaini MA, Iritani Y. Serotyping of *Haemophilus paragallinarum* in Malaysia. *J. Vet. Med. Sci.* 54: 363-365, 1992.