

# Secuenciación de la región variable del gen hntp210 de *Avibacterium paragallinarum* como método alternativo al serotipado

A.A. BENITO\*<sup>1</sup>, S. ANIA<sup>1</sup>, O. ALZUGUREN<sup>1</sup>, C. SANZ<sup>1</sup>, L. SOLANS<sup>1</sup>, G. CHACON<sup>1</sup> y A. FERNANDEZ<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Exopol S.L. Pol. Río Gállego 50840, San Mateo de Gállego, Zaragoza, España.

\*E-mail del autor: [abenito@exopol.com](mailto:abenito@exopol.com)

---

*Avibacterium paragallinarum* es el agente causal de la coriza aviar, una enfermedad respiratoria aguda que ocasiona importantes pérdidas económicas a la industria avícola. La enfermedad afecta al tracto respiratorio superior y causa también un descenso en los parámetros productivos. Actualmente se han descrito tres serovares de *A. paragallinarum* según la clasificación Page (A, B y C) y tres serogrupos (A, B y C) con nueve serovares distintos (A1-A4, B1 y C1-C4) según Kume. Adicionalmente, se ha observado que no hay inmunidad cruzada entre los serovares A-C, e incluso entre algunos serovares de un mismo serogrupo Kume. Esta información resalta la importancia del serotipado en la elaboración de vacunas; sin embargo, su uso está restringido a muy pocos laboratorios en el mundo debido a la utilización de pruebas de inhibición de la hemaglutinación (IHA) con anticuerpos serovar-específicos. Recientemente, la identificación de la principal proteína hemaglutinante de *A. paragallinarum* y su respectivo gen (hntp210), ha llevado al desarrollo de métodos moleculares como alternativas al tipado. En este estudio, presentamos un protocolo para secuenciar la región hipervariable del gen hntp210 como herramienta alternativa en la asignación del serotipo de *A. paragallinarum*. Utilizando las secuencias disponibles en el Genbank se diseñaron cebadores específicos para amplificar esta región (aproximadamente 1800nt) en los diferentes serogrupos/serovares de *A. paragallinarum*. La secuenciación fue realizada por el método de Sanger y en un total de diez cepas de *A. paragallinarum* aisladas en nuestro laboratorio, procedentes de casos clínicos de España y Portugal. El análisis filogenético permitió asignar las cepas incluso a nivel de serovar y con una homología nucleotídica >99,9% con secuencias de referencia depositadas en el Genbank. Siete cepas fueron asignadas como serovar A1 con gran homología a las cepas de referencia 0083 y 221; mientras que las otras tres fueron asignadas como serogrupo C con gran homología a la cepa HP31 y HP60. Adicionalmente, la aplicación de este protocolo en el ADN obtenido de una vacuna comercial que incluye los tres serotipos confirmó su utilidad para identificar también la cepa 0222 del serotipo B. Por otro lado, la homología nucleotídica entre las cepas de este estudio del serovar A1 fue del 99,4% y entre las del C fue del 100%; mientras que entre estos dos serovares fue menor al 75,9%. Nuestros datos corroboran el potencial uso de este protocolo para el serotipado de *A. paragallinarum* que nos permitirá estudiar la variabilidad de los diferentes serovares presentes en las explotaciones avícolas.

---

**Palabras clave:** *A. paragallinarum*; serovar; serotipo; inmunidad cruzada

*Avibacterium paragallinarum* is the causative agent of infectious coryza, an acute respiratory disease that causes important economic losses in poultry industry. The disease affects the upper respiratory tract and also causes a drop in production parameters. Currently, three serovars of *A. paragallinarum* have

been described according to the Page scheme (A, B and C), whereas the Kume scheme defined three serogroups (A, B and C) with nine different serovars (A1-A4, B1 and C1-C4). Additionally, it has been observed that there is no cross-immunity between serovars A-C, and even among some of the serovars in the same Kume serogroup. This information highlights the importance of serotyping in vaccine development; however, the test is available only in very few laboratories that use Indirect Haemagglutination Assay (IHA) tests with serovar-specific antibodies. Recently, the identification of the main haemagglutinating protein of *A. paragallinarum* and its corresponding gene (hmtp210), has led to the development of molecular methods as alternative to typing. In this study, we present a protocol to sequence the hypervariable region of the hmtp210 gene as an alternative tool in the assignment of the serotype of *A. paragallinarum*. Using the sequences available in the Genbank database, specific primers were designed to amplify this region (of approximately 1800nt) in the different serogroups/serovars of *A. paragallinarum*. Sequencing was performed by the Sanger method in ten strains of *A. paragallinarum* isolated in our laboratory, from clinical cases originated in Spain and Portugal. The phylogenetic analysis allowed the strains to be classified at the serovar level and with a nucleotide homology >99.9% to the reference sequences deposited in the Genbank. Seven strains were assigned to serovar A1 with high homology to reference strains 0083 and 221; and the other three were assigned as serogroup C with high homology to strain HP31 y HP60. Additionally, the application of this protocol using the DNA obtained from a commercial vaccine that includes the three serotypes, confirmed the identification of strain 0222 of serotype B. Moreover, in this study the nucleotide homology between the strains within each A1 and C2 serovar was 99.4-100%, while it was less than 75.9% between A1 and C2. In conclusion, our data confirm the potential application of this protocol to serotype *A. paragallinarum* allowing studying the variability of the different serovars in poultry farms.

---

**Keywords:** *A. paragallinarum*; serovar; serotype; cross-immunity

## Introducción

La coriza aviar es una enfermedad muy contagiosa que afecta al tracto respiratorio superior de las aves provocando rinitis y sinusitis infraorbital, junto con descarga nasal y ocular, cuyo agente causal es *Avibacterium paragallinarum* (Blackall y Matsumoto, 2003). Las pérdidas económicas asociadas a esta enfermedad están directamente relacionadas con la disminución del crecimiento en pollos de engorde y el descenso de la puesta que varía entre un 10-40% en gallinas ponedoras, pudiendo incluso alcanzar mortalidades de entre 5-30% (Blackall y Soriano-Vargas, 2013).

En general, los síntomas suelen durar unas 2 o 3 semanas y las medidas de control y prevención están basadas en la bioseguridad mediante medidas higiénico-sanitarias y vacunación. Los tratamientos antibióticos consiguen controlar los síntomas de la enfermedad pero incrementan los tiempos de espera debido a la aparición de residuos en carne y huevos (Blackall y Soriano-Vargas, 2013). *Avibacterium paragallinarum*, anteriormente clasificado como *Haemophilus paragallinarum* (Blackall y cols., 2005) es una bacteria Gram negativa, no móvil con forma de bacilos cortos o cocobacilos, de 1-3 mm de longitud perteneciente a la familia *Pasteurellaceae*. Se denomina germen fastidioso debido a su lento crecimiento *in vitro* y a sus requerimientos de factor V o NAD (nicotinamida adenin dinucleótido) (Blackall y Soriano-Vargas, 2013). También existen cepas NAD-independientes, aunque hasta la fecha solo se han descrito en Sudáfrica y México (Mouahid y cols., 1992).

Se han descrito 3 serovares diferentes de *A. paragallinarum* denominados A, B y C según la clasificación de Page (Page, 1962) y según el esquema de Kume 3 serogrupos (A, B y C) y 9 serovares (A1-A4, B1 y C1-C4) (Kume y cols. 1983). Por otro lado, se ha demostrado que los serogrupos de Kume corresponden con los serovares de Page (Blackall y cols., 1990; Kume y cols., 1983) y los 3 representan 3 distintos inmunovares (Blackall, 199). Adicionalmente, se ha descrito que la inmunidad basada en un solo serovar Kume, no necesariamente proporciona inmunidad cruzada frente al resto de serovares

(Soriano y cols., 2004; Wang y cols., 2016) lo cual revierte relevancia para el desarrollo de nuevas estrategias vacunales dirigidas a los serotipos específicos presentes en una explotación.

Los esquemas de clasificación Page y Kume, están basados en pruebas de inhibición de la hemaglutinación usando anticuerpos específicos, por lo que hacen que este tipo de diagnóstico este restringido a pocos laboratorios en el mundo. Recientemente, la identificación de la principal proteína hemaglutinante de *A. paragallinarum* y su respectivo gen (hntp210), ha llevado al desarrollo de algunos ensayos específicos de PCR y PCR-RFLP como alternativas al serotipado mediante anticuerpos (Sakamoto y col., 2012); sin embargo, estos métodos, han demostrado por el momento no ser del todo fiables (Wang y col., 2016). En este estudio, presentamos un modelo de secuenciación de la región hipervariable del gen hntp210 como herramienta alternativa para la asignación del serotipo a aislados clínicos de *A. paragallinarum*.

## Material y métodos

### Cultivo microbiológico

Durante el periodo 2017-2019 fueron aisladas en nuestro laboratorio un total de 10 cepas de *A. paragallinarum*, las cuales procedían de casos clínicos compatibles con coriza en pollos de engorde y gallinas ponedoras de España (n=6) y Portugal (n=4). Las cepas fueron conservadas a -80 °C en medio de congelación a base de glicerol y leche desnatada para su posterior utilización. Previo al estudio, se procedió a descongelar los viales y sembrar cada cepa en medio específico para *Haemophilus* compuesto por BHI (Oxoid, CM1135), NAD (Sigma, N7004) y Agar Bacteriológico (Oxoid, LP001) y en Agar Columbia Sangre (Oxoid) junto con una estria de *Staphylococcus aureus* donde se puede observar el fenómeno de satelitismo debido a la necesidad de factor V de la sangre para su crecimiento. Los cultivos se incubaron durante 24 horas a 37°C en aerobiosis. *A. paragallinarum* forma colonias blancas, redondas y pequeñas en medio *Haemophilus* y transparentes en medio Columbia Sangre. Se recogió el crecimiento de media placa y se resuspendió en 0,5 ml de PBS para realizar la extracción de ADN.

### Extracción de ADN e identificación de *A. paragallinarum*

La extracción de ácidos nucleicos fue realizada mediante un robot automático de extracción KingFisher™ Flex y el respectivo kit comercial MagMAX CORE™ Nucleic Acid Purification (Thermo Fisher Scientific) siguiendo las recomendaciones del fabricante. Una vez obtenido el DNA y previo al estudio de secuenciación, todas las cepas fueron analizadas para este agente usando un kit comercial de PCR en tiempo real (EXOone Avibacterium paragallinarum) y siguiendo las instrucciones del fabricante.

### Protocolo de Secuenciación parcial del gen hntp210

Utilizando las secuencias disponibles en el Genbank de las principales cepas de referencia de *A. paragallinarum* (Tabla 1) y un programa bioinformático de alineamiento de secuencias (MAFFT v7), se procedió a diseñar tres parejas de cebadores para amplificar una zona del gen hntp210, de aproximadamente 1800pb, conocida como región hipervariable o región 2. Estas parejas de cebadores fueron utilizados posteriormente en combinación para amplificar la totalidad de esta región en dos segmentos de aproximadamente 1000pb y 800pb. Una pareja de cebadores (AVACf/AVACr) se diseñó para hibridar en zonas altamente conservadas entre los diferentes serovares, al final de la región 1 y al inicio de la región 3; mientras que las otras dos parejas restantes se diseñaron para hibridar con cepas compatibles con el serovar A1 la primera (AVA1f/AVA1r), y con todo el resto de serovares la segunda (AVA2f/AVA2r), tal como se aprecia en la Figura 1. Una área de solapamiento de aproximadamente 100pb fue dejada entre los dos fragmentos a secuenciar de la región hipervariable.

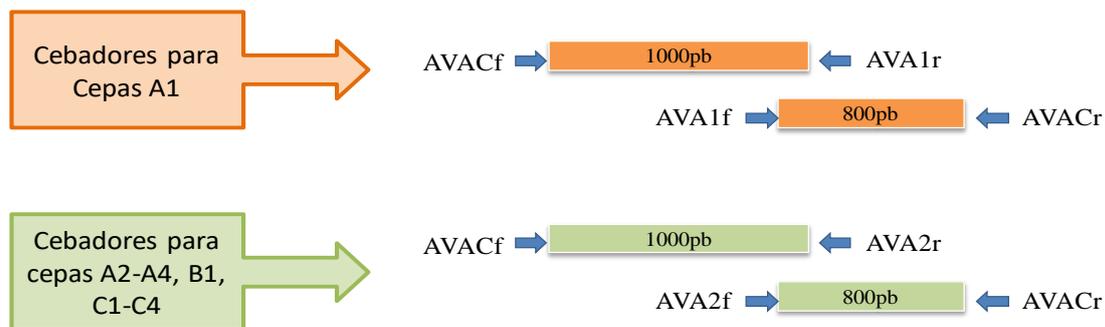
**Tabla 1** Cepas de referencia utilizadas en el diseño de los cebadores para el protocolo de secuenciación del gen hntp21 de *A. paragallinarum*.

Cepa de Referencia	Origen	Serogrupo Page	Serovar Kume	Nro acceso Genbank
221	Japon	A	A-1	KU143734
0083	USA	A	A-1	KU143735
2403	Alemania	A	A-2	KU143736
E-3C	Brazil	A	A-3	KU143737
HP14	Australia	A	A-4	KU143738
0222	USA	B	B-1	KU143739
2671	Alemania	B	B-1	KU143740
H-18	Japon	C	C-1	KU143741
Modesto	USA	C	C-2	KU143742
SA-3	Sudáfrica	C	C-3	KU143743
HP60	Australia	C	C-4	KU143744

Figura 1 Ubicación de los cebadores utilizados en la secuenciación de la región hipervariable del gen hmtp21 de *A. paragallinarum*.

### hmtp210 (6100 nt)

Región 1	Región 2 Posición aprox. nt 3000 a nt 4800	Región 3
----------	--	----------



Cada cepa de *A. paragallinarum* fue evaluada con las cuatro parejas de cebadores y los productos de amplificación, visualizados en un gel de agarosa al 1% para determinar el tamaño. Las muestras con un tamaño apropiado de producto (1000pb y 800pb) fueron secuenciadas mediante el método de Sanger y utilizando un equipo secuenciador de DNA 3500XL Genetic Analyzer (Applied Biosystems). La secuenciación de cada producto fue realizada en ambos sentidos (directo y reverso) con los mismos cebadores utilizados para amplificar. Adicionalmente, se procedió a secuenciar el DNA obtenido de una vacuna comercial que contenía los tres serotipos de *A. paragallinarum* (serotipo A cepa 17756, serotipo B cepa 0222, serotipo C cepa Modesto). Los productos de amplificación obtenidos de esta vacuna, fueron previamente clonados usando el kit TOPO® TA Cloning® for Sequencing (Thermo) con la finalidad de separar el material de las diferentes cepas presentes en la vacuna.

#### Análisis de secuencias y asignación del serotipo

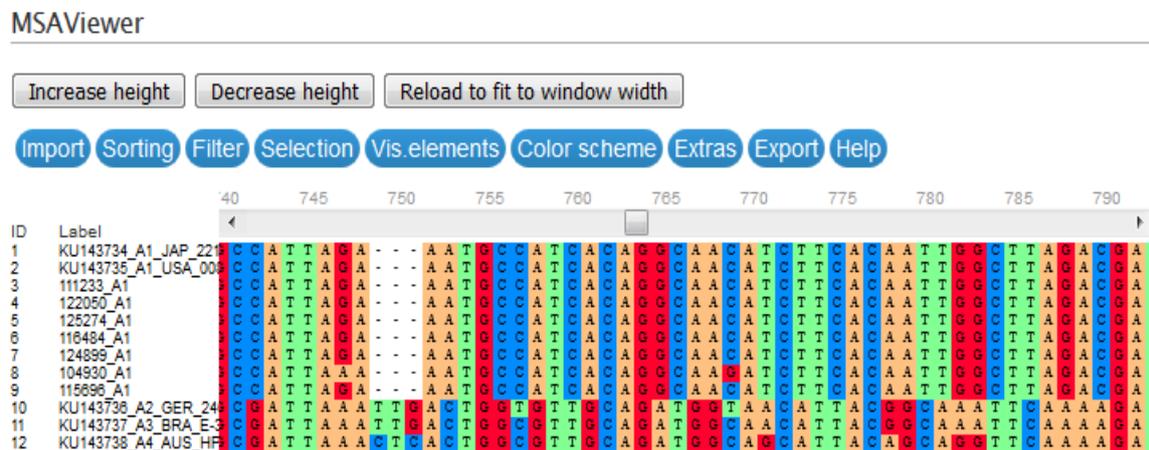
Cada una de las secuencias obtenidas fue evaluada en la base de datos BLASTn con el fin de encontrar las cepas de referencia con mayor homología nucleotídica. Adicionalmente, una vez determinado el posible serogrupo/serovar, se procedió a realizar un alineamiento de secuencias usando el programa MAFFT e incluyendo la secuencia problema y las de los distintos serovares de ese serogrupo u otras secuencias relacionadas. Para la asignación del serotipo, se consideró, además del porcentaje de homología nucleotídica, la identificación de mutaciones puntuales (SNPs), así como de posibles inserciones/delecciones observadas en la secuencia problema con la de los distintos serovares descritos de *A. paragallinarum*. Adicionalmente, el programa SDTv1.2 fue utilizado para obtener los porcentajes de homología nucleotídica entre las distintas cepas evaluadas en este estudio

## Resultados y discusión

Todas las cepas del estudio fueron confirmadas como *A. paragallinarum* mediante el ensayo de qPCR, resultando positivas en un rango de ciclo umbral (Cq) de entre 16,6 y 21,5. Tras la evaluación de cada cepa con el protocolo de secuenciación descrito, se observó que siete de ellas tuvieron productos de amplificación correctos con los cebadores para el serovar A1, mientras que las tres restantes lo tuvieron con los cebadores diseñados para los otros serovares. La secuencia de la región hipervariable del gen hntp210 fue obtenida para las 10 cepas evaluadas en este estudio.

El análisis de las secuencias con la herramienta BLASTn demostró que siete de las cepas tuvieron una homología de entre un 99,8% y un 100,0% con las cepas de referencia 0083 y la cepa 221, ambas del serovar A1; pero también gran homología (>99,7%) con las cepas de campo F-8, Gd3, Gd2, Gd1 y Yun, aisladas en China y clasificadas como serogrupo A según Wang y col. 2016. Por otro lado, el alineamiento de secuencias de estas cepas con los distintos serogrupos, demostró que las cepas del serovar A1 mostraban un perfil conservado entre ellas, pero diferente al del resto de serovares en el serogrupo A (Figura 2); y también con las secuencias de referencia de los serogrupos B y C. Estas siete cepas fueron asignadas como serovar A1, cuatro de las cuales procedían de Portugal y tres de España.

**Figura 2** Alineamiento de las secuencias obtenidas en este estudio como serovar A1, con las cepas de referencia de los serovares A1-A4.



Las tres cepas restantes procedentes de casos españoles, tuvieron de acuerdo al BLASTn, una homología de entre un 96,1% a un 99,9% con varias cepas de referencia del serogrupo C; encontrándose el mayor grado de similitud con la cepa de campo HP31 (99,9%) identificada como serovar C2, seguida de la cepa HP60 (99,8%) serovar C4 y la cepa Modesto (96,1%) serovar C2. Sin embargo, se observó también una similitud con las cepas de referencia HP14 (99,4%) perteneciente al serovar A4 y la cepa 2403 (96,7%) del serovar A2; aunque el porcentaje de cobertura en el alineamiento con estas dos últimas cepas fue solo del 85% de la secuencia evaluada.

El posterior alineamiento de las tres cepas compatibles con el serogrupo C, con la cepa HP31 y las cepas de referencia de los distintos serovares de este serogrupo, demostró la presencia de varios SNP, así como de inserciones/delecciones que permitían diferenciarlas de las cepas C1, C3 y C2 modesto; pero no de la cepa de referencia HP60 serovar C4 (Figura 3a y 3b). Por otro lado, la inclusión en el alineamiento de las secuencias de los serovares A4 y A2, con homología cercana según el BLASTn, demostró también la presencia de múltiples SNP, así como de inserciones/delecciones que permitían separarlas de estos serovares (Figura 3B). Aunque no fue posible diferenciar, por la alta homología, las cepas del estudio como serovar C2 o C4, la evaluación realizada permitió asignarles dentro del serogrupo C.

**Figura 3** Alineamiento de las secuencias obtenidas en este estudio como serovar C con la cepa de referencia HP31 serovar C2 (delimitadas en rojo) y los otros serovares del serogrupo C.

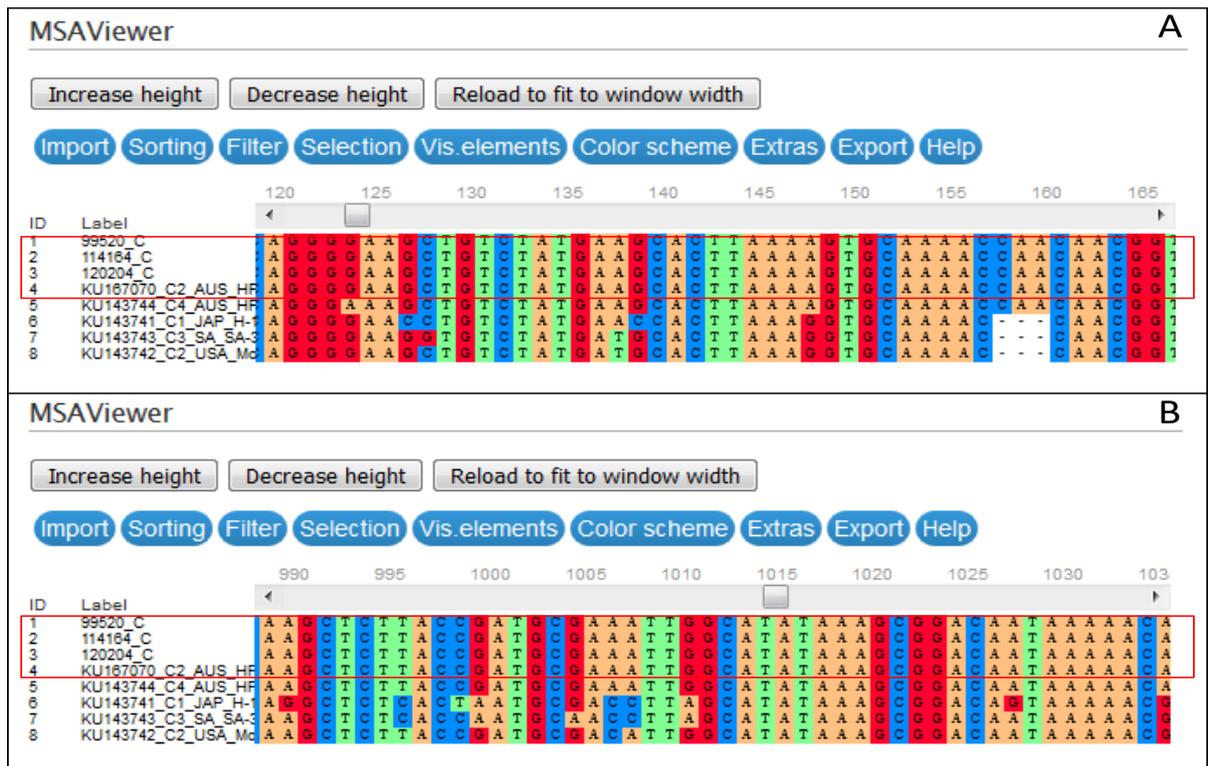


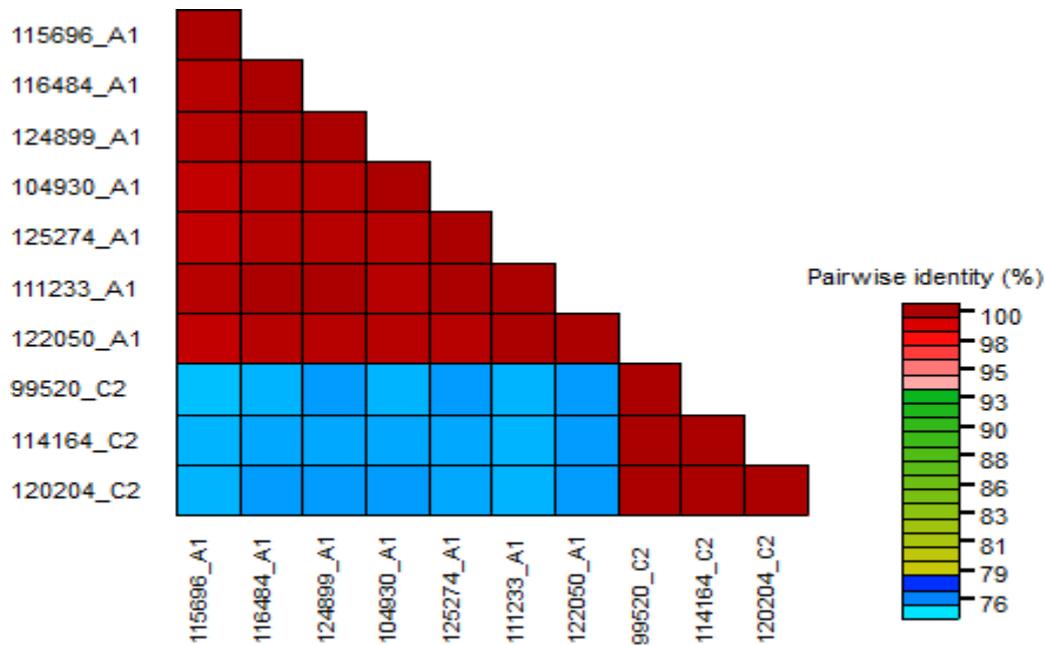
Figura 3-4 Alineamiento de las secuencias del estudio asignadas como serovar C con las cepas de referencia HP31 y HP60 (delimitadas en rojo), las cepas de los otros serovares del serogrupo C y los serovares A2 y A4.



El análisis de la homología nucleotídica entre las cepas Españolas y Portuguesas evaluadas en este estudio, demostró que si bien la identidad nucleotídica entre las cepas de un mismo serogrupo fue muy alta (>99,4% en las A1 y 100% en las del serogrupo C); el porcentaje de identidad entre las cepas de

distintos serogrupos (entre las A1 y las C2) fue inferior al 76,0%, tal como se aprecia en la siguiente figura.

Figura 4-5 Matriz de identidad de secuencias (%) para la región hipervariable del gen hntp210 de las cepas de *A. paragallinarum* evaluadas en este estudio.



Adicionalmente, el uso de este protocolo sobre un total de 10 clones obtenidos con los cebadores AVA2f/AVACr en el DNA de la vacuna comercial, permitió obtener una secuencia de 782pb, la cual fue 99,6% homóloga a la cepa de referencia 0222 de serotipo B, confirmado su utilidad para la identificación de este serotipo.

El gen hntp210 del *A. paragallinarum* codifica para una proteína (hemaglutinina) que ha sido identificada como antígeno protector mayor y por tener un rol importante en la patogenicidad de este agente (Wang y col. 2014). Esta hemaglutinina presenta una región hipervariable localizada

aproximadamente entre los amino ácidos desde la posición 1100 a la posición 1600, y que es considerada como la región más antigénica de la proteína; lo que ha llevado a sugerirla como potencial diana para el serotipado y la elaboración de vacunas (Wu y col. 2011). En este estudio presentamos el uso de un protocolo para secuenciar y analizar esta región hipervariable como una herramienta alternativa para el tipado de *A. paragallinarum*. Adicionalmente, nuestros datos proporcionan información preliminar sobre la presencia de cepas serovar A1 y serogrupo C en casos clínicos de coriza en la península ibérica.

## Referencias

- BLACKALL, P.J.** (1999). Infectious coryza: overview of the disease and new diagnostic options. *Clinical Microbiology Reviews* **12**: 627-632.
- BLACKALL, P.J., CHRISTENSEN, H., BECKENHAM, T., BLACKALL, L.L., BISGAARD, M.** (2005) Reclassification of *Pasteurella gallinarum*, [*Haemophilus*] *paragallinarum*, *Pasteurella avium* and *Pasteurella volantium* as *Avibacterium gallinarum* gen. nov., comb. nov., *Avibacterium paragallinarum* comb. nov., *Avibacterium avium* comb. nov. and *Avibacterium volantium* comb. nov. *Int J Syst Evol Microbiol* **55**:353-62.
- BLACKALL, P.J. y SORIANO-VARGAS, E.** (2013) Infectious coryza and related bacterial infections. In: Swayne, D.E., Glisson, J.R., McDougald, L.R., Nolan, L.K., Suarez, D.L., Nair, V.L. (Eds.) *Diseases of Poultry*, ed. 13th. Wiley-Blackwell, Ames, Iowa, Chapter 20, pp. 859-873.
- BLACKALL, P.J., EAVES, L.E. y ROGERS, D.G.** (1990) Proposal of a new serovar and altered nomenclature for *Haemophilus paragallinarum* in the Kume hemagglutinin scheme. *J Clin Microbiol* **286**: 1185-1187.
- KUME, K., SAWATA, A., NAKAI, T. y MATSUMOTO, M.** (1983) Serological classification of *Haemophilus paragallinarum* with hemagglutinin system. *J Clin Microbiol* **17**:958-964.
- MOUAHID, M., BISGAARD, M., MORLEY, A.J., MUTTERS, R. y MANNHEIM W.** (1992) Occurrence of V-factor (NAD) independent strains of *Haemophilus paragallinarum*. *Vet Microbiol* **31**:363-368.
- PAGE, L.A.** (1962) *Haemophilus* infections in chickens. I. Characteristics of 12 *Haemophilus* isolates recovered from diseased chickens. *Am J Vet Res* **23**:85-95.
- SORIANO, E.V., LONGUINOS-GARDUÑO, M., TELLEZ, G., FERNANDEZ-ROSAS., P, SUAREZ-GÜEMES, F. y BLACKALL, P.J.** (2004) Cross-protection study of the nine serovars of *Haemophilus paragallinarum* in the Kume haemagglutinin scheme. *Avian Pathology* **33**:506-511
- SAKAMOTO, R., KINO, Y. AND SAKAGUCHI, M.** 2012. Development of a multiplex PCR and PCR-RFLP method for serotyping of *Avibacterium paragallinarum*. *J. Vet. Med. Sci.* **74**: 271-273.
- WANG, H., SUN, H., BLACKALL, P.J., ZHANG, Z., ZHOU, H., XU, F. y CHEN, X.** (2016) Evaluation of a proposed molecular methodology for the serotyping of *Avibacterium paragallinarum*. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation* **28**:555-560.
- Wang, Y. P., Hsieh, M. K., Tan, D. H., Shien, J. H., Ou, S. C., Chen, C. F. and Chang, P. C.** (2014). The haemagglutinin of *Avibacterium paragallinarum* is a trimeric autotransporter adhesin that confers haemagglutination, cell adherence and biofilm formation activities. *Vet. Microbiol.* **174**: 474-482.
- Wu, J. R., Wu, Y. R., Shien, J. H., Hsu, Y. M., Chen, C. F., Shieh, H. K. and Chang, P. C.** (2011). Recombinant proteins containing the hypervariable region of the haemagglutinin protect chickens against challenge with *Avibacterium paragallinarum*. *Vaccine* **29**: 660-667.

