

UNIVERSIDAD PERUANA CAYETANO HEREDIA

**FACULTAD DE CIENCIAS Y FILOSOFÍA
“ALBERTO CAZORLA TALLERÍ”**



**ANÁLISIS BIOINFORMÁTICO DE LA VARIABILIDAD GENÉTICA Y
EPITÓPICA DE FACTORES DE VIRULENCIA DE *AVIBACTERIUM*
PARAGALLINARUM PARA LA CLASIFICACIÓN SEROLÓGICA DE AISLADOS**

**TRABAJO DE INVESTIGACIÓN PARA OPTAR EL GRADO DE BACHILLER
EN CIENCIAS CON MENCIÓN EN BIOLOGÍA**

AUTORES:

**ALFONSO MATÍAS ROJAS MONTERO
GABRIEL ANDRÉS SANDOVAL GANOZA**

ASESOR:

MIRKO J. ZIMIC PERALTA, Ph. D.

Lima – Perú

2021

ÍNDICE

RESUMEN.....	3
ESTADO DEL ARTE.....	7
PROBLEMA DE INVESTIGACIÓN.....	16
ESTRATEGIA DE ABORDAJE.....	19
REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	22

RESUMEN:

La coriza infecciosa es una enfermedad del tracto respiratorio de *Gallus gallus domesticus* causada por la bacteria *Avibacterium paragallinarum* (AP), que genera una mortalidad incrementada y una disminución productiva para la industria avícola (1). La prevención de la coriza es dificultosa debido a la diversidad fenotípica de AP, cuyos aislados de campo requieren una identificación larga y costosa (2).

Para estudiar la diversidad fenotípica de AP, se han clasificado los aislados de la bacteria en 3 serogrupos que contienen 9 serovariedades, usando un método de inhibición de la hemaglutinación (2). Esta clasificación es altamente demandante e ineficiente para identificar acertadamente todos los aislados (3), lo que es crucial para prevenir los brotes de la enfermedad. Si no se identifica qué serovariedad causa un brote específico, no se puede utilizar la vacuna adecuada, ya que las vacunas tienen una protección específica para cada serovariedad (1, 4).

Los esfuerzos previos de serotipificación mediante técnicas moleculares (5, 10-12) y los análisis de la variabilidad genética de las proteínas causantes de la hemaglutinación HagA y HMTp210 (6,7,8) han sido poco exitosos y de baja reproducibilidad. Si bien se ha demostrado la relevancia de HMTp210 (13,14), la investigación reciente se ha enfocado infructuosamente en la secuencia de este único gen (13,15,16). Este enfoque ignora que la serotipificación tradicional se realiza a partir de extractos sonicados de AP (2), por lo que potencialmente podrían interferir otras moléculas inmunorrelevantes como factores de virulencia. Además, los estudios de HMTp210 registrados no contemplan la predicción de

las estructuras post-traduccionales que determinan la respuesta inmune, como los epítopes reconocidos por el MHC-II (34).

En este trabajo planteamos el análisis genético de los factores de virulencia de AP de 25 genomas para identificar si sus secuencias presentan polimorfismos específicos para cada serovariedad. Además, proponemos la predicción epitópica de 25 secuencias del gen HMTp210 para verificar si existen diferencias los epítopes predichos para cada serovariedad.

Palabras clave: Coriza, factores de virulencia, serotipos, genomas, serotipificación, Avibacterium

ABSTRACT:

Infectious coryza is a disease of the respiratory tract of chickens and hens caused by the bacterium *Avibacterium paragallinarum* (AP), which causes increased mortality and a relevant decrease in production for the poultry industry (1).

The pathogen, AP, has wide phenotypic variability that has prevented the finding of a single prevention method. AP isolates can be classified according to their serological characteristics into 9 Kume serotypes, and the vaccines developed have a restricted range of action specific to each serotype, with some exceptions. Classification into the 9 serotypes is done through hemagglutination inhibition assays. These tests evaluate the hemagglutination capacity (adhesion of the pathogen to blood cells) of each isolate in the presence of standardized inhibitors. Identification is crucial because the usual prevention method uses inactivated whole cell vaccines whose cross protection between different serovars is limited (4). HI assays can identify serovars in the vast majority of isolates, but molecular characteristics related to serotype diversity have not yet been precisely identified.

Non-gene specific molecular techniques have been developed to genetically typify the reference strains of the 9 Kume serotypes (5). In addition, from the report and characterization of two AP hemagglutinins - HagA (6) and HMTp210 (7,8) - typing analyzes directed at these genes (9) have been developed. However, the results of these methods are not consistent with the Kume serovars (10–12).

It is proven that HMTp210 has the greatest contribution to the haemagglutinating effect of AP (13) and is the main antigen inhibited by protective antibodies (14), so recent research has focused on this gene (9,11,13,15,16). However, the structural differences in the proteins expressed by this gene between the different serovars have not been analyzed. Furthermore, the antibodies used for Kume serotyping correspond to the entire mixture of antigens present in a sonicated extract of AP (2), but other antigens have not been considered in previous attempts at molecular serotyping. Likewise, it is known that the degree of virulence of AP varies

significantly between serovars (17), a change whose correlation between the virulence genes of AP has not yet been sought.

We propose to analyze the joint genetic variability of the virulence genes as potential antigens that interact in the HI assays and are likely responsible for the variations in virulence between serovars.

Keywords: Coryza, factors, virulence, serotypes, genomes, typing, Avibacterium

ESTADO DEL ARTE:

1. Generalidades de *Avibacterium paragallinarum*

1.1. Problema de salud pública

1.1.1. Resumen epidemiológico

La coriza infecciosa es una enfermedad respiratoria aguda en pollos causada por *Avibacterium paragallinarum*, una bacteria de la familia *Pasteurellaceae* (1). Los signos clínicos de la infección incluyen descarga nasal severa, lacrimación, diarrea y edema facial. La enfermedad está asociada a un retardo en el crecimiento y a una reducción en la ovoproducción de las aves, lo que puede generar grandes pérdidas económicas en la industria avícola (1).

Se han documentado brotes de coriza infecciosa en varios continentes (1). La industria de los países en vías de desarrollo es la más afectada económicamente debido a que los factores de estrés y potenciales patógenos asociados a las malas condiciones de almacenamiento de las aves pueden facilitar la ocurrencia de brotes más severos (1). En estudios previos no se ha analizado la posible asociación entre los factores de virulencia y la clasificación en serovariedades. En el Perú se ha realizado estudios de serotipificación de aislados nacionales, y se ha demostrado que la alta diversidad de las cepas presentes en el país demanda un constante esfuerzo para identificar brotes tempranamente, y poder prevenir su expansión (2). Sin embargo, aún no se cuenta con estudios enfocados en el análisis del gen HMTp210 u otros factores de virulencia que incluyan secuencias aisladas en Perú.

1.1.2. Prevención

La principal estrategia de intervención para la enfermedad son las vacunas, disponibles comercialmente, que se realizan a partir de células enteras inactivadas, o bacterinas. Blackall hace una revisión de los factores que pueden afectar la eficacia de este tipo de vacunas: tipo de adyuvantes, medio de crecimiento para la producción de la vacuna, agentes inactivantes, etc. (1,19).

La protección provista por las vacunas de bacteria inactivada es específica para cada serovariedad, y la evidencia indica que no brindan protección cruzada de amplio espectro (1). Incluso se ha observado que la protección específica por serotipo es ineficiente cuando la vacuna se ha producido a partir de una cepa distinta de la que se pretende proteger (5,19).

1.2. Clasificación serológica

1.2.1. Fundamento de la hemaglutinación y la serotipificación de AP

La hemaglutinación es la aglomeración de glóbulos rojos inducida por la adsorción de proteínas de superficie de agentes patógenos, un proceso que impide la libre precipitación de los glóbulos rojos (20). Este proceso es perceptible cuando, sobre pequeños pocillos de base cóncava, se comparan dos muestras de sangre, una libre de patógenos y una mezclada con partículas virales o bacterianas con capacidad de adsorción, llamadas hemaglutinantes (20). Esta comparación permite observar que en la muestra libre de partículas hemaglutinantes, la sangre se separa y los glóbulos rojos precipitan, formando un punto

rojo al fondo del pocillo; por el contrario, en la muestra con partículas hemaglutinantes, los glóbulos rojos se mantienen en suspensión formando una redícula grande que no precipita (3). Este principio fue aprovechado para realizar ensayos en placas de aglutinación para clasificar serológicamente AP. En primer lugar se determinó la existencia de 3 grupos: A, B y C (4), llamados a continuación serogrupos o serovariedades de Page. Este método dejaba muchas muestras sin clasificación, por lo que se realizaron modificaciones hasta obtener un método de Inhibición de la Hemaglutinación usando sueros hiperinmunes de conejo sobre muestras de eritrocitos de pollo fijados con glutaraldehído (4). Reconfirmó la existencia de los 3 serogrupos de Page, y amplió la clasificación a 9 serovariedades divididas entre los 3 serogrupos: A-1, A-2, A-3, A-4, B-1, C-2, C-3, C-4 (3). La serotipificación por el método de Kume es técnicamente demandante, costosa, y requiere antígenos y antisueros de referencia, por lo cual su aplicación se limita a escasos laboratorios de equipamiento avanzado (1).

1.3. Las proteínas que se asocian a la hemaglutinación son factores de virulencia

1.3.1. Hemaglutininas

Las hemaglutininas (HA) son proteínas de membrana responsables del efecto hemaglutinante de AP (9). Se ha comprobado que cepas mutantes que carecen de estos factores tienen comportamientos no-patogénicos, y no muestran actividad hemaglutinante, además de tener una incapacidad de colonización en las vías respiratorias del huésped (14,17).

Las dos proteínas que han sido reportadas como agentes de hemaglutinación clave son hagA y HMTp210 (15,17). Varios estudios respaldan que HMTp210 es la HA de mayor contribución a la hemaglutinación, y por ende, a la elaboración de vacunas, lo que la convierte en una proteína de interés debido a su potencial protectorio (14,17). HMTp210 pertenece a la familia de autotransportadores de adhesinas triméricas, lo que le otorga actividad de adherencia y de formación de biofilms (21). Esta proteína cuenta con una región hipervariable que ha sido tratada como candidata para la producción de vacunas, y cuya diversidad genética es estudiada en varios aislados (14, 16).

Un ejemplo diferente de *A. paragallinarum* sobre este factor es el de *H. influenzae*, organismo más estudiado de su misma familia (Pasteurellaceae). En este caso, la adherencia a las células epiteliales del huésped está mediada por un pili hemaglutinante, construido a partir de la expresión del operón *hif*. Las estructuras aglutinantes características de la familia de las TAA las hacen perfectas candidatas para el desarrollo de vacunas ya que son inmunogénicas (22).

1.4. Los demás factores de virulencia de AP reconocidos por la literatura

1.4.1. Proteasas y Toxinas RTX (22,23)

Las toxinas RTX son proteínas con actividad hemolítica y citotóxica presentes en varias bacterias gramnegativas. Su operón está formado por la toxina propiamente dicha, la proteína activadora y dos proteínas de secreción. Entre la familia *Pasteurellaceae*, RTX es tomada en cuenta como factor de virulencia importante en el desarrollo de enfermedades.

En el caso de *Avibacterium*, se han caracterizado dos proteínas RTX AvxA y AvxI, la última de estas posee actividad citotóxica.

1.4.2. Toxina citoletal distensora (25)

Por otro lado, se ha identificado la actividad de la toxina citoletal distensora (Cdt) en AP. Esta proteína posee la capacidad de generar daño en el ADN y ciclo celular de las células del huésped, lo que la convierte en un factor de virulencia. Está organizada en un operón de 3 regiones, dos que funcionan como proteínas de anclaje y transporte de Cdt, mientras que la otra región es la toxina per se.

1.4.3. Proteínas de la fimbria (26)

Las proteínas de la fimbria (flfA) son filamentos que, al igual que HMTp210, cumplen un rol de adherencia hacia las células del huésped. Su ensamblaje requiere de 4 proteínas agrupadas en un cluster en el genomas, puede haber más de un cluster por genomas. En el caso de AP, se ha podido detectar la presencia de flfA y su carácter virulento.

1.4.4. La cápsula bacteriana (27)

La cápsula bacteriana brinda protección contra el sistema inmune del huésped y media la unión de la bacteria a este, gracias a que la bacteria puede regular su formación de cápsula y por ende cualquier otra estructura extracelular de adherencia como las fimbrias o pili. De esta manera, la cápsula es considerada también un factor de virulencia, sujetos inoculados con AP sin cápsula no son patogénicos (27). Asimismo, es conocido que la cápsula puede impedir la actividad hemaglutinante (27). Este efecto puede variar según la cepa debido a las diferente composición de la pared celular que puede haber los aislados (27).

1.5. Intentos previos de serotipificación molecular

1.5.1. Identificación de serotipos mediante ERIC PCR

En 2004, Soriano y colaboradores realizaron una clasificación utilizando polimorfismos basados en secuencias consenso de Enterobacterias (ERIC-PCR) con el fin de generar el *fingerprint* de cada serovariedad de Kume a partir del uso de cepas de referencia y aislados mexicanos. Se identificaron 9 patrones de huella genética, uno para cada serovariedad (6). Sin embargo, Morales-Erasto y colaboradores evidenciaron que estas huellas no eran conservadas por aislados de campo (11).

1.5.2. Identificación de serotipos mediante mPCR y PCR RFLP

En 2012, se planteó una serotipificación molecular utilizando multiplex PCR para el gen *HMTp210* como método alternativo a la serotipificación por inhibición de la hemaglutinación (10). Posteriormente, se evaluó el método propuesto y se demostró que, al igual que el ERIC-PCR, su poder predictivo era muy pobre en aislados de campo, y su reproducibilidad baja entre cepas de la misma serovariedad (11,12).

1.5.3. La variabilidad genética dentro del gen HMTp210 no es concluyente

Un análisis informático de la variabilidad genética dentro del gen de HMTp210 falló en el intento de determinar polimorfismos asociados o predictores de las diferentes serovariedades dentro de la región hipervariable del gen (16). Este mismo estudio evaluó la cercanía filogenética de los aislados a partir de la igualdad nucleotídica de la región

hipervariable del gen HMTp210, pero no encontró un agrupamiento consistente con la clasificación por serovariedades, algo que podría también deberse a que no se analizaron los cambios estructurales o epitópicos inducidos por las mutaciones, cuya relevancia en antígenos ha sido demostrada previamente en otras especies (28, 29). Esta evidencia abre las puertas a cuestionarse sobre la posible asociación de la variabilidad en otras proteínas en la predicción del comportamiento serológico, como sucede en otras especies (30–34), y el rol estructural o epitópico de la hipervariabilidad genética en el gen HMTp210.

De la misma manera, el análisis realizado por Wu (15) justifica la protección específica para serovariedad de los anticuerpos producidos contra la región hipervariable del mismo gen, pero su resultado se limita solo a 3 cepas de 2 serovariedades y no comprueba que las proteínas recombinantes producidas en su experimento tengan el mismo comportamiento que los lisados de AP en los ensayos de HI de Kume.

2. Asociación entre la hemaglutinación y los factores de virulencia

2.1. La clasificación por hemaglutinación depende de anticuerpos específicos para cada serovariedad

2.1.1. Las adhesinas no son los únicos antígenos

Los autotransportadores de adhesión triméricos (TAA) son adhesinas de superficie involucrados en la patogenia de las gramnegativas (14). Poseen un rol clave en la internalización de la bacteria en el huésped, colonización de tejidos por adhesión, y la evasión de la respuesta inmune del huésped, por lo que son considerados importantes factores de virulencia (1). En el caso de AP, está demostrado que cambios en la expresión

de HAs tienen efectos importantes en su comportamiento virulento (14), sin embargo, no se ha comprobado si la inducción de estos cambios es suficiente para impedir la distinción de serovariedades.

Los antígenos usados en la serotipificación de Kume son producidos a partir de sonicados de las cepas de referencia, y por lo tanto los anticuerpos no son específicos únicamente contra las hemaglutininas (3). Por consiguiente, las proteínas antigénicas que no son hemaglutininas podrían ser objeto de un estudio in silico para serotipificación molecular, menos demandante que un estudio in vivo de mutantes y recombinantes de esta bacteria de difícil cultivo.

2. 2. La virulencia varía según el serotipo

Soriano-Vargas encontró una relación entre el grado de virulencia y las serovariedades de Kume utilizando las cepas de referencia para cada serotipo. Su estudio evidenció que los cambios en la severidad del cuadro de coriza varían según la serovariedad infectante; por ejemplo, C1, C3 y A1 poseen los valores más altos de virulencia que el resto (18). Al respecto, y sobre las fallas en las vacunas para la protección cruzada entre serovares, Blackall sugiere que la composición antigénica debe presentar diferencias entre serovariedades (1).

2. 3. Los factores de virulencia pueden predecir serotipos en otras especies

En estudio de bacterias del género *Streptococcus* y *Haemophilus* el uso de locus de genes de biosíntesis de la cápsula ha dado resultados favorables al ser empleados como secuencias base en herramientas para distinguir serotipos (30–33) . Un caso parecido es el

de *E. coli*, donde marcadores en estos genes capsulares y en el antígeno O han servido para desarrollar *software* de identificación de serotipos (34). En AP, sfuerzo de tal magnitud en factores de virulencia diferentes a las hemaglutininas no han sido realizados al nivel de los anteriores casos. Por ejemplo, los genes capsulares de AP no han recibido el nivel de escrutinio que se le ha dado a las TAA.

PROBLEMA DE INVESTIGACIÓN

A pesar de que la serotipificación planteada por Kume otorga un método experimental útil para la identificación de serovariedades, aún no se han identificado si la diversidad de serovariedades está relacionada a variaciones genéticas, (11,12,16) que nos permitirán identificar y tipificar los aislados de esta bacteria con métodos más convenientes, además de ampliar el conocimiento disponible para el futuro desarrollo de métodos preventivos de menor especificidad y mayor espectro de acción entre variantes de la bacteria (15).

Los intentos previos de zanjar esta brecha en el conocimiento han desarrollado con poco éxito técnicas moleculares dirigidas hacia toda la diversidad genética de AP, como análisis de restricción por endonucleasas, *ribotyping*, electroforesis multilocus de enzimas y ERIC-PCR para tipificar genéticamente las cepas de referencia de los 9 serotipos de Kume (6). Además, a partir del reporte y caracterización de dos hemaglutininas de AP - HagA (7) y HMTp210 (8,9) - se han desarrollado análisis de tipificación dirigidos a estos genes, como RFLP-PCR y Multiplex-PCR (10). Sin embargo, la reproducibilidad y consistencia de ambos tipos de métodos para predecir serovariedades es muy baja como para reemplazar enteramente la tipificación mediante HI (11–13).

Actualmente, está comprobado que HMTp210 tiene la mayor contribución al efecto hemaglutinante de AP (14) y es el principal antígeno inhibido por anticuerpos protectores (15) por lo que la investigación reciente se ha enfocado en este gen (1,10,12,14,16,17). Estos esfuerzos están restringidos por la baja disponibilidad en bases de datos públicas de secuencias del gen (16). Sumada a las limitaciones por la disponibilidad de secuencias, en

investigaciones anteriores se ha obviado la predicción de variantes estructurales o epitópicas en HMTp210 que podrían estar asociadas a su variabilidad genética. Además, existen diversas evidencias que cuestionan la distinción de serovariedades basada únicamente en hemaglutininas e indican que otros factores de virulencia podrían otorgar características útiles para agrupar las cepas de AP según su comportamiento serológico (4,15).

1.- La variabilidad genética dentro del gen HMTp210 no está asociada a las serovariedades de Kume de forma concluyente (11,12,16). En vista de que no se han estudiado la asociación de la variabilidad genética en otras proteínas con la clasificación serotípica, y el rol estructural o epitópico de la hipervariabilidad genética en el gen HMTp210, es necesario hacer estos análisis *in silico*, ya que son menos demandantes que el estudio *in-vivo* de mutantes y recombinantes en esta bacteria de difícil cultivo.

2.- Los anticuerpos inhibitorios de hemaglutinación no comparten el comportamiento protector contra AP entre todas las cepas pertenecientes a los mismos serotipos de Kume, y ofrecen patrones de protección cruzada sugerentes de una interacción de más de un factor (5). Por la evidencia del uso de factores de virulencia en la predicción serotípica de otras especies (30–34) y su rol predominante como antígenos, realizar un escaneo de la variabilidad genética en este grupo de moléculas parece el camino adecuado para encauzar futuros estudios moleculares *in vivo*.

Con esta evidencia, hacemos dos preguntas específicas:

¿Pueden predecirse las serovariedades de Kume a partir de polimorfismos genéticos en los genes de virulencia de AP?

¿Las predicciones de la estructura proteica de HMTp210 presentan epítopes específicos para cada serovariedad?

ESTRATEGIA DE ABORDAJE

Se utilizará el método de serotipificación *in silico* a partir del genoma bacteriano, previamente empleado en *Streptococcus agalactiae*, *S. suis*, *E.coli* y *H. influenzae* (30–34). En los estudios de *S. agalactiae* y de *S. suis* se usaron secuencias de locus de biosíntesis de la cápsula de polisacárido (cps), un factor de virulencia, para identificar marcadores SNP que pudiesen distinguir los serotipos (30,31). En el caso de *H. influenzae* y *E. coli* se han creado herramientas web para asignar serotipos a alguna secuencias problema, en el caso de esta última bacteria, el antígeno O ha acompañado al cps como secuencia clave para la serotipificación.

Se creará una base de datos a partir de 16 genomas secuenciados por la empresa FARVET a partir de aislados de campo peruanos, y 9 genomas de referencias de cada una de las serovariedades (extraídos del *GenBank*). De estos 25 genomas se trabajará únicamente con las secuencias de HMTp210 y los 6 genes de los factores de virulencia previamente identificados en AP: Proteasas y toxinas RTX (2 genes) , toxina citoletal distensora (1 gen) , proteínas de la fimbria (1 gen), la cápsula bacteriana (1 gen). Para extraer estas 7 secuencias de cada uno de los 25 genomas, se utilizarán como referencia las secuencias de los genes de los factores de virulencia registrados públicamente en la base de datos *GenBank*. Estos 7 genes serán alineados a cada genoma para extraer las 175 secuencias correspondientes, 7 por cada uno de los 25 genomas.

El problema con AP se abordará en tres partes: identificación de polimorfismos específicos para cada serovariedad, corroboración de la robustez predictiva de los polimorfismos

identificados, y predicción de cambios epitópicos en la proteína HMTp210 a partir de los polimorfismos identificados.

En primer lugar, para identificar los polimorfismos de las secuencias extraídas, se realizarán 7 alineamientos locales, uno por cada factor de virulencia. En estos alineamientos se identificarán los SNPs, las regiones conservadas y las regiones hipervariables correspondientes a cada gen. Se identificarán los SNPs que están presentes únicamente en una serovariedad y serán considerados como predictores potenciales de la clasificación en serovariedades de Kume.

En segundo lugar, se comprobará la robustez de los predictores identificados utilizando para ello todas las secuencias de los 7 genes estudiados disponibles en las bases de datos públicas que cuenten con clasificación en las serovariedades de Kume por inhibición de la hemaglutinación. Para esto se recopilarán todas las secuencias del Genbank para los genes de interés que poseen una clasificación serotípica de Kume y posteriormente se realizará un alineamiento local para identificar la especificidad de los predictores potenciales identificados en la etapa 1.

En tercer lugar, se comprobará si los polimorfismos predictores encontrados en la secuencia de HMTp210 poseen un correlato fenotípico que pueda alterar su estructura epitópica. Para ello, las 25 secuencias de HMTp210 serán traducidas a secuencias peptídicas y se someterán a una identificación de epítopes a través de la herramienta web NetMHCIIpan - 4.0, que analiza las secuencias cortadas en segmentos de 9 aminoácidos como antígenos potenciales para predecir qué segmentos presentarían la mayor afinidad de unión a las moléculas del sistema de histocompatibilidad mayor de clase II presentadoras

de antígeno (35). Esta información luego será examinada para verificar si los antígenos predichos son diferentes entre las serovariedades de AP.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS:

1. Blackall PJ, Soriano-Vargas E. Infectious Coryza and Related Bacterial Infections. In: Swayne DE, editor. Diseases of Poultry [Internet]. Chichester, UK: John Wiley & Sons, Ltd; 2017 [cited 2019 Oct 20]. p. 859–73. Available from: <http://doi.wiley.com/10.1002/9781119421481.ch20>
2. Mendoza-Espinoza, A., H.R. Terzolo, R.I. Delgado, A.I. Zavaleta, Y. Koga, and Y.D. Huberman. 2009. Serotyping of *Avibacterium paragallinarum* isolates from Peru. *Avian Dis.* 53:462–465.
3. Kume K, Sawata A, Nakai T, Matsumoto M. Serological Classification of *Haemophilus paragallinarum* with a Hemagglutinin System. *J CLIN MICROBIOL.* 1983;17:7.
4. Blackall PJ, Eaves LE, Aus G. Serotyping of *Haemophilus paragallinarum* by the Page scheme: comparison of the use of agglutination and hemagglutination-inhibition tests. *Avian Dis.* 1990 Sep;34(3):643–5.
5. Soriano EV, Garduño ML, Téllez G, Rosas PF, Suárez-güemes F, Blackall PJ. Cross-protection study of the nine serovars of *Haemophilus paragallinarum* in the Kume haemagglutinin scheme. *Avian Pathol.* 2004 Oct;33(5):506–11.
6. Soriano VE, Téllez G, Hargis BM, Newberry L, Salgado-Miranda C, Vázquez JC. Typing of *Haemophilus paragallinarum* Strains by Using Enterobacterial Repetitive Intergenic Consensus-Based Polymerase Chain Reaction. *Avian Dis.* 2004 Dec;48(4):890–5.
7. Hobb RI, Tseng H-J, Downes JE, Terry TD, Blackall PJ, Takagi M, et al. Molecular analysis of a haemagglutinin of *Haemophilus paragallinarum*. *Microbiologu.* 2002;148:2171–9.

8. Tokunaga E, Sakaguchi M, Matsuo K, Hamada F, Tokiyoshi S. Polypeptide for *Haemophilus paragallinarum* and process for preparing the same [Internet]. 6919080, 2005 [cited 2019 Oct 20]. Available from:
<http://www.freepatentsonline.com/6919080.html>
9. Noro T, Oishi E, Kaneshige T, Yaguchi K, Amimoto K, Shimizu M. Identification and characterization of haemagglutinin epitopes of *Avibacterium paragallinarum* serovar C. *Vet Microbiol*. 2008 Oct;131(3–4):406–13.
10. Sakamoto R, Kino Y, Sakaguchi M. Development of a Multiplex PCR and PCR-RFLP Method for Serotyping of *Avibacterium paragallinarum*. *J Vet Med Sci*. 2012;74(2):271–3.
11. Morales-Erasto V, Posadas-Quintana J de J, Fernández-Díaz M, Saravia LE, Martínez-Castañeda JS, Blackall PJ, et al. An evaluation of serotyping of *Avibacterium paragallinarum* by use of a multiplex polymerase chain reaction. *J Vet Diagn Invest*. 2014 Mar;26(2):272–6.
12. Wang H, Sun H, Blackall PJ, Zhang Z, Zhou H, Xu F, et al. Evaluation of a proposed molecular methodology for the serotyping of *Avibacterium paragallinarum*. *J Vet Diagn Invest*. 2016 Sep;28(5):555–60.
13. Hellmuth JE, Hitzeroth AC, Bragg RR, Boucher CE. Evaluation of the ERIC-PCR as a probable method to differentiate *Avibacterium paragallinarum* serovars. *Avian Pathol*. 2017 May 4;46(3):272–7.
14. Wang Y-P, Hsieh M-K, Tan D-H, Shien J-H, Ou S-C, Chen C-F, et al. The haemagglutinin of *Avibacterium paragallinarum* is a trimeric autotransporter adhesin that confers haemagglutination, cell adherence and biofilm formation activities. *Vet Microbiol*. 2014 Dec;174(3–4):474–82.
15. Wu J-R, Wu Y-R, Shien J-H, Hsu Y-M, Chen C-F, Shieh HK, et al. Recombinant

- proteins containing the hypervariable region of the haemagglutinin protect chickens against challenge with *Avibacterium paragallinarum*. *Vaccine*. 2011 Jan;29(4):660–7.
16. Araya-Hidalgo E, Gutiérrez-Jiménez C, Chaves-Ramírez M, Suárez-Esquivel M, Guzmán-Verri C, Barquero-Calvo E. Sequence analysis of the hypervariable region in *hntp210* of *Avibacterium paragallinarum*. *J Vet Med Sci*. 2017;79(7):1210–4.
 17. Hsu Y-M, Shieh HK, Chen W-H, Shiang J-H, Chang P-C. Immunogenicity and haemagglutination of recombinant *Avibacterium paragallinarum* HagA. *Vet Microbiol*. 2007 Jun;122(3–4):280–9.
 18. Soriano VE, Longinos GM, Fernández RP, Velásquez QE, Ciprián CA, Salazar-García F, et al. Virulence of the Nine Serovar Reference Strains of *Haemophilus paragallinarum*. *Avian Dis*. 2004 Dec;48(4):886–9.
 19. Blackall PJ. Vaccines against infectious coryza. *Worlds Poult Sci J*. 1995 Mar;51(1):17–26.
 20. Ryu W-S. Chapter 4 - Diagnosis and Methods. In: Ryu W-S, editor. *Molecular Virology of Human Pathogenic Viruses* [Internet]. Boston: Academic Press; 2017 [cited 2019 Dec 1]. p. 47–62. Available from: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/B9780128008386000047>
 21. Qin W, Wang L, Lei L. New findings on the function and potential applications of the trimeric autotransporter adhesin. *Antonie Van Leeuwenhoek*. 2015 Jul;108(1):1–14.
 22. Ecevit IZ, McCrea KW, Pettigrew MM, Sen A, Marrs CF, Gilsdorf JR. Prevalence of the *hifBC*, *hmw1A*, *hmw2A*, *hmwC*, and *hia* Genes in *Haemophilus influenzae* Isolates. *J Clin Microbiol*. 2004 Jul 1;42(7):3065–72.
 23. Küng E, Frey J. *AvxA*, a composite serine-protease-RTX toxin of *Avibacterium paragallinarum*. *Vet Microbiol*. 2013 May;163(3–4):290–8.
 24. Pan Y-C, Tan D-H, Shien J-H, Liu C-C, He Y-S, Shen P-C, et al. Identification and

- Characterization of an RTX Toxin–Like Gene and Its Operon from *Avibacterium paragallinarum*. *Avian Dis.* 2012 Sep;56(3):537–44.
25. Chen Y-C, Tan D-H, Shien J-H, Hsieh M-K, Yen T-Y, Chang P-C. Identification and functional analysis of the cytolethal distending toxin gene from *Avibacterium paragallinarum*. *Avian Pathol.* 2014 Jan 2;43(1):43–50.
 26. Liu C-C, Ou S-C, Tan D-H, Hsieh M-K, Shien J-H, Chang P-C. The Fimbrial Protein is a Virulence Factor and Potential Vaccine Antigen of *Avibacterium paragallinarum*. *Avian Dis.* 2016 Sep;60(3):649–55.
 27. Tu T-Y, Hsieh M-K, Tan D-H, Ou S-C, Shien J-H, Yen T-Y, et al. Loss of the Capsule Increases the Adherence Activity but Decreases the Virulence of *Avibacterium paragallinarum*. *Avian Dis.* 2015 Mar;59(1):87–93.
 28. Baarda BI, Martinez FG, Sikora AE. Proteomics, Bioinformatics and Structure-Function Antigen Mining For Gonorrhoea Vaccines. *Front Immunol* [Internet]. 2018 Dec 4 [cited 2019 Dec 2];9. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6288298/>
 29. Soria-Guerra RE, Nieto-Gomez R, Govea-Alonso DO, Rosales-Mendoza S. An overview of bioinformatics tools for epitope prediction: Implications on vaccine development. *J Biomed Inform.* 2015 Feb 1;53:405–14.
 30. Kapatai G, Patel D, Efstratiou A, Chalker VJ. Comparison of molecular serotyping approaches of *Streptococcus agalactiae* from genomic sequences. *BMC Genomics.* 2017 Dec;18(1):429.
 31. Athey TBT, Teatero S, Lacouture S, Takamatsu D, Gottschalk M, Fittipaldi N. Determining *Streptococcus suis* serotype from short-read whole-genome sequencing data. *BMC Microbiol.* 2016 Dec;16(1):162.
 32. Howell KJ, Weinert LA, Luan S-L, Peters SE, Chaudhuri RR, Harris D, et al. Gene

- Content and Diversity of the Loci Encoding Biosynthesis of Capsular Polysaccharides of the 15 Serovar Reference Strains of *Haemophilus parasuis*. *J Bacteriol.* 2013 Sep 15;195(18):4264–73.
33. Watts SC, Holt KE. hicap: *In Silico* Serotyping of the *Haemophilus influenzae* Capsule Locus. Mellmann A, editor. *J Clin Microbiol.* 2019 Apr 3;57(6):e00190-19, /jcm/57/6/JCM.00190-19.atom.
34. Joensen KG, Tetzschner AMM, Iguchi A, Aarestrup FM, Scheutz F. Rapid and Easy *In Silico* Serotyping of *Escherichia coli* Isolates by Use of Whole-Genome Sequencing Data. Carroll KC, editor. *J Clin Microbiol.* 2015 Aug;53(8):2410–26.
35. Reynisson B, Barra C, Kaabinejadian S, Hildebrand WH, Peters B, Nielsen M. *Improved methods for predicting peptide binding affinity to MHC class II molecules.* *J Proteome Res* 2020 Apr 30. doi: 10.1021/acs.jproteome.9b00874. PubMed: 32308001