



**MEMORIAS DE LA XXVII CONVENCION ANUAL
ASOCIACION NACIONAL DE ESPECIALISTAS EN
CIENCIAS AVICOLAS**

1 al 5 de mayo de 2002 • Puerto Vallarta, México

&

**PROCEEDINGS OF THE FIFTY-FIRST
WESTERN POULTRY DISEASE CONFERENCE**

May 1-5, 2002 • Puerto Vallarta, Mexico

**MEMORIAS DE LA XXVII CONVENCION ANUAL DE LA
ASOCIACION NACIONAL DE ESPECIALISTAS EN
CIENCIAS AVICOLAS**

**PROCEEDINGS OF THE FIFTY-FIRST
WESTERN POULTRY DISEASE CONFERENCE**



**MESA DIRECTIVA
GESTION 2001-2002**

Presidente	Dr. Julián Carrillo Valadez
Vice presidente y Tesorero	Dr. Fernando de la Colina
Secretario	Dr. Roberto Señas C.
Relaciones Comerciales	Dr. Sergio Higuera Dr. Miguel A. Romero
Coordinador WPDC	Dr. Ernesto Soto P.
Comité Científico	Dr. José A. Quintana Dr. Carlos López Coello Dr. Ricardo Cuetos Dr. Susano Medina Dr. Guillermo Tellez
Membresías	Dra. Cecilia Rosario C.
Comité Editorial	Dr. Victor Mireles
Comité Pro fondos	Dr. David Sarfati Dr. Francisco Báez
Relaciones Internacionales	Dr. Marco A. Rebollo Dr. Marco Quiroz Dr. Luis Etcharren
Relaciones Nacionales	Dr. Arturo Suazo Orozco Dr. Antonio Ortiz
Vocales	Dr. Carlos Sanchez Widmanm Dr. José Manuel Arriola Dr. José Jesus Gomez Dr. Jesús Corona Dr. Mauricio Gonzalez Dr. Jesus Bernal Dr. José Quesada Fox
Estatutos	Dr. Bernardo Lozano Dra. Martha Silva
Comité Ex Presidentes	Dra. Maritza Tamayo
Gerente Administrativo	Lic. Felipe Nuñez



Expresidentes ANECA	Periodo
MVZ. Benjamín Lucio Martínez	1970-1972
MVZ. José Antonio Villaseñor Michel	1972-1973
MVZ. Alejandro Cuadra Germán	1973-1974
MVZ. Miguel Angel Márquez Ruíz	1974-1976
MVZ. Antonio Berna Santos	1976-1977
MVZ. Jorge Basurto Bello	1977-1979
MVZ. Angel Mosqueda Taylor	1979-1980
MVZ. Miguel Ángel Márquez Ruíz	1980-1981
MVZ. Luis Villaseñor Michel	1981-1982
MVZ. Carlos López Coello	1982-1983
MVZ. Francisco Javier Aranda Torres	1983-1984
MVZ. Jorge Basurto Bello	1984-1985
MVZ. Jorge Basurto Bello	1985-1986
MVZ. Bernardo Lozano Dubernard	1986-1987
MVZ. Manuel Golzarri Moreno	1987-1988
MVZ. David Sarfati Mizrahi	1988-1989
MVZ. Manuel Benegas Vilchis	1989-1990
MVZ. Martha Silva Maldonado	1990-1991
MVZ. José Antonio Varona Beascochea	1991-1992
MVZ. Eduardo Lucio Decanini	1992-1993
MVZ. Francisco Báez Medina	1993-1994
MVZ. Hugo Galicia B	1994-1995
MVZ. Ricardo Salado Carbajal	1995-1996
MVZ. José Antonio Varona Beascochea	1996-1997
MVZ. Guillermo Téllez Isaías.	1997-1998
MVZ. Agustín Torres	1998-1999
MVZ. Guillermo Luna O.	1999-2000
MVZ. Maritza Tamayo Salmoran	2000-2001

ACTUAL PRESIDENT: MVZ Julian Carrillo Valadez 2001-2002

ANECA gratefully thanks the following Special Sponsors for their support of this Convention:

3P S A
Alpharma Animal Health
Alta Tecnología Industrial
ALLTECH de México
Anglo Corp S. A. de C. V.
Argos Ferpac S. A. de C. V.
Bayer de México S. A. de C. V.
Biotecnología Industrial S. A. de C. V.
BM Editores S. A. De C. V.
Boehringer Ingelheim
Biosíntesis Laboratorios
Collins División Veterinaria
ECO México Sanidad Animal, S. A. de C. V.
Ediciones Pecuarias
Europlast S. A. de C. V.
Fort Dodge Animal Health S. de R L de C V
García Cornejo
Intervet de México S. A. de C. V.
Investigación Aplicada S. A. de C V
Laboratorio AVI- MEX S. A. de C. V.
Laboratorios Sanfer S. A. de C. V.
Laboratorios BIODICI
Laboratorios Gortie S. A. de C.V.
Lubing Mesoamericana
Merial México
Midia Relaciones
Novartis Salud Animal S. A. de C. V.
Pharmacia & Upjohn
PISA Agropecuaria S A de C V
Premezclas de México
Purina S. A. De C. V.
Schering – Plough S. A. de C. V.
Synbiotics
Vétoquinol de México S. A. de C. V.
Vrot S. A. de C. V.
Elanco Animal Health
Kemia S. A. de C. V.



3P, S. A. DE C. V.



PREMEZCLAS
DE MEXICO



Europlast, S.A. de C.V.M.R.



LUBING MESOAMERICANA
S.A. DE C.V.



sanfer®
DIVISION
VETERINARIA



ECO MEXICO
Sanidad Animal, S.A. De C.V.



Boehringer
Ingelheim





PROLOGO

Estimados amigos, La Asociación Nacional de Especialistas en Ciencias Avícolas (ANECA) se enorgullece en ofrecer a todos nuestros socios el máximo evento que es nuestra XXVII Convención Anual y que en esta ocasión se enaltece por llevarse en conjunto con la 51a. Convención de la Western Poultry Disease Conference (WPDC) esto le da una gran importancia puesto que tenemos excelentes ponencias y ponentes de talla internacional.

Cabe señalar que el poder llevar a cabo un evento de esta magnitud nos obliga a las dos Organizaciones a cumplir con cada uno de los detalles para lograr nuestro objetivo final que es el éxito de nuestra convención.

Es importante también señalar que durante el desarrollo de nuestra convención, debemos aprovechar la experiencia de cada uno de los ponentes, así mismo como mexicanos mostrar todas nuestras capacidades desde técnicas hasta de cordialidad.

Estamos seguros que este evento nos comprometerá a todos los mexicanos en seguir capacitándonos y actualizándonos con eventos de ésta calidad, también estamos convencidos sin lugar a duda que el éxito de nuestra Convención de ANECA y WPDC se logra por el trabajo en equipo tanto de esta mesa directiva de ANECA como todo el comité de la WPDC.

En ANECA seguiremos trabajando por llevar a cada socio la actualización y capacitación con la calidad y organización que siempre nos ha caracterizado, como lo es este evento.

Les deseamos que nuestra Convención, las Ponencias y estas Memorias cubran con todas las expectativas, que ustedes se han marcado, así que aprovechemos al máximo el trabajo de todos los ponentes que plasmaron su mejor esfuerzo.

ATENTAMENTE

**MESA DIRECTIVA
2001-2002**

PREFACE

Dear friends, The National Association of Specialists in Poultry Sciences (ANECA) is proud to offer all our members the maximum event that is our XXVII Annual Convention, and that in this occasion it is ennobled to be held in conjunction with the 51st meeting of the Western Poultry Disease Conference (WPDC). This gives it great importance, since we have excellent papers and presenters of international size.

It must be emphasized that the ability to carry out such an event of this magnitude requires both organizations to work together to complete every detail in order to achieve our final objective: the success of our convention.

It is also important to point out that during the convention we should take advantage of the experience of each one of the presenters; likewise as Mexicans, to display all of our capacities – from our technical ability to our cordiality.

We are sure that this event will commit us to all the Mexicans in continuing to qualify and upgrade us with events of this quality. We are also undoubtedly convinced that the success of our Convention of ANECA and WPDC is achieved by the teamwork displayed by this board of directors of ANECA as well as the WPDC Executive Committee.

In ANECA we will continue working to deliver to each member the update and training with the quality and organization that has always characterized us through this event.

It is our desire that our Convention, the presentations, and these proceedings fulfil your every expectation. May we take full advantage of the work of all these presenters who have brought together their best efforts for our enlightenment.

SINCERELY

**BOARD OF DIRECTORS
2001-2002**



DEDICATORIA AL DR. CARLOS SANCHEZ WIDMANN

Nació el 27 de octubre de 1936, en la ciudad de México D.F. Estudió en la Escuela Nacional de Medicina Veterinaria, Universidad Nacional Autónoma de México, siendo la segunda generación de Ciudad Universitaria (1956-1960). Teniendo como compañeros al Dr. Alejandro Cuadra, Dr. Fabián Ubiña, Dr. Enrique Salinas Aguilera entre otros.

Su interés por las aves se remonta a antes de entrar a la facultad de Medicina Veterinaria, ya que por los años 50's, su tío fue avicultor de gallina de postura con 18,000 aves y algo de pollo de engorda, pero desgraciadamente en esa época apareció una de las enfermedades que más estragos ha causado en México como es el Newcastle y los obligó a retirarse del negocio avícola.

El Dr. Sánchez Widmann inició su propio negocio en el año de 1962 con 20,000 pollos de engorda en la zona de Chimalhuacán y al mismo tiempo fue asesor técnico externo de la empresa Alimentos Industriales (AISA) de 1959 a 1962. Posteriormente, de 1962 a 1964 fue asesor de Alimentos Malta, para luego regresar a AISA hasta el año de 1994. También en esa década fue asesor de Laboratorios Vinelad trabajando junto con el Dr. Alejandro Cuadra y el Dr. Miguel Ángel Márquez.

Para los años 70's, se asocia con el Dr. José García para engorda de pollo durante dos años. Posteriormente en los 80's también se asocia con el Sr. Juan Antonio Sánchez Barse con una producción de 90,000 pollos de engorda y con el Sr. Arturo Gilio con 60,000 pollos de engorda en la zona de Zumpango, Estado de México.

Y es justo durante esa década cuando el Lic. Raúl Canales lo induce a unirse a la Asociación de Avicultores del Valle de México, ocupando el cargo de Presidente de Consejo en el período de 1982 a 1986, y según lo permiten los estatutos, toma cargo de Secretario General del Consejo en la Unión Nacional de Avicultores (UNA) de 1983 a 1988.

En 1988, se asocia con el Sr. Alfonso Larey para la producción de 450,000 pollos de engorda en la zona del Lago de Guadalupe, terminando en 1996, debido a dos causas: por un lado la crisis de la devaluación de la moneda en México, y por otro la crisis de la escasez del grano. Pero permanece en la UNA como Gerente General, puesto que ocupa a la fecha, en donde su principal función es el enlace de aspectos técnicos, sanitarios y productivos con la SAGARPA y en la Secretaría de Asistencia participa en la elaboración de normas relacionadas con la actividad avícola.

Actualmente también es miembro del Comité Nacional de Sanidad Animal (CONASA), enfermedades de las aves, desde 1990.

Así mismo ha participado dentro de algunos consejos de ANECA, siendo Vocal o miembro del Comité Científico.

Dentro del área de asesorías, ha participado con varias empresas avícolas, entre ellas:

- Agropecuaria El Avión (actualmente)
- Avícola Nochistongo
- Avícola Simón Bolívar
- Propollo
- Alcer

Actualmente continua participando en la avicultura con 200,000 pollos de engorda en la zona de Texcoco, Estado de México.

A lo largo de su trayectoria, al Dr. Sánchez Widmann le ha tocado ver y participar en los procesos de consolidación y crecimiento de la industria avícola desde sus inicios, y actualmente en la concentración de la misma.

Sin duda alguna el Dr. Carlos Sánchez Widmann, ha sido un ejemplo para las nuevas generaciones de Médicos Veterinarios, ya que mas allá de cuidar la salud de las aves, ha demostrado que los Médicos Veterinarios tenemos la capacidad de encabezar puestos tanto políticos, como administrativos, e incluso empresariales.

FELICIDADES DR. CARLOS SÁNCHEZ WIDMANN



DEDICATION OF THE XXVII ANECA CONVENTION TO DR. CARLOS SANCHEZ WIDMANN

Dr. Carlos Sanchez Widmann was born October 27, 1936 in Mexico City D. F. He studied at the National School of Veterinary Medicine, Autonomous National University of Mexico, where he was in the 2nd generation from 1956 to 1960. His associates were Dr. Alejandro Cuadra, Dr. Fabián Ubiña, Dr. Enrique Salinas Aguilera, among others.

His interest in poultry dates back before entering Veterinary School. In the 50's he worked with his uncle as a poultry producer of 18,000 hens. Unfortunately during that time one of the awful illnesses appeared in Mexico: Newcastle Disease. This forced them to retire from the poultry business.

In 1962 Dr. Sanchez Widmann began his own business in Chimalhuacan with 20,000 chickens. He served as external technical advisor for the AISA Company from 1959 to 1962. Then from 1962 to 1964 he was technical advisor for Malta, afterward returning to AISA until 1994. Also during that decade he acted as technical advisor for Vineland Laboratories, working together with Dr. Alejandro Cuadra and Dr. Miguel Angel Marquez.

During the 70's he partnered with Dr. José Garcia to raise chickens for two years; then later on in the 80's he associated with Mr. Juan Antonio Sanchez Barse, producing 90,000 chickens; and with Mr. Arturo Gilio producing 60,000 chickens in the Zumpango, State of Mexico area.

It was during the '80's, that the Layer Raul Canales induced him to join the Association of the Valley of Mexico, occupying the president's advisory position from 1982 to 1986; and according to what the statutes allowed, he took the general secretary's advisory position in the National Union of Poultry Producers (UNA) from 1983 to 1988.

In 1988 he worked with Mr. Alfonso Larrey producing 450,000 chickens in the area of Guadalupe Lake, State of Mexico. They had to quit raising chickens in 1996 due to two causes: 1) the crisis of the devaluation in Mexico and 2) a grain shortage crisis. However, he continued on as General Manager of National Union of Poultry Producers (UNA), which position he presently holds, where his main function is in the connection of technical aspects, sanitariums, and production with the Mexican Authorities (SAGARPA), and as Attendance Secretary he participates in the elaboration of norms related to poultry activity.

From 1990 to the present he has also been a member of the National Committee of Animal Health (CONASA), Diseases of Poultry. Likewise, he has participated in various advisory positions of ANECA as well as serving as a member, *Vocal*, and as a member of the scientific committee.

Within the area of advisory, he has participated with several poultry companies, among them:

Agropecuaria El Avion (at the moment)

Avícola Nochistongo

Avícola Simón Bolívar

Productora de Propollo

Avicola Alcer

He currently continues to be an active poultry producer, raising 200,000 chickens in the Texcoco area.

During his career Dr. Carlos Sanchez Widmann has played an integral role in the consolidation and growth of the poultry industry from its beginnings. He continues to do the same.

Undoubtedly Dr. Carlos Sanchez Widmann has been an example for the new generations of veterinarians now finding themselves with the responsibility of caring for poultry health. He has demonstrated that veterinarians have the capacity to head influential political, administrative, and even managerial positions.

Congratulations!!!!!! Dr. Carlos Sanchez Widmann.

DEDICATION OF THE ANECA/WPDC JOINT MEETING TO DR. HIRAM LASHER

The joint meeting of the XXVII Convención Anual ANECA and the 51st Western Poultry Disease Conference is proudly dedicated to Dr. Hiram Lasher for his many contributions to the poultry industry in Mexico, the USA and throughout the world.

Dr. Lasher obtained his DVM from Cornell University in 1942 and began providing routine diagnostic service to independent poultry farms in the Eastern and Central New York area. He then took a position as an extension veterinarian in Delaware with the State Board of Agriculture focusing on poultry pathology and disease control.

In 1950, Dr. Lasher established the Delaware Poultry Laboratories, which specialized in poultry diagnostics and production of poultry vaccines. This business eventually became Sterwin Laboratories from which Dr. Lasher retired in 1979. Subsequently, he established a new company, Intercontinental Biologics in Millsboro, Delaware. This company was subsequently acquired and renamed Intervet America, Inc. Some of Dr. Lasher's accomplishments include the production of the first vaccines for use against tenosynovitis and infectious bursal disease, the first commercial production of vaccines using JMK and Holland strains of infectious bronchitis virus, and the first tissue-culture fowl pox vaccine.

Dr. Lasher is still actively consulting throughout the world as President of Lasher Associates, Inc.

Dr. Lasher is a strong supporter of new students and researchers in the field of avian medicine. He and his brother, the late William Lasher of Sunrise Farms, have been long-time contributors to the Western Poultry Disease Conference and the annual conferences of ANECA, and were the first Benefactor contributors to WPDC. Dr. Lasher has been honored with numerous awards and is past recipient of the American Association of Avian Pathologists' C. A. Bottorff Award, an award that he helped establish and fund. Additionally, Dr. Lasher has received well-deserved recognition for his public service to the Delmarva Poultry Industry and to the State of Delaware, its people and government.

51ST WESTERN POULTRY DISEASE CONFERENCE OFFICERS

WPDC President

Dr. Ken Takeshita
Lohmann Animal Health International
4759 Ridgeview Lane
Vacaville, CA 95688

Program Chair

Dr. Barbara Daft
California Animal Health & Food
Safety Laboratory System –
San Bernardino
105 W. Central Ave.
San Bernardino, CA 82408

Program Chair-elect

Dr. David Willoughby
California Department of Food & Ag
3800 Cornucopia Way, Suite F
Modesto, CA 95350

Proceedings Editor

Dr. David Frame, Utah State University
Cooperative Extension
USU Turkey Research Center
325 West 100 North
Ephraim, UT 84627

Secretary - Treasurer

Dr. Richard P. Chin
California Animal Health & Food Safety
Laboratory System - Fresno
2789 S. Orange Ave.
Fresno, CA 93725

Contributions Co-Chairs

Dr. A. S. Rosenwald & Dr. Ken Takeshita
Western Poultry Disease Conference
P.O. Box 1531
Davis, CA 95617-1531
wpdcontribution@cs.com

The **Proceedings** of the 51st Western Poultry Disease Conference and XXVII Convención Annual ANECA are not refereed, but are presented as a service and a source of information to those attending the conference and to others who wish to gain some insight as to the information presented. Copies of the Proceedings are available in either hardcopy or electronic (CD) formats. Currently, we are only able to accept payments by check.

Copies of these Proceedings are available from: Dr. R. P. Chin

CAHFS-Fresno
University of California, Davis
2789 S. Orange Ave.
Fresno, CA 93725
rpchin@ucdavis.edu

Price per copy (includes shipping & handling): US\$20.00 for USA shipment.

US\$17.00 for AAAP members and orders of 5 or more for USA.

US\$21.00 for Canada and Mexico.

US\$23.00 for all other countries.

Add an additional US\$6.00 for airmail.

Make checks payable to: UC Regents

Still available...

50th WPDC Anniversary CD-ROM. Copies can be purchased from the AAAP. Phone: 610-444-4282, 610-444-5800-ext.2714. Fax: 610-925-8106. aaap@vet.upenn.edu.

Web: <http://cahpwww.nbc.upenn.edu/~aaap/index.html>

WESTERN POULTRY DISEASE CONFERENCE (WPDC) HISTORY

	PRESIDENT	PROGRAM CHAIR	DEDICATION	RECOGNITION
1 st WPDC – 1952		A. S. Rosenwald		
2 nd WPDC – 1953	P. D. DeLay	A. S. Rosenwald		
3 rd WPDC – 1954	C. M. Hamilton	Kermit Schaaf		
4 th WPDC – 1955	E. M. Dickinson	W. H. Armstrong		
5 th WPDC – 1956	D. E. Stover	E. E. Jones		
6 th WPDC – 1957	D. V. Zander	H. E. Adler		
7 th WPDC – 1958	H. E. Adler	E. E. Jones		
8 th WPDC – 1959	R. D. Conrad	L. G. Raggi		
9 th WPDC – 1960	L. G. Raggi	A. S. Rosenwald		
10 th WPDC – 1961	A. S. Rosenwald	D. V. Zander		
11 th WPDC – 1962	D. V. Zander	R. V. Lewis		
12 th WPDC – 1963	R. V. Lewis	Walter H. Hughes		
13 th WPDC – 1964	W. H. Hughes	Bryan Mayeda		
14 th WPDC – 1965	B. Mayeda	R. Yamamoto		
15 th WPDC – 1966	R. Yamamoto	David S. Clark		
		1st sign of Contributors		
16 th WPDC – 1967	D. S. Clark	Roscoe Balch		
17 th WPDC – 1968	R. Balch	Richard McCapes		
18 th WPDC – 1969	R. McCapes	Dean C. Young		
19 th WPDC – 1970	D. C. Young	W. J. Mathey		
4 th Poultry Health Sym. (PHS)		1st combined WPDC & PHS, 1st listing of distinguished members		
20 th WPDC – 1971	W. J. Mathey	Ramsay Burdett		
5 th PHS				
21 st WPDC – 1972	R. Burdett	Marion Hammarlund		
6 th PHS				
22 nd WPDC – 1973	M. Hammerlund	G. W. Peterson		
7 th PHS				
23 rd WPDC – 1974	G. W. Peterson	Craig Riddell		
8 th PHS				
24 th WPDC – 1975	C. Riddell	Ralph Cooper		
9 th PHS				
25 th WPDC – 1976	R. Cooper	Gabriel Galvan		
10 th PHS				
26 th WPDC – 1977	G. Galvan	Don H. Helfer	Hector Bravo	
11 th PHS				
27 th WPDC – 1978	D. H. Helfer	Art Bickford		
12 th PHS				
28 th WPDC – 1979	A. Bickford	J. W. Dunsing		
13 th PHS				
29 th WPDC – 1980	J. W. Dunsing (WPDC)		G. Yan Ghazikhanian P. P. Levine	
14 th PHS				
5 th ANECA	Angel Mosqueda T. (ANECA)			
30 th WPDC – 1981	G. Y. Ghazikhanian	Mahesh Kumar		
15 th PHS				
31 st WPDC – 1982	M. Kumar	Robert Schock		
16 th PHS				
32 nd WPDC – 1983	R. Schock	George B. E. West		
33 rd WPDC – 1984	G. B. E. West	Gregg J. Cutler		
34 th WPDC – 1985	G. J. Cutler	Don W. Waldrip		Bryan Mayeda
35 th WPDC – 1986	D. W. Waldrip (WPDC)	Duncan A. McMartin (WPDC)	J. A. Allen	

	PRESIDENT	PROGRAM CHAIR	DEDICATION	RECOGNITION
11 th ANECA	Jorge Basurto(ANECA)	Mario Padron (ANECA)	A. Tellez – G. Rode	
36 th WPDC – 1987	D. A. McMartin	Marcus M. Jensen		
37 th WPDC – 1988	M. M. Jensen	Barry Kelly	A. S. Rosenwald	
38 th WPDC – 1989	B. Kelly	Masakazu Matsumoto		Louise Williams
39 TH WPDC – 1990	M. Matsumoto	Jeanne M. Smith		Dean Young
40 th WPDC – 1991	J. M. Smith (WPDC)	Richard P. Chin (WPDC)	A. S. Rosenwald	
16 th ANECA	Martha Silva M.(ANECA)	David Sarfati M.(ANECA)	A. S. Rosenwald	
41 st WPDC – 1992	R. P. Chin	Rocky J. Terry	Marcus Jensen	Henry E. Adler (posthumous) R. A. Bankowski C. E. Whiteman
42 nd WPDC – 1993	R. J. Terry	A. S. Dhillon	W. W. Sadler	Royal A. Bagley
43 rd WPDC – 1994	A. S. Dhillon	Hugo A. Medina		G. B. E. West
44 th WPDC – 1995	H. A. Medina	David D. Frame	W. M. Dungan (posthumous)	A. J. DaMassa Gabriel Galvan Walter F. Hughes W. D. Woodward R. Yamamoto
45 th WPDC – 1996	D. D. Frame (WPDC)	Mark Bland (WPDC)	Don Zander (WPDC)	Pedro Villegas
21 st ANECA	R. Salado C.(ANECA)	G. Tellez I. (ANECA)	M. A. Marquez (ANECA)	Ben Lucio M. Mariano Salem Victor Mireles Craig Riddell
46 th WPDC – 1997	Mark Bland	James Andreasen, Jr.	Bryan Mayeda	Roscoe Balch Paul DeLay J. W. Dunsing Don Helfer D. E. Stover
47 th WPDC – 1998	J. Andreasen, Jr.	H. L. Shivaprasad	W. J. Mathey	Marcus Jensen Duncan Martin
48 th WPDC – 1999	H. L. Shivaprasad	R. Keith McMillan		
49 th WPDC – 2000	R. K. McMillan	Patricia Wakenell	R. P. Chin	Ralph Cooper Robert Tarbell
50 th WPDC – 2001	P. Wakenell	Ken Takeshita		Don Bell Art Bickford
51 st WPDC – 2002	K. Takeshita	Barbara Daft	Hiram Lasher	
52 nd WPDC – 2002	B. Daft	David H. Willoughby		

SPECIAL ACKNOWLEDGMENTS

The Western Poultry Disease Conference (WPDC) is honored to acknowledge the many contributions to the Conference. These contributions provide support for outstanding participants and to help pay for some of the costs of the Conference. Over 30 organizations, companies and individuals have given substantial financial support. Many companies and organizations, including some that also contribute, send speakers at no expense to the Conference. We thank all these people, and acknowledge their support and contribution.

We are extremely pleased to acknowledge three contributors at the Benefactor level. They are the American Association of Avian Pathologists, Intervet, Inc., and Merial, Inc. Once again, our distinguished Patrons, Donors, Sustaining Members, and Friends of the Conference are listed on the following pages. We greatly appreciate their generosity and say thanks to them and their representatives.

The WPDC is especially grateful to Dr. Ernesto Soto, Dr. Victor Mireles and Dr. Julian Carrillo for their hard work and efforts into the planning and organization of this joint meeting.

Thanks and appreciations are due to Dr. Barbara Daft, for accepting the responsibilities of Program Chair for this joint meeting. Barbara, Victor and Ernesto have put together an excellent program, with an impressive array of international speakers and poster presenters. With more than 200 titles submitted, dual sessions for both oral and posters were necessary in order to fit as many titles as possible into the program. We thank all the presenters for their time and effort in making this an outstanding program.

Many have provided special services that contribute to the continued success of this conference. The WPDC would like to thank Ms. Nicole Gibson and the Center for Avian Biology for their secretarial support to Dr. “Rosy” Rosenwald and Dr. Ken Takeshita; Jo Anne Allen, Yvette Velasquez, Judy Brooks, Jan McCarthy, and the University of California, Veterinary Medicine Extension/Public Programs for administering the contributions and financial services; Dr. Rosenwald for once again garnering the outstanding contributions; and to all others who contributed to the program and conference.

This year, we are especially appreciative of Ms. Robin Sanchez for handling the registration and administrative duties of this conference. Robin didn’t know what she was getting into especially with a joint meeting in Mexico this year. Dr. Chin is grateful for her patience and hard work with this international conference.

We thank Dr. David Frame for editing and producing an outstanding Proceedings of this joint meeting. Dr. Frame is indebted to Ms. Sherry Nielson, Senior Secretary of The Utah State University Turkey Research Center, for her seemingly endless hours of proofreading and formatting the Proceedings for publication. In addition, we must acknowledge the contributions of ANECA for collecting the papers submitted in Spanish and to Dr. Victor Mireles for his translation of all summaries, both Spanish and English papers. We express our gratitude to all authors who submitted manuscripts – especially those who followed the instructions and submitted their papers on time! We again acknowledge and thank Ms. Rebecca Dodson and Ominpress, Madison, Wisconsin, for the handling and printing of this year’s Proceedings. Once again, we thank Bruce Patrick (Graphic Communications, Brigham Young University) for the cover design.

WPDC SPECIAL RECOGNITION AWARDS

At this year's conference, the WPDC is pleased to present its Special Recognition Award to the following companies for their many years of financial contribution and support to the conference. We are especially proud to honor these companies from Latin America during this joint meeting. The 2002 Awardees are:

Bachoco S.A. de C.V.

Productos Toledano S.A.

2002 BENEFACTORS

AMERICAN ASSOCIATION OF AVIAN PATHOLOGISTS

Kennett Square, PA

EMBREX, INC

Research Triangle Park, NC

INTERVET

Boxmeer, The Netherlands

MERIAL SELECT, INC.

Gainesville, GA

2002 PATRONS

Cobb-Vantress
Siloam Springs, AR

IDEXX Labs, Inc.
Westbrook, ME

Lohman Animal Health International
Gainesville, GA

Nippon Biologicals, Inc.
Tokyo, Japan

Sunrise Farms, Inc.
Catskill, NY

Synbiotics Corporation
San Diego, CA

2002 DONORS

Alltech Biotechnology Centre, Inc.
Guelph, ON, Canada

Bachoco S.A. de C.V.
Celaya, GTO, Mexico

Bayer Corporation
Shawnee Mission, KS

Biomune Co.
Lenexa, KS

Boehringer Ingelheim Vetmedica, S.A. de C.V.
Guadalajara, Jalisco, Mexico

Charles River SPAFAS
North Franklin, CT

Cutler & Associates
Moorpark, CA

Hy-Line International
Dallas Center, IA

Jones-Hamilton Co. – PLT
Salisbury, MD

Lasher Associates, Inc.
Millsboro, DE

Perdue Farms, Inc.
Salisbury, MD

Productos Toledano S.A.
Panama City, Panama

Arnold & Jo Rosenwald
Davis, CA

Shaver-Hubbard ISA
Cambridge, ON, Canada

Tyson de Mexico
Gomez Palacio, DGO, Mexico

Veterinary Service, Inc.
Salida, CA

2002 SUSTAINING MEMBERS

Aviagen North America
Huntsville, AL

Fort Dodge Animal Health
Overland Park, KS

Foster Poultry Farms
Livingston, CA

Gemperle Enterprises, Inc.
Turlock, CA

J.S. West Milling Company
Modesto, CA

Merrill's Poultry Farms, Inc.
Paul, ID

Moroni Feed Company, Inc.
Moroni, UT

Nicholas Turkey Breeding Farms, Inc.
Sonoma, CA

Novus International, Inc.
St. Charles, MO

Orlopp Turkey Breeding Farms
Orosi, CA

Pacific Egg and Poultry Association
Sacramento, CA

Preserve International
Turlock, CA

Schering-Plough Animal Health/ASL
Union, NJ

Walco International, Inc.
Ceres, CA

2002 FRIENDS OF THE CONFERENCE

Agri Stats, Inc.
Fort Wayne, IN

California Poultry Federation, Inc.
Modesto, CA

Consortium of California Poultry Extension
Veterinarians
Davis, CA

M. A. Hammarlund, DVM
Riverside, CA

Bryan Mayeda, DVM
Sacramento, CA

International Poultry Production
East Yorkshire, UK

Minutes of the 50th WPDC Annual Business Meeting

President Wakenell called the meeting to order on Sunday, 25 March 2001, at 12:00 PM, at the Memorial Union II, University of California, Davis, California. There were approximately 30 people in attendance.

APPROVAL OF 49TH WPDC BUSINESS MEETING MINUTES

The minutes from the 49th WPDC business meeting were reviewed and a motion was carried to approve them as printed in the Proceedings of the 50th WPDC.

ANNOUNCEMENTS

President Wakenell acknowledged all the contributors; in particular, those contributing at the Super Sponsor level, which included the American Association of Avian Pathologists, Merial-Select and International Poultry Production. She also thanked all the contributors for their generous donations. President Wakenell acknowledged the efforts of the current WPDC officers. It was noted that Dr. Wakenell was incorrectly listed as the Program Chair on the page of WPDC officers in the Proceedings.

REPORT OF THE SECRETARY-TREASURER

Dr. R. Chin presented the Secretary-Treasurer report. There were 237 registrants for the 49th WPDC. At the end of the 1998-99 fiscal year, contributions for the 49th WPDC were \$31,950 and income from the meeting was \$21,455.02. There were expenses of \$45,515.56 for the meeting with a net gain of \$7,889.46. The current balance in the WPDC account is \$55,705.45. Dr. Chin estimates a net gain of about \$2400 for the 2001 meeting.

REPORT OF THE PROCEEDINGS EDITOR

Dr. D. Frame presented the Proceedings Editor report. In general, the production of the Proceedings went well with all papers being submitted by E-mail. Total expenses for preparing and printing the Proceedings were \$5910.40. There were 700 Proceedings printed, each with 202 pages, for a cost of \$8.44/copy. There are still problems with authors not following the directions, in particular, problems with formatting, length and number of tables. Dr. Frame said this was a good learning experience and has prepared him and his secretarial support (Sherry Nielson) to be ready for next year's meeting in Mexico. He will work on developing instructions that address the length and number of tables.

REPORT OF THE LOCAL ARRANGEMENTS COORDINATOR

Dr. C. Cardona commented on the difficult planning this year with the meeting being held at UCD. Previously, when the meeting was held at UCD, it was much smaller. Prior to the start of this year's meeting, we had 346 people registered. She also mentioned the difficulty in working with the present coordinating group and suggested we consider a proposal from the School of

Veterinary Medicine Public Programs for future meetings. It was agreed that Dr. Cardona should look at other organizations for coordinating future meetings.

OLD BUSINESS

Dr. R. Chin reported that the WPDC completed reimbursement to Dr. Rosenwald for his previous out-of-pocket expenses at the WPDC meeting in Cancun.

NEW BUSINESS

President Wakenell reported that the WPDC Executive Committee did not have a nomination for Program Chair-elect of the 52nd WPDC in 2003. Three people were asked and said they would think about it. It was agreed that President Wakenell would continue talking with these three individuals and report if one agreed to accept the position. (Note: Dr. Dave Willoughby accepted the Program Chair-elect.) President Wakenell nominated the following officers for 2001-2002:

Program Chair: Dr. Barbara Daft
President: Dr. Ken Takeshita
Local Arrangement Coordinator: Dr. Carol Cardona
Contributions Chair: Dr. Ken Takeshita
Proceedings Editor: Dr. David Frame
Secretary-Treasurer: Dr. Rich Chin
(Program Chair-elect: Dr. David Willoughby)

Nominations for all offices were closed and all nominees were approved unanimously.

It was announced that the 51st WPDC, in 2002, would be held in conjunction with ANECA in Puerto Vallarta, Mexico in 2002. ANECA will be represented by Dr. Ernesto Soto as the Scientific Program Chair, and Dr. Julian Carrillo as the President for ANECA.

It was moved, seconded and approved to have the 52nd WPDC, in Sacramento, on March 9-11, 2003.

There was a discussion on when the WPDC Proceedings should be produced as CD's and/or hard copies. After much discussion, Dr. J. Jeffrey proposed that a CD version of the proceedings be produced every 5 years, in conjunction with the joint meeting with ANECA. The CD would contain the 4 previous years and that year's proceedings. This proposal was seconded and approved. In addition, it was moved, seconded and approved that ANECA and WPDC make a CD for the 2002 meeting that will be in Puerto Vallarta, Mexico.

President Wakenell passed the presidency to Dr. Ken Takeshita. President Takeshita thanked outgoing President Wakenell for her service to WPDC and adjourned the meeting at 12:40 PM.



**MEMORIAS DE LA XXVII CONVENCÓN ANUAL
ASOCIACIÓN NACIONAL DE ESPECIALISTAS EN
CIENCIAS AVÍCOLAS**

1 al 5 de mayo de 2002 • Puerto Vallarta, México

&

**PROCEEDINGS OF THE FIFTY-FIRST
WESTERN POULTRY DISEASE CONFERENCE**

May 1-5, 2002 • Puerto Vallarta, Mexico

**MEMORIAS DE LA XXVII CONVENCION ANUAL DE LA
ASOCIACION NACIONAL DE ESPECIALISTAS EN CIENCIAS
AVICOLAS**

**PROCEEDINGS OF THE FIFTY-FIRST
WESTERN POULTRY DISEASE CONFERENCE**

CONTENIDO

TABLE OF CONTENTS

Nota: Ambas presentaciones (oral y poster) se enlistan a continuación por autor en orden alfabético. El orden de las ponencias se realizó de acuerdo al Programa Científico de la Convención XXVII ANECA – 51st WPDC.

Note: Both the oral and poster presentations of the 51st WPDC – XXVII ANECA are listed below in alphabetical arrangement by presenting author. Authors and titles of all papers scheduled for presentation at the conference are listed.

AUTOR PRESENTER	TITULO TITLE	PAGINA PAGE
ACEVES, M.	Cinética de la absorción, transporte y deposición de pigmento carotenoides en pollo de engorda Kinetics of carotenoid pigment absorption, transportation, and deposition in broilers.....	235
ALLAN, B.	A model for the horizontal transfer of <i>Campylobacter jejuni</i> in poultry Un modelo para la transferencia horizontal de <i>Campylobacter jejuni</i> en aves	240
ALMAZA, Y.	Mecanismos de patogenicidad de <i>Escherichia coli</i> aviar como línea de investigación: Adherencia a proteínas de la matriz extracelular Pathogenicity mechanisms of avian <i>Escherichia coli</i> as a research line: Adhesion to extracellular matrix proteins	238
ALONSO, F.	El comportamiento de las importaciones de carne de pollo en el periodo 1994-1999 en el marco del TLCAN Broiler meat imports within the North American free trade agreement (NAFTA): 1994-1999.....	227
ALVAREZ, R. T.	Efecto de la edad en la mineralización del cascarón de huevos de gallinas criollas gen cuello desnudo (Na) heterocigotas (Nana) y su comparación con la estirpe comercial babcock B-380, durante el primer ciclo de postura Effect of age on egg shell mineralization of native, naked neck (Na gene), heterocygous (Nana), and babcock B-380 hen eggs during the first laying cycle	239
AMBROSE, N. S.	Case report: Defective down in a commercial broiler flock Plumón defectuoso en una parvada comercial de pollo de engorda.....	172
ANDERSON, A.	The human health consequences of antimicrobial use in poultry Consecuencias del uso de antimicrobianos en aves, sobre la salud humana	1
ARUMUGASWAMI, V.	Redefining a latency model for Marek's disease virus (MDV) Redefinición de un modelo de latencia para el virus de la enfermedad de Marek	123
AVAKIAN, A.	<i>In ovo</i> administration of Marek's disease vaccine: Importance of vaccine deposition site in the fertile egg Administración <i>In ovo</i> de la vacuna contra la enfermedad de Marek: Importancia del sitio donde queda depositada la vacuna en el huevo fértil	119
BARRI, C.	Caracterización histopatológica en encéfalos de pollos libres de patógenos específicos experimentalmente infectados con el virus de la enfermedad de Newcastle cepa chimalhuacán Brain histopathological characterization of specific pathogen free (SPF) chickens experimentally infected with Newcastle disease virus, chimalhuacán strain	241

BECKMAN, B.	Feeding early maturing commercial layers Alimentación de ponedoras comerciales de madurez temprana	159
BELL, D.	New technology for the poultry industry - The essential components of science and economics Nueva tecnología para la industria avícola – Los componentes esenciales de la ciencia y la economía	229
BENNETT, R. S.	The isolation and characterization of an avian pneumovirus isolate from Canada geese ..	105
BLACKALL, P.	Characterisation of Indian isolates of <i>Haemophilus paragallinarum</i> Caracterización de aislamientos de <i>Haemophilus paragallinarum</i> en la India	58
BLACKMORE, C.	A statistical prototype for establishing new histopathology cut off scores in the evaluation of infectious bursal disease vaccine efficacy Prototipo estadístico para establecer nuevas calificaciones histopatológicas y clasificar claramente los resultados, en la evaluación de la eficacia de las vacunas contra la infección de la bolsa de fabricio.....	45
BLAND, M. C.	Case report: A severe infectious coryza infection in a multiple age layer complex in Central California Informe de un caso severo de coriza infecciosa en un complejo de postura con parvadas de edades múltiples en la región Central de California	56
BOCHKOV, Y. A.	Demonstration of avian pneumovirus infection in chickens in Russia Demostración de la infección de pollos con el neumovirus aviar (APV) en Rusia.....	242
BOULIANNE, M.	<i>S. Enteritidis</i> surveillance program in layers in Quebec Programa de vigilancia de <i>S. Enteritidis</i> (SE) en ponedoras en Quebec.....	15
BOUZOUBAA, K.	Studies on predominant diseases in poultry backyard flocks in Morocco (Khenifra region) Estudios sobre las enfermedades predominantes en las parvadas de traspatio en Marruecos (región de Kenifra).....	243
BYRD, J. A.	Effect of experimental chlorate compound (ECP) on <i>Salmonella</i> contamination of poultry.....	9
CABRIALES, J.	Comportamiento de la eliminación de ooquistes como herramienta en la evaluación de una vacuna contra la coccidiosis aviar en aves reproductoras Oocyst shedding as a tool in the evaluation of a coccidial vaccine in breeders	134
CALLISON, S. A.	Creation of a novel infectious bronchitis virus S1 gene library by DNA shuffling Creación de una nueva colección del gene S1 del virus de la bronquitis infecciosa mediante la combinación aleatoria del ADN.....	74
CAMACHO, D.	Dietas formuladas a proteína ideal y restricción alimenticia, sobre la hiperplasia e hipertrofia del tejido graso abdominal en pollos de engorda Effect of ideal protein-formulated diets and feed restriction on fat pad hyperplasia and hypertrophy in broilers	170
CAMPOGARRIDO, R.	Impacto de la <i>Pasteurella haemolytica</i> en parvadas comerciales The impact of <i>Pasteruella haemolytica</i> on commercial flocks	84
CANO, M.	Situación y oportunidad de la producción de huevo organico en un sistema rural de la sierra norte de Puebla Status and opportunities of organic egg production in a rural system in the northern sierra of Puebla.....	244
CAPUA, I.	Strategies for the control of avian influenza in Italy.....	147

CARDONA, C.	Neuropathology associated with <i>Haemoproteus lophortyx</i> infection in Bobwhite quail Neuropatología asociada con la infección por <i>Haemoproteus lophortyx</i> en codornices bobwhite	246
CASTELLANOS, N. L.	Amplification of the il-2 gene of total chicken spleen cells in a <i>Salmonella gallinarum</i> infection	247
CERDA, R.	Eficacia del 3-acetil 4"-isovaleril tartrato de tilosina en el tratamiento de la enfermedad respiratoria crónica (<i>Mycoplasma allisepticum</i>) Efficacy of 3-acetyl, 4"-isovaleryl tylosine tartrate (AIV) in the treatment of chronic respiratory disease (<i>Mycoplasma gallisepticum</i>).....	212
CERVANTES, H.	Incidence of pathological conditions in clinically normal broilers from different regions of the USA	220
CERVANTES, R.	Aplicación de una cutícula artificial en huevos incubados de avestruz Application of an artificial cuticle to ostrich hatching eggs	248
CERVANTES, R.	Determinación del peso óptimo de incubación en huevos de avestruz Determination of optimum egg weight in ostrich hatching eggs	250
CHAPA, B.	Hallazgos macroscópicos y microscópicos en aves con problemas de despigmentación trabajo experimental Gross and microscopic findings in poultry with poor pigmentation - Experimental work	252
CHAPMAN, D. H.	The use of feed additives in broiler chickens in the USA Uso de aditivos alimenticios en pollo de engorda en EE.UU.....	219
CHARLES, M.	Aspectos relevantes del proceso de coagulación en las aves Relevant aspects of the blood clotting process in birds.....	156
CHIN, R. P.	<i>Neisseria sp.</i> – A novel bacterium of poultry	254
CLARK, S.	Disk-diffusion testing of reference and poultry veterinary bacterial isolates for susceptibility to Aureomycin® (Chlortetracycline) Prueba de difusión en disco para determinar la susceptibilidad a la Aureomicina® (Clortetraciclina) de aislamientos bacterianos de referencia y de casos	255
COOKSON, K.	A Comparison of 3 live <i>Salmonella</i> vaccines against group C and D <i>Salmonella</i> challenge Comparación de 3 vacunas vivas de <i>Salmonella</i> contra el desafío con <i>Salmonella</i> de los gripes C y D.....	12
COOPER, G.	<i>Hexamita meleagridis</i> infection in chukar partridges associated with high mortality and intracellular trophozoites Infección con <i>Hexamita meleagridis</i> en perdices chukar, asociada con alta mortalidad y trofozoítos intracelulares	174
CORONA, J.	Evaluación de mortalidad, lesiones entéricas y coccidiosis en pollos de engorda tratados con exclusión competitiva y toltrazuril Evaluation of mortality, enteric lesions, and coccidiosis in chickens treated with competitive exclusion and toltrazur	137
CORTES, C. A.	Digestibilidad aparente ileal de proteína y aminoácidos en pollos de engorda con la adición de fitasa en la dieta Apparent ileal digestibility of proteins and aminoacids in broilers after addition of phytase to the diet	161
CORTES, P.	The role of Marek's disease viral IL-8 in viral pathogenesis El papel de la interleucina 8 del virus de la enfermedad de Marek en la patogenia de la enfermedad	122

CUMMINGS, T.	Antibiotic use in food animal medicine: The quiet voice of reason in the antibiotic resistance debate El Uso de antibióticos en la medicina de los animals productores de alimentos para el hombre: La llamada voz de la razón en el debatede la resistencia a los antibioticos	1
CUPITT, D.	Darkling beetle [<i>alphaltobius diaperinus panzer (coleoptera: tenebrionidae)</i>] Control in Australian broilers—enhancing food safety Control del escarabajo negro (<i>alphaltobius diaperinus panzer [coleoptera: tenebrionidae]</i>) en pollos de engorda Australianos: favoreciendo la seguridad alimentaria.....	32
DAVILA, V.	The effect of Nobilis Cox ATM®, avian coccidiosis vaccine, on pigmentation and productive parameters in broilers The effect of Nobilis Cox ATM®, avian coccidiosis vaccine, on skin pigmentation and productive parameters in broilers	256
DHILLON, A. S.	High mortality in layers as a result of clostridial enteritis	175
DONOGHUE, D.	Transfer of food borne bacterial pathogens: Investigating potential modes of infection in turkeys Transferencia de bacterias patógenas de origen alimentario: Investigación de los modos potenciales de infección en pavos.....	259
ECKROADE, R.	Using geographic information system (GIS) technology to determine the location of commercial poultry flocks, support industry and live bird market system companies, dealers and markets in Pennsylvania Uso de la tecnología del sistema de información geográfica (GIS) para determinar la ubicación de las parvadas comerciales y apoyar a la industria, las compañías, distribuidores y los mercados de aves vivas en Pennsylvania.....	146
ESCAMILLA, J.	Protección conferida por vacunas emulsionadas contra un aislamiento local del virus de gumboro Protection with oil emulsion vaccines against challenge with local IBDV isolates	47
ESCORCIA, M.	El virus de influenza aviar. ¿Potencial pandémico? (Revisión bibliográfica) Avian influenza virus: Pandemic potential? (A bibliographic review)	261
ESQUIVEL, P.	SEXADO DE AVESRUCES Sex determination in ostriches.....	262
FADLY, A.	Influence of Marek’s disease vaccines on the response of commercial broiler breeder chickens to infection with subgroup J avian leukosis virus Influencia de las vacunas contra la enfermedad de Marek sobre la respuesta de las reproductoras pesadas a la infección con el virus de la leucosis aviar, subgrupo J.....	129
FERENC, R.	Diagnostic pathology and ultrastructure of Avian diseases	223
FERNANDEZ, A. I.	Efecto de una vacuna comercial de coccidia sobre el tipo de especie presente después de un desafío patógeno en pollos de engorda Effect of a coccidial commercial vaccine on the <i>Eimeria</i> species present after a pathogenic challenge in broilers	266
FERNANDEZ, P.	Revision critica de la coriza infecciosa Infectious coryza: a critical review.....	66
FERNANDEZ, R.	Identificación de virus de la enfermedad de gumboro en el Perú por elisa de captura de antígeno Identification of infectious bursal disease virus in Peru using antigen capture ELISA	263

FIERRO, J. A.	Compatibilidad de un adsorbente organoaluminosilicato de Micotoxinas con aditivos quimicos Compatibility of a Mycotoxin adsorbing organic aluminum silicate with chemical additives	269
FUENTE, M.	Efecto de la adición de fitasa como fuente de fósforo inorgánico en dietas para gallinas de postura The effect of phytase addition as a source of inorganic phosphorous in layer diets.....	162
GALLAZZI, D.	Effects of the vaccination and normal avian gut flora (NAGF) application on <i>Salmonella enteritidis/S. gallinarum</i> control in commercial layers in Italy Efectos de la vacunación y de la aplicación de flora intestinal avícola normal (NAGF) sobre el control de <i>Salmonella enteritidis/S. gallinarum</i> en ponedoras comerciales, en	270
GARCIA, A.	Presencia de <i>Haemophilus paragallinarum</i> NAD independiente en México The presence of NAD-independent <i>Haemophilus paragallinarum</i> in Mexico	59
GARCIA, A.	Efecto de Ocratoxina A, urea y amprolio sobre la pigmentación en pollo de engorda Effect of Ochratoxin A (OA), urea, and amprolium on skin pigmentation in broilers	204
GARCIA, A.	Evaluación de la capacidad de secuestro <i>in vitro</i> de Ocratoxina A por diferentes secuestrantes comerciales utilizados en México Evaluation of the <i>in vitro</i> effectiveness on Ochratoxin A (OA) of different Mycotoxin binders used in Mexico	271
GARCIA, A.	Evaluación de secuestrantes de micotoxinas para reducir la toxicidad en dietas para pollo de engorda contaminadas con cultivos de <i>Aspergillus ochraceus</i> y <i>fusarium tricinctum</i> productores de Ocratoxina A y toxina T-2 Evaluation of mycotoxin binders to decrease toxicity in broiler diets contaminated with Ochratoxin A-/T-2 toxin-producing <i>Aspergillus ochraceus</i> and <i>fusarium tricinctum</i> cultures.....	274
GARCIA, I.	Evaluación de la calidad de absorbentes amoniacos Quality evaluation of ammonia absorbents	209
GARCIA, J	Caracterización de un aislamiento mexicano de un virus de gumboro Characterization of a mexican infectious bursal disease virus (IBDV) isolate	46
GAY, M.	Evaluación experimental de una vacuna atenuada contra la bronquitis infecciosa serotipo BL56 Experimental evaluation of an attenuated infectious bronchitis vaccine, serotype BL-56	75
GAZDZINSKI, P.	Venereal colibacilosis (acute vaginitis) in turkey breeder hens Colibacilosis venérea (vaginitis aguda) en pavas reproductoras.....	176
GELB, J.	Inactivated virus vaccination for controlling the nephropathogenic PA/wolgemuth/98 strain of infectious bronchitis virus Vacunación con virus inactivado para el control de la cepa neuropatógena PA/wolgemuth/98 del virus de la bronquitis infecciosa.....	70
GILBERT, R.	Autogeneous IBD vaccines: techniques for isolating “New” IBD strains which are not protected by maternal immunity	53
GOMIS, S.	Stimulation of the immune system of broilers against cellulitis / colibacilosis Estímulo del aparato inmunocompetente de los pollos de engorda contra la celulitis/colibacilosis.....	42
GONZALEZ, C.	Coriza infecciosa, inmunidad y resistencia bacteriana a los antibióticos Infectious coryza (CI): Immunity and bacterial antibiotic resistance	63

GONZALEZ, E.	Patrones de resistencia antibiótica en <i>Pasteurella haemolytica</i> aviar Antibiotic resistance pattern of avian <i>Pasteurella haemolytica</i>	87
GUENTHER, R.	New variety of <i>Ornithobacterium rhinotracheale</i> Una nueva variedad de <i>Ornithobacterium rhinotracheale</i>	277
GUERRERO, R.	El codex, seguridad alimentaria, y el comercio internacional The codex alimentarius, food safety, and international trade	37
GUSTAFSON, C.	<i>In ovo</i> technology meeting the challenges of today and tomorrow La tecnología <i>In ovo</i> satisface los retos de hoy y del mañana.....	20
HADDAD, E.	Safety and efficacy of a novel Newcastle disease vaccine administered <i>In ovo</i> to SPF and commercial broiler birds Seguridad y eficacia de una nueva vacuna contra la enfermedad de Newcastle administrada <i>In ovo</i> a aves <i>SPF</i> y a pollos de engorda comerciales.....	101
HAFEZ, H. M.	Pre- and post- harvest approaches to reduce <i>Salmonella</i> in poultry meat production: Review	4
HAFEZ, H. M.	Re-emergence of fowl pox in Germany Resurgimiento de la viruela aviar en Alemania	28
HEINS MILLER, S.	Proven triculitis/poor feed conversion: A case study.....	177
HERNANDEZ, V. X.	Evaluación de una vacuna de <i>Eimeria tenella</i> , <i>E. acervulina</i> y <i>E. maxima</i> en pollo de engorda Evaluation of an <i>Eimeria tenella/E. acervulina/E. maxima</i> vaccine in broilers	278
HOWELL, L.	Use of diclazuril for the prevention of coccidiosis in turkeys El uso del diclazuril para la prevención de la coccidiosis en pavos.....	140
HUERTA, J.	Caracterización molecular del virus bronquitis infecciosa Molecular characterization of infectious bronchitis virus.....	280
HUFF, G. R.	The influence of behavior and environmental enrichment on resistance of turkeys to <i>Escherichia coli</i> respiratory infection Influencia del comportamiento y del enriquecimiento del ambiente sobre la resistencia de los pavos a la infección respiratoria por <i>Escherichia coli</i>	282
HUFF, W.	Studies on the use of bacteriophage aerosol sprays to prevent <i>E. coli</i> respiratory disease in poultry Estudios sobre el uso de aspersiones de bacteriófagos para prevenir la enfermedad respiratoria causada por <i>Escherichia coli</i> en aves	41
INGALLS, F.	Analisis de la rentabilidad en la comercializacion de pollo en México A profitability analysis of broiler trade in Mexico	283
JACKWOOD, M.	Advances in diagnosis of IBV using real-time RT-PCR Avances en el diagnóstico de la bronquitis infecciosa usando la reacción en cadena con polimerasa y transcriptasa inversa (RT-PCR) de tiempo real	69
JACOBS, A.	An emerging immunotype (variant type B) of <i>Haemophilus paragallinarum</i> : Serotyping and vaccination-challenge experiments Un nuevo inmunotipo (tipo variante B) de <i>Haemophilus paragallinarum</i> : Serotificación y experimentos de vacunación y desafío	62

JUAREZ, M.	Caracterización biológica de cuatro cepas velogénicas y una lentogénica del virus de la enfermedad de Newcastle Biological characterizatiohn of one lentogenic and four velogenic strains of Newcastle disease virus	79
JUAREZ, M.	Captura de antígeno contra el virus de leucosis aviar en distintos órganos de pollo de engorda Antigen capture against avian leukosis virus in different broiler organs	130
JUAREZ, M. A.	Evaluación de una cutícula artificial sobre la pérdida de humedad e incubabilidad en huevos de aves leghorn de segundo ciclo Evaluation of an artificial cuticle on moisture and hatchability loss in the eggs of second-cycle leghorn hens	284
KAPCZYNSKI, D.	Immune function following vaccination with an inactivated avian pneumovirus vaccine La función inmune después de la aplicación de una vacuna inactivada contra el neumovirus aviar	287
KELLY, B. J.	Fluoroquinolone use in poultry in the USA: Impact on public health ? El uso de las fluoroquinolonas en la industria avícola estadounidense – ¿Impacto sobre la salud pública?.....	29
KLEVEN, S.	Recent developments in Mycoplasma diagnosis and control Desarrollos recientes en el diagnóstico de <i>Mycoplasma</i> y su control	109
LECHUGA, M.	Técnicas para la evaluación del tamaño de la bolsa de fabricio y su relación con el estado de salud de la parvada Techniques for bursal size evaluation and its relationship with flock health status	43
LEDESMA, N.	Diferenciación de aislamientos del virus de anemia infecciosa en México Differentiation of chicken anemia virus strains isolated in Mexico.....	55
LEE, M.	Vaccine potential of core LPS of avian <i>Escherichia coli</i> El potencial del lipopolisacárido (LPS) central de <i>Escherichia coli</i> aviar como vacuna	288
LIMA, A.	Cambios hematologicos en aves infectadas con la cepa 73688 altamente patogena del virus de infeccion de bolsa de fabricio Hematological changes in birds infected with highly pathogenic 73688 strain, infectious bursal disease (IBD) virus	290
LOBANOV, V. A.	Application of the PCR to detect chicken anemia virus genome Aplicación de la reacción en cadena con polimerasa (PCR) para detectar el genoma del virus de la anemia del pollo	292
LOPES, V.	<i>Ornithobacterium rhinotracheale</i> : Its survival over time and temperature in poultry litter <i>Ornithobacterium rhinotracheals (ort)</i> : Su supervivencia ante el tiempo y la temperatura en la cama avícola	90
LOPEZ, B.	Efecto de la estirpe genetica, sexo y algunas practicas de manejo sobre los parametros de produccion en el pollo de engorda Effect of the strain, sex, and management practices on broiler production parameters.....	293
LOPEZ, C. C.	Efecto de la temperatura de crianza sobre el emplume de pollos de engorda machos y hembras The effect of brooding temperature on feather development in male and female broilers	192
LOPEZ, C. C.	Mtodología para evaluar excretas de pollo Methodology for fecal evaluation.....	206

LOUGOVSKAIA, N. N.	Enzyme-linked immunosorbent assay using peptide specific antibodies for detection of avian infectious bronchitis virus Ensayo de inmunoabsorción ligado a enzimas usando anticuerpos específicos contra péptidos para la detección del virus de la bronquitis infecciosa	294
LU, H.	Persistence and immune response of a Pennsylvania nephropathogenic strain of IBV in SPF chickens Persistencia y respuesta inmune de una cepa nefropatógena del virus de la bronquitis infecciosa en pollos libres de patógenos específicos (SPF) en Pennsylvania.....	71
MANIN, T. B.	Characterization of ND virus isolate from recent outbreak in central region of Russia Caracterización de un aislamiento del virus de la enfermedad de newcastle de un brote reciente en la región central de Rusia.....	295
MARQUEZ, M. A.	Prevalencia e identificación de serogrupos y serovariedades de <i>Haemophilus paragallinarum</i> en gallinas de postura en México Prevalence and identification of <i>Haemophilus paragallinarum</i> serogroups and serovars in commercial layers in Mexico.....	60
MARQUEZ, R.	Evaluación <i>in vivo</i> de la capacidad inhibitoria de las micotoxinas en aves alimentadas con dietas contaminadas con aflatoxinas, Ocratoxina A y toxina T-2 con la adición de levaduras <i>Saccharomyces cerevisiae</i> y con mananglucanooligosacáridos (Safmannan [™]) <i>In vitro</i> evaluation of the mycotoxins inhibitory activity of the addition of <i>Saccharomyces cerevisiae</i> yeast and mannan oligosaccharides (Safmannan [™]) in birds fed aflatoxin-, Ochratoxin A-, and T-2 toxin- contaminated feeds.....	202
MARRUFO, D.	Evaluación de la aplicación de una vacuna inactivada contra el virus de la bronquitis infecciosa por aspersión en una parvada de pollo de engorda Evaluation of a spray-given, killed, infectious bronchitis virus (IBV) vaccine in a broiler flock	295
MARSH JOHNSON, T.	Impact of poultry house air quality on human health Impacto de la calidad del aire en las casetas avícolas sobre la salud humana	187
MARTINEZ, J. F.	“Evaluación de parámetros productivos y grado de pigmentación en pollos de engorda vacunados contra coccidiosis (Nobilis Cox ATM®) y medicados con Salinomycin (Sacox®).” Evaluation of productive parameters and skin pigmentation of coccidia-vaccinated (Nobilis Cox ATM®)/Salinomycin-treated (Sacox®) broilers	297
MATA, S.	Manejo para la ponedora comercial Managing the commercial layer	190
MC DOUGALD, L. R.	Control of histomoniasis in chickens and turkeys Control de la histomoniasis en pollos y pavos	142
MC KEE, S. R.	Low levels of electron beam irradiation improve poultry meat safety but alter meat quality La radiación con un haz de electrones de bajo nivel mejora la seguridad de la carne de ave pero modifica su calidad.....	36
MEDINA, H.	Experiences with killed oil emulsion Newcastle disease virus vaccine on day old turkey poults in the Midwest (USA) Experiencias con una vacuna inactivada y emulsionada en aceite, elaborada con el virus de la enfermedad de Newcastle para uso en pavipollos de un día en el medio oeste Estadounidense.....	103

MEDINA, J. C.	Aseguramiento de calidad en determinar el nivel de vitamina A en alimentos balanceados Quality assurance in the quantification of vitamin A in finished feeds	164
MENDEZ, G.	Análisis comparativo de antibiogramas realizados en aislamientos de <i>Escherichia coli</i> Durante el periodo 1996 – 2001 Comparative analysis of sensitivity tests using <i>Escherichia coli</i> isolates: 1996 – 2001	299
MERINO, R.	Uso del ensayo ELISA para detectar anticuerpos contra el virus de Influenza Aviar en yema de huevo y establecer el estado de infección/vacunación en gallinas de postura Use of ELISA test to detect avian influenza virus (AIV) antibodies in egg yolks and to establish infection/ vaccination status in laying hens	16
MERINO, R.	Uso del ensayo ELISA para detectar anticuerpos contra <i>Salmonella enteritidis</i> en yema de huevo y establecer el estado de infección en gallinas de postura The use of ELISA to detect <i>Salmonella enteritidis</i> (SE) antibodies in the yolk sac, and to establish infection status in laying hens.....	154
MIRANDE, A.	Reduction of <i>Salmonella</i> in the United States poultry industry through vaccination Reduccion de <i>Salmonella</i> en la industria avicola de los Estados Unidos a traves de la vacunacion	7
MIREYA, J.	Estudio serológico y morfológico de adenocarcinomas abdominales en gallinas reproductoras semipesadas Serological/morphological study of abdominal adenocarcinomas in semi-heavy breeders.....	301
MONCADA, L. B.	Epizootiología de la leucosis mieloide subgrupo “J” en aves semiligeras y criollas del Norte de Puebla Epidemiology of myeloid leukosis subgroup “J” in semi-heavy and native hens in Northern Puebla	302
MONDAL, S. P.	A preliminary report on a rapid test for the detection of infectious bronchitis virus Reporte preliminar de una prueba rápida para la detección del virus de la bronquitis infecciosa	68
MOORE, K. M.	Efficacy and safety of a recombinant fowl poxvirus containing laryngotracheitis genes Eficacia y seguridad de un poxvirus recombinante conteniendo genes de laringotraqueitis.....	21
MORALES, L. R.	Efecto del 25 hidroxicolecalciferol (25-(OH)D ₃) en los parámetros productivos e inmunidad de pollos de engorda Effect of 25 hydroxy-chole-calciferol (25-(OH)D ₃) on productive parameters and immunity of broilers.....	303
MUNOZ, J.	Uniformidad en alimentos balanceados Balanced feed uniformity.....	168
MUNOZ, J.	Lo que se debe conocer de las evaluaciones de adsorbentes de micotoxinas What we should know about mycotoxin binders	304
MUNOZ, P.	Evaluacion de proteccion contra la enfermedad de Newcastle ante un desafio, utilizando diferentes calendarios de vacunacion Protection against challenge using different Newcastle disease vaccination programs schedules.....	98
MURILLO, M. A.	Experiencia de tres años con el uso de una vacuna termosensible de <i>Mycoplasma synoviae</i> Three-year experience using a temperature-sensitive <i>Mycoplasma synoviae</i> (ms) vaccine.....	305
NAGARAJA, K. V.	Serodiagnosis of <i>Salmonella enteritidis</i> infection in poultry	13

NASCIMENTO, E.	Serologic responses and recovery of <i>Mycoplasma gallisepticum</i> in SPF vaccinated chickens	307
OJKIC, D.	Phylogenetic analysis of Ontario infectious bronchitis virus isolates Análisis filogenético de aislamientos del virus de la bronquitis infecciosa en Ontario	73
ORTEGA, D.	Patogénesis molecular de infecciones provenientes de <i>Salmonella spp</i> Molecular pathogenesis of <i>Salmonella spp</i> infections	308
ORTIZ, A.	Bienestar y productividad en la industria avícola Welfare and productivity in the poultry industry	309
ORTIZ, M.	Caracterización molecular de aislamientos mexicanos del virus de la enfermedad de newcastle: 1997-2001 Molecular characterization of mexican newcastle disease virus (NDV) isolates, 1997– 2001	77
OWENS, C. M.	Screening broilers with halothane and succinylcholine to identify birds prone to developing pale, soft, exudative (PSE) meat Análisis del pollo de engorda con halotano y succinilcolina para identificar a los individuos susceptibles al desarrollo de carne pálida, suave y exudativa (PSE)	310
PAGES-MANTE, A.	Utilización de proteínas recombinantes en una vacuna inactivada contra la enfermedad de gumboro The use of recombinant proteins in a killed, infectious bursal disease virus (IBDV) vaccine.....	52
PARCELLS, M.	Characterization of vv+MDVs having mutations in glycoprotein L (gL) Caracterización de los virus muy virulentos de la enfermedad de marek que presentan mutaciones en la glucoproteína L (gL).....	311
PRADO, R.	Efecto de edad de la reproductora en peso de huevo, pérdida de humedad, mortalidad embrionica, tiempo de reposo, y viabilidad de progenitura durante la primera semana de vida Effect of breeder age on egg weight, moisture loss, embryo mortality, resting time, and first week broiler livability	312
PRIGGE, J.	Characterization of the Marek's disease virus phosphoprotein 38 (pp38) gene family Caracterización de la familia del gene de la fosfoproteína 38 (pp38) del virus de la enfermedad de Marek ...	125
QUEZADA, T.	Aseguramiento de calidad en determinar el nivel de vitamina A en alimentos balanceados Quality assurance in the quantification of vitamin A in finished feeds	166
QUINTANA, J.	Efecto de dos regímenes alimenticios en reproductoras pesadas Effect of two broiler breeder feeding programs (Hubbard).....	313
QUINTANA, J.	Productividad en reproductoras de consumo incrementado de alimento Productivity of broiler breeders with a higher feed intake (Avian farms)	314
QUINTANA, J.	Determinación de hormonas sexuales y tiroideas en muestras de suero implementando un método radio inmuno análisis humano Detection of sexual and thyroid hormones in broiler breeder serum using human radio immuno	318
QUINTERO, M. T.	Primer hallazgo en México del ácaro <i>Pteryocrusolichus chanayi</i> en guajolotes de México First report in Mexico of the mite <i>Pteryocrusolichus chanayi</i> in turkeys	145

QUINTERO, T.	Primer hallazgo en México del ácaro <i>Pterygocrusolichus chanayi</i> en guajolotes de México First report in Mexico of the mite <i>Pterygocrusolichus chanayi</i> in turkeys	321
RAMIREZ, G.	Cambios hematológicos en aves leghorn infectadas con el virus H5N2 de influenza aviar de alta patogenicidad Hematological changes in leghorn birds infected with highly pathogenic H5N2 avian influenza virus	150
RATH, N.	Modulation of phagocyte function by ovotransferrin, a chicken acute phase protein Modulación de la función de los fagocitos por la ovotransferrina, proteína de fase aguda en el pollo	322
RAVIV, Z.	Magnesium intoxication in broiler breeder chicks Intoxicación con magnesio en pollas reproductoras pesadas	178
REBOLLEDO, P.	El efecto de humedad incubatoria en los parámetros productivos del pollo The effect of incubation humidity on hatchability and embryo mortality, and on major broiler productive parameters	187
REIMERS, N.	Gastric intussusception in laying hens Intususcepción en ponedoras	180
REVELO, U.	Enfermedad de Marek en pollo de engorda informe de un caso Marek's disease (MD) in broilers: A case report	323
REYNNELLS, R.	Animal welfare and related issues El bienestar de los animales y aspectos relacionados	113
ROSARIO, C.	Determinación de la sensibilidad a antibióticos de diferentes cepas de <i>E. coli</i> Determination of antibiotic sensitivity of different <i>Escherichia coli</i> strain	214
RUBIO, E.	Comparación del uso de un inmunoestimulante y de un compuesto antiestrés en la respuesta inmunológica contra la enfermedad de Newcastle en pollo de engorda y su efecto sobre la productividad de la parvada Comparison of one immunostimulant and one anti-stress compound on the immune response to Newcastle disease, and their effect on broiler productivity	95
SALAZAR, G.	Manejo de los desechos en la industria avícola (Estudio recapitulativo) Waste management in the poultry industry (A summary report)	325
SALEM, M.	Estudio de una serie de casos de cuadro de complejo respiratorio temprano en pollos de engorda Study of a series of cases of early respiratory complex in broilers	182
SANDER, J.	A study of <i>Pseudomonas aeruginosa</i> contamination in a commercial poultry hatchery Estudio de contaminación con <i>Pseudomonas aeruginosa</i> en una incubadora comercial	184
SEFTON, T.	Comparison of survey data on antibiotic growth promotants and responses to alternatives Comparación de los datos de una encuesta sobre los promotores antibióticos del crecimiento y las respuestas a otras alternativas	326
SENTIES-CUE, G.	An unusual case of <i>mycoplasma synoviae</i> infection in broiler chickens Un caso inusual de infección con <i>mycoplasma synoviae</i> (ms) en pollo de engorda	91
SERRATOS, J.	Interacción genotipo-ambiente en una línea de aves productora de huevo comercial Genotype: Environment interaction in a commercial layer strain	197

SHARMA, J.	Disease control by multivalent <i>In ovo</i> vaccines Control de enfermedades mediante vacunas multivalentes <i>In Ovo</i>	19
SHIVAPRASAD, H. L.	An outbreak of inclusion body hepatitis in broiler chickens Un brote de hepatitis con cuerpos de inclusión en pollo de engorda	181
SIVANANDAN, V.	La vacunación como un método de control <i>Pasteurella haemolytica</i> en aves Vaccination as a control method of <i>Pasteurella haemolytica</i> in poultry	89
SOMMER, F.	Mortality problems in hatcheries: Have they disappeared due to modern technology? Problemas de mortalidad en la incubadora: ¿Han desaparecido gracias a la tecnología moderna?	185
SORIANO, V. E.	Caracterización genómica de <i>ornithobacterium rhinotracheale</i> mediante la técnica de ERIC-PCR ERIC-PCR genomic characterization of <i>haemophilus paragllinarum</i>	57
SORIANO, V. E.	Aislamiento y caracterización de <i>Ornithobacterium rhinotracheale</i> obtenido de pavos con enfermedad corizoide Isolation and characterization of <i>Ornithobacterium rhinotracheale</i> from turkeys with a coryza-like infection	328
SOSA, A.	Evaluación comparativa <i>in vitro</i> de dos antimicrobianos a base de fosfomicina utilizando la técnica de MIC contra diversas especies bacterianas <i>In vitro</i> comparison of two fosfomycin-based antimicrobials using the minimum inhibitory concentration (MIC) technique against different bacterial species	217
SOTO, E.	<i>In vitro</i> evaluation of various antibiotic against <i>Mycoplasma synoviae</i> <i>In vitro</i> microbiological determination of the susceptibility of mycoplasma synoviae to five antimicrobials	329
TEJEDA, G. R.	Efecto en la cantidad de pigmento sintético en plasma de pollo de engorda después de la vacunación contra <i>Eimeria acervulina</i> , <i>E. maxima</i> , <i>E. mivati</i> y <i>E. tenella</i> y tratado con toltrazuril Synthetic pigment plasma levels in broilers after <i>Eimeria acervulina</i> , <i>E. maxima</i> , <i>E. mivati</i> , and <i>E. tenella</i> vaccination and treatment with toltrazuril	330
THRONE-STEINLAGE, S.	Case report: Zygomycosis in layer pullets and cockerels Zigomicosis en pollas para postura y gallos jóvenes	182
TOSCANO, A.	Determinación del daño a la bolsa de fabricio causada por la aplicación de vacunas a virus vivo con cepas intermedias, así como la protección al desafío Intermediate live vaccine virus-associated bursal damage and protection against challenge	49
TRIPATHY, D. N.	Future of new generation of virus-vectored vaccines for efficient poultry production El futuro de una nueva generación de vacunas que utilizan virus como vectores, para la producción avícola eficiente	22
TRUETA, R.	Análisis de la situación de la avicultura Mexicana y Norteamericana productora de carne de ave en el periodo 1990-1999 Analysis of the Mexican and the US broiler industries: 1990-1999	224
TSAI, H. J.	Complete VP1 nucleotide sequences of field goose and muscovy duck parvovirus isolates and their attenuated derivatives Secuencias completas de los nucleótidos VP1 de aislamientos de campo de parvovirus de gansos y patos rusos, y sus derivados atenuados	332

VALDIVIA, A.	Reducción de la intoxicación alimentaria con aflatoxina B ₁ en pollo de engorda mediante N-acetilcisteína Decreased dietary aflatoxin B ₁ (AFB ₁) toxicity using N-acetyl-cysteine (NAC) in broilers.....	200
VALLADARES, J. C.	Productividad y respuesta serológica de reproductoras con exposiciones vacunales y/o de campo a <i>Mycoplasma gallisepticum</i> y <i>Mycoplasma synoviae</i> Productivity and serological response of broiler breeders after field and/or vaccine exposure to <i>Mycoplasma gallisepticum</i> (MG) and <i>Mycoplasma synoviae</i> (MS)	92
VALLADARES, J. C.	Detección de la miopatía pectoral profunda bajo dos sistemas de manejo de carga y embarque en pollo de engorda Deep pectoral myopathy (DPM) in broilers using two catching/shipping systems.....	194
VAZQUEZ, D.	Frecuencia en el diagnóstico de las enfermedades aviares en el laboratorio de diagnósticos clínicos veterinarios durante los dos últimos años. Frequency of poultry disease diagnostics in diagnósticos clínicos veterinarios in recent years.....	333
VAZQUEZ, M. E.	Aislamiento e identificación de <i>Pasteurella haemolytica</i> aviar Isolation and identification of <i>Pasteurella haemolytica</i> aviar Isolation and identification of <i>P. haemolytica</i> ...	82
VEGA, C.	Monitoreo de salud gastro-intestinal en el pollo de engorda Monitoring the gastrointestinal (GI) health in broilers	132
VELAYUDHAN, B.	Wild birds and their role in the epidemiology of avian pneumovirus (APV) infection in domestic birds As aves silvestres y sus papel en la epizootiología de la infección con el neumovirus aviar (APV) en aves domésticas.....	106
VOLKOVA, M. A.	Indirect enzyme-linked immunosorbent assay for the quantitative detection of antibodies to avian adenovirus group 1 serotype 4 Ensayo de inmunoabsorción ligado a enzimas indirecto para la detección cuantitativa de anticuerpos contra el adenovirus aviar, serotipo 4, grupo 1.....	335
VOLKOVA, M. A.	Development of liquid-phase blocking enzyme-linked immunosorbent assay for the quantitative detection of avian adenovirus group 1 serotype 4 Desarrollo de un ensayo de inmunoabsorción ligado a enzimas de bloqueo en fase líquida para la detección cuantitativa de adenovirus aviar serotipo 4, grupo 1	336
WHITFILL, C.	Virus antibody complex vaccines: Present and future Complejos virus-anticuerpo usados como vacunas: Presente y futuro	25
WITTER, R. L.	Susceptibility of adult chickens to Marek's disease Susceptibilidad de los pollos adultos a la enfermedad de Marek.....	127
WOOLCOCK, P.	Isolation of low pathogenicity avian influenza virus (h6n2) from chickens in California, 2000-2001 Aislamiento de un virus de la influenza aviar de baja patogenicidad (h6n2) de pollos en California, 2000-2001	152
ZHAO, S.	Characterization of antibiotic resistance of <i>campylobacter</i> isolated from retail poultry meats Caracterización de la resistencia a los antibióticos de aislamientos de <i>campylobacter</i> de carne de ave para venta Al menudeo.....	38

PRESENTACIONES ADICIONALES

ADDITIONAL PRESENTATIONS

AUTOR PRESENTER	TITULO TITLE	PAGINA PAGE
HERRERA, J. A.	Criopreservación y evaluación fisiológica de los espermatozoides de aves Cryo-preservation and physiological evaluation of poultry sperm cells	337
LUCIO, E.	Evaluación de vacunas inactivadas contra influenza aviar Evaluation of killed avian influenza (IA) vaccines.....	338
RATCLIFF, J.	Organic chicken production Avicultura orgánica	342

THE HUMAN HEALTH CONSEQUENCES OF ANTIMICROBIAL USE IN POULTRY

CONSECUENCIAS DEL USO DE ANTIMICROBIANOS EN AVES, SOBRE LA SALUD HUMANA

Alicia D. Anderson, DVM, MPH

RESUMEN

El creciente uso de agentes antimicrobianos para propósitos agropecuarios ha causado preocupaciones acerca el impacto de estos usos sobre la salud humana. Los esfuerzos para mitigar el efecto del aumento de la resistencia requieren la colaboración de varios segmentos de la comunidad, incluyendo a los granjeros, los médicos veterinarios, la industria farmacéutica y el sector de la salud pública. En esta presentación revisaremos información reciente del *NARMS* y otras actividades de la investigación aplicada, así como datos similares procedentes de Europa, relacionados con las consecuencias sobre la salud pública del uso de antimicrobianos en aves.

The increased use of antimicrobial agents for agricultural purposes has caused concern regarding the impact these uses have on human health. Extensive

agricultural use of antimicrobial agents increases the risk of human bacterial pathogens, which have food animal reservoirs, developing cross-resistance to drugs approved for use in human medicine. As resistant bacteria become more prevalent, the potential for increased incidences, more severe infections, and treatment failures in foodborne illnesses is considerable. Efforts to mitigate the effect of increasing resistance require collaboration by several partners, including the farming, veterinary, pharmaceutical, and public health communities. Such resistance is tracked through the National Antimicrobial Resistance Monitoring System (NARMS) at the Centers for Disease Control and Prevention. This presentation will review recent data from NARMS and other applied research activities, as well as similar data from Europe related to human health consequences of antimicrobial use in poultry.

ANTIBIOTIC USE IN FOOD ANIMAL MEDICINE: THE QUIET VOICE OF REASON IN THE ANTIBIOTIC RESISTANCE DEBATE

EL USO DE ANTIBIÓTICOS EN LA MEDICINA DE LOS ANIMALES PRODUCTORES DE ALIMENTOS PARA EL HOMBRE: LA CALLADA VOZ DE LA RAZÓN EN EL DEBATE DE LA RESISTENCIA A LOS ANTIBIÓTICOS

Timothy S. Cummings, DVM, MS, ACPV

Clinical Poultry Professor, College of Veterinary Medicine, Mississippi State University

RESUMEN

El uso de antibióticos en los animales de granja y su impacto subsecuente en los patrones de resistencia entre los patógenos que afectan al humano no es un debate nuevo. Mientras que actualmente se están realizando numerosos proyectos de investigación e iniciativas para ayudar a llenar los vacíos de información, es necesario poner en tela de juicio la simplista creencia de que la prohibición de cualquier porción del uso de antibióticos en la medicina de los animales productores de alimentos para el hombre, vaya a frenar o dar marcha atrás con la tendencia actual del incremento de la resistencia de los patógenos bacterianos que afectan al ser humano. En esta

presentación citaremos hallazgos recientes y pertinentes que justifican el uso continuo de antibióticos en la medicina de estos animales y que ayudan a enfocar la atención hacia otros factores de riesgo que más probablemente contribuyan para la existencia de este problema.

The topic concerning antibiotic use in farm animals and subsequent impact on the resistance patterns in human pathogens is not a new debate, beginning in the 1960s. The issue has been raised several times since then without any definitive conclusion being reached. As we're all aware, the latest flare-up came when the EU began the process to ban

certain, long established growth promotant antibiotics from use in animal feeds. The EU invoked the “precautionary principle” to justify its position despite the lack of scientific data to support their concerns. In doing so, they essentially ignored the report of their own committee of experts (SCAN) which concluded that there was no justification to take action at the time. It should also be noted that this debate came at a time when food safety issues were at an all time high in Europe due to other unrelated concerns.

As a result, the debate became headlines in the US with much activity being initiated. There have been positions taken by individuals and agencies/groups on both sides of the issue with data being used to support each sides’ point of view, but there has been some sharp debate on the validity and conclusions of certain reports. In reality, it appears that the question is still very much unanswered, as the topic is a very complex matter. While research projects, risk assessments, and prudent use guidelines for antibiotic use in animals and humans have been initiated worldwide and are to be commended, the simplistic belief that the banning of any portion of antibiotic use in food animal medicine will halt or reverse the current trend towards antibiotic resistance patterns in human medicine is not rational and must be challenged.

The theoretical hazard to human public health related to antibiotic use in animals revolves around the transfer of resistant bacteria from animals to humans largely through the food chain. In order for resistant animal bacteria to successfully transmit through the food chain, they must develop resistance and survive a myriad of obstacles throughout the production, processing, transportation, storage, and cooking of the food source. Even if a resistant bacterium of animal origin survived to the point of being consumed by a human, the bacteria would have to contend with various enteric defenses to prevent their survival and multiplication to the point of causing disease or allowing the transfer of resistance factors. Attempts to estimate the chances of this risk have been offered, and while there is much debate about the legitimacy of these risk assessment models, critical thinking of the facts as we currently know them points towards other causes besides antibiotic use in animals as having much more of an impact in causing resistance in human pathogens/commensals.

The two antibiotics used in food animal production which have received the most attention in the current debate are the fluoroquinolones and virginiamycin. The fluoroquinolones are a therapeutic class of antibiotics approved for use in poultry via the water, whereas virginiamycin is a feed additive antibiotic used to enhance performance in poultry, swine, and cattle. It should be noted that very real differences exist when discussing this topic with

regard to the therapeutic use of antibiotics via injection or water versus those used for performance enhancement in the feed as different organisms are targeted. Also recognize there are other antibiotic uses in veterinary medicine which have attracted concern, but we will primarily focus on these two groups of antibiotics.

The virginiamycin debate evolves around *Enterococcal* infections in humans, which has become an important pathogen in immunosuppressed individuals and a potential nosocomial complication in post-operative patients. The initial concern involved Vancomycin resistance development by these organisms (VRE), which at the time was one of the few remaining efficacious antibiotics against *Enterococcal* infections approved for use in humans. Vancomycin is a glycopeptide class antibiotic. Avoparcin, a growth promotant antibiotic used in Europe at the time, was removed from the market in 1997 because of its relatedness to Vancomycin. On the other hand, Vancomycin resistance was much more prevalent in the US where Avoparcin had never been used. This would put the VRE resistance problem in the US squarely on human clinical use of Vancomycin as the primary instigator of glycopeptide resistance in the States, since Vancomycin had been approved for use there.

Shortly afterwards, a new product, Synercid, was being reviewed for treatment of human *Enterococcal* infections in certain countries. It belonged to the streptogramin class of antibiotics. Virginiamycin, also a streptogramin antibiotic, had been in use in the worldwide animal market for over 25 years with little evidence of streptogramin resistance to date, yet it became the next target. It should be noted that enterococci resistance data is often reported as a group, but needs to be differentiated by species due to the natural resistance of certain species to different antibiotics. For instance, *E. faecalis* is naturally more resistant to virginiamycin, but is often included in relevancy data pertaining to this issue. This is of vital importance when attempting to draw accurate conclusions from the data pool. Unfortunately, most labs do not or can not speciate *Enterococcal* infections due to the technical expertise required to do so.

In one very large, yet little cited clinical study by Jones et al which involved over 28,000 human clinical isolates from 200 different medical centers in the US and Canada, found streptogramin resistance to be 0.2% in the *E. faecium* isolates. This is a highly significant study in that it involved over 1,000 *E. faecium* isolates from a clinical setting. Thus, there is meaningful evidence that streptogramin resistance in human clinical isolates of *Enterococcus* was miniscule in the US despite decades of virginiamycin use by the poultry industry. Similarly, pristinamycin, another human

streptogramin approved for use in France since 1973, has been used along with virginiamycin for decades without any unusual rates of streptogramin resistance development in that country.

With regard to the fluoroquinolones, the concern revolves around treatment for *Campylobacter* infections in humans. *Campylobacter* has been the leading cause of food borne enteric illness in humans, with the disease being self limiting in the vast majority of infected individuals. However, infections in humans has been markedly decreasing over recent years, due in part to the new HACCP regulations implemented in the mid 1990's. Fluoroquinolones are considered to be an efficacious therapeutic drug for *Campylobacter* infections in humans although the organism remains highly sensitive to the macrolides as well. Since the fluoroquinolones were also approved for use in poultry in the mid 1990's, there were concerns that this would result in an increase in therapeutic failures in humans due to resistant strains of *Campylobacter* originating from poultry meat consumption.

This was one impetus for the establishment of the National Antimicrobial Resistance Monitoring System (NARMS) in 1996, which is a collaboration among CDC, FDA, and the USDA to monitor antimicrobial resistance in human enteric bacteria. The most recent NARMS FoodNet data indicates that overall fluoroquinolone resistance rates in human *Campylobacter* isolates actually decreased slightly in 2000 back to 1998 baseline levels. In addition, the 1999 NARMS resistant *C. jejuni* chicken isolate data held steady at 9.4% vs 9.3% in 1998, hence resistance does not appear to be on the increase despite use of the antibiotic in the poultry industry.

As alluded to earlier, a risk assessment model was developed by David Vose to estimate the human health impact of fluoroquinolone resistant *Campylobacter* infections associated with the consumption of chicken. Although the model had some merit, there were serious shortcomings according to other experts in risk assessment which called into question its results which significantly overestimated the number of individuals who could be affected by use of fluoroquinolones in poultry. Irregardless, CVM proposed to withdraw the fluoroquinolones from use in poultry, and the matter currently is awaiting an opportunity for hearing (NOOH) to be announced

Seemingly, other areas of concern beg scrutiny before attempting to enact regulatory action against antibiotic usage in animals. For example, the impact of foreign travel should not be overlooked. In one study (Smith et al), 70% of the resistant *Campylobacter* isolates from people was related to foreign travel or prior use of a fluoroquinolone. In addition, the debate always centers around resistant bacteria being passed from animals to man, but who is asking about the other

way around? There remains the distinct possibility that certain pathogens containing resistant factors may be entering the animal microflora and/or environment from human exposure (Kinde et al). Finally, there is mounting evidence that certain strains of bacteria tend to be host specific and do not colonize other animal species (Johnson et al, 2000), making it less likely for resistance factors to be transferred.

Various governmental and independent organizations have weighed in on the matter, but most have agreed that there is simply not enough information to draw any conclusion. The 1998 National Research Council Report, The General Accounting Office Report of 1999, the SCAN Opinions, and the HAN Foundation Report of 1999 fall into this category. The consensus was that while use of drugs in food animals does have some concerns, the evidence to date does not constitute an immediate public health concern. Having said this, the WHO organization recently issued new guidelines to "slow the growth of microbes resistant to commonly used antimicrobials" which included calling for mandatory prescriptions for all antibiotics used to control diseases in animals and the cessation of the use of antimicrobials to promote animal growth.

This is not to say that the use of antibiotics in food or companion animal poses no risk to the human medicine sector, as resistance development/transfer in bacteria is a real occurrence. However, there needs to be more scientific evidence or at least a consensus in the scientific community to justify any further regulatory action. All currently approved antibiotics in animal production play far too important a role in maintaining animal health and performance to simply remove them from use based upon perceived risks. Various resistance surveillance projects have been funded and other research studies are underway to help fill in the data gaps, but it will take time to begin to get a reasonable chance for meaningful answers. Hopefully, the true risk factors at stake will be elucidated, as this issue is much too important to human and animal health for wrong associations to be made.

REFERENCES

1. Johnson, Judith A. AVMA/AAAP abstract at the annual convention. 2000.
2. Jones, R. et al. Antimicrobial activity of quinupristin/dalfopristin tested against over 28,000 recent clinical isolates from 200 medical centers in the United States and Canada. *Diagn Microbiol Infect Dis* 30:437-451. 1998.
3. Kinde, H. et al. Sewage effluent: likely source of *Salmonella enteritidis* phage type 4 infection in a commercial chicken layer flock in southern California. *Avian Dis* 40:672-676. 1996.

4. Smith, K. E. et al. Quinolone-resistant *Campylobacter jejuni* infections in Minnesota, 1992-

1998. New England J Med 340:1525-1532. 1999.

PRE- AND POST- HARVEST APPROACHES TO REDUCE *SALMONELLA* IN POULTRY MEAT PRODUCTION: REVIEW

Hafez Mohamed Hafez

Institute of Poultry Diseases, Free University Berlin, Koserstr. 21, 14195 Berlin, Germany

SUMMARY

The significant increase in the number of reported foodborne outbreaks world-wide has altered the view of food safety. The fact that processing plants have not been able to effectively reduce the pathogenic bacteria in poultry products, mean that every effort must be made to reduce foodborne pathogen infection and / or contamination of the live birds before dispatch to processing plants. In general the major strategy to control *Salmonella* should include: stamping out infected breeder flock, Good Animal Husbandry Practices (GAHPs) and logistic slaughtering. In the processing plants the machine design must permit easy and thorough cleaning and disinfection. Several developments and modifications to reduce the contamination were introduced and some are still in further modification. It is essential to incorporate education programs by all people involved throughout the poultry production chain.

Poultry and poultry products have repeatedly been implicated as a source of *Salmonella* infection for humans. The significant increase in the number of reported foodborne outbreaks world-wide has altered the view of food safety. It has become clear that current legislation alone is not enough, and industry accepted a greater share of responsibilities for the quality and safety of the food product from farm-to-fork. Different systems of Hazard analysis critical control points (HACCP) to identify, evaluate and control microbial hazards have been integrated at different production levels, in which each link of the food chain can be carefully analyzed to demonstrate where and how specific hazards can be introduced.

Pre-harvest approach

The fact that processing plants have not been able to effectively reduce the pathogenic bacteria in poultry products, mean that every effort must be made to reduce foodborne pathogen infection and / or contamination of the live birds before dispatch to processing plants. In general the major strategy to control *Salmonella* should include: Cleaning the production chain from the top by stamping out infected flock; hatching egg sanitation, preventing introduction

and spread at the farm through Good Animal Husbandry Practices (GAHPs).

The major strategy to control *Salmonella* in poultry should be directed to clean the production chain from the top to prevent *Salmonella* introduction through breeder flocks. Control measures to prevent introduction and spread of *Salmonella* infection in breeder flocks should be concentrated on high standards of animal management accompanied with bacteriological and serological monitoring of the flocks (22). Guidelines on cleaning, disinfection and vector control in *Salmonella* infected poultry flocks have been provided by WHO (1). *Salmonella* control programs toward *S. Typhimurium* and *S. Enteritidis* in chicken breeder flocks were adopted in the European Union by the Zoonoses Directive (92/117/EEC). These measures must be coupled with meticulous attention at all stages of hatching egg production and sanitation (9). Different approaches have been used to reduce the contamination of **feed** ingredients as well as finished feed (10,19). To maintain the hygienic quality of finished feed, cleaning and inspection programs for feed transportation vehicles must be applied. Also several **feed additives** such as short chain organic acids (formic acid, propionic acid) can be used for decontamination as well as for prevention of recontamination of feed (3,12) Other feed additives such as carbohydrates (lactose, mannose, galactose, saccharose) which are able to influence the caecal environment by increasing the amount of acid produced by bacterial fermentation thus decreasing the pH, have been found to reduce *Salmonella* colonization (13). In addition, certain **antimicrobial products** can be used as feed additives to prevent and to reduce shedding, but not to treat clinical *Salmonellosis* in poultry. The use of **probiotics** in chickens was reviewed by (2,14). It is also generally known, that **Competitive Exclusion (CE)** in combination with conventional hygienic measures has been shown to be very effective as a preventive measure against *Salmonella*, *Campylobacter* and *E. coli* O157H7 colonization in poultry (17,20). In addition, different live and inactivated **vaccines** were developed and used in aim to control clinical *Salmonellosis* as in case of *S. Gallinarum* and to reduce *Salmonella* shedding and colonization especially by *S.*

Typhimurium and *S. Enteritidis* infections. However, a few number of vaccine are currently commercial available. Also, in birds previously infected with a field *Salmonella* strain, the vaccine did not eliminate the infection, but may reduce the number of carriers (8,16). Recently, we carried out field trails using live and inactivated vaccines. In 12 commercial layer flocks kept on farms with floor and/or free range rearing form, with *S. Enteritidis* history, The birds were vaccinated twice with *S. Enteritidis* live vaccine (Salmovac SE[®], DT Impfstoffwerk, Dessau-Tornau GmbH, Germany) at 2nd and 16th days of age via drinking water (the vaccine is licenced in Germany since mid 2000) and then once between 15th and 16th weeks of age with inactivated *S. Enteritidis* vaccine (Salenvac[®], Intervet). The results indicate, that the applied of live and inactivated vaccines together with improvement in the production hygiene, have been remarkably successful and have resulted in a marked decline in *Salmonella* at least in the first 7 vaccinated flocks. In birds previously infected with a field *Salmonella* strain (at 1st day of age), the vaccine did not eliminate the infection. It seems to be, that the use of the vaccine might sends the wrong message, since the *Salmonella* detection rates were increased in the last four vaccinated flocks (8). In conclusion vaccination must be considered as an important support to good hygiene and husbandry practices in all production systems.

HYGIENIC CATCHING AND TRANSPORT

Currently, there is no legislation or obligation for testing meat poultry flocks for *Salmonella* before slaughtering. However, the fact remains that processing plants have not been able to effectively reduce the incidents of pathogenic bacteria in poultry products. This facts has forced several companies in Europe to changes the slaughter and processing system towards the logistic slaughtering of the flocks with a known status based on the history of individual farm and the results of a bacteriological examination before slaughtering in order to improve the quality and reduce the cross contamination during the processing (7). Food should be withheld from the birds for several hours before the planned slaughter time to reduce the amount of subsequent defecation. In general, equipment used in collecting live birds on the farm must also be adequately cleaned and disinfected before re-use. It is essential that loading and transport of the birds is carried out by trained personnel, who handle the birds carefully and do not cause them distress. There are primarily two systems used for transportation, with either loose containers for the birds or containers that are fixed to the vehicle. Fixed equipment is more difficult to clean and disinfect

properly after use. Also the introduction of steam cleaning failed to improve the situation (15).

Post-harvest approach. Although the microbiological quality of poultry meat is determined by the health status of the live birds, a great deal of attention must be given to limiting cross-contamination during processing. In aim to reduce the further contamination during the processing regular schedules of cleaning and disinfection of the equipment and plant are essential for maintaining sanitary condition required to reduce contamination. Machine design must permit easy and thorough cleaning. Several development and modifications to reduce the contamination during processing and packaging were introduced and some are still in further modification (4,5,21). In all approaches to the development of new processing technology environmental saving aspects must be considered. The amount of water, detergents and chemical used should be optimized (18).

Since the success of any safe food program on the farm and processing plant depends on personal sanitation, it is essential to incorporate education programs about microorganisms, modes of transmission as well as awareness of the reasons behind such control programs by all people involved throughout the poultry production chain. In the farm-to-fork concept, post processing food handling is very important in reduction of foodborne infections. Effective education programs must also be implemented to increase public awareness and the necessary measures to be taken for protection against microbial contamination in food products. Finally, development and application of acceptable methods for end-product decontamination and preservation must be progressed and/ or re-evaluated (11).

REFERENCES

1. Anon. World Health Organization Guidelines on cleaning, disinfection and vector control in *Salmonella* infected poultry flocks. WHO/ Geneva. Zoon 94.1 72. 1994.
2. Barrow, P.A. Probiotics for chickens. In: Fuller R (ed) Probiotics. Chapman Hall, London. p. 1-8. 1992a.
3. Berchieri, A. and P.A. Barrow. Reduction in Incidence of Experimental Fowl Typhoid by Incorporation of a Commercial Formic-Acid Preparation (Bio-Add[™]) into Poultry Feed. Poultry Science 75, 339-341. (1996)
4. Bolder, N. M. Safety and economic aspects of modified atmosphere packaging (MAP) of poultry products. In: Flair No.6 11. Contamination with pathogens in relation to processing and marketing of products. Ed. Löpfe, J., Kan, C.A. and Mulder, R.W.A.W., COVP-DLO Het Spelderholt, p. 89-94. 1993.

5. Farber, J.M. Microbiological aspects of modified atmosphere packaging technology-A. review. *Journal of Food Protection*, 54, 58-70. 1991
6. Hafez, H.M. Poultry meat and food safety: Pre- and post-harvest approaches to reduce foodborne pathogens. *World's Poultry Science Journal* 55: 269-280. 1999.
7. Hafez, H.M. and A. Mazaheri. Bacteriological investigation on salmonella in meat turkey flocks. Proceedings of the 3rd International symposium on turkey diseases, Berlin.(Ed. H.M. Hafez - ISBN 3-930511-92-4). pp. 319 – 325. 2000.
8. Hafez, H.M., A. Mazaheri, and A. Edel. Trials on the efficacy of *Salmonella Enteritidis* live and inactivated vaccine in layer flocks under field condition. Proceedings of the 50th Western Poultry Disease conference, Davis, California, USA. 2001P 31-32.
9. Hafez, H.M., S. Jodas, J. Kösters and H. Schmidt. Treatment of *Salmonella enteritidis* artificially contaminated hatching eggs with Pressure Differential Dipping (PDD) using antibiotics. *Archiv fuer Gefluegelkunde*. 59:69-73. 1995.
10. Häggblom, P. Monitoring and control of *Salmonella* in animal feed. Proceedings of International course on Salmonella control in animal production and products. A presentation of the Swedish *Salmonella* Programme. WHO. Ed. Bengtson S. O., p. 127-137. 1993.
11. Hinton, M.H. and J. Corry. The decontamination of carcass meat. In: COST Action 97-5. Poultry and food safety. Ed. Nagy, B. and Mulder, R.W.A.W. European communities ISBN 92-828-3609-6, pp. 23 - 31.1998.
12. Hinton, M. and G.C. Mead. Control of *Salmonella* infections in broiler chickens. In: In: Flair No.6 5. Zoonoses control in Europe Ed. Mulder, R.W.A.W. and Lan, C.A. COVP-DLO Het Spelderholt, pp. 25-27. 1991a.
13. Hinton, M. and G.C. Mead. Opinion. *Salmonella* control in poultry: the need for the satisfactory evaluation of probiotics for this purpose. *Letters in Applied Microbiology*, 13, 49-50. 1991b.
14. Huis in't Veld, J.H. Probiotics and the control of pathogens: what do we know? In: COST Action 97- 5. Poultry and food safety. Ed. Nagy, B. and Mulder, R.W.A.W., European communities ISBN 92-828-3609-6, pp. 103-108. 1998.
15. Mead, G. C. Critical control of major pathogens in poultry. In: COST Action 97- 6. Safe chicken for the next century. Ed. M. Hakkinen, L. Nuotio, E. Nurmi and Mead, G.C., European communities ISBN 92-828-3669-X, pp. 6-12. 1998.
16. Meyer, H., U. Methner, G., Martin and G. Steinbach. Control of *Salmonella* infection in poultry farm: competitive exclusion, vaccination and antimicrobial treatment: In: COST Action 97- 5. Poultry and food safety. Ed. Nagy, B. and Mulder, R.W.A.W. European communities ISBN 92-828-3609-6, pp. 115-122. 1998.
17. Mulder, R.W.A.W. Probiotics and competitive exclusion microflora against *Salmonella*. *World Poultry Misset Salmonella Special*, May, pp. 30-32. 1996a
18. Mulder, R.W.A.W. The impact of slaughter technologies on microbial contamination of poultry meat. *World Poultry Misset Salmonella Special*, May, pp. 44-46. 1996b.
19. Renggli, F. Preventing an on-farm infection through proper feed treatment. *World Poultry Misset Salmonella Special*, May, pp. 34-35. 1996
20. Schneitz, C. and E. Nurmi. Competitive exclusion in poultry production. In: American Association of Avian Pathologists (ed.) Proceeding of Enteric Disease Control. 39th Annual Meeting. Louisville, KY, pp. 44-55. 1996.
21. Stals, P. Slaughter and dressing of poultry. In: Concerted Action CT94-1456- Factors affecting the microbial quality of meat. 2. Slaughter and Dressing. Ed. Hinton, M.H. and Rowlings, C. Published by University of Bristol Press, UK. ISBN 0 86292 4367, pp.99-106. 1996.
22. Wray, C. and R.H. Davies. Guidelines on detection and monitoring of *Salmonella* infected poultry flocks with particular reference to *Salmonella Enteritidis*. World Health Organization Veterinary Public Health Unit. WHO/Zoon 94.173, Geneva. 1994.

REDUCTION OF SALMONELLA IN THE UNITED STATES POULTRY INDUSTRY THROUGH VACCINATION

REDUCCION DE SALMONELLA EN LA INDUSTRIA AVICOLA DE LOS ESTADOS UNIDOS A TRAVES DE LA VACUNACION

Armando Mirandé y Joan Leonard

Biomune Co., Lenexa, Kansas, E.U.A.

RESUMEN

Las vacunas contra salmonella continúan siendo el método mas efectivo para controlar la salmonelosis en la industria avícola. Experiencias de campo han demostrado consistentemente que la vacunación de reemplazos para pollos y pavos reproductores y de pollas para postura con bacterinas de salmonella, controla la salmonella tanto en ponedoras comerciales como en reproductoras y su progenie. La vacunación de pollos con la vacuna viva tiene las expectativas de ser una intervención efectiva cuando se requiera de una acción correctiva inmediata y también en donde exista la necesidad de una protección temprana, además de servir como primovacunación para la administración de la bacterina. Datos sobre resultados de campo de productores en los E.U.A. serán presentados para ilustrar los efectos de la vacunación contra salmonella.

Current food safety regulations aimed at reducing the incidence of human salmonellosis in the United States have been directed extensively towards the poultry industry, including both the meat and egg sectors. In the commercial egg industry there is zero tolerance for *Salmonella enteritidis* (SE) in table eggs since the early 1990's. There are indications that this situation will soon expand to include *Salmonella typhimurium* as well because of serious public health concerns over the multiple antibiotic resistance pattern of the definite type 104 (DT 104). The United States Department of Agriculture (USDA) established a microbiological standard for broilers in 1998 allowing a maximum of 11 *Salmonella* sp. positive broiler carcasses out of a series of 51 broilers at the completion of processing (21.5%). This figure is expected to drop to 7.5% in the year 2003 and efforts to reduce further the microbiological load of poultry products, including turkey meat, are likely to continue even if "kill-step" interventions, such as the in-shell pasteurization of eggs or the gamma irradiation of meat, are routinely adopted. Not surprising, interventions in the area of food safety are already branching to poultry industries in countries where the export of poultry products is vital, i.e. Brazil.

To comply with these rules the U.S. poultry industry has been forced to modify certain management practices to reduce bacterial load, in general, and in particular to apply interventions aimed specifically at reducing the prevalence of salmonella. It is now clear that control of poultry foodborne pathogens involves an approach of multiple interventions at multiple levels of the food chain.

One of the most successful and cost-effective interventions to control *Salmonella* in poultry has been the use of vaccines. Data are presented from actual field results obtained by producers in the U.S. with the use of *Salmonella* vaccines produced by Biomune Co.

Chicken and turkey breeders have long relied on oil-based autogenous inactivated vaccines (bacterins) made with isolates specific to a farm or company location. Their past use in an operation tended to be sporadic, however, due to growing demands from integrators for a cleaner product during the last 4 years, salmonella bacterin use has gained wider acceptance as part of a routine vaccination program. Data generated by breeders obtained with the use of *Salmonella* vaccines are often difficult to collect because of the resistance of these companies to share sensitive information, especially as it relates to baseline values on the prevalence of certain types of *Salmonella* within the organization. However, the following information was provided and illustrates the control of a group D *Salmonella* in a breeder operation.

This broiler breeder company eliminated a group D *Salmonella* from its operation with the use of autogenous bacterin when other measures had failed. Although SE and other invasive group D *Salmonellae* such as *Salmonella gallinarum* and *S. pullorum* were not prevalent, chicks serologically and culture positive at hatch to group D *Salmonella* presented export marketing problems for this producer. The *Salmonella* vaccination program consisted of vaccinating breeder stock pullets on known positive farms with two doses of an autogenous *Salmonella* bacterin at 12 and 18 weeks of age. The incidence of *Salmonella* was monitored by monthly environmental cultures of all vaccinated breeder flocks and meconium cultures of every hatch comprising more than 1500 cultures per

month. Results were compared with the previous year's prevalence on known positive farms. Reduction of group D *Salmonella* in chicks was evident the first year after vaccination began as young pullets replaced older, non-vaccinated hens. Elimination of the group D *Salmonella* from the breeder chicks at hatch and from the operation occurred shortly after all breeders had been vaccinated twice and has continued for more than six years.

A turkey integrator had been troubled with an insidious problem with *Salmonella arizonae* (SA). SA appears sporadically as a problem in the turkey industry, although it belongs to serogroup K, a group rarely found in poultry. This integrator was recovering SA only occasionally from growing replacement breeders but it rapidly disseminated vertically through egg transmission into the meat birds. The overall prevalence of SA in commercial poults was 60%, as determined by culture of early-death embryos from eggs candled at 7 days of incubation. A *Salmonella* vaccination program, consisting of two doses of an autogenous SA bacterin at 18 and 26 weeks of age, was implemented. A year after this program was initiated the prevalence of SA in poult embryos fluctuates at levels consistently under 10%.

The broiler industry has experienced a dramatic increase in the use of *Salmonella* bacterins in breeders during the past years, obviously as a result of the new regulations enacted by USDA, also known as the Mega Reg. Typically, bacterins used are oil-based autogenous products showing very good results at both the breeder and broiler (post-processing) level. It is imperative to be patient and not abandon the program if the prevalence of *Salmonella* does not drop significantly within the first three to six months. It will take a full year for all the breeders in a complex to be replaced with vaccinated pullets and before major progress is achieved at the processing plant, but it will work!

These bacterins can be produced with adjuvants that are less tissue reactive to add flexibility in the vaccination program particularly when commercial cholera bacterins are being injected subcutaneously in the neck. However, it has been demonstrated that granuloma formation at the injection site is necessary for any inactivated, adjuvanted vaccine to provide adequate, long-term protection. Words of caution are that a *Salmonella* vaccination program with bacterins that are too mild and non-reactive could result in a poor immune response and subsequent failure to reduce salmonella infection and lead to a waste of money and time. Two doses are always recommended.

The ability of a commercial SE bacterin, Layermune SE, to reduce the incidence of total *Salmonellae* in broiler chickens at processing was evaluated by an integrator. Since contamination at this

integrator's plant was determined to be of *Salmonella* groups B and C, but not group D, Layermune SE was also evaluated for cross-protection. An advantage of a commercial versus an autogenous vaccine is the fact that with a commercial bacterin, isolates have been carefully selected and thoroughly tested for their immunogenicity (ability to induce an immune response).

The field study consisted of vaccinating all pullets at 10 and 18 weeks of age in one complex for one year. A separate complex with a comparable rate of *Salmonella* contamination in processed broiler flocks served as the non-vaccinated control. No other intervention aimed specifically at reducing *Salmonella* was instituted at either complex during the trial. Six broiler farms were designated as "study flocks" and received new litter for placement of the first flocks only. These study farms were divided in half and each half received broiler chicks from the corresponding group of breeders. Broilers on each farm were evaluated for *Salmonella* contamination in three consecutive grow-outs during the year by culturing cecae from 30 birds from each flock at the processing plant. The incidence of *Salmonella* positive broilers in the vaccinated complex was 7.1%, compared to 36.0% the previous year. Incidence of *Salmonella* in broilers from the control, non-vaccinated complex was 26.7%, compared to 28.0% the year before. Breeder vaccination significantly reduced the number of broilers with intestinal contamination by effectively reducing *Salmonella* shed from breeder hen to egg and, therefore, from hatchery to broiler.

The use of live *Salmonella* vaccines in the U.S. is more recent and there are fewer field studies than with bacterins. Data are presented from results obtained by a broiler complex on the Eastern Shore of the U.S. where Salmune, a chemically mutated *Salmonella typhimurium* live vaccine, was successfully used in an effort to reduce a high level of *Salmonella* contamination of broilers at the processing plant. This field study involved 16 million broilers over an 11-week period. Salmune has protection claims of the intestine and internal organs against the most common serotypes in the U.S., including types of serogroups B, C and D. Only one dose by spray is required and data have shown that the vaccine organism does not persist in the environment or vaccinated chickens.

Salmonella monitoring data of this broiler complex showed that during the three months prior to vaccination, the average prevalence of *Salmonella* at the processing plant was at 22.5%, 11.4% and 14.6%, respectively, as measured by the company's whole-bird carcass rinse test. This plant was at risk of being out of compliance. During the three months following the processing of broilers vaccinated with Salmune the prevalence of total *Salmonella* decreased to a monthly

average of 6.8%, 5.0% and 2.3%, respectively. These were the lowest levels of *Salmonella* reported in this plant since the carcass rinse testing was implemented. Total *Salmonella* levels at the same plant during the same months the previous year were at 6.5%, 7.9% and 12.1%, respectively, suggesting that the reduction observed was independent of seasonal variation. Very importantly, this overall reduction at the plant was achieved without compromising productive performance of broilers as determined by a lower average adjusted caloric conversion per pound in vaccinated broilers during the 11-week trial than in non-vaccinated broilers during five weeks before and five weeks after the trial.

In the commercial egg industry the use of Layermune SE in the State of Pennsylvania has provided the largest, most comprehensive and standardized vaccine field trial ever conducted in layers. Pennsylvania has 23 million layers and more than 90% are enrolled in the State's egg quality-assurance program (PEQAP). PEQAP is considered the premier egg quality program in the country mainly because of the intensity of environmental testing for SE. It is also being used as the model for a national mandatory program that will be enacted soon by the Food and Drug Administration. Under PEQAP SE-positive environmental samples within a flock result in the testing of eggs. SE-positive eggs result in the mandatory diversion into the breaker market (pasteurization) with heavy economic loss. Thus, it is imperative for the egg producer to maintain a SE-negative environment.

The effects of SE vaccination have been monitored in PEQAP flocks since 1997. The State Department of Agriculture conducts all the SE testing, environmental and eggs, and collects, summarizes and

analyzes the data. PEQAP flocks follow standard management guidelines relating to cleaning and disinfection, rodent control and biosecurity, making comparisons between contemporary flocks much more relevant. All pullets in the PEQAP study have been injected at 13 weeks of age with one dose of Layermune SE or Layermune 3 (in combination with Newcastle disease and infectious bronchitis virus) by the same servicing company, thus facilitating the identification and follow-up of the flocks.

Cumulative results of SE prevalence in PEQAP flocks from 1997 to 2000, include 1,005 non-vaccinated flocks representing 57.4 million layers, with SE-positive eggs found in 7.9% of flocks. The percent of SE-positive environmental samples was 2.20% with 12.6% of flocks having a SE-positive environment. During this period there were 182 vaccinated flocks comprising 15.9 million layers. Vaccinated flocks with SE-positive eggs were 0.55%. The percent of SE-positive environmental samples was 0.24% with 3.3% of flocks having a SE-positive environment. These figures indicate a reduction of SE prevalence of 93%, 89% and 74% in eggs, environmental samples and flocks, respectively. This reduction in SE is greater than that reported in the United Kingdom two years after mandatory vaccination with a bacterin was implemented.

Layermune SE is the most thoroughly tested salmonella vaccine in the market because it was the first of its type to be licensed by the USDA and by regulatory authorities in many other countries. It has been subjected to a high degree of scrutiny by independent researchers and governments and, most importantly, it has been used without disappointment in more chickens around the world under the most varied set of circumstance than any other SE bacterin.

EFFECT OF EXPERIMENTAL CHLORATE COMPOUND (ECP) ON *SALMONELLA* CONTAMINATION OF POULTRY

J.A. Byrd², R.C. Anderson, and D.J. Nisbet

U.S. Department of Agriculture, Agricultural Research Service, Southern Plains Agricultural Research Center,
2881 F&B Road, College Station, Texas 77845
BYRD@FFSRU.TAMU.EDU

ABSTRACT

E. coli and *Salmonella* are members of the family *Enterobacteriaceae*, a common commensal family of bacteria. *Salmonella* and *E. coli* have a nitrate reductase enzyme that allows respiration in anaerobic conditions. Nitrate reductase can also co-metabolize chlorate to chlorite ion which will kill the bacteria. This study was performed to investigate the effect of chlorate on cecal *Salmonella typhimurium* (ST)

recovery in poultry. Broilers or turkeys provided a chlorate solution in the drinking water had significantly lower populations and incidence of crop and cecal *Salmonella* compared to the controls. This study suggests that incorporation of chlorate in the drinking water prior to slaughter can reduce *Salmonella* contamination in broilers.

INTRODUCTION

Salmonella and *Escherichia coli* O157:H7 are important food borne pathogens of concern to the meat industries in the U.S.(1,2,3,4). These bacteria are members of the family *Enterobacteriaceae* that also includes some of the most pathogenic bacteria most often encountered in human disease outbreaks including *Shigella*, *Klebsiella*, and *Yersinia* (5). Most members of the family *Enterobacteriaceae* possess respiratory nitrate reductase activity (5,6). Respiratory nitrate reductase functions to conserve electrons via electron transport phosphorylation (6,7). One interesting fact that has been reported was respiratory nitrate reductase also co-metabolizes chlorate to chlorite which is cytotoxic to the bacterium (6). The nitrate reductase bacteria built up toxic levels of chlorite and eventually die. *In vitro* and *in vivo* studies in cattle rumen contents indicate that chlorate significantly reduced *E. coli* O157:H7 populations and did not alter the total anaerobic bacterial counts (8,9). Similarly, sodium chlorate significantly reduced pigs cecal concentrations of *Salmonella typhimurium* but not potentially beneficial anaerobes (10). Since sodium chlorate effectively reduced *E. coli* O157:H7 and *Salmonella typhimurium* in bovine and swine species, we conducted a study to determine whether chlorate will selectively inhibit *Salmonella* in day-of-hatch chicks.

MATERIALS AND METHODS

Experimental Design Two hundred day-of-hatch broiler chicks were obtained from a commercial hatchery, divided into 4 groups of 50, and placed in round floor pens on clean pine shavings at a density of 0.33 ft²/bird. The chicks were maintained under continuous lighting and provided free access to water and unmedicated corn-soybean meal-based broiler starter ration that met or exceeded the levels of critical nutrients recommended by the National Research Council (11). The paper liners from chick transport boxes and feed samples were cultured for *Salmonella* as described previously (12,13).

On Day 1, chicks (25) of each group was challenged with 10⁸-10⁹ cfu novobiocin (NO) and nalidixic acid (NA) resistant *S. typhimurium* (Seeders) and placed in the pen with the remaining unchallenged chicks (Contacts). One hour later, a reconstituted competitive exclusion (CE) product (PREEMPT™) was administered by oral gavage (0.25 mL) to Group 2 and 4. After additional hour, chicks were provided either distilled water or experimental chlorate product (ECP; ECP is equivalent to a 15 mM chlorate ion concentration; groups 3 and 4) for 4 days. After this period, all chicks were provided free access to water until termination of the experiment. On day 3, approximately 48h post-CE treatment, 10 chicks in

each group were randomly selected and euthanized by cervical dislocation. The concentration of volatile fatty acids (VFA) (acetic + propionic + butyric + isobutyric + valeric + isovaleric) in the caecal contents were determined by gas liquid chromatography as reported previously (14).

Recovery of *Salmonella*. On Day 10, all chicks were killed by cervical dislocation and evaluated for *Salmonella* colonization. Cecal contents were aseptically collected from a cecum of each chick, serially diluted and spread-plated on NO/NA BGA, incubated for 24 hours at 37°C, and the number of colony forming units of *Salmonella* was determined and expressed as log₁₀ *Salmonella* /g cecal contents. Cecal contents that were negative at a 100 fold dilution on BGA plates but were positive at a 10 fold dilution on BGA plating were assigned 1.50 log₁₀ *Salmonella* /g cecal contents (14,15).

RESULTS AND DISCUSSION

Seeder or Contact chicks given ECP in the drinking water or CE, had decreased cecal *Salmonella* incidence and lower number of *Salmonella* cfu recovered was statistically ($P < 0.05$) lower than the controls or CE treated (Table 1). Seeders or Contacts chicks had significantly lower numbers of cecal *Salmonella* cfu recovered and lower incidence of *Salmonella* recovered as compared to the controls. Chicks provided the combination of ECP and CE had significantly lower numbers of *Salmonella* cfu recovered from the ceca and the incidence detected in the cecal as compared to the controls. Furthermore, the combination of ECP and CE was not significantly different from the ECP alone with the exception on non-challenged chicks provided ECP alone. ECP alone or in combination with CE provided to broiler chicks 3 days prior to sampling did not significantly effect the cecal volatile fatty acid populations compared to the controls or the CE treated (data not shown).

The data in the present study suggest that ECP provided in the drinking water during the first 4 days of life may reduce the incidence and the population of *Salmonella* in newly hatched chicks. In addition, data suggest that ECP will not adversely affect the microbial population naturally found in the gastrointestinal tract or artificially introduced in CE. These data suggest that ECP treatment may be a practical preharvest intervention strategy. Because poultry have access to water during the initial placement or during the feed withdrawal period and ECP can be administered in the drinking water, ECP could have an impact on the pathogen load during grow-out or that will be transported to the processing plant. The reduction of foodborne pathogens entering the processing plant should reduce pathogen contamination on the final product.

The use of ECP in a preharvest program will still need to be further investigated to maximize its effectiveness in a commercial setting. Chlorate has been approved for use in low concentrations in veterinary and human medicine and has been used previously in toothpaste in Europe (16). The lethal dose of chlorate in humans has been determined to be 1 g/kg body weight (16). Studies demonstrated that chlorate significantly reduced *E. coli* O157:H7 and *Salmonella typhimurium* DT104 in gastrointestinal contents while not significantly alter normal total culturable anaerobic bacteria counts suggesting that chlorate supplementation maybe a viable strategy to reduce foodborne pathogens that posses nitrate reductase enzyme. Government regulations (Pathogen Reduction Act) have brought a need for cost efficient approaches to reducing food borne pathogens without dramatically altering present management techniques. The results of the present study suggest a possible means to reduce food borne pathogens that can be incorporated into existing commercial management procedures.

(Mention of a trade name, proprietary product, or specific equipment does not constitute a guarantee or warranty by the U.S. Department of Agriculture and does not imply its approval to the exclusion of other products that may be suitable.)

REFERENCES

1. Doyle, M., *Escherichia coli* O157:H7 - the nemesis of the cattle industry. Beef Safety Symposium: Emerging microbial pathogens and issues in beef. National Beef Cattle Association Greenwood Village, Co. pp. 42-45. 1998.
2. Hogue, A., Akkina, J., Angulo, F., Johnson, R., Petersen, K., Saini, P. and Schlosser, W. S. *typhimurium* DT104 situation report. Proc. Beef Safety Symposium: Emerging microbial pathogens and issues in beef. National Beef Cattle Association. Greenwood Village, Co. pp 13-23. 1998.
3. Wells, S., Fedorka-Cray, P. J., Besser, T., McDonough, P. and Smith, B. *E. coli* O157 and *Salmonella*, status on U.S. dairy operations. p. 1-8 In NAHMS '96 National Animal Health Monitoring system. pp. 1-8. 1999.
4. Woteki, C. E. The food safety research agenda-emerging microbial pathogens and issues In Beef Safety symposium, emerging microbial pathogens and issues in beef. National Cattlemen's Beef Association, Greenwood Village, Col. pp 1-5. 1998
5. Brenner, D. J. "Enterobacteriaceae" In: Krieg, N. R. and Holt, J. G. (eds.) *Bergey's manual of systemic bacteriology.*, Vol. 1. The Williams & Wilkins Co., Baltimore. pp. 408-420. 1998.
6. Stewart, V. Nitrate respiration in relation to facultative metabolism in enterobacteria. *Micro.Reviews* 52:190-232. 1988.
7. Cole, J. A. "Assimilatory and dissimilatory reduction of nitrogen to ammonia." In: Cole, J. A. and Ferguson, S. J. (eds.) *The nitrogen and sulfur cycles.* Cambridge University Press, Cambridge. pp. 281-329. 1988.
8. Anderson, R.C., Buckley, S.A., Callaway, T.R., Genovese, K.J., Kubena, L.F., Harvey, R.B., and Nisbet, D.J. Effect of sodium chlorate administration on *Salmonella typhimurium* concentrations in weaned pig gut. *J. Food Protect.* 64:255-258. 2001.
9. Callaway, T. R., Anderson, R. C., Anderson, T. J., Poole, T. L., Bischoff, K. M., Kubena, L. F. and Nisbet, D. J. *Escherichia coli* O157:H7 becomes resistant to sodium chlorate in pure culture, but not in mixed culture in vivo. *J. Applied Micro.* 91:1-8. 2001
10. Anderson, R. C., Buckley, S. A., Callaway, T. R., Genovese, K. J., Kubena, L. F., Harvey, R. B. and Nisbet, D. J. Effect of sodium chlorate on *Salmonella sv. typhimurium* concentrations in the pig gut. In: Lindberg, J. E. and Ogle, B. (eds.) *Digestive Physiology of Pigs.* CABI Publishing, Wallingford, UK, pp. 308-310. 2001.
11. National Research Council. *Nutrient Requirements of Domestic Animals. Nutrient Requirement of Poultry.* 9th Rev. Edition. Natl. Acad. Sci., Washington, DC. 1994.
12. Andrews, W.H., V.R. Bruce, G. June, F. Satchell, and P. Sherrrod. *Salmonella.* in: *Bacteriological Analytical Manual.* 7th ed. Association Official Analytical Chemists, Arlington, VA pp 51-69 1992.
13. Corrier, D.E., D.J. Nisbet, C.M. Scanlan, A.G. Hollister, D.J. Caldwell, L.A. Thomas, B.M. Hargis, T. Tomkins, and J.R. DeLoach. Treatment of commercial broiler chickens with a characterized culture of cecal bacteria to reduce salmonellae colonization. *Poultry Sci.* 74:1093-1101. 1995.
14. Corrier, D.E., D.J. Nisbet, A.G. Hollister, C.M. Scanlan, B.M. Hargis, and J.R. DeLoach. Development of defined cultures of indigenous cecal bacteria to control salmonellosis in broiler chicks. *Poultry Sci.* 72:1164-1168. 1993.
15. Corrier, D.E., D.J. Nisbet, C.M. Scanlan, A.G. Hollister, and J.R. DeLoach. Control of *Salmonella typhimurium* colonization in broiler chicks with a continuous-flow characterized mixed culture of cecal bacteria. *Poultry Sci.* 74:916-924. 1995.
16. Cosmetic Ingredient Review Panel. Final report on the safety assessment of potassium chlorate. *J. Am. College Toxicology* 14:221-231. 1995.

Table 1. Effect of an experimental chlorate compound (ECP) provided in the drinking water and competitive exclusion culture (CE) during the first 4 days on *Salmonella typhimurium* cecal colonization in broilers chicks (two trials)¹.

Groups	<i>Salmonella</i> challenged (Seeders)		Non- <i>Salmonella</i> challenged (Contacts)	
	Log ₁₀ <i>Salmonella</i> per gram cecal contents	<i>Salmonella</i> positive chicks per total chicks (%) ^B	Log ₁₀ <i>Salmonella</i> per gram cecal contents	<i>Salmonella</i> positive chicks per total chicks (%) ^B
Control	5.37 ± 0.98 ^{A2}	40/40 (100) ^A	3.94 ± 2.15 ^A	33/39 (84.6) ^A
CE-gavage	4.21 ± 2.05 ^B	35/40 (87.5) ^B	1.31 ± 2.08 ^B	13/39 (33) ^B
ECP	1.71 ± 2.31 ^C	16/39 (41) ^C	0.42 ± 0.97 ^C	7/40 (15) ^B
CE + ECP	1.76 ± 2.37 ^C	15/40 (37.5) ^C	0.07 ± 0.45 ^C	1/40 (2.5) ^C

¹ECP is equivalent to a 15 mM chlorate ion concentration

²Mean ± standard deviation

^{a-c}Mean values within the same column with no common superscripts differ significantly ($P \leq 0.05$).

A COMPARISON OF 3 LIVE *SALMONELLA* VACCINES AGAINST GROUP C AND D *SALMONELLA* CHALLENGE

COMPARACIÓN DE 3 VACUNAS VIVAS DE *SALMONELLA* CONTRA EL DESAFÍO CON *SALMONELLA* DE LOS GRUPOS C Y D

K.C. Cookson and H. Fan.

Fort Dodge Animal Health, Inc., Overland Park, Kansas.

RESUMEN

En EE.UU. actualmente existen tres vacunas vivas de *Salmonella typhimurium*, a saber Salmune de Biomune, Megan Vac-1 de Megan y Poulvac ST de Fort Dodge. Este trabajo se realizó para comparar los tres productos bajo condiciones idénticas. Ninguna de las aves reaccionó ante la prueba en placa para *S. pullorum* a los 14 ni a los 42 días de edad. En el estudio de desafío SK, la ganancia de peso antes y después del desafío fue de la siguiente manera: Salmune (541, 87), Megan Vac-1 (545, 78), Poulvac ST (579, 107) y testigos (533, 115). En el estudio de desafío SE la ganancia de peso antes y después del desafío fue: Salmune (547, 85), Megal Vac-1 (515, 103), Poulvac ST (554, 105) y testigos (530, 99).

INTRODUCTION

There are three live *Salmonella typhimurium* (ST) vaccines currently available in the U.S. poultry market—Biomune's Salmune, Megan's MaganVac-1 and Fort Dodge's Poulvac ST. Because each of these vaccines is derived from a different field isolate and each was attenuated by the modification of different properties of the parent strain, these vaccines

potentially may be quite different in the way they behave (1,2,4). This study was conducted in order to compare all three products under identical conditions.

MATERIALS AND METHODS

Day old SPF pullets were housed in Horsfall isolator units until the termination of the study at 49 days. Vaccinate groups were given a single dose of live ST by course spray at day of age, then they received a second dose by drinking water at 14 days of age. At 14 and 42 days of age, ten birds from each group were bled for Pullorum plate testing. At 42 days of age, all birds were challenged by 1.0 ml oral gavage with virulent strains of either *Salmonella kentucky* (SK) or *Salmonella enteritidis* (SE). The SK challenge titer was 1.7×10^6 colony forming units (CFU)/dose and the SE challenge titer was 3.6×10^7 CFU/dose. One week post challenge, all birds were sacrificed and cultured for salmonella. Organ pools consisted of liver, spleen and kidney. Intestinal pools consisted of sections of duodenum, jejunum and ileum. Body weights (grams) were taken at 1, 42 and 49 days of age.

RESULTS

No birds reacted on the Pullorum plate test at either 14 or 42 days of age. In the SK challenge study, the pre-challenge and post-challenge weight gains were as follows: Salmune (541, 87), MeganVac-1 (545, 78), Poulvac ST (579, 107) and Controls (533, 115). In the SE challenge study, the pre-challenge and post-challenge weight gains were: Salmune (547, 85), MeganVac1 (515, 103), Poulvac ST (554, 105) and Controls (530, 99). However, none of these differences were significant. The re-isolation results post challenge are summarized in Table 1 below.

DISCUSSION

Although there were no significant pre-challenge weight differences between vaccinates and controls, it is interesting that vaccinate weights were numerically higher in 5 out of 6 groups. This is consistent with previously published work (1,3), which at least demonstrates the safety of the live ST products regarding weight gains. The results also showed that SK and SE did not affect the non-vaccinates' body weights in the seven day post-challenge period. In this limited study, none of the vaccines caused Pullorum plate reactions 2 weeks after the day of age vaccination or 4 weeks after the 14 day vaccination. However, more extensive field testing should be conducted on these products before ruling out their potential to cause false positive reactions.

All vaccine groups showed a significant reduction of SK and SE re-isolation from the internal organs post challenge compared to the non-vaccinated controls. In

addition, Poulvac ST showed reductions in intestinal re-isolations of SE and cecal re-isolations of both challenge strains, while the other products did not. Titration of the vaccines indicated that they were all potent at the time of vaccination. Finally, it must be noted that in order to compare all three vaccines under identical conditions, Salmune was not given according to label recommendations. Thus, based on this study no comments can be made about the relative efficacy of Salmune given by day of age spray alone.

REFERENCES

1. Alderton, M.R., K.J. Fahey, and P.J. Coloe. Humeral reponses and salmonellosis protection in chickens given a vitamin-dependent salmonella typhimurium mutant. *Avian Dis.* 35:435-442. 1991.
2. Barbezange, C., F. Humbert, V. Rose, F. Lalande, and G. Salvat. Some safety aspects of salmonella vaccines for poultry: distribution and persistence of three salmonella typhimurium live vaccines. *Avian Dis.* 44:968-976. 2000.
3. Coloe, P.J., N.L Gerraty, W. Christopher, M.R. Alderton, and S.C. Smith. Vaccination of poultry with salmonella typhimurium STM-1. Laboratory and field evaluations. *Proc. 43rd West. Po. Dis. Conf.* 37-39. 1994.
4. Hassan, J.O., and R. Curtis III. Efficacy of a live avirulent salmonella typhimurium vaccine in preventing colonization and invasion of laying hens by salmonella typhimurium and salmonella enteritidis. *Avian Dis.* 41:783-791. 1997.

Table 1. Re-isolation rates 7 days post challenge with *S. kentucky* and *S. enteritidis*.

Vaccine Group	<i>S. kentucky challenge</i>			<i>S. enteritidis challenge</i>		
	Organ pool	intestine	cecum	organ pool	intestine	cecum
Salmune	7/23*	20/23	12/23	9/25*	23/25	23/25
MaganVac-1	8/25*	25/25	22/25	10/24*	24/24	23/24
Poulvac ST	2/23*	19/23	7/23*	2/25*	18/25*	17/25*
Control	14/21	21/21	14/21	23/24	23/24	23/24

* denotes a significant difference from control group (Chi-square test, p<0.05)

SERODIAGNOSIS OF *SALMONELLA ENTERITIDIS* INFECTION IN POULTRY

Kakambi V. Nagaraja, Professor

College of Veterinary Medicine, Department of Veterinary Pathobiology,
University of Minnesota, St.Paul, MN 55108

Salmonellosis is the most common foodborne infectious disease of humans reported in the US. The incidence of cases of SE in humans in the US began to rise in the late 1970s, and later it became the leading serotype responsible for food poisoning in US. A

number of disease outbreaks from SE infection in humans have been traced to the consumption of SE contaminated eggs. To the producers of the eggs, SE is an important economic as well as public health issue. It is estimated that 0.01% of all shell eggs contain SE,

and the percentage may be even higher in some parts of US (8). The presence of SE in chickens and its transmission through table eggs into human food chain highlights the need for specific test to identify SE infected chickens and to eliminate them from the flock.

Preharvest food safety is the most important component of an effective prevention and control strategy for SE infection. Many control strategies have been implemented to reduce the prevalence of SE infection in poultry with the ultimate aim of reducing SE outbreaks in humans. Successful implementation of control measures requires rapid, specific and inexpensive methods of detection of birds infected with SE. Current methods for the detection of SE infection in chickens rely primarily on conventional bacteriologic culture. This procedure is relatively slow, often taking up to 3 to 4 days to provide even a presumptive diagnosis. More importantly, birds infected with *Salmonella* may not excrete the organism everyday and with this intermittent shedding, traditional bacteriologic culture methods generally have a low sensitivity.

The detection of antibodies specific to the bacterium can provide an alternate method for assessing the presence of infection. Several serological methods such as serum plate agglutination (2,3), microagglutination (15), microantiglobulin tests (6), ELISA (7,12,14) have previously been employed for the detection of SE infection in poultry. The major problem with these assays is that they lack either the sensitivity or the specificity to detect SE infected birds, or the tests are too difficult to perform in a routine laboratory or at field setting (1). This has precluded the widespread application of these tests for the detection of SE infection.

Egg yolk has been recognized as an excellent source of antibodies. Only a small proportion of eggs from infected flocks may be positive for *Salmonella* on culture and the examination of large number of eggs for evidence of infection by culture is impractical. Alternatively, detection of antibodies in eggs from SE infected birds does not involve physical handling of birds and is economical.

SE produces at least four distinct fimbriae: SEF14, SEF17, SEF18 and SEF21 (4,5,9,10). The SEF14 fimbriae is a uniquely specific structure consists of repeating subunits with a molecular mass of 14,300 (10). The gene *sefA*, encoding SEF14 has been shown to have limited distribution among *Salmonella* serotypes belonging to serogroup-D. SEF14 fimbriae are present in *S. enteritidis*, *S. dublin*, *S. moscow* and *S. blegdam* (11). Though, many of the serogroup-D *Salmonella* such as *S. typhi*, *S. gallinarum* and *S. pullorum* possess the intact gene, they fail to express SEF14 fimbriae (13).

We evaluated rSEF14 fimbrial antigen of Enteritidis for specific detection of Enteritidis infected chickens using the latex agglutination test (LAT) and ELISA. RSEF 14 antigen was highly specific in identifying birds infected with Enteritidis. Sera from chickens infected with closely related serogroup-D *Salmonella* and other avian pathogens did not react with rSEF14 antigen. The rSEF14 antigen identified antibodies in serum of 88% of chickens during first two weeks of infection, and 100% of the birds subsequently. The Enteritidis specific antibodies were detected in egg yolk as early as 6 days post infection in rSEF14-ELISA. Our results suggest that rSEF14 based assays could be used as a screening tests for detection of Enteritidis antibodies and would overcome the cross-reactions observed with existing serological tests.

REFERENCES

1. Barrow PA (1994) Serological diagnosis of *Salmonella* serotype *enteritidis* infection in poultry by ELISA and other tests. *Int J Food Microbiol* 21: 55-68.
2. Chart H, Rowe B, Baskerville A, Humphrey TJ (1990a) Serological tests for *Salmonella enteritidis* in chickens. *Vet Rec* 126: 20.
3. Chart H, Rowe B, Baskerville A, Humphrey TJ (1990b) Serological tests for *Salmonella enteritidis* in chickens. *Vet Rec* 126: 92.
4. Clouthier SC, Collinson SK, Kay WW (1994) Unique fimbriae-like structures encoded by *sefD* of the SEF14 fimbrial gene cluster of *Salmonella enteritidis*. *Mol Microbiol* 12: 893-903.
5. Collinson SK, Emody L, Muller KH, Trust TJ, Kay WW (1991) Purification and characterization of thin, aggregative fimbriae from *Salmonella enteritidis*. *J Bacteriol* 173: 4773-4781.
6. Cooper GL, Nicholas RAJ, Bracewell CD (1989) Serological and bacteriological investigations of chickens from flocks naturally infected with *Salmonella enteritidis*. *Vet Record* 125: 567-572.
7. Kim CJ, Nagaraja KV, Pomeroy BS (1991) Enzyme-linked immunosorbent assay for the detection of *Salmonella enteritidis* infection in chickens. *Am J Vet Res* 52: 1069-1074.
8. Mason J, Ebel E (1992) USDA-APHIS *Salmonella enteritidis* control program. In *Proceeding of the symposium on the diagnosis and control of salmonella*. Ed GH Snoeyenbos. Richmond, Virginia; US Animal Health Association, pp78.
9. Muller KH, Collinson SK, Trust TJ, Kay WW (1991) Type 1 fimbriae of *Salmonella enteritidis*. *J Bacteriol* 173: 4765-4772.
10. Thorns CJ, Sojka MG, Chase D (1990) Detection of a novel fimbrial structure on the surface of *Salmonella enteritidis* by using a monoclonal antibody. *J Clin Microbiol* 28: 2409-2414.

11. Thorns CJ, Sojka MG, McLaren IM, Dibb-Fuller M (1992) Characterization of monoclonal antibodies against a fimbrial structure of *Salmonella enteritidis* and certain other serogroup D salmonellae and their application as serotyping reagents. *Res Vet Sci* 53: 300-308.

12. Timoney JF, Sikora N, Shivaprasad HL, Opitz M (1990) Detection of antibody to *Salmonella enteritidis* by a gm flagellin-based ELISA. *Vet Rec* 127: 18-19.

13. Turcotte C, Woodward MJ (1993) Cloning, DNA nucleotide sequence and distribution of the gene

encoding SEF14, a fimbrial antigen of *Salmonella enteritidis*. *J Gen Microbiol* 139: 1477-1485.

14. Van Zijderveld FG, Van Bommel AMV, Anakotta J (1992) Comparison of four different enzyme-linked immunosorbent assays for serological diagnosis of *Salmonella enteritidis* infections in experimentally infected chickens. *J Clin Microbiol* 30: 2560-2566.

15. Williams JE, Whittemore AD (1971) Serological diagnosis of pullorum disease with the microagglutination system. *Appl Microbiol* 21: 394-399.

SALMONELLA ENTERITIDIS SURVEILLANCE PROGRAM IN LAYERS IN QUEBEC

PROGRAMA DE VIGILANCIA DE *SALMONELLA ENTERITIDIS* (SE) EN PONEDORAS EN QUEBEC

M. Boulianne¹ and D. Frenette²

¹Department of Clinical Sciences, Faculty of Veterinary Medicine, University of Montreal, P.O. Box 5000, St-Hyacinthe, Qc J2S 7C6 Canada, ²Fédération des Producteurs d'Oeufs de Consommation du Québec, 555 Rolland-Therrien Blvd, Longueuil, Qc J4H 3Y9 Canada

RESUMEN

En 1996, después de un brote de infección por SE PT 4 en la provincia de Quebec, el Consejo del Huevo inició un programa de vigilancia y erradicación de SE. Este enfoque de "tolerancia cero" implica la colaboración de numerosos participantes de los sectores privado y gubernamental, para asegurar el seguimiento profundo del sistema de producción de huevo. La detección de *Salmonella* a todos los niveles de producción se combina con un rígido código de prácticas que debe obedecer el avicultor para poder comercializar su huevo.

PARTNERS OF THE PROGRAM

The egg production in Canada is managed by a supply management system, where producers must acquire quotas in order to produce. This system allows producers to benefit from a price based on production costs. It is national and production is predicted according to consumption. In the province of Quebec, there are one hundred table egg producers owning a total of 3,4 millions laying hens. All producers are members of the Quebec Egg Board and pay a levy based on numbers of layers, hence eggs produced. Part of this money has been redirected to the provincial surveillance program and a special national compensation fund covers losses when a flock is found positive.

The SE surveillance and eradication program also involves the collaboration of various governmental partners; the Provincial Ministries of Health, of Agriculture and Fisheries, and the federal Canadian Food Inspection Agency (CFIA), each with a well-defined scope of intervention. Industry partners, such as the Quebec Eggs Graders Association, the Quebec Hatcheries Association and the Faculty of Veterinary Medicine of the University of Montreal are also essential to the program. Each of these partners have a well-defined role and level of intervention in the surveillance program as well as in the case of a SE outbreak.

DETECTION TESTS

Detection tests are conducted at all levels of production. Primary breeders (grandparents) are already tested monthly by genetic companies (serology and environment tests), but an added monthly environment testing is performed in every breeder flocks (parents). Every hatched lot is sampled at the hatchery via fluff and/or meconium, and pullet houses are tested twice (environment tests) over the 19-week-growing-period. All layer flocks are tested a minimum of four times during the lay cycle, the first test being conducted before 23 weeks of age. Depending on various criteria, such as presence of a multi-age barn, some flocks will be sampled a minimum of six times a year. If the previous flock was housed in a SE-positive

barn, the two subsequent flocks will be tested at least six times during the laying period, with a special attention devoted to the first months of laying.

Fluff and/or meconium samples are the responsibility of the hatcher, while environment tests in growing and laying houses are conducted by Quebec Egg Board agents. Egg graders are part of a combined industry-CFIA testing program. All samples are analysed in a provincial laboratory of the Ministry of Agriculture and Fisheries with a *Salmonella* isolation protocol including delayed secondary enrichment.

PRODUCER'S CODE OF PRACTICE

The producer must comply to a series of preventive measures for his eggs to be sent to a certified grading station for marketing purposes. Any derogation to the conditions stipulated in the Quebec Egg Board prevention program automatically diverts eggs to the breaker, at the price paid for industrial product. For example, the producer must contract services of a certified professional pest exterminator, cleaning and disinfection must be done according to Egg Board standards, premises and their immediate environment must be kept clean at all times, eggs must be placed daily in a 12C cold room, etc...

CHAIN OF ACTION IN CASE OF A SE-POSITIVE RESULT

If a fluff/meconium sample or an environment test of a pullet house is SE-positive, birds will be destroyed.

In case of a group D *Salmonella* positive sample from a laying barn, suspected eggs are located at grading stations, all eggs originating from the suspected flock are seized. Upon final bacteriological results, if found positive, they will be routed to a breaker for pasteurization. Multiple environment tests are then conducted in the SE-positive barn along with blood sampling. If one or more sample is found positive, eggs will be diverted to further processing until slaughter. If the flock represents a risk to other nearby flocks, it will be immediately destroyed.

CONCLUSIONS

This program has been highly successful in that it brought together various industry and government partners and lead to the design of a sensible and well-defined intervention program in case of a SE outbreak. Furthermore, there has been no single human case of SE foodborne poisoning related to table egg consumption of in the province of Quebec since the establishment of the program in 1997.

USO DEL ENSAYO ELISA PARA DETECTAR ANTICUERPOS CONTRA EL VIRUS DE INFLUENZA AVIAR EN YEMA DE HUEVO Y ESTABLECER EL ESTADO DE INFECCIÓN/VACUNACIÓN EN GALLINAS DE POSTURA

USE OF ELISA TEST TO DETECT AVIAN INFLUENZA VIRUS (AIV) ANTIBODIES IN EGG YOLKS AND TO ESTABLISH INFECTION/VACCINATION STATUS IN LAYING HENS

R Merino*, LY Gutiérrez, VR Tejada y JA Quintana

Departamento de Producción Animal: aves, FMVZ, UNAM, México

SUMMARY

The ELISA test had a kappa value of 0.67 as compared with HI in the detection of AIV antibodies in serum samples. Specificity and sensitivity of HI, ELISA, and AGP for AIV antibody detection in positive and negative egg yolk samples were: HI: 87% and 100% respectively; ELISA: 100% and 100% respectively. AGP did not detect any positive samples. ELISA is adequate to detect AIV antibodies in egg yolk samples, in order to learn about vaccination/infection status in layer flocks.

RESUMEN

El ensayo ELISA tuvo un valor de Kappa de 0.67 comparada con HI para detectar anticuerpos contra Influenza aviar en muestras de suero. La especificidad y sensibilidad de HI, ELISA y PGA para detectar anticuerpos contra Influenza Aviar en muestras de yema de huevo positivas y negativas fueron: HI: 87% y 100% respectivamente, ELISA: 100% y 100% respectivamente. La PGA no detectó muestras positivas. El ensayo ELISA es adecuado para detectar anticuerpos contra Influenza Aviar en muestras de yema de huevo, para conocer el estado de vacunación -

infección en las parvadas de las cuales procede el huevo.

INTRODUCCIÓN

La Influenza Aviar (IA) es un padecimiento infeccioso de las aves, causado por un virus de Influenza del tipo "A" perteneciente a la familia Orthomyxoviridae. En México, la Unión Nacional de Avicultores calculó las pérdidas monetarias del sector avícola durante el brote de Influenza Aviar de alta patogenicidad, diciembre 1994 - mayo 1995, en 49 millones de dólares (Flores, 1995). Las pruebas serológicas más utilizadas en México son Inhibición de la Hemoaglutinación (HI, siglas en inglés), y Precipitación en Gel Agar (PGA). La prueba de HI es económica y rápida (Jawetz, 1992). La PGA es una técnica simple y de gran utilidad que se basa en el principio de que cuando el antígeno y el anticuerpo se difunden en un medio semisólido (agar), forman complejos inmunitarios estables que se pueden analizar visualmente (Stites, 1996; Cottral, 1978). La prueba ELISA (Enzyme-Linked Immunosorbent Assay) es altamente sensible, específica y rápida; se basa en el uso de antígenos o anticuerpos marcados con una enzima, de forma que los conjugados resultantes tengan actividad tanto inmunológica como enzimática, puede ser utilizada para la determinación serológica de anticuerpos de manera secuencial y mejorar la titulación de estos (Rubio, 1993).

La detección y cuantificación de anticuerpos en muestras de yema de huevo, contra diversos agentes virales y bacterianos, ha demostrado alta sensibilidad y especificidad. Las ventajas del análisis serológico a partir de yema de huevo son el fácil embarque, ausencia de riesgos biológicos, el huevo no requiere refrigeración (en cortos periodos de tiempo), la recolección es muy sencilla, los proveedores nuevos de huevo pueden ser analizados fácilmente, sitio central de recolección (por ejemplo, la planta incubadora), los resultados se obtienen antes del nacimiento de los pollitos, pueden representar un promedio de 6 días de producción de anticuerpos por parte de las reproductoras, puede conocerse el estado de infección / vacunación de las aves de las cuales procede el huevo (Venne, 1995).

Los objetivos del trabajo fueron calcular el valor de Kappa de la prueba ELISA comparada con HI, para detectar anticuerpos de Influenza Aviar en muestras de suero, y determinar la sensibilidad, especificidad y el valor predictivo positivo y negativo de ELISA, HI y PGA para detectar anticuerpos contra influenza aviar en yema de huevo procedente de gallinas que estuvieron en contacto con el antígeno, ya sea vacunal o no.

MATERIAL Y MÉTODOS

Antígeno de Influenza Aviar para la Precipitación en agar. El antígeno se preparó mediante la inoculación 5 huevos embrionados, de 9 días de edad, en la cavidad amnioalantoidea con 0.2 ml de virus vivo de influenza Aviar H5N2. Después de 72 horas se obtuvieron las membranas corioalantoideas, se lavaron con PBS, fueron maceradas y guardadas en congelación hasta su uso.

Obtención de las muestras. Se utilizaron 90 muestras de sueros de aves de diferentes edades y 15 muestras de huevo fértil de diferentes procedencias (n=60): Grupo negativo "A": Gallinas SPF, Grupo positivo "B": Gallinas vacunadas contra Influenza Aviar, Grupo sospechoso "C": Gallinas sospechosas de un brote de Influenza Aviar y Grupo desconocido "D": Gallinas con situación desconocida.

Detección de anticuerpos anti Influenza Aviar en suero y yema, con la técnica de Inhibición de la Hemoaglutinación (HI), método . Los sueros fueron diluidos 1:5 y las yemas 1:10; se realizaron diluciones dobles seriadas en una microplaca de titulación, de fondo en "v", donde se colocó previamente antígeno de Influenza H5N2 inactivado (4 UHA), diluido en PBS y se incubó por 30 minutos. Posteriormente, a cada pozo se agregaron 50 l de glóbulos rojos de gallina al 0.5% y se incubó nuevamente por 30 minutos. Transcurrido el tiempo de incubación se realizó la lectura. Las muestras fueron consideradas positivas cuando presentaron título de inhibición de la hemoaglutinación igual o superior a 10.

Detección de los títulos de anticuerpos anti-Influenza Aviar en suero y yema por ELISA.

Se uso un kit comercial ELISA (AIV ELISA kit, Synbiotics Corporation) que tiene placas de microtitulación revestidas con una cepa del virus de Influenza Aviar. La técnica ELISA se llevó a cabo como describe el fabricante. Las muestras fueron consideradas positivas cuando presentaron título ELISA igual o mayor a 570.

Prueba de Precipitación en Gel de Agar: Se utilizaron cajas Petri con gel de agar (PBS + 1% agarosa, 5 mm espesor) con un orificio al centro y cinco alrededor de manera equidistante. En el centro se colocó el antígeno, como control positivo se utilizó un antisuero de Influenza Aviar con título de 1280; como control negativo se usó antisuero de ENC. En los pozos restantes de cada caja se colocaron las muestras de yema de huevo diluidas 1:10. Las cajas se colocaron en una cámara húmeda y se incubaron por 24 horas a temperatura ambiente y se realizó la lectura de resultados. Las muestras se consideraron positivas cuando formaron una línea de precipitación blanquecina entre el pozo del antígeno y el pozo de la muestra.

Valor de Kappa, sensibilidad, especificidad y valores predictivos: Se obtuvieron de acuerdo con las fórmulas descritas en otros trabajos.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

En las noventa muestras de suero evaluadas por HI (4 UHA) y por ELISA los resultados fueron: 22 sueros positivos por ambas técnicas, 4 fueron positivos (+) por ELISA y negativos (-) por HI, 3 ELISA (-) y HI (+), 61 fueron negativos en ambas pruebas. El valor de Kappa fue 0.67, excelente (cuadro 1).

Las muestras de yema de huevo de los 4 grupos resultaron negativas a la presencia de anticuerpos, con la prueba PGA, por lo tanto no se calcularon sensibilidad, especificidad o valores predictivos. Los resultados de HI y ELISA fueron: Grupo A HI positivos 2/15, ELISA positivos 0/15; Grupo B HI positivos 15/15, ELISA positivos 15/15. ELISA mostró 100% de sensibilidad, especificidad, valor predictivo positivo y valor predictivo negativo para la detección de anticuerpos contra Influenza Aviar en los grupos A y B, respectivamente (cuadro 2). El HI demostró baja especificidad y valor predictivo negativo (87%), y alta sensibilidad y valor predictivo positivo(100%) para detectar anticuerpos en los grupos (A) y (B) respectivamente (cuadro 2).

Los resultados del Grupo C (HI positivos 13/15, ELISA positivos 15/15) y del Grupo D (HI positivos 7/15, ELISA positivos 8/15) demuestran que los

huevos proceden de aves que estuvieron en contacto con el virus de la influenza aviar. En el caso del grupo C se sospechaba de un brote de IA, por lo que el resultado serológico confirma el diagnóstico. Se desconoce la situación epidemiológica del grupo D, por lo tanto no es posible determinar si los anticuerpos encontrados en la yema son la respuesta inmunológica a un programa de vacunación, o a una exposición de campo.

CONCLUSIONES

El ensayo ELISA mostró un valor excelente de kappa (0.67), así como alta sensibilidad, especificidad y valor predictivo para identificar muestras positivas como positivas y negativas como negativas, con respecto a la prueba de HI. El ELISA es de utilidad para identificar anticuerpos contra el virus de Influenza Aviar en muestras de yema de huevo procedentes de gallinas que tuvieron contacto con el antígeno.

Las muestras de huevo son una fuente adecuada para detectar anticuerpos contra el virus de la influenza aviar, y determinar el estado de vacunación / infección de las parvadas de las cuales proceden.

Se recomienda llevar a cabo más estudios para establecer la relación entre los títulos de anticuerpos obtenidos por las pruebas HI y ELISA.

REFERENCIAS

Disponibles con el autor.

Cuadro 1. Concordancia entre ELISA y HI para detectar anticuerpos contra IA en muestras de suero

		Resultado ELISA		Total
		+	-	
Resultado	+	22	3	25
HI	-	4	61	65
Total		26	64	90

$Kappa = (22+61) - (7.51 * + 45.51 **) / (90 - 45.51) = 0.67$

Cuadro 2. Sensibilidad y especificidad de ELISA y HI para detectar anticuerpos contra IA en muestras de yema de huevo

		Grupo				Grupo	
		A (-)	B (+)			A (-)	B (+)
Resultado	+	0	15	Resultado	+	2	15
ELISA	-	15	0	HI	-	13	0

Sensibilidad = (15 / 15) x 100 = 100 %
Especificidad = (15 / 15) x 100 = 100 %
Valor predictivo positivo = (15 / 15) x 100 = 100 %
Valor predictivo negativo = (15 / 15) x 100 = 100 %

(15 / 15) x 100 = 100 %
(13 / 15) x 100 = 87 %
(15 / 15) x 100 = 100 %
(13 / 15) x 100 = 87 %

DISEASE CONTROL BY MULTIVALENT *IN OVO* VACCINES

CONTROL DE ENFERMEDADES MEDIANTE VACUNAS MULTIVALENTES *IN OVO*

Jagdev M. Sharma

Veterinary PathoBiology, College of Veterinary Medicine, University of Minnesota, St. Paul, MN

RESUMEN

Se combinaron varias vacunas elaboradas con virus activos disponibles comercialmente para obtener una sola vacuna multivalente (MV) para aplicación *in ovo*. Esta vacuna, que contenía los serotipos 1, 2 y 3 del virus de la enfermedad de Marek, una cepa intermedia del virus de la infección de la bolsa de Fabricio y un virus de viruela aviar recombinante que contenía inserciones de genes del virus de la enfermedad de Newcastle (rFPV-NDV), se administró a los huevos de pollo de engorda comerciales y libres de patógenos específicos (SPF) a los 18 días de incubación. La vacuna indujo anticuerpos contra todos los antígenos virales. Los pollos vacunados estuvieron protegidos contra el desafío virulento con los virus de la enfermedad de Marek, de la enfermedad de Newcastle, de la infección de la bolsa de Fabricio y de la viruela aviar. El éxito de la MV bajo condiciones experimentales y de campo amplía la utilidad de la tecnología *in ovo* para la avicultura.

Several commercially available live viral vaccines were combined into a single multivalent *in ovo* vaccine (MV). The MV, containing serotypes 1, 2 and 3 of Marek's disease virus (MDV), an intermediate infectious bursal disease virus (IBDV), and recombinant fowl pox virus containing inserts of Newcastle disease virus genes (rFPV-NDV), was administered at embryonation day 18 in SPF and commercial broiler eggs. The vaccine induced antibodies against all viral antigens. Vaccinated chickens were protected against challenge with virulent MDV, NDV, IBDV and FPV. The successful use of MV under experimental and field conditions expands the usefulness of the *in ovo* technology for poultry.

The *In ovo* vaccination system has been in commercial use in broilers for the last several years. Although Marek's disease (MD) vaccine is by far the most common vaccine delivered *in ovo*, experimental studies have shown that live viral vaccines against a number of other common poultry diseases may also be delivered *in ovo* (Wakenell and Sharma, 1986; Sharma, 1986; Ahmad and Sharma, 1992; Reddy *et al.*, 1996; Haddad *et al.*, 1997; Rautenschlein *et al.*, 2000). The *in ovo* technology has also been used experimentally in

turkeys (Fadly and Nazerian, 1989; Ahmad and Sharma, 1993; Rautenschlein *et al.*, 2000).

Recently, we examined the possibility of combining several commercially available live viral vaccines into a single multivalent *in ovo* vaccine (MV, Gagic *et al.*, 1999). The following vaccine viruses were combined: turkey herpesvirus (HVT), SB1 strain of Marek's disease virus (SB1-MDV), B2 strain of infectious bursal disease virus (B2-IBDV) and recombinant fowl pox virus (FPV) vector containing inserts of Newcastle disease virus (NDV) HN and F genes (rFPV-NDV). This MV, containing one commercially recommended dose of each of the five viruses, was inoculated in a single injection in specific-pathogen-free eggs at embryonation day 18. Chickens hatching from MV-injected eggs developed persistent viremia with the three serotypes of MDV, antibodies against the viral antigens present in the mixture and were resistant to challenge with virulent MDV, NDV, IBDV and FPV.

The efficacy of the MV was also examined in a field trial in commercial broilers. Approximately twenty thousand broiler eggs were inoculated with MV with an automatic egg-injection machine. The remaining eggs, approximately 125 thousand, were inoculated with HVT alone, the routinely used *in ovo* vaccine at the hatchery. Chickens hatching from the MV-inoculated eggs were placed in a barn, adjacent to five barns that housed the chickens that hatched from the HVT-inoculated eggs. The relative performance values for the MV- and the HVT-vaccinated groups respectively were as follows: % livability, 92.04 vs 92.95-95.22; average daily weight gain, 0.1085 lbs. vs 0.1072-0.1151 lbs.; and % total condemnation at processing, 0.68 vs 0.61-0.80. Chickens from the MV- and the HVT-vaccinated groups were challenged with virulent viruses under laboratory conditions. The relative resistance of the MV- and the HVT-vaccinated groups respectively was as follows: MDV and IBDV, 100% for both groups; NDV, 81% vs 19%; FPV, 86% vs 0%. The successful use of MV under experimental and field conditions expands the usefulness of the *in ovo* technology for poultry.

REFERENCES

1. Ahmad, J., and J. M. Sharma. Evaluation of a modified-live virus vaccine administered *in ovo* to protect chickens against Newcastle disease. *Am. J. Vet. Res.* 53:1999-2004. 1992.
2. Ahmad, J., and J. M. Sharma. Protection against hemorrhagic enteritis and Newcastle disease in turkeys by embryo vaccination with monovalent and bivalent vaccines. *Avian Dis.* 37:485-491. 1993.
3. Fadly, A.M. and K. Nazerian. Hemorrhagic enteritis of turkeys: influence of maternal antibodies and age at exposure. *Avian Dis.* 33:778-786. 1989
4. Gagic, M., C., St. Hill and J.M. Sharma. *In ovo* Vaccination of Specific Pathogen Free Chickens with Vaccines Containing Multiple Agents. *Avian Dis.* 43:293-301. 1999.
5. Haddad, E.E., C.E. Whitfill, A.P. Avakian, C. A. Ricks, P.D. Andrews, J.A. Thoma and P.S. Wakenell. Efficacy of a novel infectious bursal disease virus immune complex vaccine in broiler chickens. *Avian Dis.* 41:882-889. 1997.
6. Rautenschlein, S., J.M. Sharma, B Winslow, J. McMillen, D. Junker, and M. Cochran. Embryo vaccination of turkeys against Newcastle disease infection with recombinant fowlpox constructs containing interferons as adjuvants. *Vaccine* 18:426-433. 2000.
7. Reddy, S. K., J. M. Sharma, J. Ahmad, D. N. Reddy, J. McMillen, S. Cook, M. Wild, and R. Schwartz. Protective efficacy of a recombinant herpesvirus of turkeys as an *in ovo* vaccine against Newcastle and Marek's diseases in specific pathogen free chickens. *Vaccine* 14:469-478. 1996.
8. Sharma, J. M. Embryo vaccination of specific-pathogen-free chickens with infectious bursal disease virus: Tissue distribution of the vaccine virus and protection of hatched chickens against disease. *Avian Dis.* 30:776-780. 1986.
9. Wakenell, P. S., and J. M. Sharma. Chicken embryonal vaccination with avian infectious bronchitis virus. *Am. J. Vet. Res.* 47:933-938. 1986.

IN OVO TECHNOLOGY MEETING THE CHALLENGES OF TODAY AND TOMORROW

LA TECNOLOGÍA *IN OVO* SATISFACE LOS RETOS DE HOY Y DEL MAÑANA

Cheryl R. Gustafson^A, Chris Williams^A, Sean Bryan^A, Todd Radford^A, Bill Stuart^A, Nancy Privette^A, Dexter Smith^A, and Stacey Neuman^A

^AEmbrex, Inc., 1040 Swabia Ct., Research Triangle Park, NC, 27709

RESUMEN

La tecnología de inyección del huevo ha pasado de las instalaciones de investigación a la industria avícola con el desarrollo comercial del sistema de inyección *in ovo* Inovoject[®]. Este sistema fue diseñado para administrar vacunas al embrión en desarrollo, pero ahora se han creado nuevos dispositivos para dar valor agregado a la tecnología existente. Un sistema de detección de la viabilidad del embrión o "aparato de ovoscopia" funciona con un dispositivo de remoción (sistema Egg Remover[®]) que identifica automáticamente a los embriones vivos y muertos. Los datos recolectados se pueden usar como una fuente de información para eliminar del proceso todos los huevos no viables antes de la inyección, como una ayuda para la colocación del pollo recién nacido y para resolver problemas de operación de la incubadora.

Egg injection technology advanced from the research laboratories of the US Department of Agriculture to the poultry industry with the

development of a commercial *in ovo* injection system. The first commercial *in ovo* delivery system (Inovoject[®] system) was designed to apply Marek's disease vaccine to the developing embryo in the egg. Following its inception in 1992, the commercial application of Marek's disease vaccine *in ovo* has grown to encompass over 85% of the broiler chickens produced in North America, representing more than 8 billion eggs annually. Additionally, commercialization to date has been initiated in 31 countries worldwide, with more than 500 individual machines in operation. The success of the *in ovo* injection system is due to many factors; however, three technical application principles drive the technology. One, the *in ovo* injection system serves to deliver to the embryo biologically active vaccines at the earliest possible time of embryonic development, thereby preparing the chick immunologically for the grow-out period prior to hatching. Two, the application is a mass application on an individual dosage basis, allowing for uniform application at a rapid rate. Three, the needle and egg

punch are sanitized between each injection. Building on these basic principles, the application of the technology has grown and expanded throughout the global commercial poultry industry.

New *in ovo* system development has been focused on an egg viability detection system or 'candler' that automatically identifies the live and dead embryos during the injection and transfer process. This procedure (Egg Remover[®] system) fits with the current egg injection systems in broiler and breeder hatcheries, and can add value in several ways. Once the viability of the incubated egg is identified, the data can be used as an information source to control vaccine delivery to only viable embryos, and similarly, to remove non-viable eggs from the process before egg injection. In a large scale week-on, week-off trial in North America involving 9.5M eggs, removal of non-viable eggs resulted in increased hatch and decreased culls. This trend was observed in chicks from broiler breeder birds greater than 40 weeks of age.

The Identifier or candling component is the basis for which this technology works. The system uses rapid pulses of light (IR) to determine whether an egg is clear (infertile or early dead), or contains a developed embryo. Many individual pulses are evaluated per egg to determine viability. The candling information that is collected by the Identifier has been examined closely. The perceived light levels have been correlated to different stages of embryonic development. Almost no light is perceived by the system when a beam is directed through a live embryo. In contrast, a large amount of light is perceived when an infertile egg is

scanned. What is intriguing is the variation in light levels that is perceived by scanning embryos that have died during incubation. Levels of light can be delineated and correlated to the developmental period that embryonic death occurs, especially embryonic days one through eight. These levels are not as clearly defined as the live and infertile, however, there is continued work with the system to refine its capabilities. Additional incorporation of thermal imaging technology has shown good promise of incorporation into the candling/identification system. Thermal imaging is able to differentiate between live embryos and middle and late dead embryos, as well as contaminated 'black' rots.

The Identifier collects and collates information that can be accessed through various screens found on the control box. These information screens are used to verify accurate operation, give immediate data on scanned eggs, summarize accumulated data, trouble shoot the scanning process, and can serve as a tool for the hatchery manager. Data can be collated during operation into groups such as by incubator or by breeder flock. During operation, the individual incubator flat is shown on the screen, as well as a cumulative total viability for the individual breeder flock. This information can obviously be used to help the manager predict subsequent hatch by flock or machine, and therefore serve to help manage the placement of the hatched chicks. The data is also very useful as a troubleshooting device for incubator operation.

EFFICACY AND SAFETY OF A RECOMBINANT FOWL POXVIRUS CONTAINING LARYNGOTRACHEITIS GENES

EFICACIA Y SEGURIDAD DE UN POXVIRUS RECOMBINANTE CONTENIENDO GENES DE LARINGOTRAQUEITIS

Kristi M. Moore, Jennifer R. Davis, Yoshinari Tsuzaki, David R. Hout, Motoyuki Esaki, Takashi Okuda, and Joan D. Leonard

RESUMEN

Laringotraqueitis infecciosa (ILT) es una enfermedad viral aguda del tracto respiratorio de las aves. Los métodos de control actuales del ILT en áreas de la producción intensiva de las aves de corral incluyen el uso de vacunas vivas modificadas. Dentro de las desventajas de las vacunas vivas modificadas de ILT es que estas vacunas pueden revertir a la virulencia y causar la enfermedad en aves susceptibles. En un esfuerzo de producir una vacuna más segura de ILT usando ingeniería genética, un Poxvirus recombinante (FP) conteniendo genes del ILT fue

diseñado con el fin de limitar las desventajas de las vacunas vivas modificadas de ILT. Dos genes que expresan los antígenos protectores dominantes del ILT fueron aislados de cepas virulentas del campo de ILT. Estos dos genes de ILT fueron insertados en el genoma de una vacuna de FP, que mantuvo las características de la vacuna de FP y además demostró protección contra ILT. Esta vacuna recombinante es segura para el uso en aves y es eficaz contra el desafío de FP y de ILT. Además, esta vacuna redujo la diseminación del virus de desafío de ILT del grupo vacunado al grupo de no vacunados. En una prueba de duración de

inmunidad, que llegó hasta las 32 semanas de edad, ésta vacuna mostró protección contra desafío de ILT y FP y la protección contra ILT fue estadísticamente similar a la de una vacuna comercial de FP usada como control.

Infectious laryngotracheitis (LT) is an acute viral disease of the respiratory tract of chickens. Current LT control methods in areas of intensive poultry production include the use of modified-live vaccines. Disadvantages of modified-live LT vaccines include induction of latency and spread to susceptible chickens with the potential to revert to a more virulent form causing disease. In an effort to produce a safer LT vaccine through genetic engineering, a recombinant Fowl Poxvirus (FP) containing LT genes was designed to limit the disadvantages of modified-live LT

vaccines. Two genes expressing key protective LT antigens were isolated from virulent field strains of LT. These two LT genes were inserted into the genome of a FP vaccine, which maintained the characteristics of the FP vaccine and gained protection against LT. This recombinant vaccine is safe for use in chickens and is efficacious against FP and LT challenge. In addition, this vaccine reduced spread of LT challenge virus from vaccinates to non-vaccinated, co-mingled chickens. In a duration of immunity trial, this vaccine showed protection against LT and FP challenge through 32 weeks of age and FP protection was statistically similar to a commercial FP vaccine.

(A full-length article will be submitted to *Avian Diseases* for peer review).

FUTURE OF NEW GENERATION OF VIRUS-VECTORED VACCINES FOR EFFICIENT POULTRY PRODUCTION

EL FUTURO DE UNA NUEVA GENERACIÓN DE VACUNAS QUE UTILIZAN VIRUS COMO VECTORES, PARA LA PRODUCCIÓN AVÍCOLA EFICIENTE

Deoki N. Tripathy

Department of Veterinary Pathobiology, College of Veterinary Medicine,
University of Illinois, Urbana, Illinois 61802

RESUMEN

La industria avícola ha realizado progresos significativos en la eficiencia productiva gracias a innovadoras prácticas de manejo y al uso con regularidad de vacunas para reducir las pérdidas asociadas con las enfermedades. Tradicionalmente, el desarrollo de vacunas implica el uso de microorganismos tanto activos modificados (atenuados) como inactivados. De manera ideal, la industria avícola debería contar con vacunas económicas y efectivas que requieran menos frecuencia de manejo de las aves. Las vacunas de esta naturaleza se pueden diseñar incorporando genes específicos que codifiquen para los antígenos protectivos de los patógenos, en el genoma de un vehículo vivo. A medida que se ha modificado la estructura de la industria avícola, también ha venido aumentando la importancia de la necesidad de contar con vacunas costeables para la prevención de enfermedades. En este sentido es muy promisoría una nueva generación de vacunas elaboradas a base de vectores.

The poultry industry has made significant progress in production efficiency due to innovative management practices and the regular use of vaccines

to reduce disease-related losses. Prevention of diseases through vaccination has been shown to be extremely beneficial, in decreasing not only mortality and morbidity but also the cost of animal production. Vaccines, therefore, represent one of the most important tools available for disease prevention. In addition to providing protection, vaccines also reduce the spread of infection. In recent years poultry production has changed from a large number of small farms to a relatively few large operations. Because of the intensive nature of production units, contagious diseases can spread rapidly and the economic consequences can be devastating. Despite the regular vaccination of poultry, disease outbreaks still continue to occur frequently. Currently, live viral vaccines e.g., Newcastle disease, infectious laryngotracheitis, fowlpox, infectious bursal disease, avian encephalomyelitis, infectious bronchitis, as well as several killed vaccines are used. Without the protective effect of these vaccines, the industry would not be where it is today. In order to reduce the cost of production and administration, some of these vaccines are administered in combination with others.

The traditional approach to vaccine development involves the use of both modified-live (attenuated) and

inactivated microorganisms. Attenuated vaccines are generally preferred since they provide immunity of a longer duration and are more easily produced. However, they often pose the threat of reversion to virulence and often need to be maintained at the correct passage level. Attaining the balance between maximum immunogenicity and minimum virulence for the host does involve some risk. Since conventional vaccines are developed to some extent by "trial and error" and without knowledge of their genetic make-up, reaching the desired levels of induced protective immunity and reduced virulence may enable the "vaccine" to revert to a more virulent form under field conditions. Moreover, different strains of a vaccine (produced by separate biological companies) may exhibit a varied potential for reversion to virulence. Furthermore, *in vivo* recombination of different attenuated strains may result in the generation of a strain that is more virulent than its parents. Although these concerns are unwarranted when using inactivated or subunit vaccines, frequent administration is required and killed vaccines are more expensive than live ones. While vaccines are usually efficacious in eliciting a protective immune response in the host, none still can be claimed to be perfect.

Realizing the impact and importance of vaccines for the prevention and control of diseases, research on all aspects of vaccination against human and animal diseases has increased considerably in recent years. In spite of the fact that vaccines are popular interventions for the prevention of diseases due to their relatively low costs, limited efforts have been made towards producing a new generation of effective poultry vaccines. Ideally, the poultry industry would like to have effective vaccines that require less frequent handling of the birds and are inexpensive. Currently, administration of a large number of individual vaccines involves frequent handling of the birds, which stresses them and also increases the cost of labor. One way to reduce these problems would be the production of vaccines capable of providing protection against multiple pathogens. Such vaccines can be designed by incorporating specific genes that encode for protective antigens of pathogens into the genome of a live carrier. Since in such a live vectored vaccine only the protective antigen(s) of a pathogen are presented to the immune system of the host, chances of reversion to virulence are eliminated and the beneficial properties of both live and killed vaccines are retained.

Using current molecular methods it has become possible to uncover the biological pathways which are needed by pathogens to survive in their respective hosts. Moreover, genes encoding protective antigens of pathogens as well as those associated with their

virulence can be easily identified. The availability of such information can be used to overcome the limitations of traditional approaches in designing a new generation of effective vaccines. While protective antigens can be expressed either by bacterial or viral vectors, the later are preferred because foreign genes are expressed authentically by them. While the genomes of several viral vectors e.g., poxviruses, baculoviruses, herpesviruses and adenoviruses, have been manipulated to enable expression of foreign proteins, larger viruses like herpes and pox have an advantage in that they can accommodate a substantial amount of foreign genetic material. When considering herpes viruses as vaccine vectors, it is important to remember their potential for delayed persistence and oncogenesis. Thus for the generation of poultry vaccines, avipox viruses like fowlpox or pigeonpox virus are more advantageous than other vectors.

One of the major advantages for viral-vectored vaccines is their ability to elicit a protective cell-mediated immune response as well as a humoral immune response to the antigen delivered by the vector. However, in the case of modified viral vectors, the main safety concern is whether the vector itself is virulent and capable of producing clinical disease in the host. Concerns about the use of fowlpox virus as an expression vector are unwarranted since attenuated live fowlpox virus vaccines of chicken embryo or culture origin have been used in commercial poultry for more than 70 years. Additionally, the extensive experience obtained with fowlpox virus as a live vaccine, its restricted host range, large genome capable of accommodating substantial amounts of foreign DNA and inability to induce oncogenic transformation are desirable features for its potential use as a vector for immunization against important pathogens. The basic requirements to develop a viral vectored vaccine are: a cell culture system which will support the growth of the virus; sites within the genome of the virus which are non-essential for growth, transcriptional regulatory elements (promoters) necessary for optimal expression of the foreign genes; a procedure for inserting the foreign gene into the non-essential locus and a method of identifying the recombinant viruses.

The first recombinant fowlpox virus expressing a specific protein from an avian pathogen, in this case avian influenza virus was generated in late 1980s. Subsequently, fowlpox virus vaccines capable of expressing protective antigens of Newcastle disease, Marek's disease, infectious laryngotracheitis, and infectious bursal disease viruses were generated. In each instance, immunization of susceptible birds with such recombinants resulted in the development of specific antibodies and protection to subsequent

challenge with the respective pathogen (Tripathy, 1996).

In developing a new generation of vaccines it is important to consider:

(a) efficacy, (b) safety and (c) cost. Currently, two commercial fowlpox virus vectored vaccines expressing either avian influenza or Newcastle disease virus genes are available. Results of experimental and field studies with these vaccines revealed that they are safe and efficacious. In this regard, the fowlpox virus vectored avian influenza vaccine has been used extensively in Mexico. Although a similar vaccine designed to protect against Newcastle Disease virus has been available in the US for sometime, it has not been routinely used by the poultry industry. One of the reasons for its limited use has been its high cost as compared to the rather inexpensive conventional vaccines. Based on the current prices of poultry meat and eggs, the industry cannot afford an expensive vaccine even if it is highly effective and superior to current conventional ones. Therefore, the manufacturers must consider the cost of any new vaccines. Another concern has been that the immunity generated against fowlpox virus after initial vaccination may prevent the subsequent use of a similar recombinant containing gene(s) of different pathogens as an immunizing agent in the same animal. To circumvent this problem several other avianpox viruses e.g. quailpox, canarypox and condorpox could be developed as ideal vaccines for reimmunization since these viruses are antigenically distinct from fowlpox virus.

Fowlpox virus has certain biological attributes for its use as a vector. These include its host specificity, mild pathogenicity and low transmissibility (Tripathy and Reed, 1997). In addition, because it can accommodate large amount of foreign DNA into its genome without loss of viability, this virus could simultaneously express antigens from several pathogens and thus serve as a polyvalent vaccine.

I feel that avianpox virus vectored vaccines can be developed at a reasonable price if genes from multiple pathogens can be incorporated into the fowlpox virus genome. To obtain such a vector, several non-essential regions in the genome of fowlpox virus as well as strong virus specific promoters are required. Until recently only a few non-essential regions had been identified in the fowlpox virus genome and a limited number of homologous promoters were available. Recently, we have shown that fowlpox virus contains many genes which are not essential for its multiplication (Srinivasan, et al, 2001). Such loci could be effectively used for the insertion of various genes from multiple pathogens. Previously, in

lieu of homologous fowlpox virus promoters, heterologous vaccinia virus regulatory elements were used in creating recombinant fowlpox virus vaccines. However, realizing the importance of using homologous promoters, we have recently identified several fowlpox virus promoters and determined their efficacy. Use of such homologous promoters should allow optimal expression of foreign proteins.

It is very encouraging to survey the wealth of genetic information on various poultry pathogens that has become available in last 10 years. For example, the complete nucleotide sequence of a vaccine-like fowlpox virus has been determined (Afonso et al, 2000). Moreover, several non-essential regions and transcriptional regulatory elements in the fowlpox virus genome have been evaluated. Additionally, several genes associated with virus virulence and prolonged persistence have been identified. This information will be valuable in designing an ideal vaccine against fowlpox. Likewise, genes from several poultry pathogens, which encode for specific protective antigens have been identified. Now, it will be possible to develop a polyvalent fowlpox virus vectored vaccine incorporating genes of several respiratory pathogens. Since fowlpox virus infects the upper respiratory tract of chickens, such vaccines may eventually be administered ocularly or orally. Similar recombinant vaccines expressing multiple antigens can be designed for subcutaneous, intramuscular or *in ovo* administration.

Although fowlpox virus currently appears to be the predominant vector, the avipoxviruses are a diverse group of viruses infecting a variety of birds. Therefore, it is possible that in the near future, monovalent or polyvalent recombinant vaccines using other avian poxviruses, e.g. canarypox, pigeonpox, quailpox, psittacinepox, sparrowpox or condorpox viruses, will be created for use in commercial poultry.

As the structure of poultry industry has changed from small to large units and the efficiency of production has improved significantly, the need for cost-effective vaccines for the prevention of diseases has become increasingly important. In this regard, a new generation of vectored vaccines for which the basic technology has already been established holds great promise. Such vaccines appear to have a great future role in efficient poultry production.

REFERENCES

1. Afonso, C. L., E. R. Tulman, Z., Lu., L. Zsak, G. F. Kutish, and D. L. Rock.. The genome of fowlpox virus. *J. Virol.* 74, 3815-3831. 2000.
2. Srinivasan, V., W. M. Schnitzlein and D. N. Tripathy. Fowlpox virus encodes a novel DNA repair

enzyme, CPD-Photolyase, that restores infectivity of UV light damaged virus. *J. Virol.* 75, 1681-1688. 2001.

3. Tripathy, D. N. Fowlpox Virus Vectored Vaccines for Control of Poultry Diseases. Proc. XX

World's Poultry Congress, New Delhi, India, September 2-5; Volume II 497-503. 1996.

4. Tripathy, D. N. and W. M. Reed. Pox. In: Diseases of Poultry. 10th ed., eds Calnek, B. W. et al. Iowa State, University Press, Ames, IA, pp 643-659. 1997.

VIRUS-ANTIBODY COMPLEX VACCINES: PRESENT AND FUTURE

COMPLEJOS VIRUS-ANTICUERPO USADOS COMO VACUNAS: PRESENTE Y FUTURO

Craig E. Whitfill ^A, Alan P. Avakian ^A, Eid E. Haddad ^A, Michael P. Martin ^A,
Jan-Kees van den Wijngaard ^A, and Nick J. Chettle ^B

^A Embrex, Inc. PO Box, 13989, Research Triangle Park, NC, USA, 27709; ^B Central Veterinary Laboratory, New Haw, Weybridge, Surrey, UK, KT15 3NB

RESUMEN

Se ha creado una nueva tecnología para el desarrollo de vacunas utilizando un antisuero específico mezclado, en la proporción correcta, con un virus infeccioso para formar un complejo inmune virus-anticuerpo. Se desarrolló una vacuna para la prevención de la infección de la bolsa de Fabricio y se está usando actualmente en el campo, en todo el mundo. En este ejemplo se utiliza una vacuna intermedia plus contra esta enfermedad para generar una vacuna con el complejo virus-anticuerpo. Presentaremos una selección de los estudios realizados para documentar las características de la vacuna complejo virus de la infección de la bolsa de Fabricio-anticuerpo, administrada *in ovo* a pollos libres de patógenos específicos y a pollos de engorda, incluyendo su seguridad, las pruebas de eficacia y sus efectos ante niveles variables de anticuerpos maternos.

SUMMARY

A new vaccine technology has been developed using specific antiserum mixed in the appropriate ratio with an infectious vaccine virus to form a virus-antibody immune complex. With this technology, a vaccine for the prevention of Infectious Bursal Disease Virus (IBDV) has been developed and used in the field worldwide. In this example, an intermediate plus IBDV vaccine virus is used to generate a virus-antibody complex vaccine. Selections from the studies performed documenting IBDV-antibody complex vaccine characteristics when given (*in ovo*) to SPF and broiler chickens are presented including safety trials, efficacy trials, and vaccine efficacy with varying maternal antibody levels.

In ovo (in the egg) has become an accepted route for delivery of vaccines to chickens worldwide. The first commercial vaccines shown to be safe and effective for *in ovo* administration were for Marek's disease virus (7, 8, 14). Administration of vaccines *in ovo* may be advantageous through improved inoculation consistency and decreased labor costs. *In ovo* preventative vaccination for other poultry diseases requires the development of safe and effective vaccines suitable for *in ovo* administration.

Vaccination around day 18 of embryonic development correlates with the rise in maternal antibody levels in the chick (4). *In ovo* vaccines therefore need to withstand the neutralizing effects of high maternal antibodies to be protective. More potent vaccine viruses may be able to overcome maternal antibodies, but are unsafe in birds with lower levels of maternal antibody. Research has shown that the addition of specific antiserum to a more potent vaccine virus at an appropriate ratio creates a virus-antibody complex without neutralization of the vaccine virus (1,3,11,12). The resulting virus-antibody complex vaccine modifies the timing of vaccine virus release and remains safe to administer to birds with lower maternal antibody levels.

Very virulent strains of IBDV started to emerge in the 1980's (9). The rise of these virulent strains prompted the need for IBDV vaccines that could work in the presence of high maternal antibody levels that would have eliminated conventional vaccines if given at an early age. The virus-antibody complex vaccine technology has been very successfully used with 3 different IBDV vaccine strains: 2512, V877, and MB. Data presented here and in other papers (1,11,12)

demonstrate the safety and efficacy of IBDV-antibody complex vaccines.

MATERIALS AND METHODS

Experiment 1. SPF eggs were either vaccinated with 1000 EID₅₀ of IBDV strain 2512 (13) complexed with 240 units of specific antiserum, vaccinated with 1000 EID₅₀ of IBDV strain 2512 alone, or unvaccinated at 18 days of incubation (in ovo). Gross and histological examination was performed on the bursae of 5 birds/group on days 1, 3, 5, 7, 13, 22, and 29 of age. Bursae were evaluated grossly for signs of edema or atrophy and were given a mean histological score ranging from 0-5 as previously reported (5); 5 = extensive destruction, 0 = no lesions. Ten birds per group were bled and then challenged via intramuscular injection with 100 CID₅₀ of vvIBDV strain DV86 on day 28 of age. Birds were evaluated 4 days post-challenge for gross signs of acute bursal infection.

Experiment 2. SPF eggs were either vaccinated with 100 EID₅₀ of IBDV strain 2512 complexed with 24 units of specific antiserum at 18 days of incubation (in ovo) or unvaccinated. 150 eggs per group were used. Birds were challenged via eye drop with 100 EID₅₀ IBDV STC challenge strain from the United States Department of Agriculture (USDA) on day 29 of age. Birds were evaluated grossly 3 days post-challenge for signs of acute bursal infection and bursa to body weight ratios. Blood was collected at termination (ELISA for anti-IBDV antibodies).

Experiment 3. Broiler eggs were either vaccinated with the IBDV-antibody complex vaccine at 18 days of incubation (in ovo) or unvaccinated. Birds were challenged via eye drop with 100 EID₅₀ IBDV STC challenge strain from the USDA on day 35 of age. Birds were evaluated grossly 3 days post-challenge for signs of acute bursal infection and bursa to body weight ratios. Blood was collected at termination (ELISA for anti-IBDV antibodies).

Experiment 4. Eggs from 4 broiler breeder flocks were vaccinated with the IBDV-antibody complex vaccine at 18 days of incubation (in ovo). Blood was collected from birds within each group at hatch. Blood collection and gross evaluation of the bursae for atrophy and edema associated with the vaccine virus were made from 12-20 birds per group at each sampling (weeks 3, 4, 5, and 6 of age). Idexx, Inc. performed IBDV ELISA titers.

RESULTS AND DISCUSSION

Experiment 1. In SPF chickens, 1000 EID₅₀ IBDV strain 2512 alone caused reduced hatchability, gross bursal changes starting day 1, 15% post-hatch mortality, and 100% clinical depression in remaining birds. Complete bursal destruction was observed histologically by day 5 of age. Chickens vaccinated

with the IBDV-antibody complex IBDV vaccine had a normal hatch, no post-hatch mortality, and no clinical depression. Mild bursal atrophy was observed in 1/5 birds on day 5 and mild to moderate atrophy in 100% at day 7. Histologically, bursal changes are observed with the complex vaccine, but bursal lesion scores were consistently lower from day 5 to day 29 by 0.5-2.0 ranks on the mean histology score.

In ovo administration of IBDV vaccine virus 2512 at 1000 EID₅₀ was not safe without the addition of specific antiserum. By complexing the vaccine virus with specific antiserum, *in ovo* administration of the vaccine was safe and delayed the onset of gross bursal changes approximately 5-7 days consistent with previous findings (2). Delay in bursal changes may have occurred due to a delayed or slowed viral replication.

Pre-challenge ELISA antibody titers and post-challenge protection were used to evaluate efficacy in experiment 1. At day 28 of age, mean antibody titers for the controls, IBDV vaccine virus alone, and IBDV-antibody complex vaccine groups were 111, 174, and 2633, respectively. In the control group 0/10 birds were protected from day 28 challenge compared to 10/10 birds from the IBDV-antibody complex vaccine group. Although none of the birds in the vaccine virus alone group had clinical signs of bursal disease after challenge, complete destruction in this group of the bursal lymphoid tissue necessary for challenge virus replication made bursal changes difficult to define.

Experiment 2. In SPF birds, bursa to body weight ratios for the unchallenged controls, challenged controls and challenged IBDV-antibody complex groups were 6.32gm, 5.12gm, and 1.41gm, respectively on day 32. Between the challenge on day 29 and study termination on day 32, body weight gain for the unchallenged controls (45.69gm) and the challenged IBDV-antibody complex group (43.08gm) were similar and statistically different from the challenged controls (-1.90gm). Both challenged and unchallenged control groups had a day 32 IBDV ELISA geometric mean titer (GMT) of 1. Challenged IBDV-antibody complex group had a day 32 GMT of 851. The vaccine virus in the IBDV-antibody complex group replicates in the bursa to stimulate immunity as evidenced by bursal atrophy from the bursa to body weight ratios. Protection to challenge therefore is evaluated by body weight gain comparison to unchallenged controls, elevated antibody titers, and acute clinical signs of IBDV. The IBDV-antibody complex group was 100% protected to viral challenge (positive controls 0% protected) based on these criteria.

Experiment 3. In broilers, bursa to body weight ratios for the unchallenged controls, challenged controls, unchallenged vaccinates, and challenged vaccinate groups were 2.27gm, 2.79gm, 0.97gm, and

0.75gm, respectively on day 38 (3 days post-challenge). Unchallenged and challenged control groups had day 38 GMT of 1 and 2, respectively. Unchallenged and challenged IBDV-antibody complex groups had day 38 GMT of 3631 and 2697, respectively. Bursal atrophy occurred in all of the birds in the vaccinate group but atrophy did not significantly change in severity with IBDV challenge. Protection to challenge therefore is evaluated by elevated antibody titers and acute clinical signs of IBDV including bursal edema and hemorrhage. The IBDV-antibody complex group was 100% protected to viral challenge (positive controls 0% protected) based on these criteria.

Experiment 4. Mean IBDV maternal antibody levels at hatch for the 4 groups of broilers were 7427 (Flock A), 5560 (Flock B), 3911 (Flock C), and 3042 (Flock D). Flocks were further defined based on their maternal antibody levels as very high, high, moderate (+), and moderate, respectively. Antibody levels throughout experiment 4 are shown in figure 1. Bursal evaluation at week 3 showed 10% of Flock A were effected compared to 40% in Flock D (groups B and C not tested). Week 4 bursae were 35%, 55%, 100%, and 90% effected in Flocks A, B, C, and D, respectively. Week 5 bursae were 89%, 90%, and 100% effected in Flocks A, B, and C, respectively (group D not tested). Birds with higher levels of maternal antibodies (Flocks A and B) had an immune response (Fig. 1) and grossly infected bursae that occurred later than birds with lower levels of maternal antibodies (Flocks C and D). Data from experiment 4 suggests that the IBDV-antibody complex vaccine given *in ovo* replicates and protects birds when maternal antibody levels decrease and that even very high levels of maternal immunity (Flock A) would not interfere with the vaccine efficacy.

Conventional water and spray methods of IBDV vaccination can be less efficacious due to maternal immunity (5, 6, 10). A single virus-antibody complex vaccine given *in ovo* or at hatch is able to work with maternal antibodies eliminating the guesswork of conventional multiple vaccine schedules and reducing the risk of disease from a field challenge. *In ovo* vaccination also provides a more uniform vaccination strategy than water/spray administration.

CONCLUSIONS

Broilers given a single vaccination are able to develop an effective immune response with a wide range of maternal antibody levels. Vaccine virus is delayed approximately 5-7 days in birds with no maternal antibodies and is most likely due to the antiserum component of the vaccine. Vaccine virus replication in the bursal lymphoid cells of a broiler bird is delayed based on maternal antibody levels. Virus-

antibody complex vaccine technology provides for the first time a safe and effective means to vaccinate broilers for IBDV in the hatchery via a single inoculation.

REFERENCES

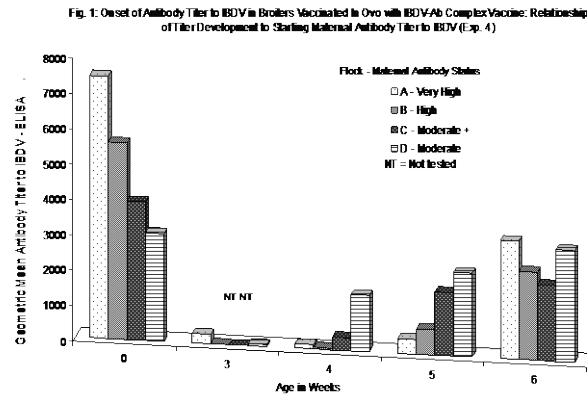
1. Haddad E. E., C. E. Whitfill, A. P. Avakian, C. A. Ricks, P. D. Andrews, J. A. Thoma and P. S. Wakenell. Efficacy of a novel infectious bursal disease virus immune complex vaccine in broiler chickens. *Avian Dis.* 41:882-889. 1997.
2. Jeurissen, S. H. M., E. M. Janse, P. R. Lehrbach, E. E. Haddad, A. Avakian and C. E. Whitfill. The working mechanism of an immune complex vaccine that protects chickens against infectious bursal disease. *Immunology* 95:494-500. 1998.
3. Kelemen, M., K. Forgach, J. Ivan, V. Palya, T. Suveges, B. Toth and J. Meszaros. Pathological and immunological study of an *in ovo* complex vaccine against infectious bursal disease. *Acta Vet. Hun.* 48:443-454. 2000.
4. Kowalczyk, K., J. Daiss, J. Halpern and T. F. Roth. Quantitation of maternal-fetal IgG transport in the chicken. *Immunology* 54:755-758. 1985.
5. Muskett, J. C., I. G. Hopkins, K. R. Edwards, D. H. Thornton. Comparison of two infectious bursal disease vaccine strains: Efficacy and potential hazards in susceptible and maternally immune birds. *Vet. Rec.* 104:332-334. 1979.
6. Tsukamoto, K., N. Tanimura, S-i. Kakita, K. Ota, M. Mase, K. Imai and H. Hihara. Efficacy of three live vaccines against highly virulent infectious bursal disease virus in chickens with or without maternal antibodies. *Avian Dis.* 39:218-229. 1995.
7. Sarma, G., W. Greer, R.P. Gildersleeve, D.L. Murray, and A.M. Miles. Field safety and efficacy of *in ovo* administration of HVT and SB-1 bivalent Marek's disease vaccine in commercial broilers. *Avian Dis.* 39:211-217. 1995.
8. Sharma, J.M., and R.L. Witter. Embryo vaccination against Marek's disease with serotypes 1, 2, and 3 vaccines administered singly or in combination. *Avian Dis.* 27:453-463. 1983.
9. van den Berg, T. P., M. Gonze and G. Meulemans. Acute infectious bursal disease in poultry: isolation and characterization of a highly virulent strain. *Avian Pathol.* 20:133-143. 1991.
10. van den Berg, T. P. and G. Meulemans. Acute infectious bursal disease in poultry: protection afforded by maternally derived antibodies and interference with live vaccination. *Avian Pathol.* 20:409-421. 1991.
11. Whitfill, C.E., E. E. Haddad, C. A. Ricks, J. K. Skeeles, L. A. Newberry, J. N. Beasley, P. D. Andrews, J. A. Thoma and P. S. Wakenell.

Determination of optimum formulation of a novel infectious bursal disease virus (IBDV) vaccine constructed by mixing bursal disease antibody with IBDV. Avian Dis. 39:687-699. 1995.

12. van den Wijngaard, J-K, A. Avakian, C. Whitfill and E. Haddad. In ovo IBD vaccinations surpass conventional approach. World Poultry – Elsevier Special: Gumboro. pp. 16-17. 2001.

13. Winterfield, R. W. and H. L. Thacker. Immune response and pathogenicity of different strains of infectious bursal disease virus applied as vaccines. Avian Dis. 22:721-731. 1978.

14. Zhang, Y. and J. M. Sharma. Early posthatch protection against Marek's disease in chickens vaccinated in ovo with a CVI988 serotype 1 vaccine. Avian Dis. 45:639-645. 2001.



RE-EMERGENCE OF FOWL POX IN GERMANY

RESURGIMIENTO DE LA VIRUELA AVIAR EN ALEMANIA

Hafez, H.M., D. Lüscho, C. Prusas and T. Hoffmann

Institute of Poultry Diseases, Free University Berlin, Koserstr. 21, 14195 Berlin

RESUMEN

En las granjas avícolas de Alemania con sistemas de explotación intensiva no se ha visto la infección con el virus de la viruela aviar durante los últimos 25 años y no se ha utilizado ninguna vacuna. No obstante, en los últimos dos años se presentaron varios brotes de viruela primero en parvadas de postura mantenidas bajo un sistema de pastoreo libre, y después en parvadas de pollos y pavos bajo explotación convencional. El presente trabajo describe el diagnóstico y la posible aplicación de las herramientas biológicas moleculares para la caracterización de las cepas aisladas. Se realizaron las primeras investigaciones con enzimas de restricción sobre el producto de la reacción en cadena con polimerasa (PCR) usando las endonucleasas EcoRV y NlaIII. No se encontraron diferencias en los patrones de la ruptura causada por el tratamiento enzimático entre 11 cepas de campo de pollos y 2 cepas de campo de pavos.

Fowl pox is a disease of chickens and turkeys with a world-wide distribution. It has been responsible

for considerable economic problems to the poultry industry. Because of difference in management, hygiene and vaccination regime in different areas the incidence of this disease in commercial poultry is variable. In Europe the trend away from intensive rearing to alternative rearing has been increases remarkably and resulted in re-emerging of important poultry diseases of the past. In Germany infection with fowl poxvirus (FPV) have never been seen for the past 25 years in poultry farms with intensive rearing system and no vaccine was used. In the last two years several outbreaks of fowl pox were firstly observed in layer flocks kept free range rearing system (2,3). Thereafter further outbreaks were detected in broiler breeder flocks as well as in turkey breeder flocks. The birds exhibited nodular lesions on comb, wattles, eyelids, and at the corner of the mouth. In addition, diphtheritic lesions on mucous membrane of mouth and larynx were detected. The symptoms were accompanied with drop in egg production and increasing mortality. The mortality rates were 5.5% to 16%, within 8 weeks after the onset of clinical signs. The present paper describes

the diagnosis and the possible application of molecular biological tools for detection and characterization of the isolated strains.

In the present investigations tissues (cutaneous nodules on the head and/or cloacae) and mucous membrane lesions were used for virus isolation in embryonated chicken eggs (5) and for detection of FPV-DNA in polymerase chain reaction (4). Poxvirus was diagnosed in 13 poultry flocks. 7 of 13 pox positive samples were derived from layer, 4 from broiler breeders and 2 from turkey breeder flocks.

From 12 out 13 examined cases, poxvirus was isolated on the chorioallantoic membrane (CAM) of 11 days old SPF- embryonated chicken eggs. The isolated virus was identified using agar gel precipitation test (AGP) and / or electron microscopy (EM) examination of CAM. In one case, the isolation of the virus on CAM revealed negative result. However, electron microscopy examination of suspected lesions revealed positive results.

In addition, the diagnosis was verified using polymerase chain reaction. FPV-PCR was performed using specific primers describes by Lee and Lee (4). FPV specific DNA was detected in all 13 cases. Additionally, in 6 cases the PCR was performed directly from skin lesions and in 2 cases from trachea lesions. In all case positive results were obtained and confirmed by virus isolation.

The specificity of the FPV-DNA amplification was confirmed by restriction enzyme analysis. PCR-products were cleaved with restriction endonucleases EcoRV and NlaIII. Based on published FPV-DNA sequence data (1) both enzymes showed the expected cleavage patterns in the case of fowlpox virus. Furthermore no differences in cleavage patterns were identified between chickens and turkey isolates.

The results of the present study indicate the re-emerging of fowlpox in Germany, where infections

have never been recorded for the past 25 years. The diagnosis was carried out using conventional methods and confirmed by polymerase chain reaction. PCR seem to be a fast and sensitive technique for the routine diagnosis and direct detection of FPV specific DNA from the lesions. Further investigations by restriction enzyme analysis showed no differences in cleavage patterns; for this reason, it was not able to distinguish between fowl poxvirus and turkey poxvirus.

REFERENCES

1. Binns, M.M., M.E.G. Bournnell, F.M. Tomley, and J. Campbell. Analysis of the fowlpox virus gene encoding the 4b core polypeptide and demonstration that it possesses efficient promoter sequences. *Virology* 170: 288-291. 1989.
2. Hafez, H. M., A., Mazaheri and C. Prusas. Re-emerging of some infectious diseases in layer flocks kept alternative rearing systems. Proceedings of the 49th Western Poultry Diseases Conference, March 5-7, 2000. Sacramento, CA. USA. pp. 68-69.
3. Hafez, H.M., A. Mazaheri, C. Prusas, K., Böhland, M. Pöppel, and D.Schulze. Aktuelle Geflügelkrankheiten bei Legehennen im Zusammenhang mit alternativen Haltungssystemen. *Tierärztl. Prax.* 29: 168-174. 2001.
4. Lee, L.H. and K.H. Lee. Application of the polymerase chain reaction for the diagnosis of fowl poxvirus infection. *J. Virol. Methods* 63: 113-119. 1997.
5. Tripathy, D.N. and W.M. Reed. Pox. In: Swayne, D.E., Glisson, J.R., Jackwood, M.W. Pearson, J.E. and Reed, W.M. (eds.). A laboratory manual for the isolation and identification of avian pathogens, 4th ed. American Association of Avian Pathologists, Kennet Square, PA, 137-140. 1998.

FLUOROQUINOLONE USE IN POULTRY IN THE U.S.A. IMPACT ON PUBLIC HEALTH ?

EL USO DE LAS FLUOROQUINOLONAS EN LA INDUSTRIA AVÍCOLA ESTADOUNIDENSE – ¿IMPACTO SOBRE LA SALUD PÚBLICA?

B.J. Kelly, D. Copeland, M. Vaughn

Bayer Animal Health, 9009 W. 67th Street, Merriam, KS 66202

RESUMEN

En octubre de 2000, el Centro para la Medicina Veterinaria (CVM) entabló un Aviso de Oportunidad de Audiencia (NOOH) con la intención de retirar las fluoroquinolonas del mercado avícola. Las evidencias

de respaldo para esta acción fueron: 1) La información generada por una evaluación del riesgo patrocinada por el CVM, 2) La información publicada por Smith *et al.* (11) y 3) Un informe sobre la elevación en la incidencia de *Campylobacter* "R" en el Sistema

Nacional Estadounidense de Monitoreo de la Resistencia a los Antimicrobianos (NARMS) en seres humanos, de 1998 (13.1%) a 1999 (17.6%). Una profunda revisión de esta información, de las referencias pertinentes que aparecen en la literatura y la información publicada recientemente por Bayer Animal Health y expertos externos, demuestra que no hay un riesgo identificable para la salud pública asociado con el uso de las fluoroquinolonas en aves desde finales de 1995 hasta la fecha. De hecho, la revisión de toda la información disponible sugiere que existen otros factores de mayor importancia conducentes a la ocurrencia de *Campylobacter* resistente a las fluoroquinolonas entre las personas, en Estados Unidos, y que las aves no contribuyen más que otros tipos de carnes o alimentos.

SUMMARY

In October of 2000, the Food and Drug Administration's (FDA) Center for Veterinary Medicine (CVM) filed a Notice of Opportunity for Hearing (NOOH) with the intent to remove fluoroquinolones (FQ's) from the market for use in poultry. The underlying premise of the NOOH was that use of FQ's in poultry resulted in the selection for and transfer of FQ resistant *Campylobacter jejuni* (Campy) from poultry live operations onto processed poultry products which, if improperly cooked or handled, could result in FQ resistant Campy infections in people. These infections might not respond to FQ therapy (if a FQ was chosen for therapy) thereby resulting in an adverse outcome to the treatment. An adverse outcome was considered to be an additional two days of diarrhea symptoms in persons for whom all these conditions were met (9). The supporting evidence for this action was; 1) information generated from a CVM sponsored risk assessment, 2) information reported by Smith et al. (12), and 3) a rise in the occurrence of resistant *Campylobacter* in people from 1998 (13.1%) to 1999 (17.6%) as reported by the National Antimicrobial Resistance Monitoring System (NARMS) (2, Table 1). An in depth review of this information, relevant literature, and newly released data by the U.S. government, along with evaluations conducted by independent experts, demonstrate no identifiable risk to public health associated with the use of fluoroquinolones in poultry. In fact, the review of all available information suggests that there are other major drivers of FQ resistant Campy occurrence in people in the U.S. and that poultry is no more a contributor than other meat or food types. Therefore, the removal of FQ's for use in poultry would have no measurable impact on the occurrence of FQ resistant Campy infections in people in the US. However, such action would deny veterinarians use of the most effective compound available to reduce suffering and

death in poultry, and would hinder their ability to assure that healthy animals enter the food supply.

OVERVIEW

Temporal trends in the U.S. relating Campy resistance in people to that in poultry are incomplete but suggest that there is no relationship. Fluoroquinolones were first approved for use in poultry in late 1995. The NARMS program did not begin to collect Campy data until 1997 so there is no valid baseline for comparison of resistance levels prior to FQ use in poultry. FQ's have been approved for use in people since the mid-1980's. Resistance levels in human isolates of 12% were reported as early as 1992-1995 in Wisconsin by Kiehlbauch (8) and approximately 6% resistance was seen in Minnesota residents in late 1995 (12). These levels of resistance are not surprising since it has been established in the literature that use of FQ's in people (1) or poultry (6) who are colonized with Campy can select for clones with reduced susceptibility. This is due to the fact that a single point mutation can occur in Campy resulting in reduced susceptibility. Other enterobacteriaceae require several mutational events to confer reduced susceptibility or resistance. Comparing the most current 2000 NARMS data with yearly data starting in 1997 demonstrates no significant difference between years by Chi-squared analysis (P 0.11) (Table 1). This provides strong evidence that the 1999 data point does not represent a trend of increasing resistance and verifies no impact on human resistant Campy infections during the first four years of FQ use in poultry. The NARMS data for poultry during this same period show that the level of resistant Campy has remained low and stable at around 10% (13,14, Table 1). Most importantly, based on a study of Minnesota residents, (12) it is estimated that 70% of all resistant Campy infections are related to travel outside the U.S. or to prior use of a FQ. The reported human NARMS data remain unadjusted for these major risk factors and, therefore, do not reflect the rate of domestically acquired resistant infection.

It is also instructive to note that the rate of increase in FQ resistant Campy in Minnesota residents that began prior to the approval of FQs for poultry did not change after approval (12) and more recently has, in fact, actually started to decline (10). If chicken were the main driver of human Campy infections (both susceptible and resistant) then, with chicken consumption increasing at the annual rate of 2.5%, it would be logical to conclude that the Campy occurrence rate in the U.S. would be increasing. The Centers for Disease Control and Prevention (CDC) data bear significantly on this point. For the fourth year in a row, the incidence of human Campy infection has dropped. In 1997 the occurrence rate was 24.7/100,000

and in 2000 it was 15.7/100,000 (2, Table 1). This represents a 36% reduction in human Campy infections. Food Safety and Inspection Service (FSIS) data also corroborate this conclusion. They report that both prevalence of carcass contamination and Campy CFU per carcass are decreasing (5, Table 1).

Recent large scale case-control studies conducted by CDC indicate that chicken or poultry meat eaten outside the home carry no greater risk than any other meat with regard to Campy infection (4). The risk of Campy infections appears to be associated with the restaurant and not the meat. Interestingly, chicken or poultry meat consumed inside the home shows no risk for Campy occurrence (4). Approximately half of the chicken consumed in the U.S. is prepared and eaten at home. Friedman et.al.(4) are the first to suggest that fast and slow food restaurants may play an important role in disseminating Campy infections among people. Their findings are important because they define vastly reduced risk associated with poultry cooked in the home versus outside the home (Odds Ratio 0.5 vs 2.4). They also reaffirm the large risk associated with foreign travel and describe a much lower Campy risk associated with poultry than do previous studies. The CVM risk assessment does not take into account these recent studies on Campy and it greatly overestimates the likely contribution of chicken to the overall incidence of Campy in people. Even if these exaggerated assumptions were correct, the risk the FDA accepts for bottled drinking water would be greater than that estimated for fluoroquinolone use in poultry.

The apparent minor role of chicken in the transmission of resistant Campy can be explained by the sequential chain of events that must occur for an infection to result. For example, retail store surveys estimate that 20% of poultry products may contain resistant Campy ($P=0.2$) (14), while molecular genotyping studies estimate that about 20% of the Campy that colonize birds are also able to colonize humans ($P=0.2$) (3). If the two events are independent, the probability of a chicken origin resistant infection in people is $0.2 \times 0.2 = 0.04$. Additionally, the literature establishes that a threshold dose of Campy required to cause patent infection is about 300 - 500 organisms. Recent FSIS data suggest that most freshly processed poultry are at, or below, this threshold level (5), and typical cooking is estimated to reduce the pathogen load by 99.99%. This makes the overall chance that a chicken origin, FQ resistant organism will be responsible for infection a remote one.

It is interesting to note that even in the face of FQ "resistant" infections, it has been reported that 38 out of 39 patients responded successfully to FQ treatment (12). Macrolide antibiotics such as erythromycin and

azithromycin remain the drugs of choice for known Campy infections in many parts of the world.

CONCLUSION

There are no current data which suggest that poultry is the predominate or even a significant source of FQ resistant Campy infections in people in the U.S. Although it is clear that FQ resistant Campy can be selected for in the poultry grow out environment, the low selective pressures due to infrequent and prudent use in conjunction with decreasing carcass contamination rates, appear to result in no detectable effects on Campy resistance in people. Most of the occurrence is clearly related to foreign travel and prior use of FQ's. The influence of other factors such as contamination of foods by infected people, contamination of surface waters, streams and reservoirs as well as the roll of domestic pets are unknown and should be further investigated. It is also apparent that typical Odds Ratios for Campy risk associated with poultry in previous studies are incorrect and no longer pertinent in the modern HACCP Food Safety era.

REFERENCES

1. Adler-Mosca, H. and M. Altwegg. 1991. Fluoroquinolone resistance in *Campylobacter jejuni* and *Campylobacter coli* isolated from human faeces in Switzerland. J. Infect. 23:341-342.
2. Anonymous. CDC Online, "NARMS". Located on the CDC website at: <http://www.cdc.gov/narms>
3. Clow, K., S. F. Park, P.R. Hawtin and D. G. Newell. 1998. The genotypic comparison of *Campylobacter jejuni* strains from humans and poultry. Cost Action 97 Pathogenic micro-organism in poultry and eggs. No. 4. Development of monitoring procedures, rapid detection methods and techniques. Molecular epidemiology of campylobacter and salmonella. (eds.) A. Aspan and R.W.A.W. Mulder. European Commission, Brussels, p. 25-31.
4. Friedman, C., S. Reddy, M. Samuel, R. Marcus, J. Bender, S. Desai, B. Shiferaw, D. Helfrick, M. Carter, B. Anderson, M. Hoekstra and the EIP FoodNet Working Group. 2000. Risk factors for sporadic *Campylobacter* infections in the United States: a case-controlled study in FoodNet sites, p. 149-150. Second International Conference on Emerging Infectious Diseases, Atlanta, GA.
5. Food Safety & Inspection Service. November, 2000. Personal communication.
6. Jacobs-Reitsma, W., Kan. C., and Bolder, N. The Induction of Quinolone Resistance in *Campylobacter* Bacteria in Broilers by Quinolone Treatment. Letters in App Micro. 1994. 19:228-231.
7. Eating chicken or turkey outside the home associated with domestically acquired fluoroquinolone-

resistant *Campylobacter* infections: a FoodNet case control study, p. 150-151. Second International Conference on Emerging Infectious Diseases, Atlanta, GA.

8. Kiehlbauch, J. A., M. H. Simon and J. M. Makowski. 1996. Use of filtration to isolate *Campylobacter* and related organisms from stools, p. 47-49. In D. G. Newell, J. M. Ketley and R. A. Feldman (eds.), *Campylobacters, Helicobacters, and Related Organisms*. Plenum Press, New York, NY.

9. Marano, N., D. Vugia, T. Fiorentino, S. Segler, M. Carter, H. Kassenborg, K. Smith, S. Zansky, K. Hollinger, F. Angulo, and the EIP FoodNet Working Group. 2000. Fluoroquinolone resistant *Campylobacter* causes longer duration of diarrhea than fluoroquinolone susceptible *Campylobacter* strains in FoodNet sites. Second International Conference on Emerging Infectious Diseases, Atlanta, GA.

10. Minnesota Dept. of Public Health. Website; www.health.state.mn.us. Antimicrobial susceptibilities of selected pathogens; 2000, 1999 & 1998.

11. Piddock, L. J. V.. 1999. Implications for human health. *J. Antimicrob. Chemother.* 44 (Suppl. A).

12. Smith, K. E., J. M. Besser, C. W. Hedberg, F. T. Leano, J. B. Bender, J. H. Wicklund, B. P. Johnson, K. A. Moore, M. T. Osterholm and the Investigation Team. 1999. Quinolone-resistant *Campylobacter jejuni* infections in Minnesota, 1992-1998. *New England J. Med.* 340:1525-1532.

13. U.S. Department of Agriculture, Agricultural Research Service. 1998. Preliminary data: NARMS National antimicrobial resistance monitoring system: enteric bacteria-animal *Campylobacter* isolate report. Athens, GA.

14. U.S. Department of Agriculture, Agricultural Research Service. 2000. Preliminary data: NARMS National antimicrobial resistance monitoring system: enteric bacteria-animal *Campylobacter* isolate report. Athens, GA..

Table 1. Important figures on Campy occurrences

Year	Human Cases per 100,000	Human "R" Campy %	Poultry "R" Campy %	FSIS Carcass Prevalence/CFU
1996 or before	23.5			88%/21mpn in carcass wash
1997	24.7	12.9		
1998	21.4**	13.1	9.4	
1999	17.3**	17.6	9.3	
2000	15.7	14.3*	10.4	82%/5mpn in carcass wash

*preliminary data

**original 5 Food Net sites

DARKLING BEETLE [*ALPHITOBIUS DIAPERINUS PANZER* (COLEOPTERA: TENEBRIONIDAE)] CONTROL IN AUSTRALIAN BROILERS—ENHANCING FOOD SAFETY

CONTROL DEL ESCARABAJO NEGRO (*ALPHITOBIUS DIAPERINUS PANZER* [COLEOPTERA: TENEBRIONIDAE]) EN POLLOS DE ENGORDA AUSTRALIANOS: FAVORECIENDO LA SEGURIDAD ALIMENTARIA

Trevor Anthony Lambkin and Damien Aaron Cupitt

Entomology Building, Queensland Department of Primary Industries, 80 Meiers Road, Indooroopilly, Qld 4068 Australia, Email: Trevor.Lambkin@dpi.qld.gov.au

RESUMEN

Disertaremos sobre el estado de la plaga por *Alphitobius diaperinus* y las enfermedades con él asociadas en los sistemas de pollo de engorda en Australia. Se observó que el piretroide ciflutrín tiene

poco o ningún efecto sobre el control de las poblaciones subterráneas del escarabajo que se ocultan en los pisos de arcilla después de limpiar las casetas, y que este insecticida no inhibió la reinfestación de la cama nueva con el citado escarabajo. Se registraron

poblaciones de aproximadamente 10 adultos vivos por litro de arcilla en estos pisos debajo de los comederos y bebederos después de haber aplicado el insecticida.

INTRODUCTION

The darkling or black beetle, *Alphitobius diaperinus* (Panzer) is a common cosmopolitan insect pest of poultry houses, in particular broiler sheds and egg barns (22, 27, 29). The species is believed to originate in tropical east Africa (2) and occurs naturally in bird and bat nests where it feeds on droppings and animal parts such as feathers and carcasses (1, 13, 21). Because of its natural association with animals, in particular birds, this tropical species is well suited to the warm humid conditions that occur in heated or insulated poultry sheds and other intensive livestock houses. It is also known to occur in animal feeds within these systems (26). Despite *A. diaperinus* being a common and ubiquitous poultry farm insect in Australia (16), no Australian research has previously been undertaken to determine the pest's abundance, behaviour, insecticide resistance and control. We commenced a research project in 1998 to investigate the pest in Australian broiler systems. These investigations have concentrated on determining and quantifying insecticide resistance in farm populations, determining the efficacy *in situ* of a registered pyrethroid (cyfluthrin WP), studying the distribution of beetle populations in a range of broiler shed types and trialing novel control strategies. In this paper we discuss the pest's status and disease association, report on the efficacy of cyfluthrin WP in tunnel-ventilated and conventional clay-floored broiler sheds, and outline potential strategies for the management of *A. diaperinus*.

PEST STATUS

Skewes and Munroe (1991) (25) believed that production losses from *A. diaperinus* infestations were difficult to recognise. Despite this, the US (23) and Australian chicken meat industries have identified the main issues associated with beetle infestations to be threats to the production of safe food and the reduction of production costs. More specifically in Australia these issues are:

- *Farm hygiene, biosecurity and consumer welfare-* *A. diaperinus* is a vector of a range of avian diseases and is a bio-security risk on farms, and for the production of safe food. As well, disposal of bio-secure litter and its use for horticulture is an important environmental issue.

- *Traditional control has been with insecticides-* *A. diaperinus* has developed high resistance to fenitrothion in some areas of Australia and is known to already have some resistance to cyfluthrin. Alternatives to insecticide control are

preferred to further ensure safe food production and disposal of environmentally friendly litter.

- *Damage to shed structure from tunnelling larvae and adults-* When pest numbers are high, adults and larvae of *A. diaperinus* tunnel into shed structures and cause damage, particularly to the compacted clay floors of sheds.

In the US, concerns are similar, with disease losses (9), feed inefficiency (23), poultry house and insulation damage (11), and environmental hazards (14) being the most important.

DISEASE ASSOCIATION

All stages of *A. diaperinus* act as reservoirs or external carriers for a number of avian diseases and parasites. The pest is known to transmit acute leucosis (9, 17), Marek's (24), infectious bursal disease [Gumboro] (19), enteritis [enterovirus and rotavirus] (8, 12), *Salmonella* spp and *Escherichia coli* bacteria (7, 5, 6, 12, 18, 20), coronavirus (28) and fungi spp (5). *A. diaperinus* is also an intermediate host for the tapeworms *Choanotaenia infundibulum* and *Raillietina resticulus* (3, 10), and the protozoan *Eimeria* sp. that causes intestinal coccidiosis (12). The pest is also a low-level transmitter of Newcastle disease and fowl-pox virus (4).

PYRETHROID EFFICACY STUDY

For some time the Australian broiler industry has suspected that, in clay-floored broiler sheds re-infestations of new litter by *A. diaperinus* mainly originate from the pest harbouring in clay floors. It has also suspected that the larval stage burrows into clay floors only when mature, just prior to pupation. These suspicions have led industry to question the efficacy of cyfluthrin WP in controlling subterranean populations.

Materials and Methods. We conducted a study to determine the efficacy of cyfluthrin WP in controlling populations below ground by comparing the life-stage profiles of *A. diaperinus* and their mortalities in clay floors before and after insecticide application in brooder sections of six clay-floored broiler sheds ie three conventional and three tunnel-ventilated. Because *A. diaperinus* varies in its resistance to cyfluthrin (15), the insecticide character of pest populations was determined by screening each with a cyfluthrin discriminating dose [D dose](15). Only populations with similar cyfluthrin resistances were chosen for the study. Core clay samples were collected and all beetle life-stages, dead and alive, before and after applications were counted and mortalities before and after were compared to determine any insecticide efficacy. Two transects were made within the brooder sections across the width of the sheds and sample points were under feeder and drinker lines that these transects crossed. Because

anecdotal evidence suggested that higher beetle numbers occurred in these areas, this was used to select transect and sample point positions.

Sampling was undertaken in each shed at the end of a batch before litter removal and again after clean-out and insecticide application, before introducing the new brood. Two core samples were collected from under each feeder and drinker ie in total per shed 16 under drinkers and 8 under feeders. Core samples of 0.86L ie 75mm diameter, 200mm deep were collected with a motorised auger. *A. diaperinus* stages from larvae to adult were counted and mortality of each life-stage was recorded. Therefore in total 124 core samples were collected from the brooder sections of six clay-floored broiler sheds that had pest populations with roughly equal cyfluthrin resistance. Results from all samples before and after insecticide applications were combined and mean numbers of alive and dead of the four stages collected ie larvae, pre-pupae, pupae and adults were determined (see Table).

Results and Discussion. For cyfluthrin to have effect on populations in the clay, it was expected that mortality of all stages of *A. diaperinus* would rise significantly after insecticide application. The data (see Table) indicates the contrary, with no significant increase in mortality after insecticide application. The results also indicate that all stages from larvae to adults occur in the clay floors. Furthermore the life-stage profiles of live insects before and after insecticide application indicate that between sample dates, development from larvae through to adults progressed unhindered despite applications of insecticide. Approximately 10 days after litter removal almost all immature stages that had been below ground developed to adults, indicating that larvae present were mostly penultimate ie mature and ready to pupate. As well, the total number of all stages (21.11 insects) before removing litter and spraying was larger than after (10.73 insects). These data strongly suggest that removal of old litter removes all stages, and no further larvae enter the clay floor. By the second sample date almost all immature stages had developed through to adults and had most likely emigrated out of the clay floor into the new litter. Recent measurements of brooder clay temperatures in Queensland broiler sheds have indicated that temperatures stay relatively constant at around 30°C (Lambkin and Cupitt: research in progress). At this temperature, it is known that penultimate larvae develop through to adults in less than 10 days (30). The results from our studies correlated positively with this (30) and indicated that almost all immature stages had developed to adults over the study period. This strongly suggested that only larvae close to pupation had entered the clay floors.

In summary, the analyses of these data suggest that cyfluthrin has little or no effect on *A. diaperinus* in

broiler shed clay floors between clean-outs. Also, applying the insecticide on the ground does not inhibit development below ground or the emigration of newly emerged adults out of the clay into new litter. Furthermore, the analyses suggests that the feeding stages of the pest's life cycle are found only above ground in litter, and larvae only enter clay floors to pupate. Also alarming is the substantially large population of approximately 10 live adult *A. diaperinus* per litre of clay that survives underground under drinkers and feeders after insecticide application of clay floors. These insects would readily infest new litter.

CONCLUSIONS

The ecology of *A. diaperinus* and its ability to vector avian pathogens and parasites makes its control high priority attempting to maintain broiler farm hygiene and bio-security. The ineffectiveness of cyfluthrin WP as described, questions its continued use. This research data suggest that applications of cyfluthrin WP in eastern Australian broiler sheds do little to prevent infestations of new litter from previous batches. Furthermore, moderate levels of cyfluthrin resistance already in some populations in southeast Queensland indicate that continued applications of cyfluthrin will increase resistance. In our current project using the same sampling methodology we are determining the spatial and temporal variability and distribution of the pest in a range of Australian broiler shed types. These studies will provide baseline data of pest numbers and distributions in clay and concrete floored conventional and tunnel-ventilated broiler sheds. As well, we are laboratory trialing a diatomaceous earth and re-looking at a borate formulation as potential litter treatments. In summary our research is aimed at defining the parameters that control *A. diaperinus*, developing more strategic, efficient and responsible uses for existing insecticides and trialing non-insecticide control methods.

ACKNOWLEDGEMENTS

We thank the chicken meat growers of Queensland and New South Wales for their cooperation during our field studies. Financial assistance was provided by the Rural Industries Research and Development Cooperation, and the Farming Systems Institute and Intensive Livestock Industries of the Queensland Department of Primary Industries.

REFERENCES

1. Arshad, M., G.A. Jan, and A. Khattack. Insect fauna of birds' nests of N.W.F.P. Bulletin of Zoology Pakistan, 2: 1-7. 1984.

2. Bayer. Understanding the darkling beetle (*Alphitobius diaperinus*). Bayer Poultry Technical Bulletin. 1995.
3. Case, A.A., and J.E. Ackert. New intermediate hosts of fowl cestodes. Kansas Academy of Science, 43: 393-396. 1940.
4. De Las Casas, E., P.K. Harein, D.R. Deshmukh, and B.S. Pomeroy. Relationship between the lesser mealworm, fowl pox, and Newcastle disease virus in poultry. Journal of Economic Entomology, 69: 775-779. 1976.
5. De Las Cases, E., P.K. Harien and B.S. Pomeroy. Bacteria and fungi within the lesser mealworm collected from poultry brooder houses. Entomops 1, 27-30. 1972.
6. De Las Casas, E., P.K. Harein, M.D. York, and B.S. Pomeroy. *Escherichia coli* serotypes isolated from within the lesser mealworm and evaluated for virulence. Annals of the Entomological Society of America, 67(6): 967-970. 1974.
7. De Las Casas, E., B.S. Pomeroy, and P.K. Harein. Infection and quantitative recovery of *Salmonella typhimurium* and *Escherichia coli* from within the lesser mealworm, *Alphitobius diaperinus* (Panzer). Poultry Science, 47: 1871-1875. 1968.
8. Despins, J.L., R.C. Axtell, D.V. Rives, J.S. Guy, and M.D. Ficken. Transmission of enteric pathogens of turkeys by darkling beetle larva (*Alphitobius diaperinus*). Journal of Applied Poultry Research, 3(1): 61-65. 1994.
9. Eidson, C.S., S.C. Schmittle, J.B. Lal, and R.B. Goode. Role of the darkling beetle. Poultry Science, 44: 1366-1367. 1965.
10. Elowni, E.E. and S. Elbihari. Natural and experimental infection of the beetle, *Alphitobius diaperinus* (Coleoptera: Tenebrionidae) with *Choanotaenia infundibulum* and other chicken tapeworms. Veterinary Science Communications, 3: 171-173. 1979.
11. Geden, C.J., and R.C. Axtell. Factors affecting climbing and tunneling behavior of the lesser mealworm (Coleoptera: Tenebrionidae). Journal of Economic Entomology, 80(6): 1197-1204. 1987.
12. Goodwin, M.A. and W.D. Waltman. Transmission of *Emeria*, viruses, and bacteria to chicks: Darkling beetles (*Alphitobius diaperinus*) as vectors of pathogens. Journal of Applied Poultry Research, 5(1) 51-55. 1996.
13. Hicks EA. Check-list and bibliography on the occurrence of insects in birds' nests. The Iowa State College Press, Iowa. 682 pages. 1959.
14. Jerrard, P.C., and K.B. Wildey. Beetle plague from deep pit muck spreading. Poultry World, 131: 20-21. 1980.
15. Lambkin, T.A. Investigations into the management of the darkling beetle. A report for the Rural Industries Research and Development Corporation. RIRDC, publication number 01/151 Online. 2001.
16. Lambkin, T.A. and M.C. Cameron. Darkling beetle control, current difficulties and future prospects. Proceedings from the 11th Australian Poultry and Feed Convention. 10-13 October 1999 Gold Coast, Queensland. 184-192. 1999.
17. Lancaster, J.L. Jnr. and J.S. Simco. Biology of the lesser mealworm, a suspected reservoir of avian leucosis. Arkansas Experiment Station, Series 159: 12pp. 1967.
18. McAllister, J.C., C.D. Steelman, and J.K. Skeeles. Reservoir competence of the lesser mealworm (Coleoptera: Tenebrionidae) for *Salmonella typhimurium* (Eubacteriales: Enterobacteriaceae). Journal of Medical Entomology, 31(3): 369-372. 1994.
19. McAllister, J.C., C.D. Steelman, L.A. Newberry, and J.K. Skeeles. Isolation of infectious bursal disease virus from the lesser mealworm, *Alphitobius diaperinus* (Panzer). Poultry Science 74, 45-49. 1995.
20. McAllister, J.C., C.D. Steelman, J.K. Skeeles, L.A. Newberry, and E.E. Gbur. Reservoir competence of *Alphitobius diaperinus* (Coleoptera: Tenebrionidae) for *Escherichia coli* (Eubacteriales: Enterobacteriaceae). Journal of Medical Entomology, 33(6): 983-987. 1996.
21. McFarlane, J.A. The carnivorous beetles of the Ithunda caves, Kenya. Studies of Speleology, 2:149-158. 1971.
22. Pfeiffer, D.G. and R.C. Axtell. Coleoptera of poultry manure in caged layer houses in North Carolina. Environmental Entomology, 9: 21-28. 1980.
23. Scarborough, A. How to deal with darkling beetles. Broiler Industry, 48-49. 1988.
24. Schmittle, S.C. Leukosis – New or changed disease? Poultry Tribune, 72: 32-34. 1966.
25. Skewes, P.A. and J.L. Munroe. Research note: The effects of darkling beetles on broiler performance. Poultry Science, 70: 1034-1036. 1991.
26. Smith, L.B. Occurrence of the depressed flour beetle, *Palorus subdepressus* (Coleoptera: Tenebrionidae), in Canada. Canadian Entomologist, 107(1): 109. 1975.
27. Turner, E.C. Jnr. Structural and litter peats. Poultry Science, 65(4): 644-648. 1986.
28. Watson, D.W., J.S. Guy, and S.M. Stringham. Limited transmission of turkey coronavirus in young turkeys by adult *Alphitobius diaperinus* (Coleoptera: Tenebrionidae). Journal of Medical Entomology, 37(3): 480-483. 2000.
29. Weaver, J.E. and V.A. Kondo. Laboratory evaluation on insect growth regulators in producing lesser mealworm mortality and egg infertility. Journal of Agricultural Entomology, 4(3): 233-245. 1987.

30. Wilson, T.H., and F.D. Miner. Influence of temperature on development of the lesser mealworm

Alphitobius diaperinus. Journal of the Kansas Entomological Society 42, 294-303. 1969.

Table 1. Mean numbers (n=124) of *A. diaperinus* per litre of clay collected from under feeders and drinkers from six clay-floored broiler sheds (3 tunnel-ventilated and 3 conventional) before and after cyfluthrin WP application (mean time between sampling was 10.3 days)

Life stage	Before cyfluthrin WP application		After cyfluthrin WP application	
	Number dead/L	Number alive/L	Number dead/L	Number alive/L
Larvae	0.79	7.21	0.18	0.36
Pre-pupae	0.38	2.08	0.14	0.17
Pupae	1.29	1.57	1.22	0.92
Adults	3.48	10.25	5.13	9.28
Totals (all stages)	5.94	21.11	6.67	10.73

LOW LEVELS OF ELECTRON BEAM IRRADIATION IMPROVE POULTRY MEAT SAFETY BUT ALTER MEAT QUALITY

LA RADIACIÓN CON UN HAZ DE ELECTRONES DE BAJO NIVEL MEJORA LA SEGURIDAD DE LA CARNE DE AVE PERO MODIFICA SU CALIDAD

S. R. McKee and S. J Lewis

Department of Food Science and Technology, University of Nebraska-Lincoln, Lincoln, NE 68583-0919

RESUMEN

La radiación con un haz de electrones es una herramienta para reducir los patógenos de origen alimentario. Debido a que se ha demostrado que esta radiación incrementa la oxidación de los lípidos, es importante observar tanto la seguridad como la calidad de los alimentos radiados. Nosotros evaluamos el efecto de 2 dosis de radiación (1.0 y 1.8 KGY) sobre la calidad y la seguridad de la carne de pechuga. La radiación se aplicó a los paquetes de 4 filetes de pechuga y fue suficiente para destruir a todos los patógenos. Los grupos de clientes que participaron como catadores sugirieron que la carne de ave recién irradiada no era diferente de los testigos, pero la carne que se irradió, se congeló y se almacenó durante 14 ó 28 días recibió menores calificaciones de sabor, textura y aceptación general.

Irradiation is known to be an effective means of destroying food-borne pathogens in food product. However, depending on the type of irradiation and dose level applied, food quality characteristics can be negatively impacted. The purpose of this study was to determine the effect of electron beam irradiation at 1.0 and 1.8 KGY on the safety and quality of packaged boneless, skinless poultry breast. Packaged breast fillets in groups of 10 were irradiated at 1.0 KGY and 1.8 KGY and 10 packages were maintained as a non-

irradiated control group. Four breast fillets in a covered/polystyrene tray constituted one sample. The experiment was conducted in triplicate. Packages were sampled after storage for 0, 14, and 28 days at 0° C. Microbial evaluation included sampling for *Salmonella*, *Campylobacter*, aerobic populations, coliforms, psychrotrophs, and generic *E. coli*. Evaluation of product quality was determined using consumer taste panels and degree of lipid oxidation as determined by TBAR analysis. Irradiation at 1.0 and 1.8 KGY effectively destroyed all bacteria except for aerobic populations. However, aerobic populations in both the 1.0 and 1.8 KGY treatments were significantly reduced compared to non-irradiated control samples. Sensory panel results indicated that at day 0 there were no differences in any of the quality attributes tested between the control and irradiated samples. By day 14, panelists ranked texture and flavor slightly lower in both irradiated groups compared to controls. By day 28, irradiated treatment groups were ranked less desirable for flavor, texture, and overall acceptability. Lipid oxidation increased with both storage time and level of irradiation. The increase in lipid oxidation was likely associated with the decrease in flavor rankings in the taste panel.

(Present research will be published as a full-length article in *Poultry Science*).

EL CODEX, SEGURIDAD ALIMENTARIA, Y EL COMERCIO INTERNACIONAL

THE CODEX ALIMENTARIUS, FOOD SAFETY, AND INTERNATIONAL TRADE

Raul J. Guerrero, D.V.M., M.S.

Elanco Animal Health, 2001 West Main Street, Greenfield, Indiana 46140-USA

SUMMARY

Codex Alimentarius is an international organization that in recent years has become very important since its decisions and recommendations are taken as a reference by the World Trade Organization in the solution of international food trade litigation procedures. One hundred and sixty five countries are innate Codex members, and they dictate internationally used standards, directions, and norms to protect human health, and to assure faithful practices in the trade of foods. It is in the best interest of developing countries being represented in the Codex meetings, for them to express their opinions and to aid in the decision-making process, on the basis of scientific criteria that reflect countries' will to produce larger amounts of quality, non-hazardous, affordable, nutritious foods

Son miembros natos del Codex 165 países que determinan estándares, directrices y normas de uso internacional para proteger la salud humana y asegurar prácticas leales en el comercio de alimentos.

Es importante para los países en desarrollo estar representados en las reuniones del Codex para poder expresar su opinión y ayudar a la toma de decisiones basadas en criterios científicos que reflejen la voluntad de los países de producir mayor cantidad de alimentos nutritivos, de buena calidad, que no representen un peligro para la salud humana y que estén al alcance de la economía de la población.

El Codex Alimentarius es una organización intergubernamental establecida en 1962, que tiene el soporte directo de la Organización Mundial de Agricultura y Alimentación (FAO) y la Organización Mundial de la Salud (OMS). El Codex fue creado con la finalidad principal de tener un organismo internacional que establezca normas y estándares internacionales en alimentos, a fin de proteger la salud de la población y facilitar el comercio internacional de alimentos.

El número de miembros natos del Codex con voz y voto es de 165 países miembros de las Naciones Unidas y más de 125 organizaciones internacionales gubernamentales y no gubernamentales que participan como observadores, con voz y sin voto.

La importancia del Codex radica en que los estándares establecidos por este grupo son considerados por los países miembros pudiendo ser incorporados en sus legislaciones locales. De igual manera la Organización Mundial de Comercio (OMC) reconoce las normas y estándares establecidos en Codex para dirimir casos de disputas internacionales en comercio de alimentos. Debido a este último hecho es que en años recientes las decisiones del Codex se han convertido en asuntos de suma importancia para prevenir posibles confrontaciones de países importadores y exportadores de alimentos. Por esta razón es sumamente importante que tanto el sector oficial como el de las industrias privadas de cada país estén representados en las reuniones de los diferentes comités del Codex para asegurar que los puntos de vista e intereses del país sean considerados en la toma de decisiones en el ámbito del Codex.

Las decisiones en Codex se toman por consenso por lo cual es necesario que los delegados manifiesten la opinión de su país durante las discusiones, para ayudar a formar consenso, particularmente en casos de asuntos que son controversiales. La delegación que no manifiesta su posición no es tomada en cuenta para establecer consenso y tomar decisiones.

Desde hace pocos años en que la OMC designa al Codex como una de las organizaciones de referencia, las discusiones y toma de decisiones en Codex se han vuelto muy importantes por ser posibles puntos de consulta para la resolución de futuros problemas de comercio internacional de alimentos.

El proceso para la adopción de estándares tiene 8 pasos establecidos y dependiendo de la naturaleza del producto en cuestión, puede demorar 4 años o más.

La Comisión del Codex es el ente máximo del Codex y se reúne cada dos años alternando entre Roma y Ginebra para considerar en estas reuniones la adopción de normas, directrices y estándares propuestos por los diferentes comités. El Codex considera criterios objetivos con fundamento científico como base para la toma de sus decisiones, aunque muchas veces se pretenden introducir intereses políticos y económicos que interfieren y entorpecen el proceso del Codex.

El Codex funciona sobre la base de Comites por materia o producto, 13 de los cuales son muy activos;

sus recomendaciones son consideradas en la Comisión del Codex para su adopción en el sistema del Codex.

CHARACTERIZATION OF ANTIBIOTIC RESISTANCE OF *CAMPYLOBACTER* ISOLATED FROM RETAIL POULTRY MEATS

CARACTERIZACIÓN DE LA RESISTENCIA A LOS ANTIBIÓTICOS DE AISLAMIENTOS DE *CAMPYLOBACTER* DE CARNE DE AVE PARA VENTA AL MENEDEO

B. Ge², J. Meng², D. G. White¹, P. F. McDermott¹, R. D. Walker¹, and S. Zhao^{1*}

¹Division of Animal and Food Microbiology / Office of Research, Center for Veterinary Medicine, Food & Drug Administration, Laurel, MD 20708; ²Department of Nutrition and Food Science, University of Maryland, College Park, MD 20742

RESUMEN

Se obtuvieron aislamientos de *Campylobacter* (191 de *C. jejuni*, 147 de *C. coli* y 31 de otras especies del mismo género) a partir de canales crudas de pollo y pechugas de pavo, usando el método de dilución en agar, determinando su resistencia a 7 agentes antimicrobianos, a saber: cloranfenicol, ciprofloxacina, doxiciclina, eritromicina, gentamicina, ácido nalidíxico y tetraciclina. La resistencia más común entre estos aislamientos de *Campylobacter* fue a la tetraciclina (75.9%), seguida de la doxiciclina (72.8%), la eritromicina (43.7%), el ácido nalidíxico (33.1%) y la ciprofloxacina (28.8%). No se demostró resistencia de ninguno de los aislamientos a la gentamicina. *C. coli* mostró tasas de resistencia mayores a la eritromicina, la ciprofloxacina y el ácido nalidíxico que *C. jejuni* ($P < 0.05$) y, asimismo, los aislamientos procedentes de pavo mostraron tasas de resistencia significativamente mayores ($P < 0.05$) que los aislamientos de pollo, a todos los agentes antimicrobianos probados, excepto a la gentamicina. Este estudio mostró que los aislamientos de *Campylobacter* resistentes a los antimicrobianos usados para el tratamiento de la infección por *Campylobacter* en humanos son comunes en las carnes de ave para venta al menudeo.

ABSTRACT

Campylobacter is the most common cause of bacterial gastroenteritis in the United States, mainly transmitted through food. Resistance to antimicrobials used for the treatment of campylobacteriosis has increased. The present study investigated antimicrobial resistance among *Campylobacter* isolates recovered from retail raw meats from 1999-2000 in the Greater Washington Area. All 369 *Campylobacter* isolates (191 *C. jejuni*, 147 *C. coli*, and 31 other *Campylobacter*), from retail raw chicken carcasses and turkey breasts, were determined using agar dilution

method to seven antimicrobial agents: chloramphenicol, ciprofloxacin, doxycycline, erythromycin, gentamicin, nalidixic acid, and tetracycline. The most common resistance among the *Campylobacter* isolates was to tetracycline (76%), followed by doxycycline (73%), erythromycin (44%), nalidixic acid (33%), and ciprofloxacin (29%). Two *C. coli* from turkey were resistant to chloramphenicol. None of the isolates demonstrated resistance to gentamicin. *C. coli* exhibited higher resistant rates to erythromycin, ciprofloxacin, and nalidixic acid than *C. jejuni* ($p < 0.05$), and isolates from turkey also showed significantly higher resistant rates ($p < 0.05$) than isolates from chicken to all the antimicrobial agents tested except for gentamicin. Multi-drug resistance was commonly observed, with 81 % of the isolates resistant to ≥ 2 , and 25% to ≥ 4 antimicrobials. *Campylobacter* isolates resistant to antimicrobial agents used for treating *Campylobacter* infection in humans are common in retail poultry meats from the greater Washington DC area.

INTRODUCTION

Campylobacter species, primarily *Campylobacter jejuni* and *Campylobacter coli*, are recognized as a leading cause of human gastroenteritis worldwide, with an estimated 2.4 million cases each year in the United States (1). *Campylobacter* is considered mainly a foodborne pathogen, with raw or undercooked poultry serving as an important source of *Campylobacter* infection in human (2). Contaminated milk, water, pork, beef, lamb, and seafood also contribute to human infections. Campylobacteriosis is usually a mild to moderate self-limiting diarrheal disease, however, severe and prolonged cases of enteritis, bacteremia, septic arthritis, and other extra-intestinal infections also occur. *C. jejuni* has also been identified as the predominant cause of antecedent infection in Guillain-

Barré syndrome (GBS) (3). When antibiotics are recommended for treatment of patients with severe, prolonged, or relapsing campylobacteriosis, erythromycin or a fluoroquinolone such as ciprofloxacin, are the drugs of choice (4). Tetracycline, doxycycline, and chloramphenicol are sometimes listed as alternative drugs for treatment. Serious systemic infections may also be treated with an aminoglycoside such as gentamicin. However, an increasing number of *Campylobacter* strains resistant to several of these drugs have been isolated from clinical samples in many countries, which compromised the effectiveness of antibiotic treatment in *Campylobacter* infections.

There is a growing concern that veterinary use of antimicrobials in food animals can select for resistant *Campylobacter* strains, which may subsequently be transmitted to humans through the food chain (5,6). However, only a few reports have examined the current trend of antimicrobial susceptibility of *Campylobacter* isolated from healthy animals or retail meats. In this study, the antimicrobial susceptibilities of 369 *Campylobacter* isolates recovered from retail poultry meats of the greater Washington DC area, were determined.

MATERIALS & METHODS

***Campylobacter* isolates and species identification.** A total of 369 *Campylobacter* isolates (191 *C. jejuni*, 147 *C. coli*, and 31 other *Campylobacter*) were obtained from a retail meat survey in the greater Washington DC area conducted from August 1999 to July 2000. *C. jejuni* ATCC 33560 was used as the quality control (QC) organism for antimicrobial susceptibility testing.

A multiplex PCR assay based on two separate PCRs of Linton²³ was developed for the identification of *C. jejuni* and *C. coli* simultaneously. Primers HIP 400F (5'-GAAGAGGGTTTGGGTGGTG-3') and HIP 1134R (5'-AGCTAGCTTCGCATAATAACTTG-3') were used for *C. jejuni*, whereas primers CC18F (5'-GGTATGATTTCTACAAAGCGAG-3') and CC519R (5'-ATAAAAGACTATCGTCGCGTG-3') were for *C. coli*.

Antimicrobial susceptibility testing. Seven antimicrobial agents were used: chloramphenicol, ciprofloxacin, doxycycline, erythromycin, gentamicin, nalidixic acid, and tetracycline. Ten double dilutions were tested. Concentration ranges of the antimicrobial agents were 0.25-128, 0.03-16, 0.125-64, 0.125-64, 0.06-32, 0.5-256, and 0.125-64 µg/ml respectively for the antimicrobial agents.

Campylobacter isolates were grown on Trypticase soy agar base supplemented with 5% sheep blood and incubated for 40-48 hr in a microaerobic atmosphere (5% O₂, 10% CO₂, and 85% N₂) at 42°C. Suspensions of the organisms were prepared in 3 ml of Mueller-

Hinton II broth and adjusted to a turbidity of 0.5 McFarland. Mueller-Hinton agar plates, supplemented with 5% defibrinated sheep blood and appropriate concentrations of the antimicrobial agents, were prepared and inoculated with *Campylobacter* cell suspensions, using a Cathra replicator (Oxoid Inc., Ogdensburg, NY) with 1 mm pins. The plates were incubated at 37°C in the same microaerobic atmosphere for 48 h. The MICs of antimicrobials were recorded as the lowest concentration of the antimicrobial agent that completely inhibited *Campylobacter* growth on the agar plates.

MIC breakpoints defined by NCCLS for members of the family Enterobacteriaceae were employed, with the exception of erythromycin. These breakpoints were that used by the National Antimicrobial Resistance Monitoring System (NARMS); chloramphenicol 32 µg/ml, ciprofloxacin 4 µg/ml, doxycycline 16 µg/ml, erythromycin 8 µg/ml, gentamicin 16 µg/ml, nalidixic acid 32 µg/ml, and tetracycline 16 µg/ml.

RESULTS & DISCUSSIONS

The MIC distributions of 369 *Campylobacter* isolates for each antimicrobial agent are summarized in Table 1. Two (0.5%) *C. coli* isolates, recovered from two turkey samples, showed an MIC of 32 µg/ml for chloramphenicol. For ciprofloxacin, MIC ranged from 0.06 µg/ml to >16 µg/ml with no isolates having an MIC of 4 or 8 µg/ml. For doxycycline, the majority of the isolates had an MIC ≥ 32 µg/ml. For erythromycin, 44% of the isolates showed an MIC ≥ 8 µg/ml, with 101 isolates having an MIC of 8 µg/ml. For gentamicin, all the isolates had an MIC ≤ 2 µg/ml, with most of them clustered at MIC of 0.5 or 1 µg/ml. For nalidixic acid, 33% of the isolates had an MIC ≥ 32 µg/ml. For tetracycline, the majority of the isolates had an MIC ≥ 64 µg/ml.

Dependent upon type of antimicrobial agents, most *Campylobacter* isolated from retail raw meats were resistant to at least one antimicrobial. The most common resistance was to tetracycline (76%), followed closely by doxycycline (73%), then erythromycin (44%), nalidixic acid (33%), and ciprofloxacin (29%). Two isolates of *C. coli* recovered from turkey meats showed resistant to chloramphenicol. However, none of the *Campylobacter* isolates demonstrated resistance to gentamicin. Cross-resistances between ciprofloxacin and nalidixic acid, and between doxycycline and tetracycline were commonly observed. All the ciprofloxacin-resistant *Campylobacter* (109 isolates) were resistant to nalidixic acid, and all the doxycycline resistant *Campylobacter* (275 isolates) were resistant to tetracycline.

Comparing the resistances among *C. jejuni* and *C. coli* isolates, *C. coli* isolates exhibited much greater

resistant rates to erythromycin (61% versus 33%), ciprofloxacin (38% versus 21%), and nalidixic acid (41% versus 26%) than *C. jejuni* ($p < 0.05$), whereas the resistant rates to tetracycline and doxycycline were comparable among *C. jejuni* and *C. coli* isolates ($p > 0.05$). Percentage resistance to each antimicrobial agent among the 369 *Campylobacter* isolates also differed as to types of meat samples from which the organisms were recovered. Noticeably, turkey isolates had significantly greater resistant rates ($p < 0.05$) than chicken isolates to all the antimicrobial agents tested except for gentamicin where there was no resistance among all the isolates.

Multi-drug resistance was commonly observed, with 91% of the isolates resistant to at least 1

antimicrobial agent tested, 81% to at least 2 antimicrobial agents, 40% to at least 3, 25% to at least 4, and 17% to at least 5 antimicrobials tested. Two *C. coli* isolates (0.5%), both recovered from turkey meat samples, were resistant to six antimicrobial agents except gentamicin. Thirty-three *Campylobacter* isolates (9%), however, were susceptible to all seven antimicrobial agents tested. The study revealed that *Campylobacter* isolates resistant to antimicrobial agents used for treating *Campylobacter* infection in humans were common in retail poultry meats from the greater Washington DC area. Surveillance on antimicrobial resistance of *Campylobacter* needs to include retail meats, particularly poultry meats.

Table 1. Distribution of MICs, MIC₅₀, and MIC₉₀ for each antimicrobial agent tested among all 369 *Campylobacter* retail meat isolates.

Agents	% isolates with MIC (µg/ml) of																		MIC ₅₀ µg/ml	MIC ₉₀ µg/ml	
	0.03	0.06	0.125	0.25	0.5	1	2	4	8	16	>16	32	>32	64	>64	128	>128	256			>256
CML							10	50	32	8		0.5*								4	8
CIP		2	18	21	20	10	1	*		5	24									0.5	>16
DOX			2	5	6	8	5	0.3	2	5*		24		44	0.3					32	64
ERY					0.3	6	18	32	27*	6		2		0.3	10					4	32
GEN			2	15	52	28	2			*										0.5	1
NAL								15	38	13		3*		2	9		17	3		8	256
TET				4	5	5	6	3	0.8	0.5*		2		10	63					>64	>64

Note: Highlighted are the 10 dilution ranges tested in the agar dilution.

* NCCLS resistant breakpoints.

** NARMS resistant breakpoint

REFERENCES

1. Mead PS, Slutsker L, Dietz V, McCaig LF, Bresee JS, Shapiro C, Griffin PM and Tauxe RV, Food-Related Illness and Death in the United States. *Emerg Infect Dis* 5:607-625, 1999.
2. Jacobs-Reitsma W. *Campylobacter* in the food supply. In: *Campylobacter* (Eds. Nachamkin I and Blaser MJ), pp. 467-482. ASM press, Washington, D. C., 2000.
3. Blaser MJ, Epidemiologic and clinical features of *Campylobacter jejuni* infections. *J Infect Dis* 176 Suppl 2:S103-5, 1997.
4. Nachamkin I, Engberg J and Aarestrup FM, Diagnosis and antimicrobial susceptibility of

Campylobacter spp. In: *Campylobacter* (Eds. Nachamkin I and Blaser MJ), pp. 45-66. ASM press, Washington, D. C., 2000.

5. Aarestrup FM, Nielsen EM, Madsen M and Engberg J, Antimicrobial susceptibility patterns of thermophilic *Campylobacter* spp. From humans, pigs, cattle and broilers in Denmark. *Antimicrob Agents Chemother* 41:2244-50, 1997.

6. Threlfall EJ, Ward LR, Frost JA and Willshaw GA, The emergence and spread of antibiotic resistance in food-borne bacteria. *Int J Food Microbiol* 62: 1-5, 2000.

STUDIES ON THE USE OF BACTERIOPHAGE AEROSOL SPRAYS TO PREVENT *E. COLI* RESPIRATORY DISEASE IN POULTRY

ESTUDIOS SOBRE EL USO DE ASPERSIONES DE BACTERIÓFAGOS PARA PREVENIR LA ENFERMEDAD RESPIRATORIA CAUSADA POR *ESCHERICHIA COLI* EN AVES

W. E. Huff, G. R. Huff, N. C. Rath, J. M. Balog, and A. M. Donoghue

USDA, Agricultural Research Service, Poultry Production and Product Safety Research Unit
Center of Excellence for Poultry Science, University of Arkansas, Fayetteville, Arkansas 72701

RESUMEN

Se realizaron tres estudios para determinar la eficacia del bacteriófago administrado mediante aerosol para prevenir la enfermedad respiratoria causada por *E. coli*. En los estudios 1 y 2 se presentó una significativa disminución en la mortalidad cuando las aves se desafiaron inmediatamente después de haber recibido el aerosol con el bacteriófago. En el estudio 3 la infección preexistente por *E. coli* causó alta mortalidad en los testigos mientras que no se observó mortalidad en las aves asperjadas con el bacteriófago. Estos datos sugieren que la administración de bacteriófagos en aerosol puede ser una manera práctica de prevenir y tratar enfermedades bacterianas en las aves.

SUMMARY

Three studies were conducted to determine the efficacy of bacteriophage administered as an aerosol spray to prevent *E. coli* respiratory disease. There was a significant decrease in mortality in Study 1 and 2 when the birds were challenged immediately after being sprayed with the bacteriophage. In Study 3 a pre-existing *E. coli* infection caused high mortality in the controls, while no abnormal mortality was observed in the birds sprayed with bacteriophage. These data suggest that the administration of bacteriophage as an aerosol spray may be a practical way to prevent and treat bacterial diseases in poultry.

INTRODUCTION

Colibacillosis is a serious problem in poultry production causing mortality and condemnations. There is a real need to find alternatives to antibiotic use for the prevention and treatment of colibacillosis in poultry production. Bacteriophage were independently discovered by Twort (1915) and d'Herelle (1917) and are viruses that infect and can kill bacteria. The objective of these studies was to determine if bacteriophage could prevent an *E. coli* respiratory infection in broiler chickens by exposing the birds to an

aerosol bacteriophage spray prior to challenging the birds.

MATERIALS AND METHODS

Bacteriophage were isolated to an *E. coli* (serotype 02) and two bacteriophage isolates were selected for these studies. The bacteriophage were amplified by growing the phage on soft agar overlay plates, which were flooded with PBS, periodically swirled, and harvested. Three studies were conducted to determine the efficacy of administering two bacteriophage, designated SPRO2 and DAF6, via an aerosol spray, to protect broiler chickens from an air sac challenge of *E. coli*. Study 1 consisted of 9 treatments with 3 replicate pens of 10 birds per pen. Three treatments consisted of an untreated control, birds exposed to an aerosol spray of PBS at 7 days of age, and birds exposed to an aerosol spray of the two bacteriophage (3.6×10^7 and 4.6×10^7 pfu per mL of DAF6 and SPRO2, respectively). Three treatments consisted of an aerosol spray of PBS at 7 days of age and challenging the birds with 5.6×10^4 cfu of *E. coli* injected into the thoracic air sac at either 7, 8 or 10 days of age. The final three treatments consisted of an aerosol spray containing 3.6×10^7 and 4.6×10^7 pfu per mL of the bacteriophage DAF6 and SPRO2, respectively, and challenging the birds with *E. coli* at 7, 8, or 10 days of age as described above. In Study 2 the titer of the 2 bacteriophage was increased providing 2.6×10^8 pfu per mL of SPRO2 and 2.35×10^9 pfu per mL of DAF6, while the *E. coli* challenge was 6.12×10^4 . In addition, instead of a PBS control, we prepared a control by flooding soft agar overlay plates made with *E. coli* without the virus and harvesting as described above to provide a control for any bacterial debris effects in these studies. Study 3 was identical to Study 2 except for differences in bacteriophage titers, with bacteriophage SPRO2 at 1.88×10^8 pfu per mL, and DAF6 at 3.60×10^8 pfu per mL, and the *E. coli* challenge was 6.85×10^4 cfu.

The birds and feed were weighed each week. Any birds that died were weighed, the severity of

airsaculitis was scored (Huff et al., 1998), the liver and airsac were cultured with sterile swabs and plated on MacConkey's agar, with isolates compared to the inoculum culture based on colony morphology. The liver, heart, spleen, and bursa of Fabricius were excised and weighed. When the birds were 3 wk of age they were killed by cervical dislocation, and necropsied as described for the mortalities.

RESULTS AND DISCUSSION

Body weights of the birds at 2 weeks of age were significantly ($P \leq .05$) decreased from controls in all *E. coli* challenged birds sprayed with diluent or bacteriophage in all 3 studies. These data indicate that the bacteriophage spray treatment did not provide complete protection to the birds challenged with an air sac inoculation of 10^4 cfu of *E. coli*. However, there was substantial protection of the birds based on mortality. In Study 1, mortality was significantly reduced from 60% to 30% when the birds were challenged with *E. coli* immediately after being sprayed with the two bacteriophage. In Study 2, the bacteriophage titers in the spray were the highest of the three studies conducted. In Study 2, there was a significant decrease in mortality from 63% to 7% in the birds challenged with *E. coli* immediately after the bacteriophage spray treatment, and a significant decrease in mortality from 40% to 3% in the birds that were challenged 3 days after being treated with the bacteriophage spray. These data demonstrate, as might be expected, that there is a correlation between the amount of bacteriophage administered and the degree of protection provided to the birds. These data also suggest that the protection provided to the birds by the bacteriophage spray was of some duration, with birds protected by an *E. coli* challenge 3 days after bacteriophage spray administration. In Study 3, there was a significant decrease in mortality from 63% to

27% in the birds challenged immediately after bacteriophage administration and in those challenged a day after bacteriophage administration (73% versus 37%). Possibly the most important data collected in Study 3 was unplanned. Mortality in the untreated controls and the birds that received only the diluent spray was unexpectedly high at 20% and 27%, respectively. The mortality in these control birds was primarily caused by airsaculitis, and an *E. coli* could be isolated from the lesions. The mortality of the birds that received only the bacteriophage spray was significantly less than the mortality of the other controls (3%). We were able to determine that the *E. coli* isolated from these control birds was not our challenge culture and was susceptible to only one of the bacteriophage in the aerosol spray. We believe the mortality that occurred in these control treatments was caused by an indigenous *E. coli* and the birds were completely protected by the bacteriophage spray. These data clearly indicate that bacteriophage can provide an alternative to antibiotics, and that spray administration of bacteriophage may be a practical way to treat poultry in production facilities.

REFERENCES

1. d'Herelle, F., 1917. Sur un microbe invisible antagoniste des *bacilles dysenteriques*. Comptes rendus de L'Academie des Sciences de Paris 165:373-375.
2. Huff, G. R., W. E. Huff, J. M. Balog, and N. C. Rath, 1998. The effects of dexamethasone immunosuppression on turkey osteomyelitis complex in an experimental *Escherichia coli* respiratory infection. Poultry Sci. 77:654-661.
3. Twort, F. W., 1915. An investigation on the nature of ultramicroscopic viruses. Lancet 2:1241-1243.

STIMULATION OF THE IMMUNE SYSTEM OF BROILERS AGAINST CELLULITIS / COLIBACILLOSIS

ESTÍMULO DEL APARATO INMUNOCOMPETENTE DE LOS POLLOS DE ENGORDA CONTRA LA CELULITIS/COLIBACILOSIS

Susantha Gomis¹, Dale Godson², Lorne Babiuk¹, Brenda Allan¹, Rolf Hecker³, and Andrew Potter¹

¹ Veterinary Infectious Disease Organization, 120 Veterinary Road, Saskatoon, SK, Canada S7N 5E3.

² Dept. of Veterinary Microbiology, University of Saskatchewan, Saskatoon, SK, Canada

³ Qiagen GmbH, Hilden, Germany

RESUMEN

Se ha demostrado que los oligonucleótidos sintéticos del ácido desoxirribonucleico bacteriano que

contienen motivos CpG (CpG-DNA) son agentes inmunoprotectores efectivos en modelos de laboratorio en animales. El objetivo de este trabajo fue investigar

el efecto del CpG-DNA en un modelo de celulitis/colibacilosis en pollos. El grupo testigo que no recibió el CpG-DNA tuvo una tasa de supervivencia del 15% mientras que los grupos que sí lo recibieron por inyección subcutánea o intramuscular, presentaron tasas de supervivencia significativamente más elevadas. De la misma manera, el tamaño de la lesión causada por la celulitis fue significativamente menor en el grupo que recibió el CpG-DNA por vía subcutánea ($p < 0.01$). Este estudio demostró que el CpG-DNA tiene efectos protectores tanto locales como sistémicos en el pollo.

Synthetic bacterial DNA oligonucleotides containing CpG motifs (CpG-DNA) have been shown

to be effective immunoprotective agents in laboratory animal models. The objective of this study was to investigate the effect of CpG-DNA in a disease model of cellulitis / colibacillosis in chickens. The control group of birds that received no CpG-DNA had a survival rate of 15%. In contrast, groups that received CpG-DNA by subcutaneous or intramuscular injection had significantly higher survival rates. As well, the size of the cellulitis lesion was significantly smaller in the group that received CpG-DNA by the subcutaneous route ($p < 0.01$). This study demonstrated that CpG-DNA had both localized and systemic immunoprotective effects in chickens.

TÉCNICAS PARA LA EVALUACIÓN DEL TAMAÑO DE LA BOLSA DE FABRICIO Y SU RELACIÓN CON EL ESTADO DE SALUD DE LA PARVADA

TECHNIQUES FOR BURSAL SIZE EVALUATION AND ITS RELATIONSHIP WITH FLOCK HEALTH STATUS

Mario Lechuga G.

Fort Dodge Animal Health

SUMMARY

The purpose of this paper is to demonstrate the importance of bursal size as an indicator of the immune status of the flock. Three techniques to evaluate the size of the bursa of Fabricius are discussed, together with the relationships that exist among them. Similarly, we offer a model to generate –through a data base– a bursal size standard to be used as the basis for the clinical prognosis of flocks' immune status.

RESUMEN

El objetivo de este trabajo es demostrar la importancia del tamaño de la Bolsa de Fabricio (BF) como indicador del estado inmunológico de la parvada, así como mostrar tres técnicas para la evaluación del tamaño de la BF y la relación que existe entre ellas. Así mismo, ofrecer un modelo para generar, a través de un banco de datos, un estándar de tamaños de la bolsa de fabricio, y en base a este, hacer un “pronóstico” clínico del estado inmune de la parvada.

MATERIAL Y MÉTODO

Este es un trabajo de campo, en que se dio seguimiento a 8 parvadas de pollo de engorda, midiendo el tamaño de la BF a los 28 días de edad y, posteriormente, se evaluó la mortalidad de cada parvada.

Para medir la BF se puede utilizar un vernier, seguir la técnica de Rountree o utilizar el bursómetro, siendo estas dos más objetivas, pues facilitan el análisis de los datos obtenidos.

Vernier. Es un instrumento de precisión que puede dar medidas en centímetros, décimas y centésimas de centímetro.

Inmunovaloración de Rountree. Esta técnica se basa en que el diámetro de la Bolsa de Fabricio representa un porcentaje del tamaño del tarso, medidos con Vernier (Se divide el diámetro de la bolsa entre el tamaño del tarso) y se ubican en una de tres categorías : 1) 20 o mayor; 2) 16 a 19.9 y; 3) menor a 16. La interpretación es: grupo 1 es bueno, grupo 2 es regular y, grupo 3 es malo.

Bursómetro. Es una regla de plástico con ocho perforaciones de diferente diámetro, graduada del uno al ocho; para utilizar el bursómetro, se extrae la Bolsa de Fabricio y, el diámetro por donde la bolsa pase más fácilmente, indicará el grupo al que pertenece. A los 28 días de edad, bolsas en el grupo 4 es malo, grupo 5 es regular, grupo 6 es bueno y, grupo 7 es excelente.

RESULTADOS

Los resultados se resumen en la tabla 1.

DISCUSIÓN

Los resultados obtenidos con el bursómetro van de la mano con los obtenidos con el Vernier y con la técnica de Rountree. El Bursómetro tiene relación directa con la inmunovaloración de Rountree.

Existe una relación directa entre el tamaño de la Bolsa de Fabricio y el estado de salud de la parvada.

Es importante hacer una medición objetiva para dejar el método del tanteo.

Las técnicas de Rontree y el Bursómetro ofrecen una medición objetiva para evaluar el tamaño de la Bolsa de fabricio.

La técnica del Bursómetro es más sencilla que el Vernier y la de Rountree, y por lo tanto, más práctica. Observando los resultados obtenidos con el Bursómetro, se verá tiene su equivalente a la técnica de Rountree, sin embargo, esta última surgió de medir bolsas, tarsos y aplicar varias fórmulas matemáticas, a diferencia del Bursómetro, que pudo obtener las mismas conclusiones, únicamente pasando la Bolsa de Fabricio por una perforación.

El generar una base de datos en cuanto al tamaño de la bolsa de fabricio y su relación con la salud de las parvadas facilitará y mejorará la toma de decisiones.

Tabla 1. Resultados obtenidos con las diferentes técnicas y su relación con la salud de la parvada, tomando como parámetro de esta, el porcentaje de mortalidad final.

No. Parvada	Diámetro de la bolsa			% mortalidad
	de Fabricio	Rountree	Bursómetro	
1	1.88	21.9	7	2.04
2	1.75	20.64	6	1.7
3	1.66	20.00	6	3.59
4	1.66	19.80	6	3.29
5	1.24	14.15	5	4.00
6	1.15	14.00	4	1.63
7	1.10	13.41	4	5.43
8	1.07	13.39	4	6.79

REFERENCIAS

1. Glick.. Normal growth of the Bursa of Fabricius in chickens. *Poultry Science* 35:843-851. 1956.
2. Kuney D.R., A.A. Bickford, D.D. Bell. The significance of bursal size survey, *Proceedings of 29th Western Poultry Disease Conference and 14th Poultry Health Simposia*. Pp 44-46. 1980

3. Ulloa Jorge H. Caracterización del desarrollo de la Bolsa de Fabricio, Timo y Bazo en pollos Broilers. XVI Congreso Latinoamericano de Avicultura, Perú. 1999.
4. L.A. Mazariegos, Lukert P.D. and John Brown.. Pathogenicity and immunosuppressive properties of Infectious Bursal Disease “intermediate” strains. *Avian Diseases* 34:203-208. 1990.

A STATISTICAL PROTOTYPE FOR ESTABLISHING NEW HISTOPATHOLOGY CUT OFF SCORES IN THE EVALUATION OF INFECTIOUS BURSAL DISEASE VACCINE EFFICACY

PROTOTIPO ESTADÍSTICO PARA ESTABLECER NUEVAS CALIFICACIONES HISTOPATOLÓGICAS Y CLASIFICAR CLARAMENTE LOS RESULTADOS, EN LA EVALUACIÓN DE LA EFICACIA DE LAS VACUNAS CONTRA LA INFECCIÓN DE LA BOLSA DE FABRICIO

Craig Blackmore^A, Ken Takeshita^B, Joseph Giambrone^C, and Patricia Wakenell^A

^ADepartment of Population, Health and Reproduction, School of Veterinary Medicine, University of California, Davis, CA 95616

^BLohmann Animal Health International, 4759 Ridgeview Lane, Vacaville, CA 95688

^CPoultry Science Dept., Auburn University, AL 36849

RESUMEN

El método de desafío de pollos desarrollado en Auburn utiliza las proporciones entre el peso de la bolsa de Fabricio y el peso corporal, además de la calificación histopatológica para evaluar la eficacia de las vacunas mediante inmunidad pasiva, comparando los resultados conjuntos de la proporción entre el peso de la bolsa y el peso corporal, y el porcentaje de protección histopatológica de cada parvada (grupo) involucrada. Menos de un 20% de protección se considera “malo”, del 20 al 50% de protección se considera “regular” y más del 50% de protección se considera “bueno”. Este estudio intenta establecer nuevos niveles de separación para clasificar los resultados de la calificación histopatológica con base en los valores existentes de 20% y 50%, establecidos para las proporciones entre el peso de la bolsa y el peso corporal, usando varios métodos estadísticos.

Data on passive immunity efficacy was collected on 146 breeder flocks from five years of the Auburn University Infectious Bursal Disease virus chick challenge. Each flock was given a different combination of IBDV vaccines and fell into 1 of 3 classifications, young flocks (<40 weeks), middle-aged flocks (41-50 weeks) and old flocks (>50 weeks). 50 (unvaccinated) day old chicks were received from each flock and segregated according to how they were to be challenged. After two weeks 20 chicks from each flock were challenged with standard (APHIS) Infectious

Bursal Disease virus, 20 challenged with a variant (Var E) Infectious Bursal Disease virus and 10 were left as controls. Seven days post challenge the birds were sacrificed. Bursal to bodyweight ratios and histopathology scores were used to derive the percent passive protection provided from both the standard and variant challenges. These percentages were then combined to create an overall percent protection. Protection was considered “good” if 50% or more of the flock remained unaffected, “fair” if 20% to 50% were unaffected and “low” if less than 20% were unaffected.

The purpose of our investigation was to establish a highly prototypical method for finding new “cut off” points for histopathology scores to be used in IBDV vaccine efficacy trials. Currently, these “cut off” scores are based on the old parameters of 20% and 50% used for bursal to bodyweight scoring.

Furthermore, we hope to use the information discovered to plan and execute further studies which explore the relationship between bursal to bodyweight ratio and histopathology.

Utilization of regression analysis, the Archetti and Horsfall equation, fitted line plots and correlation were important to constructing new “cut off” points for histopathology scores. The results are preliminary, and further studies are necessary. However, in light of the information obtained a number of ancillary studies will be performed, including use of other variables as predictors.

CARACTERIZACIÓN DE UN AISLAMIENTO MEXICANO DE UN VIRUS DE GUMBORO

CHARACTERIZATION OF A MEXICAN INFECTIOUS BURSAL DISEASE VIRUS (IBDV) ISOLATE

Juan García-García¹, Manuel Gay¹, Alejandro Suárez¹, Jorge Escamilla¹, María E. Aranda¹, Ernesto Soto¹, David Sarfati¹, Agustín Morales² y Bernardo Lozano¹.

¹Laboratorio Avi-Mex, S.A. de C.V., México. ²Diagnósticos Clínicos Veterinarios S. A. de C. V. México

SUMMARY

One virus was isolated from a commercial broiler flock with a health problem characterized by a low weight gain, and a moderate mortality rate. Farm is located in the state of Mexico. Agar gel immunodiffusion, SPF bird inoculation, virus recovery, electron microscopy, and RT-PCR-RFLP analyses allowed for the characterization of this isolate as an IBDV. This virus belongs to molecular group number 6. The original isolate has been called IBF-0596.

RESUMEN

A partir de un problema sanitario en pollo de engorda, caracterizado por baja ganancia de peso y mortalidad moderada, en una granja comercial localizada en el Estado de México, se logró aislar un virus que mediante las pruebas de inmunodifusión en agar, inoculación en aves SPF, re-aislamiento viral, microscopía electrónica y RT-PCR-RFLP se identificó como un virus de la infección de la bolsa de Fabricio, perteneciente al grupo molecular seis, el aislamiento original fue denominado IBF-0596.

INTRODUCCIÓN

La enfermedad de Gumboro ó enfermedad de la bolsa de Fabricio es causada por un virus perteneciente a la familia *Birnaviridae*, que se caracteriza por ser un padecimiento agudo y altamente contagioso en aves jóvenes causando principalmente por lesiones severas en la bursa, que se inician con un proceso inflamatorio y que culminan con atrofia, lo que induce un estado severo de inmunosupresión en las aves afectadas (5). En los Estados Unidos de Norteamérica se ha descrito la emergencia de diferentes cepas variantes de este virus durante los últimos 20 años (2).

La heterogeneidad genética determinada en un segmento de 743 pares de bases del gen que codifica para la proteína VP-2, ha sido utilizada para identificar a los aislamientos y colocarlos en diferentes grupos moleculares (2, 3, 4). El segmento es amplificado por PCR y se somete a restricción por el método de Jackwood. Este procedimiento acomoda a los virus en seis grupos moleculares. En los grupos 1 y 2 se insertan

virus variantes, en los grupos 3 y 4 se insertan virus clásicos y en los grupos 5 y 6 se clasifican a virus no definidos. El procedimiento además se considera adecuado para predecir el tipo antigénico de los virus y las variantes que se aíslan en pollos vacunados con las cepas tradicionales de referencia (2, 3).

El objetivo del presente estudio fue el de identificar y caracterizar a un virus de Gumboro denominado IBF-0596, aislado de aves vacunadas, para determinar sus propiedades biológicas y el grupo molecular al que corresponde mediante la prueba del polimorfismo de la longitud de los fragmentos de restricción (RFLP) del gen VP2.

MATERIAL Y MÉTODOS

En 1996, se transportaron al laboratorio pollos de engorda, procedentes de una granja del Estado de México, con problemas de baja ganancia de peso y mortalidad moderada. Las aves fueron sacrificadas y a la necropsia se tomó una porción de tejido de aproximadamente 1cm³ de espesor de cada una de las bolsas, mismas que se colocaron en una solución de formalina al 10 % amortiguada para estudios de histopatología. Con el resto de las bolsas se elaboraron macerados independientes adicionando a cada bolsa solución amortiguada de fosfatos (PBS), pH 7.2, en proporción 1:10 (v/v). Los macerados, posteriormente se centrifugaron a 4,000 X g durante 5 minutos, los sobrenadantes se mezclaron y fueron congelados a -70C hasta su uso.

El sobrenadante se tituló y se utilizó para infectar aves SPF de tres semanas de edad conteniendo 10^{4.5} DIP50%/mL. Tres días después del desafío se sacrificaron a las aves y se determino la relación peso de bolsa/ peso corporal. Las bolsas se trataron de la misma forma que el inóculo original y el sobrenadante final se sometió a diversas pruebas.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Las lesiones histopatológicas observadas en la porción de la bolsa analizada concuerdan adecuadamente con las reportadas en la literatura, que

incluye depleción de células linfoides, necrosis y una reacción inflamatoria casi inadvertible.

El sobrenadante obtenido del macerado de las bolsas de las aves SPF dio reacción positiva en la prueba de Inmunodifusión en agar (IDA) con un antisuero de referencia específico al virus de la infección de la bolsa de Fabricio, preparado previamente en el laboratorio. El sobrenadante se llevó al microscopio electrónico en el cual se observaron partículas virales con características propias de los virus de la familia *Birnaviridae*. En una prueba para identificar la presencia de otros virus el sobrenadante se administró en aves SPF en las que se midieron la presencia de anticuerpos para otros patógenos aviares resultando negativos. Se realizaron pruebas microbiológicas para determinar la presencia de bacterias, levaduras, hongos y micoplasmas sembrando en medios apropiados resultando negativo el crecimiento.

Muestras del sobrenadante inicial y del obtenido después de la infección en pollos SPF se colocaron en una solución de fenol-cloroformo-alcohol isoamílico con el propósito de inactivar al virus pero de conservar su ácido nucleico viral. La mezcla se envió a caracterizar a un laboratorio de análisis moleculares en USA. Por medio del estudio de polimorfismo en el largo de los segmentos de restricción utilizando la enzima *Bst*NI se observaron tres bandas, la primera de 424 kilopares de bases (Kpb), la segunda de 172 Kpb y la tercera de 119 Kpb. Al someter el segmento original amplificado a la digestión con la enzima *Mbo*I se observaron dos fragmentos, uno de 362 Kpb y otro de 229 Kpb. Sin embargo, al someter el segmento amplificado a la digestión con la enzima *Ssp*I no se

observaron bandas, lo que indica la inhabilidad de esta enzima para fragmentar al amplicón (2).

Estos resultados concuerdan con los trabajos de Jackwood en 1999, quien reporta virus aislados en México y que se distribuyen en diferentes países de América latina y el Caribe con este patrón que pertenece al grupo molecular seis y que es diferente al de las cepas vacunales tradicionales. En un trabajo adicional de esta convención se determina la capacidad inmunológica de estos sobrenadantes para su uso en la prevención y control de la enfermedad.

REFERENCIAS

1. Jakwood, D. J. y Sommer, S. E. Genetic heterogeneity in the VP2 of infectious bursal disease viruses detected in commercially reared chickens. *Avian Dis.* 42: 321-339 1998
2. Jakwood, D. J. y Sommer, S. E. Restriction fragment length polymorphisms in the VP2 gene of infectious bursal disease virus outside the United States. *Avian Dis.* 43: 310-314 1999
3. Jackwood, D. J., Jackwood, R. J. y Sommer, S. E. Identification and comparison of point mutations associated with neutralizing epitope in classic and variant infectious bursal disease viruses *Virus Res.* 49: 131-137 1997
4. Ismail, N. M. y Saif, Y. M Immunogenicity of infectious bursal disease viruses in chickens *Avian disease* 35: 460-469 1991.
5. Rosales A. G., Villegas, P., Lukert, P. D., Fletcher, O. J., Mohamed, M. A. y Brown, J. Pathogenicity of recent isolates of Infectious Bursal Disease virus in Specific-pathogen. Free chickens: Protection conferred by an interemediate vaccine strain. *Avian Dis.* 33: 729.734, 1989.

PROTECCIÓN CONFERIDA POR VACUNAS EMULSIONADAS CONTRA UN AISLAMIENTO LOCAL DEL VIRUS DE GUMBORO

PROTECTION WITH OIL EMULSION VACCINES AGAINST CHALLENGE WITH LOCAL INFECTIOUS BURSAL DISEASE VIRUS (IBDV) ISOLATES

Manuel Gay¹, Jorge Escamilla^{1*}, Alejandro Suárez¹, Ernesto Soto¹, Bernardo Lozano¹, David Sarfati¹, Diana Vázquez², Agustín Morales² y Juan García-García¹.

¹Laboratorio Avi-Mex, S.A. de C.V., México, ²Diagnósticos Clínicos Veterinarios S.A. de C.V., México

SUMMARY

This paper presents the results of the evaluation of 3 oil emulsion IBDV vaccines for their ability to confer protection after experimental challenge. Two commercial and one experimental vaccines were tested. The experimental vaccine was prepared with a virus isolated from Mexican broilers in 1996.

Immunogenicity results show that all 3 vaccines were able to induce adequate immune responses, but only the experimental vaccine was able to confer protection after challenge with the homologous isolate, and to prevent gross and microscopic lesions in challenged birds.

RESUMEN

En el presente trabajo se presentan los resultados de la evaluación de tres vacunas emulsionadas contra Gumboro, sobre su capacidad de conferir protección al desafío experimental. Se probaron dos vacunas comerciales y una experimental elaborada con un virus aislado de pollos de engorda en México en 1996. Los resultados de inmunogenicidad indican que todas las vacunas fueron capaces de inducir una adecuada respuesta de anticuerpos, pero solamente la vacuna experimental fue capaz de conferir protección al desafío con el aislamiento homólogo, evitando la presencia de lesiones macroscópicas y microscópicas en las aves desafiadas.

INTRODUCCIÓN

La enfermedad de Gumboro (IBF) representa un serio problema para la avicultura comercial, debido a que da lugar a un estado de inmunodepresión que puede interferir con la respuesta inmune esperada, inducida por los programas de vacunación, así como a la inadecuada respuesta a infecciones que normalmente las aves sanas pueden fácilmente resolver (1, 2, 3, 5, 6).

La evolución constante observada en estos virus ha dado como resultado la presencia de cuasi-especies, que pueden variar en su comportamiento biológico tanto de patogenicidad como antigenicidad. En años anteriores fue detectada la presencia en México de un vIBF perteneciente al grupo genético seis, determinado posteriormente por pruebas de restricción en el largo de los fragmentos (RFLP por sus siglas en inglés), por lo que fue necesario evaluar la capacidad protectora de las vacunas emulsionadas comerciales disponibles y una experimental para prevenir la infección y las manifestaciones clínicas que causa esta cepa denominada IBF-0596 (3, 4, 5).

MATERIAL Y MÉTODOS

Aves: Para cada vacuna se emplearon 20 pollitos comerciales de engorda, de 10 días de edad, libres de anticuerpos contra IBF. Dos grupos de 20 pollos se utilizaron como testigos y no se vacunaron; uno de ellos fue infectado y se utilizó como grupo control positivo. El otro permaneció como grupo control negativo.

Vacunas:

- Vacuna emulsionada, laboratorio comercial A
- Vacuna emulsionada, laboratorio comercial B
- Vacuna emulsionada, experimental, conteniendo la cepa ASM97 (derivada del aislamiento original IBF-0596), elaborada en bolsa de Fabricio.

Inmunización: La aplicación de vacunas se realizó por vía subcutánea, en la porción media y posterior del cuello, a razón 0.5 ml de cada vacuna por pollo. La

inmunización se realizó a los diez días de edad del pollo.

Desafío: A los 31 días de edad del pollo (21 días posvacunación), los grupos vacunados y un grupo control no vacunado fueron desafiados con 0.05 ml vía ocular y con 0.05 ml vía cloaca con el aislamiento original denominado inicialmente IBF-0596 conteniendo $10^{4.5}$ DIP50%/ml, elaborada en bolsa de Fabricio.

Muestras: Se obtuvieron muestras de suero de todas las aves a los 14 y 21 días posvacunación (previo desafío) para determinar el nivel promedio de anticuerpos de cada uno de los grupos para el virus de IBF mediante la prueba de ELISA. Al séptimo día posdesafío se sacrificaron las aves de todos los grupos experimentales desafiados y controles. Se separaron las bolsas de Fabricio, se obtuvo el peso promedio de ellas para cada uno de los grupos y se colocaron en una solución de formalina al 10% para estudios histológicos.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Los resultados de potencia e inmunogenicidad, evaluados a través de la prueba de ELISA indirecta y de los pesos promedio de las bolsas de Fabricio de cada uno de los grupos experimentales, se resumen en el Cuadro 1.

Los resultados de inmunogenicidad, determinados por el título promedio de anticuerpos de cada uno de los grupos experimentales, indican que la respuesta a la vacunación fue similar para las tres vacunas en estudio tanto a los 14 como a los 21 días después de la aplicación de las vacunas.

Los resultados del peso promedio de las bolsas de Fabricio, para cada uno de los grupos, indican que solamente la vacuna experimental fue capaz de conferir protección al desafío con la cepa original denominada IBF-0596, mientras que las vacunas comerciales evaluadas no fueron capaces de proteger al desafío ya que su peso promedio fue igual o muy cercano al observado en el grupo control desafiado.

Los estudios histológicos indican que el 100% de las bolsas de Fabricio de las aves inmunizadas con la vacuna experimental no mostraron lesiones sugestivas al virus de IBF, mientras que el 100% de las bolsas de Fabricio de los grupos inmunizados con las vacunas comerciales presentaron lesiones histológicas de IBF en diversos grados, de manera similar a lo observado en el grupo control desafiado.

CONCLUSIONES

Las vacunas comerciales empleadas en esta investigación, inducen una adecuada respuesta de anticuerpos, detectable por la prueba de ELISA; sin embargo, no fueron capaces de conferir protección a

las lesiones en la bursa, cuando se desafiaron con la cepa original IBF-0596.

La vacuna experimental conteniendo la cepa ASM 97 indujo una adecuada respuesta de anticuerpos y confirió protección del 100% al desafío con la cepa

homóloga (IBF-0596), indicando que su mosaico antigénico de protección es diferente al de las cepas tradicionales utilizadas en las vacunas comerciales para la prevención de la enfermedad de Gumboro.

Cuadro 1. Resultados de la prueba de inmunogenicidad y potencia de tres vacunas administradas en pollos de engorda, libres de anticuerpos contra IBF y desafiados con la cepa IBF-0596.

Vacuna	ELISA 14 días Promedio geométrico	ELISA 21 días Promedio geométrico	Peso promedio de bolsas de Fabricio 7 días post-desafío	Lesiones histológicas sugestivas de IBF
Comercial A	431	1496	0.31g	+
Comercial B	325	1230	0.38g	+
Exp. Cepa ASM97	573	2571	0.71g	-
Control positivo	228	226	0.31g	+
Control negativo	225	225	0.69g	-

REFERENCIAS

1. Jackwood, D.J., Sommer, S.E. and Odor, E. Correlation of enzyme-linked immunosorbent assay titers with protection against infectious bursal disease virus. *Avian Dis.* 43: 189-97. 1999.

2. Kumar, D.V.M. and Bocclair, M.S. Avances en la Producción de Biológicos Contra la Enfermedad de Gumboro. *Memorias del Quinto Curso de Actualización Avimex.* México. Enfermedad de Gumboro. 15-20. 1993.

3. Lasher H. and Shane , S.W. Infectious Bursal Disease. *World's Poultry Science Journal.* Vol. 50. 1994.

4. Lukert,P.D., y Y.M. Saif.. Infectious Bursal Disease. En *Diseases of Poultry.* Décima edición. Editado por Calnek, B.W., Barnes, H.J., Beard, C.W., McDougald, L. Y M. Saif. Editorial Board for the American Association of Avian Pathologists. Iowa State University Press.721-738.1997.

5. Rosenberger, J.K The Role of IBD in Immunosuppression, Increase in Susceptibility to other Infectious Diseases. *World Poultry, Special.* December 1994.

6. Shane, S. La enfermedad de Gumboro en Pollo de Engorda. *Memorias del Quinto Curso de Actualización Avimex.* Enfermedad de Gumboro. 37-44. 1993.

DETERMINACION DEL DAÑO A LA BOLSA DE FABRICIO CAUSADA POR LA APLICACIÓN DE VACUNAS A VIRUS VIVO CON CEPAS INTERMEDIAS, ASI COMO LA PROTECCION AL DESAFIO

INTERMEDIATE LIVE VACCINE VIRUS-ASSOCIATED BURSAL DAMAGE AND PROTECTION AGAINST CHALLENGE

Toscano C. Arnulfo; Jiménez P. Alma; Rodríguez G. Elizabeth; Gómez V. Edna; Chapa B. Joaquín

Laboratorio de Biología de Investigación Aplicada S.A de C.V.
Tehuacán, Puebla, Mexico. 7 Norte 416. Col. Centro. C.P. 75700

RESUMEN

Se evaluaron 2 vacunas de Gumboro, para determinar el daño que causan a la Bolsa de Fabricio (BF), comparar la respuesta inmune humoral por la prueba de ELISA; microscópicamente por las pruebas

de Histopatología e Inmunoperoxidasa observar el grado de lesión que presentan las BF. Se realizó la prueba de Índice Bursal (IB), para ver si entre el IB y la respuesta inmune humoral presenta relación con lesiones bursales. De acuerdo a los resultados

obtenidos, la dos vacunas resultaron ser cepas intermedias y protegen al desafío.

INTRODUCCION

La enfermedad infecciosa de la bolsa, es una enfermedad viral aguda y altamente contagiosa, que normalmente afecta a aves jóvenes, se caracteriza por daño severo en la BF. Las aves son más susceptibles a la infección clínica de 3 a 6 semanas de edad, aunque la ocurrencia de la enfermedad se ha reportado entre 2 y 15 semanas de edad. Las aves que son susceptibles y que presentan lesiones a las 2 semanas de edad, son infectadas subclínicamente, pero la infección normalmente presenta inmunosupresión prolongada grave.

El mecanismo de la inmunosupresión no está completamente entendido, pero se presume que resulta en destrucción linfocitaria y degeneración de la bolsa. Medidas efectivas para controlar la IBF, son necesarias por el efecto de infección temprana en el sistema inmune. La infección temprana de IBF disminuye la respuesta a la vacunación e incrementa la susceptibilidad a otras infecciones. Hoy en día hay dos métodos de prevenir el daño de IBF en el sistema inmune.

1) Inmunización de parvadas reproductoras, de modo tal que se transmita inmunidad de los progenitores hacia su progenie. Tales anticuerpos maternos protegen al pollo de infecciones inmunosupresivas tempranas, y normalmente protegen de 1 a 3 semanas (inmunidad pasiva).

2) Las aves jóvenes pueden ser inmunizadas por vacunación, con vacunas a virus vivo de IBF (inmunidad activa).

Las cepas llamadas "Intermedias" son actualmente las más populares y/o utilizadas. Estas pueden ser usadas en pollos con inmunidad materna alta, ya que estas cepas son capaces de superar altos niveles de inmunidad materna a diferencia de las cepas atenuadas. Sin embargo estas cepas intermedias varían en cuanto a antigenicidad, virulencia y por consiguiente, provocan en mayor o menor grado inmunodepresión por inducir atrofia en la BF que es donde se replica el virus, así como la producción del nivel de anticuerpos depende de la antigenicidad de la vacuna y de la capacidad de respuesta del sistema inmune.

De acuerdo a lo anterior, el presente trabajo se realizó, con el siguiente objetivo.

OBJETIVOS

a) Determinar el daño que provocan las cepas vacunales (intermedias) a la Bolsa de Fabricio (BF), por sí mismas.

b) Comparar la respuesta inmune humoral contra Infección de la Bolsa de Fabricio (IBF), producida por cada vacuna.

c) Cuantificar el grado de lesiones bursales microscópicamente, por medio de pruebas Histopatología (HP) e Inmunoperoxidasa (IP).

d) Correlacionar las lesiones bursales, entre el Índice Bursal (IB) y la respuesta inmune humoral de IBF.

MATERIAL Y METODOS

Cepas Vacúnales: Para dicha prueba, se utilizaron 2 vacunas comerciales contra la IBF, conocidas como cepas "Intermedias". Estas vacunas se identificaron como grupos B y C.

La cepa Edgar del virus de la IBF, se utilizó como un virus virulento (control positivo), para compararla con las cepas vacunales "Intermedias". Este control positivo se identificó como grupo D. También se incluyó un grupo E, al cual no se le aplicó ninguna vacuna, ni virus virulento (control negativo).

Aves: Para cada grupo se utilizó 40 aves Libres de Patógenos Específicos (LPE) de 14 días de edad. Cada grupo de aves se colocó en diferentes unidades de aislamiento tipo Horsfall Bauer, a presión negativa, provistas de agua y alimento *Add Libitum*.

A los 14 días de edad, se vacunaron las 40 aves de los grupos B y C, con diferentes vacunas, a razón de una dosis por ave, vía ocular, una gota en el ojo (0.03 ml), así como también las aves del grupo D, se infectaron con el virus virulento de IBF (cepa Edgar), con una dosis de 10^4 DIE₅₀/ml.

Cinco aves de cada grupo y a diferentes tiempos (17, 21, 28, 35, 40, 45, 50 y 55 días de edad respectivamente), se sangraron para realizar pruebas serológicas ELISA así como también se sacrificaron, para cosechar la BF y determinar el IB, así como realizar pruebas de HP e IP, para evaluar el grado de daño microscópicamente.

A los 35 días de edad (21 días post-vacunación (DPV)) se desafiaron las aves vacunadas de los grupos B y C, al igual que las aves del grupo D (control positivo) se infectaron nuevamente con el virus virulento de IBF (cepa Edgar), con una dosis de 10^4 DIE₅₀/ml.

RESULTADOS

Grupo B: En la prueba de ELISA, presento serología positiva a IBF (respuesta inmune humoral) durante los MPV, alcanzando títulos arriba de 2000, similar a los títulos del grupo D (control positivo); a los 5, 10 y 15 DPD, los títulos tienden a bajar, esto debido a que hay una neutralización de los títulos vacunales hacia el virus de desafío, y a los 20 DPD tienden a incrementarse nuevamente. A los 14 DPD, las BF presentan un IB muy bajo (0.2) aunque a los 21 DPV

se recuperan (0.8), sin embargo a partir de los 10 DPD hasta el término de la prueba las BF presentan un IB regular (0.6). Microscópicamente durante toda la prueba tanto por HP como por IP, las BF no presentan lesiones, ni positividad, a excepción, que a los 10 DPD, por HP solamente algunas BF presentan lesiones en fase crónica regenerativa.

Grupo C: En la prueba de ELISA, presento serología positiva a IBF (respuesta inmune humoral) durante los MPV, alcanzando títulos arriba de 2000, similar a los títulos del grupo D; durante los MPD los títulos se mantienen e inclusive se incrementan (cerca de 4000), igual que los títulos del grupo D. A los 14 DPD, las BF presentan un IB bajo (0.4); y durante los MPD las BF presentan un IB de regular a normal (de 0.7 a 1.2) hasta los 15 DPD, pero a los 20DPD nuevamente presentan un IB bajo. Microscópicamente tanto por HP como por IP, las BF a los 3 y 7 DPV no presentan lesiones, ni tinción positiva, pero a los 14 y 21 DPV algunas BF presentan lesiones en fase subaguda y fase regenerativa; durante los MPD por IP, las BF no presentan tinción positiva, al igual que por IP no presentaron lesiones, a excepción, que a los 15 DPD algunas BF presentan lesiones en fase crónica regenerativa.

Grupo D: Durante toda la prueba hubo serología positiva a IBF, alcanzando títulos arriba de 4000, debido al virus de desafío; así como también por IB las BF a partir de los 7 días post-infección (DPI) hasta el final de la prueba presentaron IB muy bajo (de 0.2 a 0.4). Microscópicamente, durante los monitoreos post-infección (MPI) por HP, las BF presentan lesiones que van desde fase aguda, subaguda y crónica regenerativa; al igual que por IP, las BF presentan tinción positiva a excepción de los 2 últimos monitoreos, ya que la tinción resulto negativa.

Grupo E: Durante toda la prueba, no presento serología positiva a IBF, ya que no se le aplicó ninguna vacuna, ni virus de desafío (control negativo); las BF presentan un IB normal durante toda la prueba (1.0). Microscópicamente por HP las BF no presentan ninguna lesión al igual que por IP, no presentan tinción positiva a IBF.

DISCUSION Y CONCLUSIONES

Las cepas vacúnales intermedias contra la IBF, son actualmente las más populares y/o utilizadas, pero

estas cepas pueden variar en cuanto a antigénicidad y virulencia . De acuerdo a los resultados obtenidos, las vacunas de los grupos B y C resultaron ser vacunas realmente intermedias, aunque la vacuna del grupo C, microscópicamente por HP e IP y por IB resulto ser una cepa un poco más agresiva , ya que a los 14 y 21 DPV presentaron lesiones en fase subaguda y regenerativa, tinción positiva e IB de bajo a regular.

El conocimiento del efecto o daño de las vacunas sobre el tejido de la BF puede ser de utilidad para determinar el momento de la vacunación y las vacunas de elección.

De acuerdo a los objetivos planteados en el presente trabajo, se establece que:

a) La vacuna del grupo C, microscópicamente, provoca un daño moderado a la BF, por la aplicación de la misma.

b) La respuesta inmune humoral de las vacunas de los grupos B y C fue muy similar.

c) Microscópicamente las lesiones bursales post-vacunación, fueron negativas, a excepción del grupo C que a los 14 DPV presento un daño moderado tanto por HP como por IP; y las BF de los grupos B y C, presentaron daño por HP pero en fase crónica con regeneración del tejido linfoide y por HP fueron negativos.

d) No existe una correlación entre las pruebas de Elisa e IB con las pruebas de HP e IP, ya que en algunos

monitoreos tanto post-vacunación como post-desafío, las BF presentan un IB bajo o regular y los títulos por la prueba de ELISA se incrementan, con esto se podría decir que la disminución del IB es debido al incremento en los títulos a causa del virus vacunal o del virus de desafío, sin embargo por las pruebas de HP e IP, las BF de los 2 grupos vacunados y del grupo control positivo, poco a poco se va regenerando el tejido linfoide conforme pasa el tiempo.

En conclusión, las vacunas de los grupos B y C, son cepas realmente intermedias, ya que las dos vacunas presentaron seroconversión en las aves, así como también ambas vacunas son capaces de proteger a las aves ante un desafío contra la IBF.

NOTA: Bibliografía y mayor información al presente trabajo, disponible con el autor.

UTILIZACIÓN DE PROTEÍNAS RECOMBINANTES EN UNA VACUNA INACTIVADA CONTRA LA ENFERMEDAD DE GUMBORO

THE USE OF RECOMBINANT PROTEINS IN A KILLED, INFECTIOUS BURSAL DISEASE VIRUS (IBDV) VACCINE

Saubi, N.^A; Martínez-Torrecuadrada, J.L.^B; Casal, I.^B; Vela, C.^B Pagès-Manté, A.^A; España, E.^A

^A Laboratorios Hipra, S.A. - Avda. La Selva, 135 – 17170 AMER (Girona) Spain.

^B INGENASA - C/Hnos .García Noblejas 41, 4 - 28037 Madrid Spain.

SUMMARY

From a series of IBDV recombinant proteins obtained in a baculovirus, experimental vaccines have been prepared in order to determine which protein is more antigenic. Once candidate proteins were selected, a test was performed to determine the amount of protein necessary for the vaccine to fulfill the requirements of the European Pharmacopoeia.

RESUMEN

A partir de una serie de proteínas recombinantes del virus de la enfermedad de Gumboro (IBDV), obtenidas en baculovirus, se han preparado unas vacunas experimentales para determinar cual de las proteínas es más antigénica. Una vez seleccionadas las proteínas candidatas, se ha realizado una prueba para determinar la cantidad de proteína necesaria para que la vacuna cumpla los requerimientos de la Farmacopea Europea.

INTRODUCCIÓN

El uso de vacuna recombinantes inactivadas frente la enfermedad de Gumboro (IBD) puede ser de gran utilidad en el futuro siempre que su inocuidad y potencia sean buenas para el control de esta importante enfermedad. Las dudas técnicas que aparecen son: ver primero qué proteínas constitucionales se deben utilizar, cual es el contenido de las mismas y cual es su potencia si se compara con vacunas inactivadas clásicas de IBD siguiendo las directrices de la Farmacopea Europea.

Existen dos objetivos importantes en este estudio: primero determinar cual de las tres proteínas recombinantes seleccionadas VP2, VPX y poliproteína son óptimas para la elaboración de una vacuna inactivada de IBD. Segundo, cuál es la dosis mínima de la proteína recombinante en una dosis vacunal que proteja las aves.

MATERIAL Y MÉTODOS

Se han utilizado tres proteínas recombinantes, expresadas en el sistema baculovirus: VP2, VPX y

Poliproteína (VP2-VP3-VP4). , Aves: se han utilizado pollitas SPF de 4 semanas de edad libres de IBD. Se alojaron en condiciones de aislamiento completo para evitar cualquier tipo de contagio que pudiera interferir la prueba. Vacunas: Se prepararon vacunas tipo W/O (water in oil), con la misma composición que la vacuna inactivada comercial descrita a continuación. Para la determinación de la proteína más inmunogénica, se prepararon vacunas con 25 µg de proteína. Para la determinación de la dosis vacunal, se prepararon vacunas con 9 µg, 3 µg y 1 µg de proteína. Las vacunas se administraron por vía subcutánea, a razón de 0,5 ml de vacuna por ave. Cada una de las vacunas se probó en un lote de 10 animales. Se utilizó una vacuna de IBD inactivada comercial (HIPRAGUMBORO-BPL2) para la comparación de los resultados. Protocolo: A las 4 semanas de edad, las aves se referenciaron individualmente y se tomó una muestra de sangre de cada una de ellas. Se vacunaron con las diferentes vacunas, y a los 28 días post-inoculación se procedió a tomar una muestra de sangre, para la determinación de anticuerpos por sueroneutralización (método requerido por la Farmacopea Europea para el control de lote de vacunas inactivadas contra IBDV), y se realizó una infección experimental con un IBDV de alta virulencia (vvIBDV), cepa Girona, a razón de 0,2 ml de suspensión vírica por animal, por vía oral. Se valoraron los datos clínicos, postración, plumas hirsutas, motilidad y muerte post-infección experimental, y a los 10 días del enfrentamiento con el vvIBDV se procedió al estudio post-mortem de los animales, que comprendía el estudio macroscópico de las lesiones y el análisis de la relación de pesos entre la Bolsa de Fabricio (BF) y el Peso corporal (BW), BF/BW*1000.

RESULTADOS

Los resultados de protección obtenidos en la prueba de selección de proteína muestran que las mejores candidatas son la VP2 (ningún animal muerto, sólo un animal con atrofia grave de la BF, título de sueroneutralización por encima de 100.000 Unidades

de Farmacopea Europea, UFE), seguido de la poliproteína (ningún animal muerto, 2 animales con lesiones graves (BF/BWx1000 < 2) de la BF y título de sueroneutralización entre 50.000 y 100.000 UFE). La proteína que descartamos es la VPX (ningún animal muerto, 3 animales con lesiones graves de BF y un título sueroneutralizante de 12000 UFE). Los resultados de la vacuna comercial de referencia, HIPRAGUMBORO BPL2, son similares a los obtenidos con 25 µg VP2 (ningún animal muerto, un animal con lesión grave en la BF, título sueroneutralizante de 51200 UFE) Respecto a la prueba de evaluación de la dosis vacunal los resultados obtenidos demuestran que la dosis de 3 µg de VP2 son suficientes para satisfacer los requerimientos de la Farmacopea Europea.

DISCUSIÓN

Tal como hemos podido constatar en este estudio el uso de las subunidades antigénicas es interesante dentro de las posibilidades de profilaxis en avicultura.

AUTOGENEOUS IBD VACCINES: TECHNIQUES FOR ISOLATING “NEW” IBD STRAINS WHICH ARE NOT PROTECTED BY MATERNAL IMMUNITY

Robinette A. Gilbert, DVM, MAM, Diplomate ACPV

Merial Select, PO Drawer 2497, Gainesville, GA 30503

Infectious Bursal Disease (IBD) causes millions of dollars in losses to the poultry industry in the USA. These IBD strains do not cause high mortality as strains in other countries. However, these IBD strains typically cause either permanent, or more commonly, temporary immunosuppression that results in poor performance, poor feed conversions, and increased susceptibility to other diseases. IBD vaccination began in the late 1960's, with classic strains of IBD. By the early 1980's, the clinical picture for IBD had changed and the classic IBD vaccine programs began to fail. Variant IBD strains were being isolated. These strains were shown to easily break through the classic vaccine programs. Once variant IBD vaccines were added to the breeder and broiler vaccination program, bird health improved. There is recent evidence that the IBD strains are changing once again. Several poultry integrators are seeing early IBD challenges despite the use of both breeder and broiler IBD vaccines. The current IBD vaccine programs are not protecting these flocks as well as they have in the past. As in the 1960's and 1980's, integrators seek other options to protect their flocks. One option is to isolate the “new” IBD

Pero consideramos en este caso validar además este tipo de vacunas directamente en aves con anticuerpos pasivos de IBD y a la vez su uso en reproductoras, con el fin de conocer mejor los estímulos pasivos de inmunidad y su catabolismo para intentar neutralizar los casos subclínicos de IBD en brotes tal como ha ocurrido con el uso de vacunas inactivadas que utilizan antígeno completo.

REFERENCIAS

1. European Pharmacopoeia 1997 (monografía 1997:0960).
2. Martínez-Torrecuadrada, JL, Lázaro, B; Rodríguez, JF; Casal, JI. "Antigenic properties and diagnostic potential of baculovirus expressed Infectious Bursal Disease Virus proteins VPX and VP3", publicado en el Clin. Diagn. Lab. Immunol. 2000 Jul; 7(4):645-651
3. Pagès-Manté, A. “Cinética de anticuerpos frente a la enfermedad de Gumboro (IBD). Estudio evolutivo mediante una prueba de ELISA indirecta. Tesis Doctoral. 1990. Universidad de Zaragoza.

strains that break through the maternal immunity and produce an autogenous vaccine that will protect against these strains. The methods outlined below were used to isolate these “new” IBD strains in a poultry operation and, determine if they were candidates for an autogenous IBD vaccine.

Clinical signs that suggest a “new” IBD variant. The occurrence of any of the following clinical signs in a poultry operation that has a solid breeder and broiler IBD vaccination program would suggest the presence of a “new” IBD variant.

1. Bursal infection or atrophy occurs early (before 17 days of age).
2. Broiler performance and feed conversions deteriorate despite good management on the farms.
3. Miscellaneous bird health issues are present on the farm due to possible immunosuppression from IBD.

Setting up a monitoring program in the operation.

1. Remove all broiler IBD vaccines. Do not use IBD vaccines (hatchery or field administration) in flocks where the bursae will be collected. This will

confirm when the IBD challenge breaks through the maternal immunity without the possibility of interference from live broiler IBD vaccines.

2. Screen as many farms as possible. Special emphasis should be placed on well managed, poor performing farms and farms with a history of an early IBD challenge.

3. Bursal collection - Collect bursae at both 12 and 17 days of age (two collections per farm). Typically, five (5) birds per farm at each collection age are sufficient. The bursae should be split with one-half being placed in 10% neutral buffered formalin (for histopathology), and one-half in a sterile bag (for PCR). The bursas in the formalin jars should be kept at room temperature and the bursas in the sterile bags should be kept frozen.

4. Each farm should have two formalin jars and two sterile frozen bags. The labels should contain the following information: farm name, age at collection (12 or 17 day collection), and the date.

Histopathology and virus isolation results that suggest a “new” IBD variant

1. Since PCR (polymerase chain reaction) analysis is relatively expensive, histopathology is used as a screening tool. Histopathological results usually reveal one of three findings:

- a. Normal or slight variations in follicular size
- b. Acute or sub-acute follicular necrosis
- c. Chronic follicular necrosis

2. Samples that show acute or sub-acute follicular necrosis (suggesting that virus is actively replicating) are selected and the frozen paired samples are sent for PCR analysis.

3. PCR analysis is used to characterize the virus isolates into molecular groups. This test is helpful in determining if the virus is a vaccine strain (used previously on the farm) or if it is a wild IBD virus. PCR analysis is also used to characterize new isolates that do not fit into the current molecular groups. The current vaccines may not protect against these “new” pattern IBD viruses.

Progeny challenge on the IBD candidates. Once an isolate that is suspected of breaking through maternal immunity is identified, progeny challenge is done to confirm that current breeder programs will not protect against the isolate.

1. Progeny for the challenge study are selected from breeder flocks vaccinated with two live priming vaccines (classic and variant), plus one hot live classic priming vaccine. The live vaccines are followed by two inactivated bursal-derived vaccines, containing classic and variant IBD strains. Progeny are selected from a number of different breeder flocks. Fifty one-day-old chicks from each of the breeder flocks are sent to the laboratory.

2. The progeny are housed in isolators for 14 days.

3. At 14 days, twenty birds from each breeder source are challenged with the variant E strain (positive control) and twenty birds from each breeder source are challenged with the “new” isolate (test group). Ten birds from each breeder source are left unchallenged (negative control).

4. At 21 days, all the birds are sacrificed and the bursa/body weight (BBW) ratios are recorded for each bird. The BBW ratios are calculated for each individual bird using the following formula.

BBW ratio = [bursa weight (in grams)/body weight (in grams)] x 1000. The mean BBW ratio and the standard deviations (\pm SD) are determined for the negative control group of each flock. The benchmark BBW ratios are established by subtracting the two SD from the mean BBW ratio.

5. A BBW ratio of each individual bird is compared to the benchmark standard for the group. If the BBW ratio is less than the benchmark standard, then the bird is classified as unprotected. If the BBW ratio is equal to or greater than the benchmark standard, then the bird is classified as protected. The other factor that is assessed is whether the individual bursa has gross lesions indicating active infection (without atrophy). If this is the case, then the bird is classified as unprotected, regardless of the BBW ratio. The level of protection is calculated as a percentage using the formula:

(Number of birds classified as protected / Number of birds in the group) x 100

6. The following is an example of the results from a progeny challenge study on a “new” IBD strain.

7. “New” IBD isolates with numerous moderate and poor group ratings should be considered as candidates for a potential autogeneous vaccine.

Flock # (see note below)	Percent Protected	
	Variant E	“New” IBD Strain
1	100	11
2	95	47
3	90	26
4	95	60
5	100	68
6	74	67
7	65	0
8	95	0
9	100	53
10	100	63

The protection ratings are as follows:

<20% = Poor
20-50% = Moderate
>50% = Good

DIFERENCIACIÓN DE AISLAMIENTOS DEL VIRUS DE ANEMIA INFECCIOSA EN MÉXICO

DIFFERENTIATION OF CHICKEN ANEMIA VIRUS STRAINS ISOLATED IN MEXICO

Ledesma MN^{A*}, Huerta LB^A, Alonso MR^B, Fehervari BT^A y Tellez IG^A.

^A Departamento de Producción Animal:Aves FMVZ UNAM

^B Laboratorio de Genética Molecular FMVZ UNAM

SUMMARY

The chicken anemia virus was isolated in Mexico in 1993. Nevertheless, given the difficulties that the isolation represents, little information has been obtained about the characteristics of these isolates. The purpose of this paper was to differentiate –using polymerase chain reaction (PCR) and restriction fragment length polymorphism (RFLP)– 10 isolates obtained in the Poultry Pathology Laboratory, Department of Animal Production: Poultry, Faculty of Veterinary Medicine and Animal Husbandry, The National Autonomous University of Mexico (*Laboratorio de Patología Aviar, Departamento de Producción Animal: Aves, de la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia de la Universidad Nacional Autónoma de México*), during 2001. Results showed genomic differences between Mexican isolates, which can be related with the clinical differences observed in the field. Further, full sequence studies are required in order to determine more accurately genomic differences/similarities.

RESUMEN

El virus de anemia infecciosa fue aislado en México en 1993, sin embargo dadas las dificultades de aislamiento, se tiene poca información acerca de las características de estos virus. El objetivo del presente trabajo fue diferenciar por medio de PCR y RFLP 10 aislamientos obtenidos en el Laboratorio de Patología Aviar del Departamento de Producción Animal: Aves de la FMVZ UNAM durante 2001.

A partir de macerados de timo y médula ósea de aves remitidas para diagnóstico al Departamento de Producción Animal Aves de la FMVZ UNAM y que al ser inoculados en aves libres de patógenos específicos de 1 día reprodujeron el cuadro clínico característico de anemia infecciosa, fue extraído el DNA total mediante un buffer de lisis con proteinasa K y SDS y posterior tratamiento con Fenol-cloroformo-alcohol isoamílico. El DNA fue precipitado con etanol, resuspendido en agua y congelado hasta su utilización.

Fueron empleados los iniciadores 5'GAC TGT AAG ATG GCA AGA CGA GCT C3' (Sentido) y 5'GGC TGA AGG ATC CCT CAT TC3' (Reversa) que amplifican un fragmento de 675 pb correspondiente al extremo amino terminal del gene

para la proteína viral VP1. Los productos de PCR fueron corridos en geles de agarosa al 1% y teñidos con bromuro de etidio. Las bandas fueron cortadas y purificadas mediante la técnica de “perlas”, y posteriormente digeridas con las enzimas *HaeIII* y *Hinfl*. Los productos de digestión fueron corridos en geles de poliacrilamida al 1% y teñidos con plata.

De los diez casos estudiados, con la enzima *HaeIII*, 2 aislamientos fueron compatibles con la cepa de referencia Cux-1 encontrándose los fragmentos esperados de 238, 161, 113, 67, y 58 pares de bases. Los 8 aislamientos restantes, presentaron diferencias con respecto de las cepas descritas previamente.

Mediante el uso de esta enzima los aislamientos pudieron ser separados en 6 grupos.

Con la enzima *Hinfl*, los virus pudieron ser separados en 5 grupos, sin embargo no hubo relación con los hallazgos de la enzima *HaeIII*. Estos resultados muestran que existen diferencias en los genomas de los virus aislados en México, lo cual podría tener relación con los diferentes cuadros que se encuentran en campo. Se requieren sin embargo más estudios en los que sea posible secuenciar el genoma completo para establecer diferencias o similitudes más precisas.

(El artículo completo será presentado para su publicación en la revista *Avian Diseases*).

CASE REPORT: A SEVERE INFECTIOUS CORYZA INFECTION IN A MULTIPLE AGE LAYER COMPLEX IN CENTRAL CALIFORNIA

INFORME DE UN CASO SEVERO DE CORIZA INFECCIOSA EN UN COMPLEJO DE POSTURA CON PARVADAS DE EDADES MÚLTIPLES EN LA REGIÓN CENTRAL DE CALIFORNIA

Bland, M.C. ^{AB}, A, A. Bickford ^A, B.R., Charlton^A, G. L. Cooper ^A, F. Sommer ^A, G. Cutler ^B

^A California Animal Health Food Safety Laboratory, Turlock Branch, University of California – Davis, 1550 N. Soderquist Av., P. O. Box 1522, Turlock CA 95381

^B Cutler Associates P. O. Box 1042 Moorpark, CA 93020

RESUMEN

Se presentó un brote de coriza infecciosa en 4 parvadas de ponedoras –en un complejo con edades múltiples– durante un período de 13 semanas a partir de enero del 2000. Los signos clínicos incluyeron inflamación facial, sinusal y palpebral, tos, estertores, depresión severa y anorexia. La mortalidad varió del 8 al 64% y la producción de huevo cayó de un promedio de 77% a tan solo 15%. Disertaremos sobre diversas prácticas de manejo, incluyendo la vacunación de las parvadas susceptibles en presencia del brote.

The first week of January 2001, a large multi-age layer complex located in the Central Valley of California became infected with *Haemophilus paragallinarum* (Infectious Coryza). Complex “A” is a large facility of five environmental buildings housing approximately 389,000 layers ages 67 to 104 weeks. Located nearby is complex b, a second but smaller complex operated by the same company, consisting of six “California Woody Style” buildings housing approximately 180,000 layers, About a half kilometer separates the two complexes. Neither facility had a history or clinical signs of Infectious Coryza.

Clinical signs began in building 7, (Complex A) in a flock of 95 week-old layers. Signs included severe

depression, loss of appetite, respiratory distress (rales, snicking, swollen sinuses) and increased mortality. Approximately 15 – 20 % of the flock was initially involved. Mortality increased from 0.3 to 31.7 % per week in 3 weeks. Total mortality over an 8-week period was approximately 48 %. Egg production dropped from 75 to 15.7 % over a 3-week period. Feed consumption dropped from 26 lbs to 10 lbs per 100 birds in 2 weeks.

Birds were submitted to the California Animal Health Food Safety lab in Turlock. Gross lesions consisted of swollen sinuses containing yellow caseous exudate, mucoïd tracheitis, peritonitis, and swollen kidneys. *H. Paragallinarum* was isolated from the sinuses and airsacs. Isolated from the trachea were *Ornithobacterium rhinotracheale* and *Pasteurella hemolytica*-like bacteria and from the sinus *Pasteurella gallinarum* and *Mycoplasma* sp. (not typable). Virus was not isolated from the trachea or cecal tonsil. Serology for Avian Influenza (AGID) was negative. Paired serology (ELISA) showed no increase in titers to Newcastle Disease or Infectious Bronchitis. Birds were serologically (Plate agglutination and ELISA) positive to MG and MS.

The flock was medicated for ten days with chlorotetracycline in the feed and erythromycin in the

water. However, medication did not reduce mortality or slow the progress of the disease. The following management protocols were implemented in the affected flock (building 7) as well as the adjacent flock (building 8) in an attempt to mitigate the spread of the disease to the adjacent flocks in complex A as well as complex B.

Building 8 was medicated with the same medications as the affected flock (building 7). It was recommended that the affected flock be marketed; however the owner felt that this was not a viable option. We reviewed a number of biosecurity issues with complex employees including, keeping equipment and movement of employees separated between the two complexes as well as the rest of the flocks located in the back units as much as possible. Feed and egg trucks were advised to visit complex B first before proceeding to Complex A. Mortality was to be picked up and disposed separately between the two complexes as well as from the other flocks in the complex A.

Within two weeks the adjacent flock in building 8 began to exhibit clinical signs of *Coryza*. Mortality increased from 0.3 to 16 % per week in 6 weeks. Total mortality over a 10-week period was 43 %. Egg production dropped from 74 to 22 % over a 5-week

period. Feed consumption dropped from 24 lbs to 11 lbs per 100 birds in 2 weeks.

Flocks housed in buildings 11 and 12 (complex A) were vaccinated 5 weeks after the initial infection in building 7 with a killed *Coryza* Bacterin in an effort to reduce clinical signs from the oncoming *Coryza*. However, approximately 6 and 10 weeks after the initial infection (1 and 5 weeks post vaccination with the killed *Coryza* vaccine) flocks housed in buildings 11 and 12 started showing signs of respiratory distress. Clinical signs were not as severe in the vaccinated flocks as compared to flocks housed in buildings 7 and 8. Total mortality was 22 and 9 %, egg production dropped to 25 and 33 % respectively and the duration of clinical signs was shorter.

All incoming pullet flocks that were to be housed in complex "A" were to be vaccinated twice as pullets with a killed *Coryza* vaccine. No new clinical cases of *Coryza* have been observed on either the front or back units. Further investigations did not reveal a source for the *Coryza*, although the *Coryza* spread through complex A very slowly (total of 13 weeks), complex B never broke with the disease. We were unable to serotype the *Haemophilus paragallinarum* isolate.

CARACTERIZACION GENOMICA DE ORNITHOBACTERIUM RHINOTRACHEALE MEDIANTE LA TECNICA DE ERIC-PCR

ERIC-PCR GENOMIC CHARACTERIZATION OF *HAEMOPHILUS PARAGALLINARUM*

Soriano VE¹, RP Fernández² y PJ Blackall³

¹Departamento de Investigación y Desarrollo Avícola, Biosíntesis Laboratorios SA. Toluca 50130, México.

²Centro de Investigación y Estudios Avanzados en Salud Animal, FMVZ-UAEM. Toluca 50000, México.

³Queensland Department of Primary Industries, Agency for Food and Fibre Science, Animal Research Institute, Yeerongpilly 4105, Australia.

SUMMARY

The genomes of reference strains and field isolates of *H. paragallinarum* were typified in accordance with Kume's typifying scheme, using the ERIC-PCR test. A total of 9 amplicone factors were observed, corresponding to each reference strain (A-1 to C-4). Fifteen isolates showing 8 different patterns were also included in the study.

RESUMEN

Se tipificaron genómicamente cepas de referencia y aislamientos de *Ornithobacterium rhinotracheale* mediante la prueba de ERIC-PCR. Se observaron seis patrones de amplicones entre las cepas de referencia y cuatro para los aislamientos. El empleo de esta prueba

permitió establecer las relaciones genómicas y epizootiológicas entre las cepas de *O. rhinotracheale*.

Este estudio reporta el análisis de la distribución de variabilidad de secuencias ERIC (Enterobacterial Repetitive Intergenic Consensus) en el ADN cromosómico de cepas de referencia y aislamientos de *Ornithobacterium rhinotracheale* empleando una prueba de PCR. El propósito del estudio fue establecer la diversidad genética de este microorganismo.

La variación genética de *O. rhinotracheale* ha sido evaluada mediante la prueba de electroforesis enzimática multilocus (MLEE), PCR basado en las secuencias repetitivas (REP-PCR), secuencia del gen 16 ARNr (1) y RAPD (2).

Secuencias de ADN repetitivas han sido descritas para eubacterias. Las secuencias ERIC son altamente conservadas al nivel de secuencia de nucleótidos, pero la localización cromosomal difiere entre especies o cepas. Las secuencias ERIC son de 126 bp aproximadamente y parecen estar restringidas a regiones transcritas del genoma, tanto en regiones intergénicas de operones policistrónicos como en regiones no transcritas (3).

Se incluyeron nueve cepas de referencia de *O. rhinotracheale* (A - I), las cuales mostraron seis patrones de amplicones ERIC. Asimismo, se incluyeron 10 aislamientos obtenidos de casos clínicos (4), los cuales mostraron 4 patrones diferentes.

La prueba de ERIC-PCR es una técnica que establece diferencias intraespecie en *O. rhinotracheale*, permitiendo ser empleada en estudios tanto de relaciones genéticas, así como de relaciones epizootiológicas, de este microorganismo.

REFERENCIAS

1. Amonsin, A., Wellehan, F. X., Li, L. L., vandamme, P., Lindeman, C., Edman, M., Robinson, R. A., and V. Kapur. Molecular epidemiology of *Ornithobacterium rhinotracheale*. J. Clin. Microbiol. 35:2894-2898. 1997.
2. Hung, A. L., and A. Alvarado. Molecular investigation of *Ornithobacterium rhinotracheale* outbreaks in commercial poultry. Proc. 50th West. Poul. Dis. Conf. Davis, California. pp. 109-110. 2001.
3. Lupski, J. R., and G. M. Weinstock. Short interspersed repetitive DNA sequences in prokaryotic genomes. J. Bacteriol. 174:4525-4529. 1992.
4. Soriano, V. E., Longinos, G. M., Navarrete, G. M., and R. P. Fernández. Characterization and adherence tests of *Ornithobacterium rhinotracheale* isolates from Mexico. Proc. 49th West. Poul. Dis. Conf. Sacramento, California. p. 50. 2000.

(Al artículo completo se publicará en *Avian Diseases*).

CHARACTERISATION OF INDIAN ISOLATES OF *HAEMOPHILUS PARAGALLINARUM*

CARACTERIZACIÓN DE AISLAMIENTOS DE *HAEMOPHILUS* *PARAGALLINARUM* EN LA INDIA

S. Tongaonkar¹, S.G. Deshmukh¹ and P.J. Blackall²

¹Vaccine R & D, Poultry Diagnostic and Research Centre, Venkateshwara Hatcheries Ltd, Pune, India

²Agency for Food and Fibre Sciences, Queensland Department of Primary Industries, Animal Research Institute, Yeerongpilly, Australia

RESUMEN

No se conocen los tipos de *Haemophilus paragallinarum* que causan brotes de coriza infecciosa en la avicultura de la India, lo cual representa una importante limitación para el desarrollo de vacunas a nivel nacional. Se realizó la serotipificación de ocho aislamientos de *H. paragallinarum* en Australia e India, usando la prueba de inhibición de la hemaglutinación con antisueros de conejo de alto título. Todos los aislamientos usados en este estudio se confirmaron como positivos a *H. paragallinarum* mediante la reacción en cadena con polimerasa (PCR). Encontramos que cuatro aislamientos eran del serovar A y cuatro del serovar C, no logrando identificar ninguno del serovar B. El éxito de esta colaboración permitirá el desarrollo de vacunas completamente caracterizadas contra la coriza infecciosa, a nivel nacional, con base en los aislamientos de *H. paragallinarum* obtenidos en la India, al servicio de la industria avícola de dicho país.

Infectious coryza (IC) is an acute respiratory disease of chickens caused by *Haemophilus paragallinarum* (2). The greatest economic losses associated with this disease result from poor growth performance in growing birds and marked reduction (10–40%) in egg production in layers (2). The most commonly used serological classification scheme for *H. paragallinarum* is the Page scheme, which recognizes serovars A, B, and C (2). The importance of the Page serotyping scheme is that inactivated vaccines provide serovar-specific protection (2).

There was no knowledge about the types of *H. paragallinarum* present in Indian poultry. This is a major limitation to the development of national vaccines. Hence, a collaborative research program between the Bacteriology Research Laboratory and the research laboratories of the Venkateshwara Hatcheries Ltd Group was commenced.

A total of eight Indian isolates were serotyped at both the Bacteriology Research Laboratory in Australia and at the Venkateshwara Hatcheries Ltd Group in

India. The serotyping was done using a haemagglutination inhibition test with high titre rabbit antisera as previously described (1). All of the isolates used in this study were confirmed as *H. paragallinarum* by the HP-2 PCR as previously described (3).

We found that four isolates were serovar A and four isolates were serovar C – no isolates of serovar B were identified. This successful collaboration will allow the development of fully characterised, national infectious coryza vaccines based on Indian isolates of *H. paragallinarum*.

REFERENCES

1. Blackall, P. J., L. E. Eaves, and G. Aus. Serotyping of *Haemophilus paragallinarum* by the

Page scheme: comparison of the use of agglutination and hemagglutination-inhibition tests. *Avian Dis.* 34:643-645. 1990.

2. Blackall, P. J., M. Matsumoto, and R. Yamamoto. Infectious coryza. In: *Diseases of Poultry*, 10th ed. B. W. Calnek, H. J. Barnes, C. W. Beard, L. R. McDougald, and Y. M. Saif, eds. Iowa State University Press, Ames, Iowa. pp. 179-190. 1997.

3. Chen, X., J. K. Mifflin, P. Zhang, and P. J. Blackall. Development and application of DNA probes and PCR tests for *Haemophilus paragallinarum*. *Avian Dis.* 40:398-407. 1996.

PRESENCIA DE *HAEMOPHILUS PARAGALLINARUM* NAD INDEPENDIENTE EN MÉXICO

THE PRESENCE OF NAD-INDEPENDENT *HAEMOPHILUS PARAGALLINARUM* IN MEXICO

¹ Alejandro García F., ² Patrick Blackall., ³ Enrique Angulo

¹Laboratorios Avilab., ²Department of Primary Industries Queensland Australia., ³Clínico de campo.

SUMMARY

NAD-independent *H. paragallinarum* causes infectious coryza in poultry. This disease is economically important. Mexican strains of this pathogen were identified using polymerase chain reaction (PCR) and biochemical tests. When susceptible birds were inoculated with these isolates, they developed typical infectious coryza. Two serovars were identified in accordance with Page's classification, i.e.: B (PUMA), and C (AZUL y ORO). Serovar C has only been reported in South Africa and now in Mexico. Serovar B had not been reported in the world before. This is the first report of serovar B (PUMA) of NAD-independent *H. paragallinarum*.

RESUMEN

Haemophilus paragallinarum NAD independiente causa Coriza Infecciosa aviar, siendo esta de

importancia económica. Mediante PCR y bioquímicas se identificaron dos cepas mexicanas de *Haemophilus paragallinarum* NAD independientes. Cuando estas se inocularon en aves susceptibles, se presentó el cuadro característico de Coriza. Se identificaron dos serovares de Page, uno de ellos el B (PUMA) y C (AZUL y ORO). El serovar C se ha reportado solo en Sudáfrica y ahora en México. No hay reportes en el mundo del serovar B, siendo esta investigación la primera que demuestra la presencia de este serovar de *Haemophilus paragallinarum* NAD independiente (PUMA).

(El trabajo completo se publicará en la revista *Avian Diseases*).

PREVALENCIA E IDENTIFICACIÓN DE SEROGRUPOS Y SEROVARIEDADES DE *HAEMOPHILUS PARAGALLINARUM* EN PONEDORAS COMERCIALES DE POSTURA EN MÉXICO

PREVALENCE AND IDENTIFICATION OF *HAEMOPHILUS PARAGALLINARUM* SEROGROUPS Y SEROVARS IN COMMERCIAL LAYERS IN MEXICO

Miguel A. Márquez ^A, Juan Luis García ^A, y Pomposo Fernández ^B

^A Boehringer Ingelheim Vetmedica, Guadalajara, Jalisco, México, ^B Centro de Investigación y Estudios Avanzados en Salud Animal, Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia. Universidad Autónoma del Estado de México
mmarquez@gua.boehringer-ingelheim.com

SUMMARY

Twenty six Mexican suspected isolates of *H. paragallinarum* obtained from laying hens were serotyped using the hemagglutination inhibition test and following Kume's scheme. Twenty two (84.6%) isolates were positive to *H. paragallinarum*. Eight (36.36%) of these isolates corresponded to serogroup A, 8 (36.36%) to serogroup B and 6 (27.27%) to serogroup C. Prevailing serovars were A-1, A-2, B-1, and C-2. The considerable increase of Serogroup B is remarkable and surprising. In addition to the 22 isolates *H. paragallinarum*, 3 (11.5%) isolates were identified as *Pasteurella avium*, and one sample (3.8%) was positive to *Ornithobacterium rhinotracheale*.

RESUMEN

Empleando el Esquema de Kume, se serotipificaron por medio de la Prueba de Inhibición de la Hemoaglutinación, veinte y seis aislamientos de *Haemophilus paragallinarum* (*H. pg.*) hechos en México, a partir de gallinas en postura. Veintidos de ellos, fueron positivos a *H. pg.* (84.6 %), de los cuales, ocho correspondieron al Serogrupo A (36.36 %), ocho al Serogrupo B (36.36 %) y seis al Serogrupo C (27.27 %). Las serovariedades predominantes fueron: A-1, A-2, B-1 y C-2. Es remarcable y sorprendente el considerable aumento de la presencia del Serogrupo B. Además de los veintidos aislamientos de *H. pg.*, tres aislamientos se identificaron como *Pasteurella avium* (11.5 %) y una muestra resultó positiva a *Ornithobacterium rhinotracheale* (3.8%).

INTRODUCCIÓN

La Coriza Infecciosa (CI) es una enfermedad aguda del tracto respiratorio superior de la gallina doméstica, ocasionada por el *Haemophilus paragallinarum* (*H. pg.*). La CI se encuentra ampliamente distribuida en la avicultura industrial mundial. Su impacto económico es gran importancia ya

que provoca un aumento del porcentaje de aves eliminadas durante el periodo de crianza y desarrollo y además, en gallinas adultas puede disminuir la producción de huevo entre un 10 y 40 % ⁽⁴⁾.

El *H. paragallinarum*, es un microorganismo inmóvil, con tendencia a formar filamentos, gram negativo y de tinción bipolar, que puede poseer o no cápsula. El *H. pg.* requiere de factores de crecimiento como Nicotinamida Adenina Dinucleótido (Factor V). Sin embargo, desde 1992 se han reportado aislamientos de *H. pg.* independientes de NAD en África del Sur; generando el temor de que los inmunógenos elaborados con cepas clásicas de *H. pg.* NAD-dependientes no confieran una protección suficiente ^(1,2,3).

A lo largo de los años se han realizado varias clasificaciones del *H. pg.* basadas en su estructura antigénica. Page clasificó los aislamientos en Serogrupos A, B y C mediante pruebas de aglutinación en placa. Kume, utilizando la técnica de Inhibición de la Hemoaglutinación identificó los serogrupos I, II, III y 7 hemoaglutininas o serovariedades. Una octava y novena serovariedad han sido reconocidas en Australia. Recientemente, Blackall propuso una modificación de la clasificación de Kume, en la cual, se utiliza en primera instancia la clasificación de Page en base de Serogrupos y posteriormente en orden progresivo, a las 9 hemoaglutininas identificadas hasta ahora, ordenadas de la siguiente manera : A1, A2, A3, A4; B1; C1, C2, C3 y C4. Esta nueva clasificación es muy flexible y práctica, ya que permite la incorporación de nuevas hemoaglutininas.

Debido a que las bacterinas absorbidas en hidróxido de aluminio ó emulsionadas en aceite, actualmente empleadas en el campo incluyen los serogrupos A, B y C de Page de *H. pg.* más comúnmente identificados a nivel internacional, y a pesar de que se ha reportado inmunidad cruzada entre los serogrupos A y C con el serogrupo B, a este último se le considera un serogrupo emergente bajo la

sospecha de poseer subtipos, ya que se ha encontrado en algunos países (Africa del Sur, Alemania, Argentina y México) con incidencia y prevalencia crecientes ^(2,3). Por esta razón se consideró relevante, realizar un estudio epizootológico para determinar los serogrupos y las serovariedades prevalentes, en casos recientes de CI, en las principales explotaciones de gallinas de postura de diversas zonas avícolas de México; además de, evaluar la posibilidad de agregar cepas locales a las vacunas existentes para obtener una mayor protección

OBJETIVOS

1. Identificar la presencia de *H. paragallinarum* en distintas áreas geográficas de México a partir de cuadros clínicos corizoides, observados en gallinas con signología respiratoria y baja de producción, observados a lo largo del 2000 y del 2001.

2. Determinar el serogrupo y la serovariedad de los aislamientos obtenidos durante el presente estudio.

MATERIAL Y MÉTODOS

Los especímenes objeto de este estudio, fueron remitidos para su estudio al Centro de Investigación y Estudios Avanzados en Salud Animal (CIESA) de la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia de la Universidad Autónoma del Estado de México

MATERIAL BIOLÓGICO

Cepas bacterianas.- Se utilizaron las cepas de referencia 221, 2403, HP - 14 ; 2671 ; H-18 , Modesto, SA - 3 y HP - 60, correspondientes a los serovares A-1, A-2, A-3, A-4 ; B-1 ; C-1, C-2, C-3 y C-4 de *H. paragallinarum*, respectivamente. Dichas cepas fueron facilitadas al MVZ Pomposo Fernández Rosas con fines de investigación por el Dr. Patrick J. Blackall del Animal Research Institute, Queensland Department of Primary Industries, Agency for Food and Fibre Sciences, Yeerongpilly, Queensland , 4105, Australia

Se estudiaron veinte y seis muestras procedentes de diferentes parvadas de gallinas ponedoras presentando cuadros corizoides.

Medios de cultivo.- Se utilizó Agar Sangre (10% sangre de ovino) para el aislamiento de *H. paragallinarum*, y *Staphylococcus epidermis* como colonia nodriza. Se empleó, además, el medio TM/SN reportado por Blackall et al. 1990

Antisueros.- Los antisueros correspondientes a las cepas de referencia fueron obtenidos del CIESA. Los eritrocitos fijados con glutaraldehído, se prepararon de acuerdo con la técnica descrita por Blackall et al.. 1990.

Elaboración de las hemoaglutininas.- Cultivos en TM/SN de 24 hs. de cada cepa de referencia y los aislamientos de *H. paragallinarum* fueron lavados y suspendidos en una solución de tiocianato de potasio.

La solución fue ajustada a una densidad óptica de 1.6 a 650 nanometros, equivalente a 1×10^{10} bacterias / ml y sonicada por 30 segundos (60% de pulsos de salida). El paquete bacteriano fue lavado con PBS resuspendido a una densidad óptica de 1×6 a 650 nanometros (Blackall et al, 1990)

Prueba de la Hemoaglutinación.- La actividad hemoaglutinante de cada cepa de referencia y aislamiento se determinó mediante diluciones dobles seriadas en PBS. Se adicionaron volúmenes iguales de la suspensión de eritrocitos al 1%. Después de la incubación por 30 minutos, el título de unidades hemoaglutinantes (UH) fue leído como el recíproco de la dilución máxima que mostró completa hemoaglutinación (Blackall et al, 1990).

Eliminación de las hemoaglutininas inespecíficas.- Para la eliminación de la hemoaglutininas inespecíficas se utilizó una suspensión de eritrocitos fijados con glutaraldehído al 10%.

Absorción de antisueros.- La absorción de antisueros de las cepas de referencia se realizó diluyendo estos, en 1:40 en PBS y la hemoaglutinina fue ajustada a 64 UH y el volumen fue cinco veces el del suero a absorber, la hemoaglutinina fue ajustada y centrifugada y se eliminó el sobrenadante. El paquete bacteriano (hemoaglutinina) fue resuspendido en el antisuero a absorber. La suspensión fue mantenida durante dos horas a temperatura ambiente y doce horas a 4° C. La suspensión fue centrifugada y el sobrenadante, ya como antisuero absorbido, fue conservado en congelación hasta su utilización.

Asignación de los aislamientos a los serogrupos de Kume.- Se llevo a cabo con los antisueros sin absorber, mediante la Prueba de la Inhibición de la Hemoaglutinación. La asignación de la hemoaglutinina de un aislamiento a su correspondiente serogrupo, fue realizada considerando el titulo más alto de anticuerpos inhibidores de la hemoaglutinación, mostrado en las columnas o filas de los antisueros pertenecientes a los serogrupos A, B ó C (Blackall et al, 1990)

Asignación de los aislamientos a las serovariedades de Kume.- Se realizó con los antisueros previamente absorbidos, mediante la Prueba de Inhibición de la Hemoaglutinación . La asignación de la hemoaglutinina de un aislamiento a su correspondiente serovariedad, fue realizada considerando el titulo más alto de anticuerpos inhibidores de la hemoaglutinación, mostrado en las columnas o filas del antisuero absorbido.

RESULTADOS

Bacteriología.- De los 26 casos/aislamientos estudiados, se obtuvieron los siguientes resultados.

Dos casos fueron positivos a más de un microorganismo.

Veinte y dos muestras fueron positivas a *H. paragallinarum* (84.6%).

Tres aislamientos se identificaron como *Pasteurella avium* (11.5%).

Una muestra resultó ser positiva a *Ornithobacterium rhinotracheale*. (3.8%)

Serología de los veinte y dos aislamientos de *H. paragallinarum*

Determinación del serogrupo.- Ocho aislamientos correspondieron al Serogrupo A (36.36 %), ocho al Serogrupo B (36.36 %), seis al Serogrupo C (27.27 %).

Determinación de la serovariedad.- Siete aislamientos se identificaron como serovariedad A-1, uno como A-2, cinco como B-1, seis como C-2

DISCUSIÓN

1. Los resultados de la serotipificación de veinte y seis aislamientos de *H. paragallinarum* obtenidos de diferentes regiones de la República Mexicana, muestran que las serovariedades predominantes son: A-1, A-2; B-1 y C-2, de manera similar a los resultados obtenidos por Soriano et al, 2001 (4), quien identificó las mismas serovariedades. Desde otro punto de vista los resultados obtenidos en este trabajo muestran que la serovariedad A-1 es la más frecuente, seguida de la C-2 y en menor proporción la serovariedad B-1.

CONCLUSIONES

Los brotes de Coriza Infecciosa ocurridos en parvadas inmunizadas con bacterinas bi o trivalentes, podrían estar siendo ocasionados por serovariedades de *H. paragallinarum*, que no están contenidas en los inmunógenos utilizados.

Los resultados obtenidos en el presente estudio, muestran la necesidad de realizar un diagnóstico bacteriológico y bioquímico preciso, tomando en cuenta que existen otras agentes bacterianos morfológicamente similares, como es el caso del *Haemophilus spp*, *Ornithobacterium rhinotracheale* y *Pasteurella spp*

RECOMENDACIONES

Se recomienda continuar con la búsqueda de aislamientos de *H. paragallinarum*, con el fin de definir la prevalencia de las distintas serovariedades presentes en México y en el Continente Americano. Sugerimos, asimismo, continuar con este estudio empleando pruebas de Biología Molecular, que permitan un conocimiento mas detallado del agente causal.

REFERENCIAS

1. Blackall, P. J. (1989). The Avian Haemophili. A review. Clin Microbiol Review. 1989; 2: 270-277..
2. Horner, R. F., Bishop, G. C., & Haw, C. (1992). An upper respiratory disease of commercial chickens resembling infectious coriza, but caused by a V-factor independent bacterium. Avian Pathology. 21: 421-427
3. Mouahid, M., Bisgaard, M., Morley, A. J., Mutters, R. & Mannheim, W. (1992) Occurrence of V-factor (NAD) independent strains of *Haemophilus paragallinarum*. Veterinary Microbiology. 31:363-368.
4. Soriano, V. E., P.J. Blackall, S.M. Dabo, G. Tellez; G.A. García Delgado, and R.P. Fernández. Serotyping of *H. paragallinarum* isolates from México by the Kume Hemagglutinin Scheme. Avian Dis 45:680-683.

AN EMERGING IMMUNOTYPE (VARIANT TYPE B) OF *HAEMOPHILUS PARAGALLINARUM*: SEROTYPING AND VACCINATION-CHALLENGE EXPERIMENTS

UN NUEVO INMUNOTIPO (TIPO VARIANTE B) DE *HAEMOPHILUS PARAGALLINARUM*: SEROTIPIFICACIÓN Y EXPERIMENTOS DE VACUNACIÓN Y DESAFÍO

Anton A. C. Jacobs, Karin vd Berg and Aris Malo

Intervet International BV, P.O. Box 31, 5830 AA Boxmeer, The Netherlands

RESUMEN

Hemos probado varios aislamientos de *Haemophilus paragallinarum* procedentes de brotes de coriza en parvadas bien vacunadas en Ecuador,

Argentina, Estados Unidos y Zimbabwe. La mayoría de los aislamientos apareció como intipificable ante la prueba de inhibición de la hemaglutinación, en ocasiones mostrando algún nivel de reacción cruzada

con el serotipo B. Las bacterinas comerciales trivalentes que existen en el mercado no protegieron contra el desafío con dichas cepas. En contraste, una vacuna experimental tetravalente con adyuvante oleoso que contenía una de las cepas intipificables (variante tipo B) pareció ser inmunogénica después de una vacunación contra todos estos aislamientos de campo y contra las cepas de los serotipos A, B y C. En conclusión, se confirmó la existencia de una nuevo inmunotipo (tipo variante B) de *H. paragallinarum* y parece que una vacuna tetravalente con adyuvante oleoso es la mejor opción en la batalla contra estos nuevos aislamientos de campo.

ABSTRACT

Outbreaks of Infectious Coryza are reported from different countries despite routine vaccination against this disease. This could be an indication that new serotype(s) of *Haemophilus paragallinarum* have evolved. In our experiments, several field isolates from vaccinated flocks were tested. These included strains from Ecuador (3 strains), Argentina (2 strains) the United States (1 strain), and Zimbabwe (1 strain). Except for one Ecuadorian type C strain, all other isolates appeared untypable in the hemagglutination inhibition (HI) test, sometimes showing some level of cross-reaction to serotype B of *H. paragallinarum*. This suggests that these strains may be considered variants of such serotype and most probably constitute a new immunotype. Existing inactivated commercial trivalent vaccines did not protect against challenge with

these strains. In contrast, an experimental tetravalent oil adjuvant vaccine, containing one of the untypable (variant type B) strains, appeared immunogenic after one vaccination against all isolates. The efficacy of the new experimental tetravalent vaccine was further tested in layer chickens under field conditions. Layer chickens were vaccinated in the rearing period at 8w and at 16w of age or were left unvaccinated. Vaccinates and controls were challenged with type A, B, C and variant type B at 25 or 45 weeks of age. After the challenges good protection was found against all four immunotypes.

Similar variant type B strains have been described previously by Terzolo et al (Avian Pathol. 26:365-376. 1997) who tested strains from Argentina. These authors also indicated that existing commercial vaccines were not effective against the local isolates. The fact that we isolated similar strains in other South-American countries as well as in the USA and Zimbabwe indicates that the variant strains are emerging and spreading and have reached the North-American and African continent. In conclusion, the existence of a new emerging immunotype (variant type B) of *H. paragallinarum* was confirmed and a tetravalent (oil adjuvant) vaccine including variant type B seems to be the best choice in the battle against the new field isolates.

(A full report of the study will be submitted to *Avian Pathology*).

CORIZA INFECCIOSA, INMUNIDAD Y RESISTENCIA BACTERIANA A LOS ANTIBIÓTICOS

INFECTIOUS CORYZA (CI): IMMUNITY AND BACTERIAL ANTIBIOTIC RESISTANCE

Enrique González E., Daniel Marrufo V., Eduardo Lucio D.

Investigación Aplicada S.A. de C.V. Tehuacán Pue. México.

SUMMARY

CI outbreaks were reported in an egg-producing company in Mexico starting at week 20, and for up to 3 different occasions prior to production peak. As a complicating factor of these outbreaks, *Haemophilus paragallinarum* isolates were resistant to the majority of the antibiotics tested. In an attempt to correct the problem, bacterins containing serotypes A, B, and C of *H. paragallinarum* were prepared. Different adjuvant combinations were assayed. Once the best bacterin was selected, birds were immunized. Together with a

decreased incidence of the outbreaks, a higher bacterial sensitivity to antimicrobials was also observed.

RESUMEN

En una empresa productora de Huevo en México, se reportaron brotes de Coriza Infecciosa (CI) desde la semana 20 y hasta en tres ocasiones antes o después de llegar al pico de producción, la agravante de estos brotes fue que los aislamientos de *Haemophilus paragallinarum* (*H.paragallinarum*) eran resistentes a la mayoría de los antibióticos probados. Para corregir el problema se elaboraron bacterinas conteniendo los

serotipos A, B y C de *H. paragallinarum* ensayándose diferentes combinaciones de adyuvantes. Una vez elegida la mejor bacterina, se inmunizaron las aves y junto con la disminución de los brotes, se observó mayor susceptibilidad bacteriana a los antibióticos.

INTRODUCCIÓN

En una empresa productora de huevo para plato de la zona centro de México se reportaron brotes de (CI) recurrentes que se presentaban desde la semana 20 de edad, repitiéndose hasta en tres ocasiones antes de llegar al pico de producción o después del mismo, con la agravante de que las bacterias aisladas como *H. paragallinarum* mostraron una resistencia del 98% a los antibióticos utilizados en los antibiogramas empleados en el laboratorio (cuadro 1).

En nuestra propia experiencia observamos que la resistencia bacteriana hacía que las aves no respondieran adecuadamente a los tratamientos, siendo necesario medicar hasta 10 o 15 días para tener resultados aceptables. En la empresa en la que se realizó el estudio se consideraban “eficaces” los biológicos contra (CI) utilizados, sin embargo con la presencia de los brotes se tuvieron que analizar nuevas fórmulas de productos biológicos que pudieran servir para solucionar la problemática de la empresa desde el punto de vista inmunológico, y que al mismo tiempo permitiera reducir la necesidad de tratamiento con antibióticos y/o hacerlos más eficientes.

En un trabajo previo se ensayaron tres bacterinas contra *H. paragallinarum* conteniendo los serotipos ABC en combinaciones de aceite, aceite con un adyuvante oleoso especial de Investigación Aplicada S.A. (IASA) y otra elaborada con el adyuvante oleoso especial sin aceite.

Como resultado de esa evaluación se observó que la mejor combinación fue la de aceite con adyuvante especial y se dio inicio a un programa de inmunización con el fin de evaluar la respuesta inmune y la respuesta a los tratamientos que permitiera evitar el uso indiscriminado de antibióticos.

Tomando en cuenta que la bacterina contra (CI) utilizada hasta ese momento era elaborada con aislamientos de *H. paragallinarum* serotipos A y C emulsionados, ésta se comparó con la bacterina emulsionada elaborada con los serotipos ABC y el adyuvante especial de IASA.

Material y Método: se inmunizaron con la bacterina contra Coriza infecciosa Coribact ABC alrededor de tres millones de aves en un período de un año en diferentes granjas de la empresa problema, lo que se reporta en este estudio es el resultado de 250,000 aves alojadas en una granja de postura localizada en un núcleo de edades múltiples en el cual se habían tenido brotes complicados de (CI).

Vacunación: se inmunizó contra (CI) con 0.5 ml de Coribact ABC por la vía subcutánea en la parte media posterior del cuello a las 4, 10 y 16 semanas de edad y se realizó el traspaso de crianza a postura a las 17 semanas.

Serología: se colectaron muestras de suero para evaluar la respuesta inmune hacia (CI).

Antibiogramas: de los aislamientos de *H. paragallinarum* se realizó sensibilidad a antibióticos utilizándose sensidiscos para 14 antibióticos evaluando el halo de inhibición producido por los mismos, catalogándolos como Sensibles (S) Moderados (M) y Resistentes (R).

RESULTADOS

Un año después de iniciado el programa de inmunización con la bacterina de IASA, aún se observan brotes de (CI) pero ahora se presentan de una forma muy benigna afectando solamente del 10 al 15 % de la parvada y la respuesta a los antibióticos es rápida fluctuando entre 24 y 72 hrs. En ese tiempo se observa una franca mejoría de las aves seguida del control total de la enfermedad, también los aislamientos de (CI) se han vuelto sensibles a la mayoría de los antibióticos 71.4% (cuadro 1) facilitando el tratamiento y haciendo posible que el huevo llegue al consumidor final con la calidad que marcan las normas de salud.

DISCUSIÓN

Cuando se logra un esquema de inmunización efectivo, se obtienen mejores parámetros productivos y se reduce considerablemente la necesidad de utilizar antibióticos que lejos de solucionar efectivamente los problemas, coadyuvan en el fomento de la resistencia bacteriana, el incremento de los costos de producción y ponen riesgo la salud de los consumidores. Como observación de campo se aprecia que cuando se establece una buena inmunidad y las aves responden adecuadamente al desafío, la necesidad del uso de antibióticos es mínima y las bacterias presentes en la zona o granja de múltiples edades tienden a ser nuevamente sensibles a los antibióticos a los que ya eran resistentes, esto último lo hemos podido observar consistentemente aunque hace falta llevar a cabo estudios de mayor profundidad encaminados a entender los mecanismos de resistencia de bacterias como *H. paragallinarum*. Con este análisis se pretende hacer notar que ya es tiempo de que en la industria avícola Mexicana se establezcan nexos entre las estrategias de crianza, desarrollo y producción de las aves y el control en el uso de antibióticos ya que, como se pudo observar en el presente trabajo, el hecho de no contar con bacterinas y/o vacunas adecuadas a las necesidades de las aves, repercute negativamente en el uso de los antibióticos, en los costos de producción y en la salud de los consumidores. El costo más alto de no tomar

acciones preventivas puede darse si el consumidor o el comercializador se niegan a comprar productos con residuos antibióticos.

CONCLUSIÓN

En este experimento el uso de la bacterina Coribact ABC con el adyuvante especial otorgó los siguientes beneficios:

- Reducción en el número de brotes sufrido por cada parvada.

- Disminución del % de aves afectadas durante el desafío así como el nivel de lesiones.
- Amplia reducción del uso de antibióticos con el consecuente ahorro económico.
- Cepas de (CI) aisladas un año después de la misma zona que las resistentes del cuadro 1 mostraron una mayor susceptibilidad a los antibióticos.

Cuando se presentaron los brotes, se observó una respuesta rápida y efectiva de las aves al tratamiento.

Comportamiento de campo de las dos bacterinas probadas y resultado de los antibiogramas antes y después del uso de las mismas.

Bacterina vs. Coriza Serotipos A y C. año 2000	Bact. IASA vs. Coriza serotipos ABC+ adyuvante especial. año 2001	Antimicrobiano	Antibiograma 06/2000 **	Antibiograma 12/2001 ***
No. brotes/parvada 3	No. brotes/parvada 1		H. <i>paragallinarum</i> *	H. <i>paragallinarum</i> *
% de aves afectadas 70-80 en cada brote	% de aves afectadas 10-15 una sola vez	Ac. Nalidixico	R	R
Resp. al tratamiento. Mala 10-15 días	Resp. al tratamiento. Buena 24 -72 hrs.	Amoxicilina	R	S
Resp. serológica Regular MG 10	Resp. serológica Buena MG 20	Ampicilina	R	R
Inadecuado tiempo de retiro de Antibióticos / huevo.	Adecuado tiempo de retiro de Antibióticos / huevo.	Ceftiofur	R	R
Alto (1)	Muy bajo / nulo (1)	Enrofloxacin	R	S
		Fosfomicina	R	S
		Furazolidona	R	S
		Linco+Especti	R	S
		Gentamicina	R	S
		Florfenicol	R	S
		Nitrofurazona	R	S
		Penicilina	R	R
		Tetraciclina	M	S
		Sulfa+trimetoprim	R	S

*Interpretación: S= Sensible. M= Moderado. R= Resistente.

** Aislamiento de *H. paragallinarum* antes del cambio de bacterina.

*** Aislamiento de *H. paragallinarum* después del cambio de bacterina.

REFERENCIAS

1. Sumano López, H., y L. Ocampo Camberos 1987. Farmacocinetica comparativa de tres

combinaciones de sulfonamidas + trimetoprim en pollas Leghorn sanas y en pollas con Coriza Infecciosa. Vet. México 18:21 – 26.

REVISION CRITICA DE LA CORIZA INFECCIOSA

INFECTIOUS CORYZA: A CRITICAL REVIEW

Fernández RP¹, Longinos GM¹, Velásquez QE¹ y VE Soriano²

¹Centro de Investigación y Estudios Avanzados en Salud Animal, FMVZ-UAEM. Toluca 50000, México.

²Departamento de Investigación y Desarrollo Avícola, Biosíntesis Laboratorios SA. Toluca 50130, México.

SUMMARY

This paper refers to the most recent publications on infectious coryza and its causative agent, *H. paragallinarum*. It critically reviews recently identified aspects related with both pathogenicity mechanisms and virulence factors. Similarly, the serological typing schemes of *H. paragallinarum* are correlated with the biologic products used in the prevention of the disease. Despite the technological progress, the advantages of the traditional identification of the bacterium are mentioned.

RESUMEN

El presente trabajo aborda las publicaciones más recientes concernientes con la coriza infecciosa y el agente causal, *H. paragallinarum*. Revisa de manera crítica los aspectos relacionados con los mecanismos de patogenicidad y factores de virulencia recientemente identificados. Asimismo, se relacionan los esquemas de serotipificación de este agente con los productos biológicos empleados para la prevención de esta enfermedad. No obstante el avance tecnológico, se mencionan las ventajas de la identificación tradicional de *H. paragallinarum*.

INTRODUCCIÓN

La coriza infecciosa (CI) es una enfermedad reconocida por el alto impacto en la industria avícola al nivel mundial (4). En México, se presenta de forma enzoótica en zonas avícolas densamente pobladas. Se ha registrado retraso del crecimiento y pérdida de peso en pollo de engorda, incrementando la edad de salida al mercado. De forma similar, en gallinas de postura se ha informado una reducción en la producción de huevo de más del 50%.

Propiedades bioquímicas. Las reacciones de catalasa y oxidasa, negativa y positiva respectivamente, son características uniformes en *H. paragallinarum*. En un estudio que incluyó 40 aislamientos de *H. paragallinarum* obtenidos de casos clínicos en México, todos los aislamientos produjeron ácido a partir de glucosa y manosa, pero no de galactosa, lactosa, trehalosa y xilosa. La producción de ácido a partir de manitol, maltosa y sucrosa fue variable, lo que permitió el reconocimiento de 4 biovars bioquímicos (7).

Clasificación serológica. Page en 1962 (13), identificó los serovares A, B y C mediante la prueba de aglutinación en placa. Posteriormente, Kume *et al.*, (11) identificaron 7 serovares empleando la prueba de inhibición de la hemoaglutinación (IH). Con base en el empleo de esta prueba es posible identificar los tres serovares de Page. Con la identificación de dos nuevos serovares, Blackall *et al.* (3) combinaron los esquemas de serotipificación anteriores, quedando de la siguiente manera: A-1 a A-4, B-1 y C-1 a C-4. Con base en este esquema, se han reconocido los serovares A-1, B-1 y C-2 en Estados Unidos de América; A-4, C-2 y C-4 en Australia; A-1, B-1, C-2 y C-3 en Sudáfrica; A-1 y C-1 en Japón; A-3 en Brasil y, A-1, A-2, B-1 y C-2 en Alemania y México (16).

Patogenia. Bacterias de *H. paragallinarum* carentes de antígenos hemoaglutinantes no fueron inmunogénicas y no produjeron signos clínicos de CI en aves desafiadas (19). Con base en la consideración de que la adherencia bacteriana es el primer paso en el proceso de infección, Fernández *et al.* (8) demostraron la adherencia *in vitro* de *H. paragallinarum* a células epiteliales traqueales de pollo. En un estudio posterior, las antígenos hemoaglutinantes (hemoaglutininas) se reconocieron como las adhesinas que median esta adherencia (12).

Por otra parte, se reconocieron que los receptores celulares para las adhesinas de *H. paragallinarum* son de tipo polisacárido en naturaleza, siendo la manosa el principal componente (14).

Factores de virulencia. Sawata *et al.* (15) reportaron que la cápsula es una estructura importante en la virulencia de *H. paragallinarum*. La infiltración de células cebadas en pollos inoculados con cepas capsuladas, indica que estas células pueden ser las responsables de los signos de coriza por la activación de mediadores farmacológicos.

La resistencia a los antimicrobianos es considerado un factor de virulencia importante. En un estudio que incluyó las nueve cepas de referencia de *H. paragallinarum* y 22 aislamientos de México, se observó que el 100% de los microorganismos fueron resistentes ($\geq 16 \mu\text{mL}$) a varias sulfonamidas y trimetoprim, 50% a la amoxicilina, 30% a la oxitetraciclina, 15% a la gentamicina y 2% a la enrofloxacin. Las concentraciones mínimas

inhibitorias fueron obtenidas mediante la técnica de microdilución en caldo. Se desconoce si las diferencias en la resistencia son debidas a plásmidos (18).

Un aspecto relevante en la biología de *H. paragallinarum* es la identificación de cepas independientes del NAD (dinucleótido de adenina nicotinamida). Estudios posteriores mostraron que esta característica está mediada por plásmidos y que pueden ser conferidos a cepas dependientes del NAD (6).

Inmunogenicidad. Como se mencionó anteriormente, las hemoaglutininas son los principales antígenos inmunogénicos de *H. paragallinarum*, que inducen la producción de anticuerpos IH. Kume *et al.* (10) mostraron que títulos séricos de anticuerpos IH mayores a 1:20 confirieron protección en pollos desafiados de forma homóloga. En un estudio realizado por este grupo de investigación, se mostró que los anticuerpos IH presentes en suero y en lavados traqueales, inhibieron la adherencia *in vitro* a células epiteliales traqueales de pollo (12). Este estudio muestra que los anticuerpos séricos IH actúan como anticuerpos neutralizantes de las adhesinas de *H. paragallinarum*.

Diagnóstico. No obstante el avance tecnológico, el aislamiento bacteriológico sigue siendo la herramienta más importante, ya que permite la manipulación del agente con fines de estudios antigénicos y serológicos, que pueden guiar en el empleo de productos biológicos. La prueba de la reacción en cadena por la polimerasa (PCR), es la prueba más rápida y específica para la identificación de *H. paragallinarum*, tanto de cepas independientes del NAD, como dependientes de éste. Esta técnica fue desarrollada en China y ha sido transferida con éxito a Sudáfrica y México (2). Con fines de caracterización molecular, se han utilizado las pruebas de análisis de endonucleasas de restricción, ribotipificación y ERIC-PCR (1).

El diagnóstico diferencial de la CI debe realizarse principalmente con otras enfermedades respiratorias de origen bacteriano. Bragg *et al.* (5) reportó el aislamiento de *Pasteurella avium* y *P. volantium* a partir de brotes corizoide en pollos de engorda. Estas bacterias se consideraban como agentes no patogénicos para las aves. De forma similar, debe considerarse como diferencial la infección por *Ornithobacterium rhinotracheale*, el cual se ha reportado como causante de un cuadro corizoide con mortalidad significativa en pollos.

Inmunización. Básicamente, en el mercado internacional existen productos biológicos que contienen los serovares A y C (bivalentes) y los serovares A, B y C (trivalentes). Jacobs *et al.* (9) mostraron que bacterinas bivalentes administradas en pollos, no confirieron protección cruzada ante el desafío con una cepa de *H. paragallinarum*

perteneciente al serovar B. Sin embargo, en otro estudio se mostró una protección del 100% en aves inmunizadas de forma bivalente y desafiadas con una cepa del serovar B (17). Con base en estas discrepancias, la investigación de este grupo está enfocada en la determinación del grado de protección cruzada entre los nueve serovares hemoaglutinantes del esquema de Kume. En este sentido, la prueba de IH puede ser la principal herramienta para la evaluación del estado inmune humoral en aves inmunizadas con estos biológicos.

Los resultados obtenidos en las pruebas de adherencia *in vitro* de *H. paragallinarum* a células epiteliales traqueales de pollo, orientan nuevas hipótesis en la inmunización de aves susceptibles, empleando antígenos inactivados administrados por la vía nasal.

REFERENCIAS

1. Blackall, P. J. Infectious coryza: overview of the disease and new diagnostic options: Clin. Microbiol. Reviews. 12:627-632. 1999.
2. Blackall, P. J. Infectious coryza. Proc. XVII Cong.. Latinoam. Avicult. Guatemala, pp. 4-13. 2001.
3. Blackall, P. J., L. E. Eaves and D. G. Rogers. Proposal of a new serovar and altered nomenclature of *Haemophilus paragallinarum* in the Kume hemagglutinin scheme. J. Clin. Microbiol. 28:1185-1187. 1990.
4. Blackall, P. J., M. Matsumoto and R. Yamamoto. Infectious coryza. In: Diseases of poultry, 10th ed. B.W. Calnek, Beard and Y. M. Saif eds. Iowa State University Press, Ames. pp. 179-190. 1997.
5. Bragg, R. R., J. M. Greyling and J. A. Verschoor. Isolation and identification of NAD-independence bacteria from chickens with symptoms of infectious coryza. Avian Pathol. 26:595-606. 1997.
6. Bragg, R. R., L. Coetzee and J. A. Verschoor. Plasmid-encoded NAD independence in some South African isolates of *Haemophilus paragallinarum*. Onder. J. Vet. Res. 60:147-152. 1993.
7. Fernández, R. P., G. A. García-Delgado, G. P. Ochoa and V. E. Soriano. Characterization of *Haemophilus paragallinarum* isolates from Mexico. Avian Pathol. 29:473-476. 2000.
8. Fernández, R. P., G. A. García-Delgado, and Soriano V. E. Adherence of *Haemophilus paragallinarum* to chicken tracheal epithelial cells. Proc. Haem., Actino., an Past. Intern. Conf., Acapulco, Mexico. Pp 51. 1996.
9. Jacobs A. A. A., W. Cuenen and P. K. Storm. Efficacy of a trivalent *Haemophilus paragallinarum* vaccine compared to bivalent vaccines. Vet. Microbiol. 32:43-49. 1992.
10. Kume, K., A. Sawata and T. Nakai. Clearance on the challenge organisms from the upper

respiratory tract of chickens injected with an inactivated *Haemophilus paragallinarum* vaccine. *Jpn. J. Vet. Sci.* 46:843-850. 1984.

11. Kume K., A. Sawata, T. Nakai and M. Matsumoto. Serological classification of *Haemophilus paragallinarum* with a hemagglutinin system. *J. Clin. Microbiol.* 17:958-964. 1983.

12. Longinos, G. M. y G. P. Navarrete. Efecto de los anticuerpos inhibidores de la hemoaglutinación sobre la adherencia in vitro de *Haemophilus paragallinarum* a células epiteliales traqueales de pollo. MVZ Tesis. Universidad Autónoma del Estado de México, México. 2001.

13. Page L. A. *Haemophilus* infections in chickens. I. Characteristics of 12 *Haemophilus* isolates recovered from diseased chickens. *Am. J. Vet. Res.* 23:85-95. 1962.

14. Sánchez, S. A. efecto del tratamiento de *Haemophilus paragallinarum* con varios carbohidratos y N-acetil-D-glucosamina sobre la adherencia in vitro a células epiteliales traqueales de polo. MVZ Tesis. Universidad Autónoma del Estado de México, México. 2000.

15. Sawata, A., T. Nakai, K. Kume, H. Yoshikawa and T. Yoshikawa. Lesions induced in the

respiratory tract of chickens by encapsulated or non-encapsulated variants of *Haemophilus paragallinarum*. *Am. J. Vet. Res.* 46:1185-1191. 1985.

16. Soriano, V. E., P. J. Blackall, S. M. Dabo, G. I. Téllez, G. A. García-Delgado and R. P. Fernández. Serotyping of *Haemophilus paragallinarum* isolates from Mexico by the Kume hemagglutinin scheme. *Avian Dis.* 45:680-683. 2001a.

17. Soriano, V. E., R. P. Fernández, G. A. García-Delgado y G. P. Ochoa. Evaluación de protocolos de bacterización de gallinas de postura mediante detección de anticuerpos inhibidores de la hemoaglutinación y protección ante un desafío controlado con *Haemophilus paragallinarum*. *Vet. Méx.* 32:145-148. 2001b.

18. Velásquez, Q. E. Susceptibilidad in vitro de aislamientos de *Haemophilus paragallinarum* a antimicrobianos. MVZ Tesis. Universidad Autónoma del Estado de México, México. 2002.

19. Yamaguchi, T., M. Kobayashi, S. Masaki and Y. Iritani. Isolation and characterization of a *Haemophilus paragallinarum* mutant lacks of hemagglutinin antigen. *Avian Dis.* 37:970-976. 1993.

A PRELIMINARY REPORT ON A RAPID TEST FOR THE DETECTION OF INFECTIOUS BRONCHITIS VIRUS

REPORTE PRELIMINAR DE UNA PRUEBA RÁPIDA PARA LA DETECCIÓN DEL VIRUS DE LA BRONQUITIS INFECCIOSA

Shankar P. Mondal¹, Carol Cardona²

¹Comparative Pathology, University of California, DAVIS, DAVIS, CA 95616

²Veterinary Medicine Extension, Surge III, Rm. 1383, University of California, Davis, Davis, CA 95616

RESUMEN

Es importante contar con procedimientos diagnósticos rápidos para el control de la bronquitis infecciosa, enfermedad altamente contagiosa que representa una amenaza de gran importancia para la sustentabilidad de la industria avícola. En este estudio desarrollamos una prueba rápida y sencilla para tipificar los aislamientos del virus de la bronquitis infecciosa. Las muestras se amplificaron mediante reacción en cadena con polimerasa y transcriptasa inversa (*RT-PCR*) en una membrana. Las sondas, generadas a partir de un panel de diferentes serotipos del virus en regiones selectas del genoma, se hibridaron individualmente a la membrana y se detectaron por colorimetría. Usando este método es posible distinguir entre los diferentes serotipos, incluso

en reacciones que contienen cepas múltiples del virus de la bronquitis infecciosa.

Rapid diagnostic procedures are especially important in controlling infectious bronchitis, an acute and highly contagious disease, and a major threat to the sustainability of the poultry industry. In this study, we have developed a simple and rapid test for typing infectious bronchitis virus (IBV) isolates. Samples were amplified with RT-PCR and immobilized on a membrane. Probes were generated from a panel of IBVs of different serotypes in selected regions of the genome. The probes were then individually hybridized to the membrane and detected colorimetrically. Using this method, isolates of different serotypes could be distinguished even in reactions containing multiple IBV strains. This method will provide a rapid and reliable method of diagnosing field isolates.

ADVANCES IN DIAGNOSIS OF IBV USING REAL-TIME RT-PCR

AVANCES EN EL DIAGNÓSTICO DE LA BRONQUITIS INFECCIOSA USANDO LA REACCIÓN EN CADENA CON POLIMERASA Y TRANSCRIPTASA INVERSA (RT-PCR) DE TIEMPO REAL

Mark W. Jackwood, Deborah A. Hilt, and Scott A. Callison

Poultry Diagnostic and Research Center, Department of Avian Medicine, College of Veterinary Medicine
University of Georgia, Athens, GA 30602 USA

RESUMEN

Se han desarrollado técnicas moleculares para identificar con rapidez el serotipo de los virus de la bronquitis infecciosa involucrados en brotes de enfermedad en las vías respiratorias altas, para poder vacunar adecuadamente a los pollos. El objetivo de esta investigación fue desarrollar un método molecular más rápido para la identificación del tipo de vacuna contra la bronquitis infecciosa usando la RT-PCR y la transferencia de energía de resonancia de fluorescencia (FRET), que utiliza donadores y sondas de detección. Logramos distinguir entre los tipos Massachusetts y Arkansas del virus, lo cual refleja una falta de coincidencia de cuatro pares de bases con la sonda de detección. Las faltas de coincidencia de uno o dos pares de bases con la sonda de detección no fueron distinguibles con las sondas y las condiciones del amortiguador empleadas en este trabajo.

SUMMARY

Molecular techniques have been developed to rapidly identify the serotype of infectious bronchitis viruses (IBV) involved in an upper-respiratory disease outbreak so that the chickens can be properly vaccinated. The goal of this research was to develop a more rapid molecular method for identification of vaccine type IBV using real-time reverse transcriptase-polymerase chain reaction (RT-PCR), and fluorescence resonance energy transfer (FRET), which utilizes donor and detection probes. We were able to distinguish between Mass and Ark type viruses, which reflects a 4 base pair mismatch with the detection probe. One or two base pair mismatches with the detection probe were not distinguishable using those probes and buffer conditions.

Infectious bronchitis is a highly contagious upper-respiratory tract disease in chickens that is characterized by coughing, sneezing, tracheal rales, swollen sinuses, and watery eyes. The disease is caused by a group III coronavirus, which is designated infectious bronchitis virus (IBV). Different serotypes of IBV occur and do not cross protect, making it important to rapidly identify the serotype of the virus

involved in an outbreak so that the birds can be properly vaccinated.

Many laboratories including ours have developed molecular techniques to identify IBV. Those techniques determine molecular type, which correlates with the serotype of the virus. They are based on sequence differences located in hypervariable regions of the S1 subunit of the spike glycoprotein gene. It has been our experience that most of the IBV isolates obtained from the field are the same type as the viruses that were used to vaccinate the birds. The goal of this research was to develop a more rapid molecular method for identification of those vaccine type infectious bronchitis viruses using real-time reverse transcriptase-polymerase chain reaction (RT-PCR). The LightCycler[™] (Roche diagnostics Corporation, Indianapolis, IN) is a real-time PCR instrument that measures the amplified product as it is being produced in the reaction. Detection of the disease agent and identification of the virus is almost immediate through the use of fluorescent dyes and DNA probes.

RT-PCR Product. We designed a set of primers that amplify a 382 base pair product in the hypervariable region of the S1 gene of IBV. That primer set amplified the Beaudette, Mass 41, Ark DPI, Ark 99, GA variant, Mass 41, Beaudette, Conn, Fla 18288, GA98, Iowa, NE 95, and DE072 strains of IBV and a field isolate of IBV designated 18046. Typically the reaction takes about 1 hour to complete and 32 samples can be tested in each run. Taking advantage of the sequence differences between different serotypes of IBV in this 382 base pair amplicon, we attempted to identify the above IBV strains using a melting curve analysis. Unfortunately the results were not reproducible. Many factors including enzyme activity, minor variations in salt concentration, and the amount of PCR product, made it difficult to reproduce the results from one run to the next. Thus, a complete set of reference viruses had to be run each time a field virus was to be identified.

Fluorescence Resonance Energy Transfer (FRET). The FRET technique utilizes two probes; an anchor or donor probe, which is conjugated to

fluorescein, and a detection probe conjugated to a red fluorescent dye (LightCycler[™] Red 640). Fluorescein on the anchor probe emits a green fluorescent light when it is excited by the ultra violet light source in the LightCycler[™]. When that probe comes into close proximity with the detection probe, by hybridizing to the PCR product, energy from the green fluorescent light is transferred to and excites the red dye which then emits light at 640 nm. After each round of amplification, the probes are allowed to anneal to the product and the reaction is monitored for light emitted by the red dye at 640 nm. Taking into consideration base pair mismatches in the 382 base pair RT-PCR product, we designed and utilized two probes in a melting curve analysis to identify the presence of specific IBV types. The detection probe was made identical to the Mass sequence. Based on our preliminary data, it is possible to distinguish between IBV types with as little as 4 base pair mismatches (two

A-T and two G-C) with the detection probe. The Mass type virus melting temperature for the perfectly matched probe averaged 38.27 C whereas the Ark type melting temperature was 34.88 C reflecting the 4 base pair mismatch. However, detection of 1 or 2 A-T mismatches (Fla and Conn respectively) was not possible under the current conditions. It should be emphasized that these results are specific for this set of probes and buffer conditions. Other probes and stringency conditions may yield more or less sensitive results.

There is a temperature spread of almost 4 C degrees between 0 (Mass) and 4 (Ark) base pair mismatches. Theoretically, we ought to be able to detect less than a 4 base pair mismatch, however; the number of hydrogen bonds between A-T and G-C base pairs are different and important, and need to be considered along with buffer conditions when examining the sensitivity of the assay.

INACTIVATED VIRUS VACCINATION FOR CONTROLLING THE NEPHROPATHOGENIC PA/WOLGEMUTH/98 STRAIN OF INFECTIOUS BRONCHITIS VIRUS

VACUNACIÓN CON VIRUS INACTIVADO PARA EL CONTROL DE LA CEPA NEUROPATÓGENA PA/WOLGEMUTH/98 DEL VIRUS DE LA BRONQUITIS INFECCIOSA

J. Gelb, Jr.^A, B. S. Ladman^A, C. R. Pope^A, A. F. Ziegler^B, T. Swieczkowski^C and J. M. Callahan^A

^ADepartment of Animal and Food Sciences, University of Delaware, Newark, DE 19717-1303

^BLasher Laboratory, Research and Education Center, University of Delaware, Georgetown, DE 19947

^CLohmann Animal Health International, Waterville, ME 04903-0255

RESUMEN

Se evaluó la protección proporcionada por la vacunación con virus inactivado contra el desafío con un virus virulento nefropatógeno de la bronquitis infecciosa (*NIBV*). Después de la primera inmunización con vacunas atenuadas, los pollos Leghorn libres de patógenos específicos recibieron vacunas en emulsión oleosa que contenían cepas Massachusetts y Arkansas o el aislamiento *NIBV* PA/Wolgemuth/98 del virus de la bronquitis infecciosa. Ambas vacunas inactivadas indujeron respuestas anamnésicas de anticuerpos séricos de magnitud similar; no obstante, las aves que recibieron la vacuna autógena PA/Wolgemuth/98 estuvieron mejor protegidas contra el desafío con el *NIBV* en comparación con los pollos vacunados con el producto heterólogo inactivado que contenía las cepas Massachusetts y Arkansas. La evaluación de la protección se basó en el reaislamiento del virus a partir de la tráquea y el riñón, y en la patología microscópica

renal, además de la tinción del antígeno específico del virus de la bronquitis infecciosa.

ABSTRACT

An experiment was performed to assess the protection provided by inactivated virus vaccination against challenge with a virulent nephropathogenic infectious bronchitis virus (*NIBV*). The challenge strain used was PA/Wolgemuth/98, an isolate recovered from commercial broilers during an *NIBV* outbreak in Pennsylvania from 1997-2000. Following a priming immunization with attenuated *IBV* vaccines, specific pathogen free (SPF) chickens were given either an oil emulsion vaccine containing inactivated *IBV* strains Massachusetts (Mass) and Arkansas (Ark) or an autogenous vaccine prepared from *NIBV* PA/Wolgemuth/98.

Both inactivated vaccines induced an anamnestic serum antibody response of similar magnitude in the

chickens. However, birds receiving the autogenous PA/Wolgemuth/98 vaccine were better protected against homologous virulent NIBV challenge compared to chickens given the heterologous Mass and Ark combination inactivated vaccine. Assessment of protection following challenge was based on several criteria; virus reisolation from trachea and kidney, and renal microscopic pathology and IBV-specific antigen deposition.

The findings of this study suggest that maximum protection to NIBV may be achieved by using an autogenous inactivated vaccine prepared from the same strain that exists in the field in chickens initially primed with live attenuated IBV.

(The full-length article of this paper will be submitted to *Avian Diseases* for publication).

PERSISTENCE AND IMMUNE RESPONSE OF A PENNSYLVANIA NEPHROPATHOGENIC STRAIN OF IBV IN SPF CHICKENS

PERSISTENCIA Y RESPUESTA INMUNE DE UNA CEPA NEFROPATÓGENA DEL VIRUS DE LA BRONQUITIS INFECCIOSA EN POLLOS LIBRES DE PATÓGENOS ESPECÍFICOS (SPF) EN PENNSYLVANIA

H. Lu, Q. Yang, J. Liu, T. Ward

Animal Diagnostic Laboratory, Center for Veterinary Diagnostics and Investigation
The Pennsylvania State University, University Park, PA 16801
tel: (814)863-4369; fax: (814)865-4717; email: hxl15@psu.edu

RESUMEN

Evaluamos la patogenicidad y la respuesta inmune de una nueva cepa nefropatógena de Pennsylvania del virus de la bronquitis infecciosa (npIBV) en pollos *SPF*. Observamos los signos respiratorios característicos y 25% de mortalidad cuando las aves se infectaron a los 2 días de edad. Después de inoculado, este virus se reaisló mediante improntas cloacales durante un período de 114 días. Cuando inoculamos aves de 12 semanas de edad con el citado virus no se observaron signos clínicos ni mortalidad, pero el virus inoculado persistió en las tonsilas cecales y los riñones de estas aves durante un período de 9 semanas. Los pollos *SPF* expuestos previamente a esta cepa nefropatógena de Pennsylvania estuvieron protegidos contra la infección clínica cuando se desafiaron con el virus de la bronquitis infecciosa nefropatógena.

SUMMARY

The pathogenicity and immune response of a novel Pennsylvania nephropathogenic strain of infectious bronchitis virus (npIBV) were evaluated in SPF chickens. Characteristic respiratory signs and a 25% mortality were produced when birds were infected at 2 days of age. The inoculated npIBV was isolated from cloacal swabs over a 114 day period. When 12-week old birds were inoculated with npIBV, clinical signs or mortality were not observed, but the inoculated virus persisted in the cecal tonsils and kidneys of such birds for a period of 9 weeks. SPF chickens previously

exposed to the PA npIBV were protected against clinical infection when challenged by npIBV.

A novel nephropathogenic strain of infectious bronchitis virus (npIBV) was isolated from poultry located in Pennsylvania (PA) at the Animal Diagnostic Laboratory (ADL) of Penn State University in 1997. The initial isolation was made from birds from a 12-day old broiler flock which had experienced high morbidity and mortality due to kidney failures. The isolate was diagnosed as an untypeable strain of IBV by monoclonal antibody (Mab)-based IFA (4) at the ADL, and was further characterized at Dr. Jack Gelb's Laboratory, University of Delaware (1), as a novel strain of IBV by the sequencing of the S1 gene associated with IBV isolates. This novel npIBV has been consistently isolated from clinical cases of broiler and layer chickens in PA and was also isolated from normal commercial layer flocks using SPF sentinel chickens (2). In our ongoing studies of the npIBV, observations obtained from clinical trials are presented on evaluations in SPF birds of its pathogenicity and immune response.

MATERIALS AND METHODS

Virus and SPF chicken. The PA npIBV was initially isolated from broiler chickens at the ADL, Penn State University in 1997. Specific-pathogen-free (SPF) White leghorn chicks were hatched at our laboratory from SPF eggs received from Charles River, SPAFAS at North Franklin, Connecticut.

Experiment design. Two experiments were done using the npIBV in SPF chickens at 12-weeks old (trial-1) and 5-days old (trial-2), respectively. Birds were inoculated by a combination of eye and nasal drops and oral administration which contained 1000 ELD₅₀ in 0.5 ml dose per bird. All inoculated birds were housed in negative pressure isolators and observed daily for clinical signs. In trial-1, two birds were sacrificed biweekly; cecal tonsils, kidneys, trachea and lung were collected for virus isolation using embryonating chicken eggs (3). In trial-2, cloacal swabs were collected on a weekly or biweekly basis for virus isolation; blood samples were drawn in a 2-3 week interval to evaluate the immune response by a commercial IDEXX ELISA Kit (IDEXX Laboratories Inc, Westbrook, ME). An additional experiment (trial-3) was conducted by a challenge (1000 ELD₅₀ in 0.5 ml dose per bird) of the inoculated birds at 4 weeks with the same npIBV. The challenge study was conducted following protocols established for standard vaccine challenge procedures (3).

RESULTS

In observations from trial-1, clinical signs were not observed on birds inoculated at 12-weeks old. However, the inoculated npIBV was consistently isolated from the cecal tonsils and kidneys of sacrificed birds over a period of 9 weeks and thereafter the virus was not isolated.

In trial-2, characteristic respiratory signs of gasping, sneezing and head shaking were observed during the first 2 weeks inoculation; 4 out of 16 birds died due to IBV infection within 3 weeks. The npIBV was successfully isolated from cloacal swabs from these birds in 13 subsequent samplings over a period of 114 days. Thereafter, it was not isolated in 5 additional samplings of 8 weeks duration.

In trial-3, 15 SPF chickens exposed at 5 weeks to npIBV were all protected against challenge by the npIBV at 4 weeks subsequent to the initial npIBV exposure. The challenge npIBV infected all 15 control birds not previously exposed to virus.

DISCUSSION

The results from these experimental trials demonstrate that the npIBV is highly pathogenic or virulent to baby chicks. In such chicks, npIBV produced characteristic respiratory signs and 25% mortality. Furthermore, npIBV affected about one third of surviving birds as measured by stunted growth

and continual shedding of virus in fecal materials for 114 days. The npIBV infected chickens of all ages. It persisted in cecal tonsils and kidneys of infected adult chickens for 9 weeks, but no clinical disease was observed. The fact that the npIBV was found more often in young chickens than in adult chickens suggests that the immune system of baby chicks may not recognize the virus as successfully as that of adult birds.

An additional finding indicates that birds over 5-weeks old exposed to the npIBV are able to develop a successful and protective immune response to exposure by the same virus. The findings of antibody levels in the serum samples collected from these bird trials have yet to be completed. In additional projected studies, vaccine challenge studies using known commercial IBV vaccines will be done to further evaluate the cross protection of such vaccines to the emergence and spread of the npIBV.

REFERENCES

1. Ladman, B.S., J. Gelb Jr., W. A. Nix, C.R. Pope, and B.F. Kingham. Characterization of a novel nephropathogenic infectious bronchitis virus isolated from chickens in Pennsylvania. Proc. 71st Northeastern Conf. On Avian Dis., Blacksburg, VA, p.38, 1999.
2. Lu, H., Q. Yang, T. Ward, P. Dunn, and D. Weinstock. Isolation and characterization of multiple strains of infectious bronchitis virus (IBV) from a commercial layer farm. 138th AVMA Annual Convention, Boston, MA. Proc. AAAP/AVMA Scientific Program, p. 32, July 2001.
3. Gelb, J. Jr., and M. W. Jackwood. Infectious bronchitis. In: A Laboratory Manual for the Isolation and Identification of Avian Pathogens, 4th. ed., D.E. Swayne, J.R. Glisson, M.W. Jackwood, J.E. Pierson and W.M. Reed, eds. American Assoc. Avian Pathologists. pp. 169-174. 1998.
4. Karaca, K., S. Naqi, and J. Gelb. Production and characterization of monoclonal antibodies to three infectious bronchitis virus serotypes. Avian Dis. 36: 903-915. 1992.

ACKNOWLEDGMENTS

This research was supported by the Pennsylvania Department of Agriculture and 2000 Pennsylvania Poultry Industry Research Check-Off Program.

(Complete results from this study will be submitted for publication in *Avian Diseases*).

PHYLOGENETIC ANALYSIS OF ONTARIO INFECTIOUS BRONCHITIS VIRUS ISOLATES

ANÁLISIS FILOGENÉTICO DE AISLAMIENTOS DEL VIRUS DE LA BRONQUITIS INFECCIOSA EN ONTARIO

Davor Ojkic and Brian Binnington

Animal Health Laboratory, University of Guelph, Guelph, Ontario, N1H 6R8, Canada

RESUMEN

Se amplificaron los fragmentos 5' de la secuencia de la proteína de la espícula de 39 aislamientos de campo del virus de la bronquitis infecciosa procedentes de Ontario, Canadá, mediante reacción en cadena con polimerasa y transcriptasa inversa. Se determinaron las secuencias de nucleótidos de estos fragmentos que contenían las regiones hipervariables S1 y se sometieron a análisis filogenético para examinar el grado de relación de los aislamientos de campo de Ontario con secuencias S1 conocidas del virus de la bronquitis infecciosa. Los resultados del análisis filogenético sugirieron que estos aislamientos se pueden dividir en tres grupos generales: (1) Virus similares a los vacunales, (2) Aislamientos similares o relacionados con las variantes del virus de la bronquitis infecciosa descritas en EE.UU. y (3) Aislamientos específicos de Ontario.

Infectious bronchitis virus (IBV) is a very contagious chicken pathogen. Although the primary target for virus replication is the respiratory tract some IBV strains target the intestinal tract, kidneys or the oviduct. IBV often undergoes genetic changes, generating serological variants that may escape the vaccine-induced immunity. The S1 portion of the spike protein (S) gene is responsible for the induction of neutralizing antibodies (1). The changes causing the antigenic variation occur most frequently within the "hypervariable" region of S1.

The 5' fragments of the S gene sequences from thirty-nine field isolates of IBV from Ontario, Canada were amplified by RT-PCR as described by Kingham *et al.* (2). Nucleotide sequences of the amplified segments containing the S1 hypervariable regions were determined. Amino acid sequences of these fragments were subjected to phylogenetic analysis to examine the relatedness of Ontario field isolates between themselves and their similarity to other known IBV S1 gene sequences. The results of phylogenetic analysis suggested that these isolates could be divided into three general groups: (i) vaccine-like viruses, (ii) isolates similar or related to variant IBVs described in the USA and (iii) Ontario-specific isolates.

REFERENCES

1. Cavanah, D., and Davis P.J. Amino acids within hypervariable region I of avian coronavirus IBV spike glycoprotein are associated with neutralization epitopes. *Virus Res* 11: 141-150. 1988.
2. Kingham, B.E., Keeler, C.L., Nix, W.A., Ladman, B.S., and Gelb, J. Identification of avian infectious bronchitis virus by direct automated cycle sequencing of the S-1 gene. *Avian Dis.* 44: 325-335. 2000.

(A full-length article will be submitted for publication in *Avian Diseases*).

CREATION OF A NOVEL INFECTIOUS BRONCHITIS VIRUS S1 GENE LIBRARY BY DNA SHUFFLING

CREACIÓN DE UNA NUEVA COLECCIÓN DEL GENE S1 DEL VIRUS DE LA BRONQUITIS INFECCIOSA MEDIANTE LA COMBINACIÓN ALEATORIA DEL ADN

Scott A. Callison, Mark W. Jackwood and Deborah A. Hilt

Department of Avian Medicine, College of Veterinary Medicine, The University of Georgia, Athens, GA 30602

RESUMEN

No existe todavía ninguna vacuna contra el virus de la bronquitis infecciosa con amplia protección cruzada y es sumamente necesario contar con un producto así. En un esfuerzo por acelerar el proceso de crear nuevas vacunas con la máxima posibilidad de proteger en forma cruzada, informamos sobre el uso de la combinación aleatoria del ADN (“*barajarlo*”) para crear una nueva biblioteca de genes S1. Después de este proceso los nuevos genes S1 resultantes se usaron como plantilla de inicio para una segunda ronda de combinación al azar o clonación del ADN. Se determinó la secuencia de las regiones hipervariables del gene S1 de varios clones de cada ronda de combinaciones aleatorias. El análisis más profundo de estos clones determinará sus características serológicas y su utilidad para crear una nueva vacuna capaz de proteger contra la bronquitis infecciosa.

A cross protective Infectious Bronchitis Virus (IBV) vaccine does not exist and remains sorely needed. Current procedures for new vaccine development require a great deal of time and good fortune to produce a vaccine with favorable antigenic properties. In an effort to expedite the process of creating new vaccines with the maximum possibility of being cross protective, we report the use of DNA shuffling to create a novel S1 gene library. In short, DNA shuffling requires three steps: 1) the random

fragmentation of similar or homologous pieces of DNA, 2) the consequent reassembly of the fragments into novel recombinants by primerless PCR, and 3) amplification of full-length recombinants by normal PCR to produce DNA that can be cloned or used as template for another round of DNA shuffling.

Briefly, RT-PCR was used to amplify the S1 gene from four serologically distinct IBV strains: Massachusetts 41, Arkansas DPI, Connecticut 46, and Delaware 072. The S1 genes were subjected to DNA shuffling and the resultant novel S1 genes were used as template for another round of DNA shuffling or cloned. In total, three rounds of DNA shuffling were completed to produce the final novel S1 gene library.

The S1 gene hypervariable regions were sequenced for several clones from each round of shuffling. The degree of recombination increased with each reiterative cycle of DNA shuffling. Several clones from the last round of DNA shuffling have an open-reading frame that contain sequence elements from each of the donor strains, indicating their coding potential for a spike glycoprotein that may induce cross protective antibodies. Further analysis of these clones will determine their serological characteristics and usefulness in creating a cross protective vaccine for IBV.

(These findings will be submitted for publication in *Virus Research*).

EVALUACIÓN EXPERIMENTAL DE UNA VACUNA ATENUADA CONTRA LA BRONQUITIS INFECCIOSA SEROTIPO BL56

EXPERIMENTAL EVALUATION OF AN ATTENUATED INFECTIOUS BRONCHITIS VACCINE, SEROTYPE BL-56

Manuel Gay, María E. Aranda, Bernardo Lozano, Ernesto Soto, Alejandro Suárez, David Sarfati,
Jorge Escamilla y Juan García-García.

Laboratorio Avi-Mex, S.A. de C.V., México

SUMMARY

This research evaluated the ability of a live, attenuated, infectious bronchitis virus (VBI), serotype BL56 vaccine, for the protection against the development of lesions after challenge with VBI, DS57 strain. DS57 features important differences with serotype BL56 in the S1 protein amino acid sequence. Vaccine BL56 conferred 100% protection against challenge with VBI DS57. VBI DS57 is closely related with serotype UNAM-97, since nearly a 100% homology exists between both. This result determined serotype BL56 as a protectotype of VBI DS57.

RESUMEN

En este estudio se evaluó la capacidad de una vacuna a virus vivo, elaborada con un virus de bronquitis infecciosa (VBI) serotipo BL56 atenuado, para conferir protección a la presentación de lesiones al desafío con VBI denominado DS57 el cual difiere de manera importante en la secuencia de aminoácidos de la proteína S1 del serotipo BL56. La vacuna BL56 confirió protección del 100% al desafío con VBI DS57 que está estrechamente relacionado con el serotipo UNAM-97 con una homología en su secuencia de aminoácidos cercana al 100%. Este resultado determina al serotipo BL56 como un protectotipo del VBI DS57.

INTRODUCCIÓN

En los últimos años las investigaciones sobre el agente etiológico de la bronquitis infecciosa (BI) se han centrado en el estudio de la proteína de superficie (S) que constituye proyecciones en la superficie del virus. Esta proteína reviste gran importancia ya que contiene determinantes antigénicos que inducen la formación de anticuerpos neutralizantes y además determinan el serotipo o una variante (1,2,3,4,5). Por tal razón, la gran diversidad de serotipos y variantes del VBI esta dada por la relativa facilidad con que se modifica la secuencia de aminoácidos a nivel de la proteína S1. Sin embargo, es importante señalar que la nucleoproteína (N) que se encuentra asociada al genoma del virus, ha sido señalada como altamente antigénica y de gran importancia en la respuesta

inmunológica de las aves hacia los VBI. Esto puede dar respuesta a los denominados protectotipos del VBI, en donde virus con una diferencia importante en la secuenciación de aminoácidos de la proteína S1 pueden dar reacciones de neutralización cruzada en grado importante.

En México reportamos en 1998 el aislamiento y caracterización, mediante pruebas de Inmunofluorescencia Indirecta, VSN, RT-PCR, RT-PCR-RFLP y secuenciación de aminoácidos, de un nuevo serotipo del VBI al que se le denominó BL56 (6). Este virus se atenuó en nuestro laboratorio de Investigación y Desarrollo y se demostró su inocuidad, su pureza, su no reversión a la virulencia mediante pases seriados en pollos SPF de cuatro semanas de edad y su potencia al desafío con VBI homólogo virulento (2).

El objetivo de la presente investigación fue evaluar nuestra vacuna atenuada BL56 frente al desafío con un VBI que aislamos en 1999 al que denominamos DS57, mismo que está estrechamente relacionado con el serotipo UNAM-97 con una homología en su secuencia deducida de aminoácidos cercana al 100% (Gelb, J. comunicación personal, 2000).

MATERIAL Y MÉTODOS

Aves: Se emplearon tres grupos, cada uno de ellos con treinta aves SPF de un día de edad.

Vacunas: elaborada con virus activo, atenuado, serotipo BL56

Inmunización:

- Grupo 1, control negativo no desafiado.
- Grupo 2, control positivo no vacunado y desafiado.
- Grupo 3, con aplicación de una dosis de vacuna al día de edad (0.03 ml vía ocular $10^{5.3}$ DIEP 50%/ml).
- Grupo 4, con aplicación de dos dosis iguales a las del grupo 3 al día y a los diez días de edad.

Nota.- Cada uno de los grupos se mantuvieron en unidades de aislamiento independientes hasta el desafío.

Desafío: Los grupos 2, 3 y 4 fueron desafiados a los 35 días de edad con 0.06 ml vía ocular de VBI serotipo DS57 conteniendo $10^{6.13}$ DIEP 50%/ml.

Obtención de muestras biológica: A los 42 días de edad (siete días después del desafío) se sacrificaron aves de cada grupo para observación de lesiones a la necropsia (aerosaculitis, peritonitis, friabilidad de los riñones) y para obtención de órganos para histología (tráquea, pulmón y riñones).

Coefficiente de Lesiones (CL): Con base en la escala de lesiones del 0 al 3 (donde el 0 representa sin lesión y el 3 el mayor grado de lesión), se obtuvo el CL de cada grupo que resulta de sumar el grado de lesión individual.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Los resultados de potencia evaluados a través de las lesiones macroscópicas se resumen en el Cuadro 1. Los resultados de potencia, se correlacionan directamente con las observaciones microscópicas, valoradas a través de estudios histopatológicos donde el CL para el grupo control positivo fue de 87 para traqueas, 72 para pulmones y 87 para riñones, mientras que para los grupos vacunados fue prácticamente de 0 en todos los casos.

Ambos resultados señalan que la vacuna atenuada elaborada con el serotipo BL56 fue capaz de conferir una protección del 100% a la presentación de lesiones producidas en el grupo control no vacunado y desafiado con el serotipo DS57, lo que indica que el serotipo BL56 corresponde a un protectotipo para el VBI DS57.

Por otra parte esta investigación concuerda con los resultados de trabajos anteriores realizados por nuestro laboratorio de Investigación y Desarrollo en cuanto a que la presentación de lesiones macroscópicas y microscópicas en sacos aéreos, peritoneo, riñones, pulmones y traqueas, sirven como un indicador práctico para medir la protección que confieren las vacunas contra la BI que pueden ser causadas o inducida por la acción directa del VBI sobre los epitelios.

CONCLUSIONES

1. La vacuna atenuada del VBI elaborada con el serotipo BL56 confirió protección cruzada del 100% contra el VBI serotipo DS57, por lo que se determina que corresponde a un protectotipo hacia la cepa heteróloga de desafío.

2. La prácticamente ausencia de lesiones antes del desafío en las aves vacunados con la cepa atenuada BL56 confirman su inocuidad.

3. Las lesiones macroscópicas y microscópicas desencadenadas por el desafío del VBI son un indicador práctico para la evaluación de vacunas contra la BI.

REFERENCIAS

1. Cavanagh, D. y S.A. Naqi. Infectious bronchitis. En Diseases of Poultry. Décima edición. Editado por Calnek, B.W., Barnes, H.J., Beard, C.W., McDougald, L. Y M. Saif. Editorial Board for the American Association of Avian Pathologists. Iowa State University Press. 511-526. 1997.
2. Gay, G.M., Suárez, A., Lozano, B., Soto, E., Sarfati, D., Escamilla, J., Alvarado, C. y A. Morales. Avances en la prevención de la bronquitis infecciosa en México. Memorias del XII Curso de Actualización Avimex. México. 38-51. 2000
3. Gelb, J. Jr. Bronquitis infecciosa. Vineland Update. 1990.
4. Gelb, J.Jr. Variant IBV serotypes in commercial chicken in the United States and Canada and approaches to their control. II International Symposium on Infectious Bronchitis. Rauschholzhausen, Germany, June 3 - 6, 1991.
5. Gelb, J.Jr., Rossenberg, J.K., Odor, E.M. y M. Salem. Bronquitis Infecciosa: Una actualización. La importancia de cepas variantes en los programas de vacunación. Tecnología Avícola. Año 7, No. 73.
6. Lozano, B., Gay, M., Sarfati, D., Soto, E., Suarez, A., Aranda, M.E., Escamilla, J., Hernández, M., y J. García-García. Aislamiento e identificación de una posible variante o nuevo serotipo de la bronquitis infecciosa en México. Memorias del X Curso de Actualización Avimex, México. 80-91. 1998.

Cuadro 1. Lesiones macroscópicas en sacos aéreos, peritoneo y riñones antes y siete días después del desafío con el serotipo DS57 (treinta aves por grupo).

	CL ANTES DEL DESAFÍO*			CL 7 DÍAS POSTDESAFÍO*		
	Aerosaculitis	Peritonitis	Riñón friable	Aerosaculitis	Peritonitis	Riñón friable
1. Control negativo	0	0	0	4	0	0
2. Control positivo	2	0	0	84	72	86
3. BL56 (una aplicación)	2	0	0	6	0	0
4. BL56 (dos aplicaciones)	0	0	0	4	0	0

(*) Individualmente el 0 indica sin lesiones y el 3 indica el grado mayor de lesiones. En grupo de 30 aves la escala es de 0 a 90.

CARACTERIZACIÓN MOLECULAR DE AISLAMIENTOS MEXICANOS DEL VIRUS DE LA ENFERMEDAD DE NEWCASTLE: 1997-2001

MOLECULAR CHARACTERIZATION OF MEXICAN NEWCASTLE DISEASE VIRUS (NDV) ISOLATES, 1997– 2001

Ortiz N.M.¹., Fehérvári T.¹., Huerta L.B.J.¹., Lomniczi B.²., Ledesma, N.¹., Hargis, B.³., Alonso, R.⁴., Téllez G.¹

¹Departamento de Producción Animal: Aves. Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia, Universidad Nacional Autónoma de México. México D.F. 04510

²Veterinary Medical Research Institute of Hungarian Academy of Science. H-1519 Budapest, P.O. Box, Hungary

³Poultry Health Research Laboratory. Department of Poultry Science Fayetteville, Arkansas 72701 Office

⁴Departamento de Genética, Laboratorio de Genética Molecular. Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia, Universidad Nacional Autónoma de México

SUMMARY

Determination of the molecular characteristics of some NDV's through restriction analysis using 7 reference strains: 5 velogenic viscerotropic strains (Ishii, Chimalhuacán, Miyadera, Querétaro, and Torreón), 2 lentogenic strains (LaSota and Queensland V4); and 19 NDV positive isolates. Using reverse transcription-polymerase chain reaction (RT-PCR) one 1,349 bp fragment corresponding to one fraction of the F gen was amplified. Fragments were digested with restriction enzymes (*Bst*I, *Hinf*I and *Rsa*I) to determine electrophoretic patterns. Results: Torreón 6/19 (31.5%), Chimalhuacán 1/19 (5%), LaSota 4/19 (21.5%) y 8/19 (31.5%) showed electrophoretic patterns different from those of the reference strains.

RESUMEN

Determinación de las características moleculares de algunos virus de la ENC mediante el análisis de restricción utilizando 7 cepas de referencia: 5 velogénicas viscerotrópicas (Ishii, Chimalhuacán, Miyadera, Querétaro, y Torreón), 2 lentogénicas (La Sota y Queensland V4); y 19 aislamientos positivos a la ENC. Mediante la RT-PCR se amplificó un fragmento de 1349 pb correspondiente a una fracción del gen F. Los fragmentos fueron digeridos por enzimas de restricción (*Bst*I, *Hinf*I y *Rsa*I) para determinar los patrones electroforéticos (PEs). Resultados: Torreón 6/19 (31.5%), Chimalhuacán 1/19 (5%), La Sota 4/19 (21.5%) y 8/19 (31.5%) tuvieron PEs distintos a las cepas de referencia.

INTRODUCCIÓN

La enfermedad de Newcastle (ENC) es una enfermedad altamente contagiosa tanto en aves jóvenes como adultas ocasionando mortalidad elevada. La infección que ahora denominamos ENC se conoce

desde 1926, año en que se registro el primer brote en la isla de Java (ahora parte de Indonesia), y poco después en la región de Newcastle-upon-Tyne, Inglaterra. Se considera que, desde que se reconoció por primera vez esta enfermedad se han presentado cuando menos 4 panzootias en el mundo.

Actualmente estamos siendo testigos de la cuarta panzootia, pues desde 1991 se ha venido incrementando la incidencia de una serie de brotes caracterizados por la presencia de un virus velogénico muy virulento que causa principalmente la forma respiratoria y ocasionalmente la viscerotrópica.

En México, fue notificada por primera vez en 1946. Desgraciadamente a pesar del control de la enfermedad con el uso de vacunas y métodos zoonosanitarios, las cepas virulentas extremadamente patógenas están aún presentes en la República Mexicana. El 29 de marzo del 2000 se hizo la denuncia de un nuevo brote de la ENC velogénico en la Comarca Lagunera resultando positivas 83 granjas comerciales con una población de 13 500 160 aves; estimándose el costo del brote en 250 millones de pesos.

El agente causal de la ENC es un virus clasificado como miembro de la superfamilia *Mononegavirales* en la Familia *Paramyxoviridae*. Esta familia de virus se divide en dos subfamilias: *Paramyxovirinae* y *Pneumovirinae*. En 1993, el Comité Internacional de la Taxonomía Viral reordena el género *paramyxovirus* y colocó al virus de Newcastle (VNC) en el género *Rubulavirus* entre los *Paramyxovirinae*. El virus consta de un amplio rango de hospedadores con 27 a 30 órdenes de aves que se han reportado infectadas con el virus de la ENC. La envoltura de este virus consta de polaridad negativa con un genoma de RNA de cadena sencilla con 15 156 nucleótidos, cuyo genoma codifica 6 proteínas estructurales: hemoaglutinina-

neuraminidasa (HN), fusión (F), matriz (M), fosforilasa (P), nucleoproteína (NP) y polimerasa (L). De acuerdo a la versión más reciente de la clasificación de los virus, los paramixovirus aviáres constan de 9 serotipos del PMV-1 al PMV-9. Los virus del PMV-2 al PMV-9 se pueden encontrar en muchas aves domésticas y silvestres, pero no se relacionan con la enfermedad de Newcastle.

El VNC se identifica fácilmente mediante el uso de la prueba de inhibición de la hemoaglutinación, mediante la utilización de anticuerpos específicos. Cuando el virus se pone en presencia del anticuerpo, este es capaz de neutralizar la propiedad de los virus de aglutinar los eritrocitos, por el bloqueo del sitio de unión del virus al eritrocito.

Los anticuerpos en el suero de aves se pueden identificar mediante método serológico como inhibición de la hemoaglutinación, seroneutralización y la prueba de ELISA. Otras técnicas de laboratorio que pueden ser de utilidad para la identificación del VNC son la fijación del complemento, inmunodifusión en gel, las cuales detectan antígeno soluble e inactivo.

Las pruebas de reacción de anticuerpos monoclonales (Acm) y la transcriptasa reversa – reacción en cadena de la polimerasa (RT-PCR) producto del gen de fusión del VNC indica que al menos tres genotipos diferentes (II, III y IV) fueron responsables de las epizootias. Sin embargo en la actualidad no se conoce con seguridad a que genotipo pertenecen las cepas viscerotrópicas que se encuentran afectando las diferentes regiones de nuestro país.

La efectividad de las medidas de control puede ser improvisada en el origen de la rapidez de los brotes ambiguamente identificados. La identificación de las cepas es de gran importancia en los países donde se utilizan diferentes vacunas con cepas vivas, para establecer la identidad de la vacuna. Conjuntando esfuerzos en décadas pasadas se ha logrado introducir métodos de identificación y diferenciación. Estas técnicas se han basado en las propiedades virales del virus tales como la patogenicidad ó la formación de placas, propiedades físico-químicas, tales como la termoestabilidad y el análisis de polipéptidos u oligonucleótidos estructurales. Obteniéndose los mejores resultados para la identificación y diferenciación de las cepas de la ENC con el análisis de Acm. Este método establece 10 grupos antigénicos de los cuales 5 incluyen cepas virulentas (velogénicas). Esta fue la primera clasificación de cepas de la ENC en donde las cepas comparten propiedades antigénicas y epizootiológicas. Así mismo, basados en la comparación de secuencias de nucleótidos de los genes HN y F de once cepas de la ENC tres distintas líneas evolutivas se han identificado en la actualidad. Siendo determinante primario para la patogenicidad de la proteína F sitio de anclaje en la secuencia de

aminoácidos y la habilidad de proteasas específicas para unirse a la proteína F de diferentes patotipos; encontrándose aminoácidos dibásicos rodeando a la glutamina en la posición 114 de la proteína F en el sitio de anclaje de cepas mesogénicas y velogénicas, mientras las cepas lentogénicas carecen de este sitio.

El objetivo del presente estudio fue determinar las características moleculares de algunos de los virus de la ENC aislados en México entre los años de 1997 al 2001 derivados de diferentes regiones geográficas de nuestro país en diferentes períodos de tiempo y así poder revelar las relaciones epidemiológicas de los brotes utilizando la técnica de RT-PCR amplificando el gen de la proteína F.

MATERIAL Y MÉTODOS

Virus: Se utilizaron 7 cepas de referencia: 5 velogénicas vicerotrópicas (Ishii, Chimalhuacan, Miyadera, Querétaro, y Torreón), 2 lentogénicas (La Sota y Queensland V4) y 19 aislamientos de la ENC se obtuvieron de casos remitidos al Departamento de Producción Animal: Aves, de la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia de la UNAM. Los virus de la ENC se replicaron en embriones de 9 días de edad y los líquidos alantoideos se almacenaron a -85° C hasta su utilización.

Transcriptasa reversa (RT): Este procedimiento ha sido descrito por Wehmann *et al* (1997) y se realizó sin modificación alguna.

Reacción en cadena de la polimerasa (PCR): Para el análisis de restricción del gen F un producto de 1349 pb se sintetizo (del nucleótido, nt 334 al 1682) utilizando los iniciadores 1aa 5'-TGA-ITC-WAT-YCG-IAR-GAI-ACA-AGR-KTC-TG-3' (del nucleótido 334 al 362) y 4aa 5'-ATC-TGR-YCI-ACT-GTR-TTA-TTC-CCA-AGC-CA-3' (del nucleótido 1654 al 1682). La amplificación se llevo a cabo en un termociclador utilizando 5 ciclos de 94° C durante 45 segundos, 55° C durante 30 segundos, 72° C durante un minuto y 30 ciclos de 94° C durante 45 segundos, 48° C durante un minuto, 72° C durante 3 minutos y finalmente 72° C durante 7 minutos⁷. **Análisis de restricción:** El fragmento de 1349 pb de cada una de las cepas fueron digeridos utilizando 3 enzimas de restricción (*Bst*oI, *Hin*fl y *Rsa*l) separando los fragmentos digeridos por tamaño en geles de agarosa al 3% para la determinación de los PEs.

RESULTADOS

Siguiendo la técnica de RT-PCR utilizando el genoma viral de RNA como templado para la amplificación de un fragmento de 1349 pb de los 19 aislamientos se obtuvieron los siguientes resultados: Torreón 6/19 (31.5%); Chimalhuacan 1/19 (5%) y La Sota 4/19 (21.5%). Sin embargo, 8/19 (31.5%) tuvieron PEs distintos a los de las cepas de referencia

utilizados. Un análisis de secuenciación es necesario para determinar si estas cepas se encuentran relacionadas con otras cepas conocidas o bien para determinar si son cepas nuevas.

REFERENCIAS

1. Salvador Solís. Situación de la campaña nacional contra la enfermedad de Newcastle. Memorias del Curso "Enfermedades emergentes: Enfermedad de Newcastle"; 2000 julio 14; México, D.F. México (D.F.): Asociación Nacional de Especialistas en Ciencias Avícolas de México A.C; 2000: 20-22.
2. Tamas Fehérvári. Estrategias y control de la enfermedad de Newcastle en otros países. Memorias del Curso "Enfermedades emergentes: Enfermedad de Newcastle"; 2000 julio 14; México, D.F. México (D.F.): Asociación Nacional de Especialistas en Ciencias Avícolas de México A.C; 2000: 1-7.
3. Jorge Francisco Monroy López. Epidemiología de la Enfermedad de Newcastle velogénica viscerotrópica. Memorias del Curso "Enfermedades emergentes: Enfermedad de Newcastle"; 2000 julio 14; México, D.F. México (D.F.): Asociación Nacional de Especialistas en Ciencias Avícolas de México A.C; 2000: 12-15.
4. Examen general de calidad profesional para Medicina Veterinaria. Material de estudios Area: Aves. Editor: Isidro Castro Mendoza. Primera reimpresión 1997. México. UNAM. SUA. CENNEVAL.
5. Carlos Sánchez Widman. Memorias del Curso "Enfermedades emergentes: Enfermedad de Newcastle"; 2000 julio 14; México, D.F. México

(D.F.): Asociación Nacional de Especialistas en Ciencias Avícolas de México A.C; 2000: 16-19.

6. Seal BS, King DJ and Meinersmann. Molecular evolution of the Newcastle disease virus matrix protein gene and phylogenetic relationships among the paramyxoviridae. *Virus Research* 2000; 66: 1-11.
 7. Ballagi-Pordány A, Wehmann E, Herczeg J, Belák and Lomniczi B. Identification and grouping of Newcastle disease virus strains by restriction site analysis of region from the F gene. *Arch Virol* 1996; 141: 243-261.
 8. Lomniczi B, Wehmann E, Herczeg J, Ballagi-Pordány A, Kaleta EF, Werner O, Moulemans G, Jorgensen PH, Manté AP, Gielkens ALJ, Capua I and Damoser J. Newcastle disease outbreaks in recent years in Western Europe were caused by an old (VI) and novel genotype (VII). *Arc Virol* 1998; 143: 49-54.
 9. Allan WH, Lancaster JE and Tóth B. Vacunas contra la enfermedad de Newcastle. Roma (Italia). Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación (FAO). 1980.
 10. Calnek BW, Alexander DJ. Newcastle disease and other paramyxovirus infections. In: Calnek BW, Barnes HJ, Berad CW, Reid MW, Yoder WH. *Diseases of poultry*, 9th ed. Ames (Iowa): Iowa State University Press, 1991: 496-519.
 11. Méndez HJA. Características diferenciales de algunas cepas del virus de la enfermedad de Newcastle (tesis de licenciatura). México (D.F.) Facultad de Química. IPN, 1995.
- Reed LJ and Muench. A simple method for estimating fifty percent endpoints. *AmJ Hyg* 1938; 27: 493-497.

CARACTERIZACIÓN BIOLÓGICA DE CUATRO CEPAS VELOGÉNICAS Y UNA LENTOGENICA DEL VIRUS DE LA ENFERMEDAD DE NEWCASTLE

BIOLOGICAL CHARACTERIZATION OF ONE LENTOGENIC AND FOUR VELOGENIC STRAINS OF NEWCASTLE DISEASE VIRUS

Mireya Juárez¹, Víctor M. Petrone¹, Tamas Fehervari¹

¹Departamento de Producción Animal: Aves, Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia, UNAM

SUMMARY

Newcastle disease has been a serious problem for the poultry industry in Mexico and the world. In Mexico the Doyle presentation is represented by Mexican strains like Ixtapalapa, Querétaro and Chimalhuacán strains. The purpose of this study was to biologically characterize one lentogenic and four velogenic strains of Newcastle disease virus, as well as

to perform a comparison of their biological properties, given their pathogenicity. Results showed differences between hemagglutinating units (*UIH*), chicken embryo mortality rates (*RMEP*), and chicken embryo lethal dose 50% (*DLEP* 50%).

RESUMEN

La enfermedad de Newcastle (ENC) ha sido un serio problema para la avicultura mexicana y mundial, en México la presentación Doyle esta representada por cepas mexicanas como Ixtapalapa, Querétaro y Chimalhuacán. El presente estudio tuvo como objetivo realizar la caracterización biológica de cuatro cepas velogénicas y una lentogénica del virus de la enfermedad de Newcastle, así como realizar una comparación entre sus propiedades biológicas dada su patogenicidad. Los resultados mostraron diferencias entre las unidades hemoaglutinantes (UHA), rango de mortalidad en embrión de pollo (RMEP) y dosis letal embrión de pollo 50% (DLEP 50%).

INTRODUCCIÓN

Las primeras descripciones de la enfermedad de Newcastle Velogénica Vicerotrópica (ENVV) en México datan de 1946 cuando Camargo y Téllez Girón en un brote que fue confundido con cólera aviar logran reconocer y diagnosticar la enfermedad. Olvera en 1948 registró la muerte de 300, 000 gallinas en el Distrito Federal, describió una enfermedad con infección de tipo agudo, donde los animales muestran decaimiento, anorexia, plumas erizadas, diarrea y otros signos característicos de una septicemia. Los animales tenían cianosis, edema de la cabeza, del cuello, del torax, de los párpados y de la cresta. Algunos animales morían en esta etapa, mientras que los que sobrevivían presentaban signología nerviosa: tortícolis, opistótonos, epistótonos, tics entre otros.

La enfermedad de Newcastle (ENC) ha sido un serio problema para la avicultura mexicana, ya que su desarrollo se ha visto frenado por las diversas formas de presentación de la enfermedad.

En México existen los cuatro tipos de presentación de la ENC registrados por Hanson: el tipo Hitchner, Beaudette, Beach y Doyle es último es una forma aguda y letal para aves de cualquier edad, en este tipo de presentación se encuentran a las cepas mexicanas de la ENC Ixtapalapa, Querétaro y Chimalhuacán.

La ENC es más frecuente en aquellas áreas con alta densidad de población avícola como Monterrey, Saltillo, Torreón, Guadalajara, Tehuacan, en las que el tipo de presentación es velogénico vicerotrópico.

A partir de 1991 se ha notado a nivel mundial, un aumento de la incidencia de brotes de la enfermedad. En los últimos años en Australia, Honduras, Italia, Japón y México entre otros han informado brotes de la enfermedad. A nivel nacional durante 1998 se registraron 30 focos de ENVV, 20 en 1999 y mas de 41 focos en el 2000 a raíz del brote en la comarca Lagunera, en donde fueron sacrificadas mas de 13, 610, 008 aves de 93 granjas afectadas, las cuales fueron des pobladas.

Las cepas mexicanas del virus de la enfermedad de Newcastle velogénica vicerotrópica (VENVV) estudiadas hasta la fecha han mostrado algunas diferencias en su índice de neuropatogenicidad en pollitos de 1 día de edad, tiempo medio de mortalidad y su compartamiento frente a glóbulos rojos de diferentes especies animales.

El presente estudio tuvo como objetivo realizar la caracterización biológica de cuatro cepas velogénicas y una lentogénica del virus de la enfermedad de Newcastle, así como realizar una comparación entre sus propiedades biológicas dada su patogenicidad.

MATERIAL Y MÉTODOS

Se utilizaron cuatro cepas velogénicas donadas por el Dr. Tamas Fehervari las cuales estaban conservadas a -85°C , estas cepas correspondían a la cepa Chimalhuacán y Querétaro aisladas en México entre los años 50's y 60's las cuales son usadas como cepas de desafío en pruebas de constatación en el Departamento de Producción Animal: Aves, además de utilizar 2 cepas aisladas en el Laboratorio de diagnóstico del mismo departamento en el año 2000 provenientes una de la delegación Tlalpan del Distrito Federal y otra del estado de Torreón; las cuales provenían de gallos de pelea y pollo de engorda respectivamente, además de la cepa La Sota.

Para la caracterización de estas cepas se realizaron las siguientes pruebas:

Hemoaglutinación (HA): La capacidad del virus de la enfermedad de Newcastle (VEN) para aglutinar células rojas sanguíneas se debe a la fijación de la proteína HN a los receptores de superficie de los eritrocitos. Para esta prueba se utilizo una suspensión de eritrocitos de ave al 2% y sobre una placa de acrílico se colocaron 100 μl de liquido alantoideo y 100 μl de la suspensión de eritrocitos de ave al 2%.

Tiempo de elusión (TEL) o actividad neuraminidasa: La enzima neuraminidasa es también parte de la molécula HN del VEN, el TEL e un índice que se utiliza para agrupar de manera amplio los aislamientos de VENC como en agentes de elusión rápidos o lentos. Una vez que se hizo evidente la hemoaglutinación se tomo el tiempo en que se provoco el efecto de elusión.

Termoestabilidad (TES): es una prueba basada en la actividad de hemoaglutinación del virus después de ser sometido a tratamiento térmico. Las cinco cepas fueron sometidas a una temperatura de 56°C y se tomaron 100 μl de cada uno de los liquidos alantoideos a los 0, 5, 10, 15, 30 y 60 minutos para determinar que aun hemoaglutinaban.

Determinación de unidades hemoaglutinantes (UHA): dada la capacidad del virus de hemoaglutinar glóbulos rojos de ave se puede titular el virus y así determinar la cantidad de UHA que tiene. Para esto se

emplearon placas para IH y se realizaron diluciones del virus en logaritmo base 2 y después del 30 minutos de incubación se determinó el título del virus en unidades hemoaglutinantes.

Inhibición de la hemoaglutinación (IH): Dado que la actividad hemoaglutinante puede deberse a cualquiera de los 9 serotipos de paramixovirus aviares o a cualquiera de los subtipos de hemoaglutinina tipo A de influenza. La demostración de que el virus es de un serotipo específico puede llevarse a cabo por la prueba de IH con antiseros específicos. Esta prueba fue realizada por el método α (suero constante-virus diluido).

Dosis letal embrión de pollo 50%(DLEP50%): es una prueba utilizada para determinar la dilución de virus en la cual mueren el 50% de los embriones de pollo inoculados. La DLEP50% fue determinada mediante el método de Reed and Muench.

Rango de mortalidad en embrión de pollo(RMEP): dadas las características biológicas del VEN este ha sido clasificado como velogénico, mesogénico y lentogénico, clasificación realizada en base al tiempo que tarda en matar al embrión de pollo.

Cada una de estas pruebas se llevo a cabo conforme a lo descrito en el A Laboratory manual for the isolation and identification of avian pathogens.

RESULTADOS

En la prueba de HA las 5 cepas empleadas hemoaglutinaron glóbulos rojos de ave al 2%. El TEL para las cepas Chimalhuacán, Querétaro, Tlalpan y Torreón fue en promedio de 14 minutos y para la cepa La Sota de 26. La TES para todas las cepas fue de 5 minutos a 56°C, en cuanto a las UHA las cepas Chimalhuacán, Querétaro y La Sota tuvieron 4096 UHA, la cepa Tlalpan 2048 y la Torreón de 512. Para la prueba de IH las 5 cepas se inhibieron con antisero para el VEN. La DLE50% fue de $10^{6.7}$ para la cepa Chimalhuacán, $10^{6.3}$ para Querétaro, $10^{9.07}$ para Tlalpan, $10^{8.3}$ para Torreón y $10^{7.8}$ La Sota. El RMEP fue de 36 a 48 horas para las cepas Chimalhuacán, Querétaro, Tlalpan y Torreón, mientras que para la cepa La Sota fue de 96-140 horas.

CONCLUSIONES Y DISCUSIÓN

Los datos mas relevantes de este estudio corresponden a el TEL ya que las 4 cepas velogénicas fueron clasificadas como de elusión intermedia y la cepa La Sota se comporto como de elusión lenta dato que corresponde con lo mencionado por King and Seal (1997). Para la termoestabilidad las 5 cepas evaluadas no mostraron actividad hemoaglutinante después de ser tratadas a 56°C por 10 minutos. Estos datos difieren con los resultados obtenidos por Lara (1960) y

Velázquez (1964) ya que mencionan que la cepa Querétaro es estable a 56°C por 120 minutos. En cuanto a los títulos de UHA y DLEP50% se observan claras diferencias entre cada una de las cepas. A pesar de que en este trabajo se describen propiedades de cepas que se usan como de desafío es importante mencionar que no se cuentan con datos para establecer una comparación entre las cepas trabajadas para poder decir que estas han aumentado o disminuido su patogenicidad por lo que con esto se pretende poder contar con datos de referencia para posteriores trabajos.

REFERENCIAS

1. Alexander D.J. Enfermedad de Newcastle y otras infecciones por paramixovirus. In: Enfermedades de las aves, Calnek, B.W. Barnes, H.J. Beard, C.W. Reid, W.M. Yorder, Jr. H.W. eds. Iowa State University Press, Ames, Iowa, USA. pp 386-439. 2000
2. Benjamín L.M. Panorama de la enfermedad de Newcastle en México. Vet. Mex. pp. 30-34. 1976.
3. King D.J. and Seal B.S. Biological and Molecular Characterization of Newcastle Disease Virus Isolates Surveillance of live bird markets in the Northeastern United States. Avian Dis. 41:683-689. 1997.
4. Lara, F.A.M. Estudio de algunas características del virus de la enfermedad de Newcastle. Memorias del simposium de la Enfermedad de Newcastle, 1960. México (DF) pp 14-20.1960.
5. Senne D.A. Virus propagation in Embryonating eggs. In: A laboratory manual for the isolation and identification of avian pathogens, D.E. Swayne, J.R. Glisson, M.W. Jackwood, J.E. Pearson, W.M. Reed, eds. Kendall/Hunt Publishing Company, Pennsylvania. pp 235-240. 1998.
6. Thayer S.G. and Beard C.W. Serologic Procedures. In: A laboratory manual for the isolation and identification of avian pathogens, D.E. Swayne, J.R. Glisson, M.W. Jackwood, J.E. Pearson, W.M. Reed, eds. Kendall/Hunt Publishing Company, Pennsylvania. pp 255-266. 1998.
7. Velázquez, E.A. Aceves, F.A. Temblador, A.S. García M.A. Simroth, L.H. Hernández, S.R. González, G.R. Características de algunas cepas del virus de la enfermedad de Newcastle aisladas en México. Memorias del simposium de las enfermedades respiratorias de las aves, 1964. México (DF) pp 103-109. 1964.
8. Villegas P. Titration of biological suspensions. In: A laboratory manual for the isolation and identification of avian pathogens, D.E. Swayne, J.R. Glisson, M.W. Jackwood, J.E. Pearson, W.M. Reed, eds. Kendall/Hunt Publishing Company, Pennsylvania. pp 248-254 1998.

AISLAMIENTO E IDENTIFICACIÓN DE *PASTEURELLA HAEMOLYTICA AVIAR*

ISOLATION AND IDENTIFICATION OF *PASTEURELLA HAEMOLYTICA AVIAR*

Vázquez M.E., Campogarrido M.R., González C.P. y Sivanandan V.

Boehringer Ingelheim Vetmedica S.A. de C.V. Departamento de Investigación y Desarrollo.
Calle 30 No. 2614. Zona Industrial. Guadalajara, Jalisco México. Email: evazquez@gua.boehringer-ingelheim.com

SUMMARY

Evidence of *Pasteurella haemolytica* prevalence in poultry is scarce. (1,2). This germ has been frequently isolated from birds with respiratory and reproductive problems. Field prevalence of *P. haemolytica* needs to be known in order to understand its roll in pathological conditions. Identification methodology for this pathogen was implemented. *P. haemolytica* was isolated from several breeder, layer, and broiler organs. In Mexico 5 different *P. haemolytica* biogroups prevail, i.e: 1, 2, 4, 7, and U. Their roll in respiratory and reproductive conditions should be analyzed.

RESUMEN

Las evidencias de la prevalencia de *Pasteurella haemolytica* en aves son pocas (1,2), y en México su aislamiento ha sido frecuente en aves con problemas respiratorios y reproductivos.

Con el fin de conocer el rol de *P. haemolytica*, es necesario establecer la prevalencia del microorganismo en campo, para ello se implementó una metodología para su identificación. Este microorganismo fue aislado en aves reproductoras, ponedoras y pollo de engorda a partir de diversos órganos. En México prevalecen cinco diferentes biogrupos de *P. haemolytica*: 1, 2, 4, 7 y U. Su papel en cuadros respiratorio y reproductivos debe de analizarse.

INTRODUCCION.

Pasteurella haemolytica aviar es cocobácilo gram-negativo, pequeño, no móvil, encapsulado con ligero pleomorfismo y que algunas veces presenta tinción bipolar, es β -hemolítico presentando zonas de hemólisis más grandes comparadas con *P. haemolytica* de origen bovino; algunas cepas pueden ser de naturaleza seca mientras que otras son suaves y cremosas.

Son pocos los estudios encaminados a obtener la identificación y diferenciación de *P. haemolytica* aviar por lo que su clasificación esta basada en los estudios realizados para *P. haemolytica* en rumiantes, esta

clasificación antiguamente estaba regida por la fermentación de dos azúcares la cual agrupaba los aislamientos en dos biotipos; el biotipo A (cepas que fermentan arabinosa pero no trealosa) y el biotipo T (todas las cepas fermentan trehalosa) (4). A pesar de que el empleo de pruebas de fermentación de azúcares para la determinación de biogrupos y variantes es complicada aún continua realizandose, solo que ahora con un mayor grupo de azúcares en combinación con pruebas enzimáticas, convirtiendose en una metodología aún mas compleja (3). No obstante a las modificaciones que se han hecho para la identificación de estos microorganismos no productores de indol y ureasa negativos se sigue presentando una gran heterogeneidad bioquímica. Considerando todos estos factores, varios investigadores han tratado de poner en evidencia el porque de la existencia de tantas variantes por lo que han tenido que desarrollar estudios con pruebas más sofisticadas como ribotipificación, secuenciación de rDNA 16S y hibridación de DNA-DNA (5). De esta forma *P. haemolytica* esta tendiendo a ser reclasificada considerando a las cepas trealosa (+) y arabinosa (-) como *Pasteurella trehalosi*, mientras que las cepas que son ya sea arabinosa (+) o arabinosa (-) pero trealosa (-) entrarian a formar parte del genero *Mannhemmia*, el cual esta formado por las siguientes especies: *haemolytica*, *glucosida*, *varigena*, *granulomatis*, *ruminalis* (5, 6).

El objetivo del presente trabajo fue conocer la prevalencia de *P. haemolytica* en diferentes regiones de México mediante su aislamiento e identificación a partir de brotes de campo.

MATERIAL Y METODOS

Monitoreo. La mecánica del estudio fue el obtener los aislamientos a partir de aves enfermas que presentaran signología característica a una infección por *P. haemolytica*, para esto se recopilación muestras en todas las zonas avícolas de la república o en su defecto nuestro equipo tomó las muestras en el lugar del problema. Las muestras que se tomaron fueron de hendidura palatina, senos nasales, tráquea, corazón, hígado, pulmones y gónadas.

Aislamiento. Las muestras fueron colocadas en tubos con caldo triptosa e incubadas durante 24h a 37°C. Partes de 20 µl se sembraron en cajas de agar sangre de ovino utilizando la técnica de aislamiento por estria, las placas se incubaron de 24-48 h a 37°C. Las colonias que se consideraron como sospechosas presentaron β-hemólisis, convexas bajas de 0.5 a 1.0 mm de diámetro, brillosas y cristalinas además de ser catalasa y oxidasa positivas.

Identificación. Para la determinación de biogrupo se utilizó una modificación de la técnica descrita por Jaworski et al. (3).

RESULTADOS

Los aislamientos (n=117) se recuperaron a partir de senos nasales, hendidura palatina, tráquea, hígado, corazón, pulmón y ovario. El 47% de los aislamientos fueron obtenidos en el estado de Puebla, el 26% de Yucatan, 7% de Jalisco, 6% de Veracruz, 5% de Queretaro, 3% de Nuevo León, 3% de Sinaloa y 3% del Edo. de México. Los biogrupos de *P. haemolytica* encontrados en este estudio fueron el 1, 2, 4, 7 y U, correspondiendo el 78% para el biogrupo 4 (*P. trehalosi*), 9% para el biogrupo 2 (*P. trehalosi*), 9% para el biogrupo 1 (*Mannhemia haemolytica*), 3% para el biogrupo U (sin clasificación) y 1% para el biogrupo 7 (sin clasificación).

Por su parte el 78% de los aislamientos fueron recuperados de gallina de postura cuyo rango de edad osciló entre las 20 y 40 semanas, encontrándose la presencia de los 5 biogrupos antes mencionados. En reproductoras de 40 a 60 semanas de edad el 12 % de los aislamientos estuvieron comprendidos por los biogrupos 1,2 y 4; mientras que el 10% restante fue obtenido a partir de pollo de engorda de 7 a 8 semanas de edad, estando involucrados los biogrupos 2, 4 y U.

De los 117 aislamientos estudiados se encontró la presencia de 27 biovariantes siendo las más prevalentes las variantes 4^{BCDGSX} (n=43) y 4^{CDGSX} (n=26).

CONCLUSIONES Y DISCUSION

Para poder entender cual es el papel que realmente desempeña la *P. haemolytica* aviar primero es necesario conocer y entender que tipos de bacterias se encuentran involucradas en las diferentes funciones zootécnicas de las aves. Para nuestro equipo de trabajo el principal paso era el desarrollar una metodología que nos permitiera diferenciarlos con precisión ya que la metodología de serotipificación desarrollada para bovinos arrojó datos muy variables con un mismo tipo de bacteria (datos no mostrados). La metodología empleada por Jaworski et al (3), permitió obtener datos confiables y repetitivos entre varias pruebas con un mismo aislamiento.

De acuerdo a los nuevos sistemas de clasificación *P. trehalosi* (bacterias trealosa positivas biogrupos 2 y 4), estuvo involucrada en la mayoría de los casos tanto de gallina de postura, reproductoras y pollo de engorda. Se ha reportado que *P. trehalosi* coloniza las amígdalas de ovinos en espera de algún tipo de estrés como puede ser el transporte, cambios en el régimen alimenticio, humedad etc., considerandose este tipo de infección más raro que la provocada por *Mannhemia haemolytica* (biogrupo 1), lo cual se contraponen con nuestros resultados; al mismo tiempo en gallina de postura el desarrollo de la enfermedad fue en el período en que el ave sufre un stress hormonal muy fuerte lo que pudiera desencadenar la infección de las aves con esta bacteria.

Aunque la infección con *P. haemolytica* esta más frecuente relacionada en gallina de postura, también puede ser encontrada en pollo de engorda y en reproductoras, lo cual nos sugiere que es importante reforzar los estudios en estos campos a fin de tener un conocimiento más amplio de lo que realmente esta sucediendo.

Los resultados mostraron que los estados con mayor incidencia de estos problemas son Puebla y Yucatán tal vez debido a que son zonas que manejan una alta densidad de aves y que son lugares en donde existen condiciones climáticas extremas como son frio, calor y humedad.

Este estudio nos da una perspectiva más clara del papel de *P. haemolytica* en campo, de cuales son los tipos de bacterias que se encuentran ocasionando este tipo de infecciones y sobretodo reafirma la teoría de que este agente bajo ciertas condiciones puede convertirse en un primario, al mismo tiempo se ha manejado que esta bacteria es flora normal del tracto respiratorio superior de las aves sin embargo al monitorear aves sanas sin ningún tipo de signo clínico que pudiera sugerir enfermedad no fue posible el aislamiento de *P. haemolytica*. De esta manera consideramos es sumamente importante que se continúe con este tipo de estudios a fin de comprobar y determinar cual es realmente el papel de *P. haemolytica* en aves.

REFERENCIAS

1. Hacking C.W & Pettit J.R. *Pasteurella haemolytica* in pullet and laying hens. Avian diseases. 18(3): 483-486. 1974.
2. Vázquez M.E., Campogarrido M.R., Cubillas C.A., Coss J., González C.P. y Sivanandan V. Reporte de un caso de *Pasteurella haemolytica* en gallina de postura (Babcock) en Tehuacán Puebla. Memorias del XXVI convencion anual ANECA, Acapulco, Guerrero. México. Pág: 317-319.
3. Jaworski M.D., L. Hunter, A. C. S. Ward. Biovariants of isolates of *Pasteurella* from domestic and wild ruminants. J. Vet. Invest. 10:49-55. 1988.

4. Adlam C. y J.M. Rutter. The structure, function and properties of cellular and extracellular components of *Pasteurella haemolytica*. Chapter 4. *Pasteurella and Pasteurellosis*. Academic Press Limited. Pag: 75-92. 1989.

5. Angen Oysten, Mutters Reinier, Caugant D.A., Olsen J.E and Bisgaard Magne. Taxonomix relationships of the [*Pasteurella*] *haemolytica* complex as evaluated by DNA-DNA hybridizations ann 16S rRNA sequencing with proposal of *Mannheimia*

haemolytica gen. nov., comb. nov., *Mannheimia granulomatis* comb. nov., *Mannheimia glucosida* sp. nov., *Mannheimia ruminalis* sp. nov. and *Mannheimia varigena* sp. nov. *International Journal of Systematic Bacteriology*. 49: 67-86. 1999.

6. Angen Oysten, Quirie Malcolm, Donachie Willie, Bisgaard Magne. Investigations on the species specificity of *Mannheimia (Pasteurella) haemolytica* serotyping. *Veterinary Microbiology*. 65: 283-290. 1999.

IMPACTO DE LA PASTEURELLA HAEMOLYTICA EN PARVADAS COMERCIALES

THE IMPACT OF PASTERUELLA HAEMOLYTICA ON COMMERCIAL FLOCKS

Campogarrido M.R., Vázquez M.E., Gonzalez C.P. y Sivanandan V.

Boehringer Ingelheim Vetmedica S.A. de C.V. Departamento de Investigación y Desarrollo.
Calle 30 No. 2614. Zona Industrial. Guadalajara, Jalisco México. Email: rcampoga@gua.boehringer-ingelheim.com

SUMMARY

With the participation of poultry producers and field practitioners, information from commercial layer and broiler flocks was gathered. *P. haemolytica* was identified as the causative agent of respiratory and reproductive conditions, with a 6-20% decrease in egg production, and varying mortality rates. Information about control measures with antimicrobials was also obtained. Some alternatives to prevent this particular disease in commercial flocks are discussed.

RESUMEN

Con la ayuda y participación de avicultores y clínicos de campo se recopiló información de parvadas de postura comercial y de pollo de engorda en donde *P. haemolytica* se identificó como el agente causal de procesos de tipo respiratorio y reproductivo en donde existe una reducción de la producción que osciló entre un 6 a 20 % con unos porcentajes de mortalidad variables. Además se obtuvo información acerca de las medidas de control de los problemas a través del uso de antimicrobianos y por último se mencionan algunas alternativas para prevenir esta enfermedad en las parvadas comerciales.

INTRODUCCION

Pasteurella haemolytica aviar es un cocobacilo gram-negativo, pequeño, no móvil, encapsulado con ligero pleomorfismo y que algunas veces presenta tinción bipolar, es β -hemolítico. Durante mucho tiempo el rol de la *Pasteurella haemolytica* en las parvadas comerciales fue considerado como circunstancial e

incluso solo se le atribuía su participación como un agente secundario; es en el año de 1974 cuando aparece una publicación científica que involucra a *P. haemolytica* como un agente primario en cuadros patológicos en gallinas de postura (1). Sin embargo, en México en años recientes han sido cada vez más los clínicos en campo y los laboratorios de diagnóstico que han encontrado a este agente como causal de cuadros respiratorios y reproductivos en aves que merman la actividad productiva y por ende ocasiona un impacto económico en la industria avícola.

Anteriormente el lograr el aislamiento de *P. haemolytica* en las aves a partir de muestras de hendidura palatina y de tracto respiratorio superior en general era visto como algo habitual ya que se consideraba a este agente como un habitante "normal" en esos tejidos, pero actualmente el aislamiento de esta bacteria es cada día más frecuente y además a partir de otros órganos internos y no relacionados con el tracto respiratorio; este patrón se repetía en diferentes parvadas en donde se presentaban cuadros clínicos similares con comportamiento parecidos y donde el común denominador de nuevo era el aislamiento de *P. haemolytica*.

El objetivo del presente trabajo es exponer los datos que durante más de un año se han recabado con referencia a problemas productivos en donde se ha identificado a *P. haemolytica* como responsable de los procesos patológicos en diversas regiones de México como serían los estados de Nuevo León, Sinaloa, Jalisco, Querétaro, Edo. De México, Puebla, Veracruz y Yucatán.

MATERIAL Y METODOS

Toda la información proviene de los seguimientos que Boehringer Ingelheim Vetmedica a realizado con diferentes clientes en varias zonas de la República Mexicana, por lo que los datos presentados son un resumen de todas las historias clínicas levantadas para cada caso con la colaboración de los Médicos encargados de las parvadas correspondientes así como los resultados de laboratorio que se obtuvieron en su oportunidad, los cuales se muestran en el Cuadro No.1

Para hacer un poco más comprensible la información, ésta se dividirá en dos grupos 1) Gallina de postura y 2) Pollo de Engorda.

RESULTADOS

1) Gallina de Postura.

En este caso se contó con información referente a la zona centro y sur del país en donde se afectaron parvadas comerciales en la etapa de producción donde se encontró que entre 22 y 24 semanas de edad fueron la más afectadas, aunque también se obtuvieron datos de parvadas con 40 semanas de edad. Las parvadas afectadas se manejaron con un sistema tradicional o con equipo automatizado y en casetas elevadas con poco uso de personal para su atención.

El cuadro clínico inició con un problema respiratorio ligero con secreción nasal, edema periorbital, deshidratación, diarrea de color variable (blanquecina y verdosa), disminución en el consumo de alimento, caída de crestas con un cambio de coloración (cianóticas), la producción se detuvo por 3 a 4 días, después de una semana las aves mostraron una pérdida de peso severa.

Al realizar la necropsia de las aves afectadas se observan las siguientes lesiones: Hepatomegalia, bazo inflamado y con un color como de "uva", hemorragias en grasa abdominal, hemorragias en cavidad torácica, hemorragias en la superficie del proventrículo, hemorragias en corazón, ovarios en regresión o atrofiados, folículos ovaricos deformes y algunos con licuefacción en su contenido, líquido en cavidad abdominal, hemorragias en oviducto y además es no funcional.(2).

El aislamiento bacteriano fue exitoso a través de hendidura palatina, tráquea, líquido peritoneal, hígado, proventrículo, ovario y oviducto.

Por otro lado los tratamientos que se le administraron a las parvadas tuvieron resultados variables, encontrándose situaciones en donde una medicación con Sulfas y Trimetoprim fueron efectivas para controlar el problema, así como casos en donde tratamientos con diferentes principios activos y rutas de aplicación no surtieron ningún efecto en las aves. En este caso al igual que en el pollo de engorda se ha intentado el controlar la infección por *P. haemolytica* a

través de la vacunación a diferentes edades de las aves con resultados muy alentadores.

La mortalidad no tiene un incremento muy substancial aunque sí se presenta; pero el verdadero problema, en la parvada es el estancamiento de la producción de huevo y el tamaño del mismo, ya que las aves afectadas algunas regresan a la producción pero el tamaño del huevo se ve disminuido.

2) Pollo de Engorda

En este caso se dispone de información procedente de la zona centro del país y de los estados de Jalisco, Nuevo León y de Sinaloa. Las parvadas de engorda se criaron en condiciones convencionales; esto es, en piso con comederos manuales tipo tolva, bebederos automáticos de campana tipo Plasson, la ventilación podría ser natural a través de cortinas o forzada con ayuda de extractores y ventiladores.

El cuadro clínico inicia alrededor de la 5a. y 6a. semana de edad como un proceso respiratorio agudo observándose cabezas inflamadas, estornudos, pollo caído, depresión, las aves dejan de consumir alimento, baja uniformidad de la parvada y un aumento en la mortalidad que puede ir de un 3 a 8 % en el transcurso de una sola semana.

Al realizar la necropsia de los animales se encontraron las siguientes lesiones: tráquea congestionada y con hemorragias en su porción superior, hemorragias en corazón, hemorragias en la cara interna de la cavidad torácica, hepatomegalia, bazo inflamado y hemorrágico, hemorragias en músculo (pierna y/o pechuga), hemorragias en grasa abdominal y aerosaculitis.

Para tratar de controlar el cuadro las parvadas fueron sometidas a tratamientos diversos como serían la aplicación de Iodo y ácidos orgánicos por aspersión, aplicación de antibióticos como la Fosfomicina, Clortetraciclinas, Eritromicina, Sulfas por mencionar algunos pero los resultados obtenidos son muy irregulares e incluso en ciertos casos la resistencia del microorganismo es muy alta a casi todas los principios activos. Por otro lado en algunas ocasiones se ha intentado el control del microorganismo en parvadas posteriores a través de la vacunación de las aves con resultados alentadores.

El cuadro inicial en su fase aguda con el tiempo puede cambiar a un panorama de franca complicación con exudados caseosos observándose una colibacilosis que invade por completo al ave.

El aislamiento del agente fue exitoso a partir de hendidura palatina, tráquea, hígado

La pigmentación de las aves no se ve afectada de manera significativa pero sí su peso y conversión alimenticia.

CONCLUSIONES Y DISCUSION

Los cuadros clínicos ocasionados por *P. haemolytica* en las parvadas comerciales tienen algunas diferencias notables si comparamos las aves de engorda y las gallinas de postura; ya que en los primeros, el efecto negativo en las parvadas es básicamente debido a la mortalidad que ocasiona en las aves, la disminución en la ganancia de peso y la postración de animales que termina con producir una parvada muy dispereja que muchas ocasiones es castigada en su precio de venta. Con esta información es fácil el deducir el impacto económico que induce un problema de *P. haemolytica* en las parvadas de engorda de manera directa. Por otro lado debemos de considerar dentro del impacto económico todos aquellos gastos ocasionados por el tratamiento de las aves como serían: costo del antibiótico, costo de la aplicación y la mano de obra que se necesita para controlar los brotes en campo.

En el caso de las parvadas de gallina de postura el impacto de *P. haemolytica* no es en gran medida debido a la mortalidad ya que aunque existe un ligero aumento de la misma esta no es significativa, por otro lado hay otros parámetros productivos que si son afectados dramáticamente como son la postura y la pérdida de peso ya que esto implica una merma considerable en la producción de huevo y además un retraso de la parvada que nunca se podrá recuperar y se tendrá que tratar de amortizar la pérdida por el resto del ciclo productivo que le quede a la parvada.

En cuanto a las opciones que se tienen para poder controlar los problemas por *P. haemolytica* en la granja podemos mencionar como el No. 1 a el manejo integral adecuado de la parvada que comprometa la

Bioseguridad y el uso de antibióticos de una manera razonada y mesurada; ya que al emplear indiscriminadamente los antibióticos a manera de rutina o de un programa previamente establecido acarrea problemas de resistencia bacteriana y que no solo tiene que estar ligada a *P. haemolytica* sino a todas las bacterias que en su momento pueden aparecer en la industria avícola; esto origina problemas que ya están cada día siendo más frecuentes en el campo debido a que en algunas ocasiones no es posible el detener un cuadro septicémico con la ayuda de antibióticos, lo que provoca que la bacteria sea prácticamente resistente a todos los principios activos con los que se cuenta para afrontar estos problemas.

La opción No. 2 con la que se podría contar es la vacunación de las aves tanto para *P. haemolytica* como para el resto de los agentes infecciosos. Aunque ya es posible el poder demostrar el rol primario de la *P. haemolytica* en las aves eso no quiere decir que puedan existir complicaciones virales o bacterianas que por consecuencia agraven el problema y sus pérdidas económicas.

REFERENCIAS

1. Hacking C.W & Pettit J.R. *Pasteurella haemolytica* in pullet and laying hens. *Avian diseases*. 18(3): 483-486. 1974.
2. Vázquez M.E., Campogarrido M.R., Cubillas C.A., Coss J., González C.P. y Sivanandan V. Reporte de un caso de *Pasteurella haemolytica* en gallina de postura (Babcock) en Tehuacán Puebla. Memorias del XXVI convención anual ANECA, Acapulco, Guerrero. México. Pág: 317-319.

Cuadro 1.

Granja No.	Origen	Función Zootécnica	Edad (sem)	Aves en Granja
1	Yucatán	Postura	22/4	300,000
2	Yucatán	Postura	56/3	170,000
3	Puebla	Postura	20/6	595,000
4	Puebla	Postura	68/0	58,000
5	Puebla	Postura	41/0	115,000
6	Puebla	Postura	22/0	355,000
7	Jalisco	Engorda	2/0	36,000
8	Jalisco	Engorda	6/4	52,000
9	Sinaloa	Engorda	6/0	130,000
10	Morelos	Engorda	6/0	36,000
11	Morelos	Engorda	7/0	36,000

PATRONES DE RESISTENCIA ANTIBIÓTICA EN *PASTEURELLA HAEMOLYTICA* AVIAR

ANTIBIOTIC RESISTENCE PATTERN OF AVIAN *PASTEURELLA HAEMOLYTICA*

González C. P., Vázquez M.E., Campogarrido M.R. y Sivanandan V.

Boehringer Ingelheim Vetmedica S.A. de C.V. Departamento de Investigación y Desarrollo.
Calle 30 No. 2614. Zona Industrial. Guadalajara, Jalisco México. Email: cgonzalez@gua.boehringer-ingelheim.com

SUMMARY

Pasteurella haemolytica was isolated from broilers, layers, and breeders with respiratory/reproductive conditions in hot/humid, regions of Mexico with high poultry concentrations. These conditions might have enhanced the incidence of the problem. *P. haemolytica* was suggested as being the causative agent in all these cases. Antibiotic *in vitro* sensitivity to was investigated. A certain degree of resistance was found. It is important to prevent antibiotic abuse for the control of these clinical conditions.

RESUMEN

Pasteurella haemolytica fue aislada de cuadros respiratorios/reproductivos en pollo de engorda, gallina de postura y reproductoras localizadas en diferentes regiones de México, donde se sugirió su participación como agente causal. Se investigó la sensibilidad *in vitro* a antibióticos y los resultados mostraron un alto grado de resistencia.

Los problemas con *P. haemolytica* se presentaron en regiones con una densidad de población alta y condiciones climáticas con calor y humedad; factores que pueden favorecer a que el problema se presente. Es importante cuidar el no abusar del empleo de antibióticos para el control de estos cuadros clínicos.

INTRODUCCION

P. haemolytica es un báculo pleomorfo gram-negativo que generalmente ha sido considerado como un patógeno secundario sin que todavía pueda comprobarse lo contrario, sin embargo los reportes de aislamientos de este microorganismo en el campo continúan presentándose principalmente en gallinas de postura que están iniciando sus procesos productivos en donde se ha reportado una apreciable baja en la producción de huevo sin que la calidad del mismo se vea afectado (1, 2).

El uso de antimicrobianos en la industria avícola se está convirtiendo en una práctica común no solo con el objetivo de solucionar infecciones de tipo bacteriano sino que algunos productores emplean estos

compuestos como promotores de crecimiento a concentraciones bajas. El mal uso de estas drogas puede afectar el microambiente que se encuentra en los ecosistemas de las casetas de tal manera que se pueda inducir el nacimiento de nuevos microorganismos altamente resistentes y por consecuencia muy difíciles de combatir. Actualmente no se tiene conocimiento del comportamiento de *P. haemolytica* aviar ante los diversos antimicrobianos, por lo que el objetivo del presente trabajo fue determinar dichos patrones en aislamientos de esta bacteria obtenidos en el campo.

MATERIAL Y METODOS

Muestras. 67 aislamientos de *P. haemolytica* fueron obtenidos a partir de problemas de campo localizados en los estados de Puebla, Yucatán, Jalisco, Edo. de México, Querétaro, Nuevo León y Sinaloa. Las aves afectadas fueron tanto gallina de postura, reproductoras y pollo de engorda. Los sitios de donde se obtuvieron los aislamientos de *P. haemolytica* fueron hendidura palatina, senos nasales, hígado, ovario, tráquea, corazón y pulmón. Los aislamientos fueron purificados y se biotipificaron de acuerdo a la metodología descrita por Jaworski et al (3). Para su conservación las bacterias se propagaron en caldo cerebro corazón (BHI) el cual fue suplementado con 15% de glicerol estéril para ser almacenados a -70°C .

Antibiogramas. La técnica empleada fue una modificación de la de Bauer-Kirby, en donde los aislamientos se propagaron en cajas de agar sangre de ovino (BBL-220150) durante 24 horas a 37°C . Tubos con caldo triptosa (Difco 0062-17-6) se inocularon con una colonia de aislada del cultivo en agar sangre, los tubos fueron incubados a 37°C . Después de 5 horas de cultivo las bacterias fueron crecidas en placas de agar sangre. Las drogas antimicrobianas incluidas en este estudio fueron Cefalotina (CF), Penicilina (PE), Enoxacina (ENX), Netilmicina (NET), Ceftriaxona (CRO), Trimetropin/sulfametoxazol (SXT), Ampicilina (AM), Eritromicina (E), Cloranfenicol (CL), Dicloxacilina (DC), Amikacina (AK) y Gentamicina (GE).

RESULTADOS

Los 67 aislamientos estudiados correspondieron a 7 estados de la república y estuvieron distribuidos en la siguiente forma: Casos 1 y 2 (n=26, Puebla), caso 3 (n=3, Jalisco), caso 4 (n=4, Edo. de México), caso 5 (n=4, Querétaro), caso 6 (n=2, Nuevo León), caso 7 (n=24, caso Yucatán), caso 8 (n=4, Sinaloa). Como se observa en el cuadro 1, *P. haemolytica* presentó una alta resistencia a la penicilina, enoxacina, trimetropin-sulfametoxazol, eritromicina y dicloxacilina. Sin embargo también es importante resaltar los resultados obtenidos para el cloranfenicol (casos 4, 5 y 6) ya que presentan un nivel de resistencia considerable. Los casos 3, 5 y 6 fueron los que presentaron un mayor patron de resistencia para los 12 antimicrobianos utilizados. Al comparar los patrones de resistencia en base al sitio de aislamiento se encontró que los aislamientos obtenidos de hendidura palatina mostraron tener patrones de resistencia arriba de un 43%, mientras que los provenientes de otros organos presentaron un 53% .

CONCLUSIONES

Los antibióticos más usados en la industria avícola para el tratamiento de infecciones con problemas bacterianos resultaron ser los menos eficaces, mientras que los antibióticos usados con más

baja frecuencia fueron los más efectivos para el tratamiento de *P. haemolytica*.

Los patrones de resistencia que mostraron los aislamientos de *P. haemolytica* obtenidos tanto de órganos respiratorios como sistémicos fueron igualmente susceptibles a los antibióticos probados.

El mal uso de los antibióticos empleados para el tratamiento de infecciones de tipo bacteriano cada día es mas frecuente y puede provocar cambios en la participación de *P. haemolytica*.en estos problemas, además que el someter a esta bacteria a una presión de resistencia a antibióticos puede favorecer a que actúe como un patógeno primario.

REFERENCIAS

1. Vázquez M.E., Campogarrido M.R., Cubillas C.A., Coss J., González C.P. y Sivanandan V. Reporte de un caso de *Pasteurella haemolytica* en gallina de postura (Babcock) en tehúacan Puebla. Memorias del XXVI convencion anual ANECA, Acapulco, Guerrero. México. Pág: 317-319.
2. Hacking C.W & Pettit J.R. *Pasteurella haemolytica* in pullet and laying hens. Avian diseases. 18(3): 483-486. 1974.
3. Jaworski M.D., L. Hunter, A. C. S. Ward. Biovariants of isolates of *Pasteurella* from domestic and wild ruminants. J. Vet. Invest. 10:49-55. 1988.

Cuadro 1.

Antibiótico	% de Resistencia de acuerdo al No. de Caso							
	1	2	3	4	5	6	7	8
Cefalotina	62.5	5.6	100	0	0	0	0	0
Penicilina	100	83.3	100	100	100	100	95.8	100
Enoxacina	62.5	100	100	75	100	100	100	100
Netilmicina	12.5	0	0	0	0	0	4.2	0
Ceftriaxona	0	5.6	0	0	0	0	0	0
Trimetropin-sulfametoxazol	100	94.4	100	100	100	100	12.5	100
Ampicilina	87.5	50	100	25	100	100	4.2	0
Eritromicina	100	77.8	100	100	100	100	95.8	100
Cloranfenicol	37.5	27.8	0	75	50	50	20.8	0
Dicloxacilina	100	100	100	100	100	100	100	100
Amikacina	25	11.1	100	0	0	0	0	0
Gentamicina	12.5	5.6	33.3	0	0	0	4.2	0

LA VACUNACIÓN COMO UN MÉTODO DE CONTROL *PASTEURELLA HAEMOLYTICA* EN AVES

VACCINATION AS A CONTROL METHOD OF *PASTEURELLA* *HAEMOLYTICA* IN POULTRY

Sivanandan V., Campogarrido R.M, Vázquez M.E y González C.P.

Boehringer Ingelheim Vetmedica S.A. de C.V. Departamento de Investigación y Desarrollo.
Calle 30 No. 2614. Zona Industrial. Guadalajara, Jalisco México. Email: vsivanan@gua.boehringer-ingelheim.com

SUMMARY

One alternative for the control of *Pasteurella haemolytica*-associated problems in the poultry industry is prophylactic vaccination. With the development of a vaccine it is necessary to support vaccine safety and efficacy through I) an experimental model establishing the conditions to reproduce the clinical condition, and the parameters to be evaluated, II) Vaccination with oil-adjuvanted vaccines prepared with the most antigenic bio-groups of *Pasteurella haemolytica*, and III) Controlled, experimental challenge trials to evaluate vaccine performance. Controlled vaccination trial results confirm vaccine the efficacy as an aid to reduce economic losses in susceptible flocks.

RESUMEN

Una de las alternativas para el control de los problemas ocasionados por *Pasteurella haemolytica* en la industria avícola es su profilaxis a través de la vacunación. Con el desarrollo de una vacuna es necesario el soportar la seguridad y eficacia de la misma a través de un

I. Modelo experimental en donde se establezcan las condiciones para la reproducción del cuadro clínico y los parámetros a evaluar.

II. Vacunación a través de biológicos en adyuvante oleoso conteniendo los biogrupos de *Pasteurella haemolytica* más antigénicos.

III. Pruebas experimentales en condiciones controladas en donde a través de un desafío experimental se evalúe el desempeño de las vacunas.

Los resultados obtenidos con la vacunación en pruebas bajo condiciones controladas confirman la eficacia y la ayuda brindada por el biológico para disminuir las pérdidas económicas en las parvada susceptibles.

INTRODUCCION

El uso de biológicos para la prevención y control de infecciones causadas por *P. haemolytica* esta comprobada en rumiantes (1), sin embargo el conocimiento de esta práctica en avicultura es

desconocida, aunque se en ciertas regiones del país utilizan esta herramienta como una medida de control, en donde se ha visto un desempeño exitoso del biológico empleado mediante la disminución considerable de sus pérdidas económicas. El desarrollo de vacunas eficaces no es una tarea fácil ya que se tienen que considerar un sin número de factores que juegan un papel importante a fin de que un biológico funcione exitosamente, de tal manera que el tipo de cepas que utilizan como antígenos, el tipo de adyuvante a emplear y hasta el número de inmunizaciones necesarias para levantar una respuesta inmune protectora juegan un papel decisivo.

En base al anterior el objetivo del presente trabajo fue el conocer el desempeño de una vacuna experimental de *P. haemolytica* ante un desafío bajo condiciones controladas.

MATERIAL Y METODOS

Aves. En el estudio se emplearon un total de 60 aves SPF de dos semanas de edad, las cuales se mantuvieron desde su nacimiento y durante todo su desarrollo en unidades de aislamiento. A todas las aves se les proporcionaron agua y alimento *ad libitum*.

Vacunación. La vacuna se elaboró con los biogrupos de 2 y 4 de *P. haemolytica* (*P. trehalosi*) combinando las dos cepas en un adyuvante oleoso (w/o). Las aves se inmunizaron a las 2, 5 y 9 semanas de edad vía subcutánea con una dosis de 0.5 ml por ave. Los grupos de estudio estuvieron formados por 20 aves vacunadas y 30 aves que se mantuvieron como controles (20 positivos y 10 negativos).

Desafío. Las aves se desafiaron a las 13 semanas de edad administrando 0.2 ml de cada inóculo vía intravenosa, de tal manera que se desafiaron 20 aves vacunadas y 10 no vacunadas por inóculo dejando 10 aves sin vacunar y sin desafiar como controles negativos. Las aves se observaron durante tres días para el registro de mortalidad y morbilidad. Todas las aves sobrevivientes se sacrificaron al tercer día post-desafío para efectuar el reaislamiento bacteriano a partir de órganos así como obtener el registro de las lesiones presentadas.

Reaislamiento. De cada una de las aves sacrificadas se tomaron muestras de hígado y de gónadas. Estas muestras se sembraron en tubos con 20 ml de caldo triptosa los cuales se incubaron durante 24 h a 37°C. Muestras de los tubos que presentaron crecimiento se resembraron en cajas de ajar sangre de ovino utilizando la técnica de aislamiento por estria a fin de identificar colonias características a *P. haemolytica* y después obtener su indentificación bioquímica (2).

RESULTADOS

Evaluación clínica. Las aves no presentaron ningún tipo de reacciones adversas después de la vacunación siempre se mantuvieron con un aspecto saludable después de cada una de sus tres aplicaciones. Después del desafío algunas de las aves vacunadas presentaron depresión o somnolencia desapareciendo estos síntomas después de 36 h post-desafío mientras que las aves control si presentaron la sintomatología característica a una infección ocasionada por *P. haemolytica*. Las aves que se mantuvieron como controles negativos no presentaron signos clínicos y el reaislamiento fue negativo para todos los órganos muestreados. En el cuadro no. 1 se describe la protección que confiere el biológico ante el desafío con las dos cepas que contenía la vacuna mientras que

las aves control no vacunadas se vieron afectadas por el desafío.

CONCLUSIONES

En este estudio se comprobó que el empleo de bacterinas *P. haemolytica* puede evitar el desarrollo de una infección en aves sanas y aunque el conocimiento del desempeño de estas bacterinas esta en proceso de evaluación en el campo en donde intervienen un gran numero de factores, esta práctica puede ser una herramienta para la prevención y control de infecciones ocasionadas por este microorganismo.

Es importante enfatizar que se debe continuar con el desarrollo de este tipo de estudios con el fin de clarificar la eficacia de estos productos en condiciones de campo.

REFERENCIAS

1. Confer W. A., Montelongo M., Brown M. J., Fergen B. J., Clement J.C. Onset of Serum Antibodies to *Pasteurella (Mannheimia) haemolytica* following vaccination with five commercial vaccines. The Bovine Practitioner. 35(2): 141-148. 2001.
2. Jaworski M.D., L. Hunter, A. C. S. Ward. Biovariants of isolates of *Pasteurella* from domestic and wild ruminants. J. Vet. Invest. 10:49-55. 1988.

Cuadro No. 1.

Grupos de Prueba	Inoculo de desafío	Mortalidad y Reaislamiento (%)	Protección (%)
Control Negativo	Sin desafío	0	N/A
Control Positivo	Biogrupo 4	77	23
Control Positivo	Biogrupo 2	54	46
Vacunado	Biogrupo 4	0	100
Vacunado	Biogrupo 2	5	95

***ORNITHOBACTERIUM RHINOTRACHEALE*: ITS SURVIVAL OVER TIME AND TEMPERATURE IN POULTRY LITTER**

***ORNITHOBACTERIUM RHINOTRACHAELS (ORT)*: SU SUPERVIVENCIA ANTE EL TIEMPO Y LA TEMPERATURA EN LA CAMA AVÍCOLA**

Lopes, Vanessa C., Velayudhan, B., Halvorson, D. A., and Nagaraja, K. V.

Department of Veterinary PathoBiology, College of Veterinary Medicine, University of Minnesota, Saint Paul, MN 55108.

RESUMEN

ORT se ha considerado como un patógeno respiratorio de nuevo surgimiento en aves. Causa pérdidas económicas por aumento en las tasas de decomisos en el rastro, principalmente durante los

meses del invierno. No se ha descrito la supervivencia de este germen en el medio ambiente, por lo que estudiamos su capacidad de permanecer viable en la cama de las aves ante diferentes temperatura y a lo largo del tiempo. Los resultados indican que *ORT*

sobrevive cuando menos 150 días a temperaturas bajas en la cama, lo cual sugiere que puede persistir en el medio ambiente y contribuir al aumento en la incidencia de la infección durante los meses del verano.

Ornithobacterium rhinotracheale (ORT) has been considered an emerging respiratory pathogen in poultry. ORT causes economic losses, including increased condemnation rates at the slaughterhouse especially during winter months. No report on the survival of ORT in the environment has been

described. The ability of ORT to remain viable in the poultry litter was studied at different temperatures over time. Results indicate that ORT survives for at least 150 days at low temperatures in litter, suggesting that its survival may cause the pathogen to persist in the environment and contribute to the higher incidence of ORT infection during winter months.

(The full-length of this paper was submitted to *Avian Diseases* for publication).

AN UNUSUAL CASE OF *MYCOPLASMA SYNOVIAE* INFECTION IN BROILER CHICKENS

UN CASO INUSUAL DE INFECCIÓN CON *MYCOPLASMA SYNOVIAE* (MS) EN POLLO DE ENGORDA

Gabriel Senties-Cue, H.L. Shivaprasad and R.P. Chin.

California Animal Health and Food Safety Laboratory System, Fresno Branch
University of California, Davis, 2789 S. Orange Ave., Fresno CA 93725

RESUMEN

Informamos sobre un caso inusual de infección por MS en pollo de engorda con lesiones septicémicas. El involucramiento de varios órganos como el hígado, el bazo, el músculo esquelético, el encéfalo, los nervios y la bolsa de la quilla, asociado con vasculitis y aislamiento de MS a partir del hígado y la bolsa de la quilla, hacen de éste un caso inusitado. La cepa de MS fue diferente a la WVU 1853 y a otras cepas de MS aisladas de reproductoras pesadas de la misma empresa, pero pareció tener un patrón de ADN similar al de otros MS aislados de pavos en la región central de California.

Mycoplasma synoviae (MS) infection is a common disease of chickens and turkeys, affecting the air sacs and joints (2,4,5). However, MS isolates vary in their pathogenicity (5). There are strains that may produce a subclinical infection, and strains that, in addition to the airsacculitis and synovitis, produce tenovaginitis, and other less common septicemic lesions, including keel bursitis, hepatomegaly, splenomegaly, nephromegaly, myocarditis, and encephalitis (1,3,4). We report an unusual case of MS infection in broiler chickens, with septicemic lesions.

Sixty-one live and 16 processed carcasses, ranging in ages from 33 to 47-days, were submitted for laboratory evaluation to the California Animal Health & Food Safety Laboratory System, Fresno Branch, with a clinical history of respiratory signs, keel bursitis, leg problems, increased mortality, unevenness, and

high condemnation rate at processing. The breeders of the broiler chickens were infected with MS.

Significant gross lesions found at necropsy included moderate to severe thickening of the keel bursa with accumulation of fibrinous to caseous exudate and petechial hemorrhages. The livers were mild to moderately enlarged, congested, and green, and some had small white foci. The spleens were moderate to severely enlarged, congested, and mottled white. There were mild to moderately swollen hocks with accumulation of fibrinous to caseous exudate. Other lesions included mild to severe accumulation of fibrinous to caseous exudate in the air sacs, congestion of the lungs, accumulation of fibrinous exudate in pericardium, moderate to severe atrophy of bursas of Fabricius and thymuses, kidneys were moderately enlarged and pale, proventricular walls were moderately thickened and there was moderate excess mucus in tracheas.

Microscopically, lesions were characterized by lymphocytic infiltration in and around blood vessels of the liver, spleen, keel bursa, skeletal muscle, brain, and nerves. In addition, there was mild to severe infiltration of lymphocytes in the mucosa of the tracheas, air sacs, interstitium of the lungs, kidneys, myocardium, glandular portions of the proventriculus, and keel bursas. Fibrinoheterophilic infiltration was present in the air sac, pericardium and keel bursa. In the bursas of Fabricius and thymuses there was moderate lymphoid depletion.

Escherichia coli was isolated from air sac, heart sac, trachea and liver. *Ornithobacterium rhinotracheale* was isolated from heart sac and trachea. *Pasteurella haemolytica*-like/*Actinobacillus salpingitidis* group was isolated from trachea. *Staphylococcus sp.* was isolated from liver. *Bordetella avium* was isolated from trachea. The role of these bacterial infections probably was secondary.

Sera were positive for MS by the plate agglutination, hemagglutination-inhibition, and ELISA tests.

Mycoplasma synoviae was isolated from the air sac, keel bursa, trachea and liver. By random amplification of polymorphic DNA, the MS isolated was determined to be different from the MS strain WVU 1853 and another MS isolated from broiler-breeders of the same company, but appeared to have similar DNA pattern to another MS isolated from turkeys in Central California.

Involvement of various organs, such as liver, spleen, skeletal muscle, brain, nerves, and keel bursa, associated with vasculitis, and the isolation of MS from liver and keel bursa make this MS infection in broiler chickens unusual.

(The full-length article will be published in *Avian Diseases*).

REFERENCES

1. Chin, R. P., C.U. Meteyer, R. Yamamoto, H.L. Shivaprasad, and P.N. Klein. Isolation of *Mycoplasma synoviae* from the brains of commercial meat turkeys with meningeal vasculitis. *Avian Dis.* 35: 631-637. 1991.
2. Kawakubo, Y., K. Kume and M. Yoshioka. Histo- and immuno-pathological studies on experimental *Mycoplasma synoviae* infection of the chicken. *J. Comp. Pathol.* 90:457-467. 1980.
3. Kerr, M. K., and N.O. Olson. Pathology of chickens inoculated experimentally or contact-infected with *Mycoplasma synoviae*. *Avian Dis.* 14:291-320. 1970.
4. King, D.D., S.H. Kleven, D.M. Wenger and D.P. Anderson. Field studies with *Mycoplasma synoviae*. *Avian Dis.* 17: 722-726. 1973.
5. Kleven S.H. *Mycoplasma synoviae* infection. In: *Diseases of poultry*, 10th ed. Calnek B.W., H.J. Barnes, C.W. Beard, L.R. McDougald, and Y.M. Saif, eds. Iowa State University Press, Ames, Iowa. p 220-228. 1997.

PRODUCTIVIDAD Y RESPUESTA SEROLÓGICA DE REPRODUCTORAS CON EXPOSICIONES VACUNALES Y/O DE CAMPO A *MYCOPLASMA GALLISEPTICUM* Y *MYCOPLASMA SYNOVIAE*

PRODUCTIVITY AND SEROLOGICAL RESPONSE OF BROILER BREEDERS AFTER FIELD AND/OR VACCINE EXPOSURE TO *MYCOPLASMA GALLISEPTICUM* (MG) AND *MYCOPLASMA SYNOVIAE* (MS)

Juan Carlos Valladares*, Edmundo Angulo, Benjamín Barrientos, Daniel Juárez y Alfonso Lara.

Laboratorio de Control de Calidad y Patología Aviar, Productora de Alimentos Pecuarios de Nuevo León, S.A. de C.V. Juárez y Arista s/n, Salinas Victoria, N.L., México. CP 65500. juancv@papsa.mexis.com

SUMMARY

Four commercial broiler breeder flocks with MG and MS vaccine and/or field infections were analyzed. Serological response was periodically evaluated using plate agglutination (PA) tests, and immunoassays (ELISA), in both the hens and their offspring. Breeder productive parameters were recorded. Seroconversion after field or vaccine infection was first detected by PA, and later by ELISA. Seroconversion to MS was faster and more constant than that to MG. PA detected material antibodies (Mab's) more uniformly than ELISA. Treatments of breeders with anti-mycoplasma drugs modified seroconversion indexes both in the

breeders and in their progeny. Live MS/MG vaccinations resulted in increased numbers of chicks hatched per hen housed.

RESUMEN

Se analizaron 4 parvadas de gallinas reproductoras pesadas comerciales con infecciones vacunales y/o de campo con *M. gallisepticum* (MG) y *M. synoviae* (MS). La respuesta serológica se evaluó periódicamente con las técnicas de aglutinación en placa (AP) y de ensayo inmunoenzimático (ELISA) en las gallinas y en su progenie; también se registraron los parámetros productivos de las reproductoras. La

seroconversión tras las infecciones de campo o vacunales se detectó primero por AP y posteriormente por ELISA. La seroconversión hacia MS fue más rápida y constante que hacia MG. La prueba de AP detectó anticuerpos (Ac) maternos mas uniformemente que la prueba de ELISA. Los tratamientos con antimicoplasmicos en las reproductoras modificaron sus índices de seroconversión y lo de su progenie. La vacunación con vacunas vivas de MG y de MS incrementó el número de pollos nacidos vivos por ave encasetaada.

Los micoplasmas son los patógenos primarios más importantes del aparato respiratorio de las aves domésticas, *Mycoplasma gallisepticum* (MG) y *Mycoplasma synoviae* (MS) producen infecciones crónicas y aunque son relativamente poco patógenos, dañan las células del epitelio ocasionando una mayor susceptibilidad a los efectos de otros patógenos respiratorios^{2,5,6}. El objetivo del presente estudio fue analizar la respuesta serológica de las gallinas reproductoras, la transmisión de Ac maternos a la progenie y la productividad de las gallinas procedentes de parvadas con exposición vacunal y/o de campo hacia *M. gallisepticum* y *M. synoviae*.

MATERIAL Y METODOS

Se analizaron 4 parvadas de gallinas reproductoras pesadas comerciales con diferentes combinaciones de infecciones vacunales y de campo con *M. gallisepticum* (MG) y *M. synoviae* (MS). Todas las parvadas fueron de la misma estirpe, del mismo origen y procedieron de parvadas de progenitoras libres de infección por MG y MS. Las condiciones de alojamiento, alimentación y manejo fueron similares. Los huevos procedentes de cada parvada fueron manejados de manera similar y fueron procesados en la misma Planta Incubadora.

Las infecciones de campo fueron detectadas por signología y/o seroconversión y confirmadas por la detección de sondas de DNA con la reacción en cadena de polimerasa ó PCR³ a partir de hisopos traqueales. Se evaluó la respuestas serológica hacia MG y MS con las técnicas de AP⁴ y de ELISA⁷ cada 8-10 semanas en

las reproductoras y semanalmente en la progenie recién nacida. Se registró la producción total de huevo, producción de huevo incubable, producción de pollo nacido vivo, % de huevo infértil - mortalidad embrionaria temprana, % de mortalidad embrionaria tardía - embrión picado no nacido y mortalidad en hembras y machos.

RESULTADOS Y DISCUSION

De acuerdo al tipo de exposición hacia *Mycoplasma* de campo y/o vacunal y a los tratamientos recibidos se encontraron los siguientes casos:

Parvada 1: MG libre, MS de campo a la 36^a semana. Tratamiento 3,4 isovaleril tilosina 1x3 sem hasta 36^a semana; tilosina constante de la 36^a a la 63^a semana.

Parvada 2: MG de campo a las 24^a semana, MS: vacunal a la 18^a semana. Tratamiento: tilosina permanente de las 24^a las 63^a semanas

Parvada 3: MG vacunal a las 18^a semana, MS de campo a las 8^a semana. Tratamiento: enrofloxacina de la 8^a a la 10^a semana

Parvada 4: MG: Vacunal a la 7^a semana, MS: vacunal a la 5^a semana. Sin tratamiento con antimicoplásmicos

La seroconversión tras las infecciones de campo o vacunales se detectó primero por AP y posteriormente por ELISA. La seroconversión hacia MS fue más rápida y constante que hacia MG. La prueba de AP detectó Ac maternos mas uniformemente que la prueba de ELISA, con un comportamiento similar a lo descrito previamente^{1,5,8}. Los tratamientos con antimicoplasmicos en las reproductoras modificaron los índices de seroconversión en las gallinas y en su progenie recién nacida, efecto también descrito previamente^{2,5}. Las infecciones vacunales y/o de campo con MG y MS tuvieron efectos variables sobre los parámetros productivos de las reproductoras analizados (Cuadro 1). La vacunación con vacunas vivas de MG y de MS incremento el número de pollos nacidos vivos por ave encasetaada sugiriendo un efecto protector de la vacunación sobre la producción total de pollitos por hembra reproductora.

Cuadro 1.- Parámetros productivos¹ de 4 parvadas con exposición de campo y/o vacunal a MG y/o MS

Estado en relación a <i>Mycoplasma</i> ²	No. de huevos totales por ave encasetada	No. de huevos incubables por ave encasetada	No. de pollos nacidos por ave encasetada	Mortalidad de las Hembras	Mortalidad de los Machos
MG libre, MS campo 36s	155.11	141.9	93.91	17.29%	31.27%
MG campo 24s MS vac 18 s	149.89	131.2	98.43	13.41%	41.38%
MG vac 18s MS campo 8s	142.03	131.3	76.70	15.80%	65.0%
MG vac 7s MS vac 5s	145.98	135.2	103.13	16.69%	45.81%
Estándar de la estirpe	155.6	152.5	132.8	-	-

¹ Parámetros para el período de 26.3 semanas a 60.3 semanas

² Edad a la infección (campo) o a la vacunación (vac)

REFERENCIAS

1. Contreras, M. y Fernández, R. *Mycoplasma gallisepticum* y *Mycoplasma synoviae*, interpretación de pruebas serológicas y uso de vacunas. VII Simposium Avícola, Sección Nacional de Progenitores de Aves de la Unión Nacional de Avicultores, Zacartecas, Zacatecas pp 129-135. 2000.

2. Glison, J.: Funcionamiento y enfermedades del aparato respiratorio de los pollos. Conferencia de Enfermedades Respiratorias Aviaries, Curso Pre Congreso ELANCO en XXV Convención Nacional ANECA 2000, Cancún, Q. Roo, México pp 13-16. 2000.

3. IDEXX Laboratories, Inc. FlockCheck DNA PROBE Test Kits. Technical Manual, Westbrook, Maine, USA.

4. Intervet International B.V., Boxmeer Holland.

5. Kleven, S. *Mycoplasma synoviae* infections, In Diseases of Poultry, 10th ed. B. Calnek, H. Barnes, C. Beard, L. McDougald and Y. Saif eds. Iowa State Press, Ames, Iowa, pp. 220-232. 1997.

6. Kleven, S. And Yoder, H. Mycoplasmosis, in A Laboratory Manual for the Isolation and Identification of Avian Pathogens, pp.57-623th ed, H. Purchase, L. Arp, C. Domermuth and J. Pearson eds. American Association of Avian Pathologist, Kennett Square, PA. Kendall Hunt Publishing Company, Dubuque, Iowa pp 57-62. 1989.

7. KPL Kirkegaard & Perry Laboratories, ProFLOCK, Technical Manual, Gaithersburg, Maryland, 1999.

8. Ley, D. And Joder, H. *Mycoplasma gallisepticum* infections, In Diseases of Poultry, 10th ed. B. Calnek, H. Barnes, C. Beard, L. McDougald and Y. Saif eds. Iowa State Press, Ames, Iowa, pp. 194-205. 1997.

COMPARACIÓN DEL USO DE UN INMUNOESTIMULANTE Y DE UN COMPUESTO ANTIESTRÉS EN LA RESPUESTA INMUNOLÓGICA CONTRA LA ENFERMEDAD DE NEWCASTLE EN POLLO DE ENGORDA Y SU EFECTO SOBRE LA PRODUCTIVIDAD DE LA PARVADA

COMPARISON OF ONE IMMUNOSTIMULANT AND ONE ANTI-STRESS COMPOUND ON THE IMMUNE RESPONSE TO NEWCASTLE DISEASE, AND THEIR EFFECT ON BROILER PRODUCTIVITY

MVZ MC María Elena Rubio García PROTECO, S.C., MVZ MC Néstor Ledesma Martínez FMVZ-UNAM, MVZ MC Ezequiel Sánchez Ramírez CEIEPA – UNAM, MVZ MC Elizabeth Posadas CEIEPA - UNAM

SUMMARY

Knowing that vaccine application is a stressor for birds, one immunostimulant (LEV[®]) was compared with an anti-stress compound (VsEs3-C[®]) on the immune response after vaccination with newcastle disease virus, and their effects on productive parameters in broilers. Feed intake, feed conversion rate, morality rate, and productivity index were significantly better in VsEs3-C-treated birds. The administration of VsEs3-C and LEV had no effect whatsoever on the average level of antibodies. Even though, increased *in vitro* heterophil phagocytic activity was observed. Increased bursal follicular diameter with different degrees of lymphoid depletion non-suggestive of infection was also observed.

RESUMEN

Sabiendo que la aplicación de vacunas es un factor estresante para las aves, se comparó el uso de un inmunostimulante (LEV[®]) y un producto antiestrés (VsEs3-C[®]) en la respuesta inmunológica pos-vacunal contra el virus de ENC en pollo y su efecto sobre parámetros productivos. El Consumo de alimento, Conversión alimenticia, % de Mortalidad e Índice de Productividad fueron significativamente mejores en aquellos que recibieron VsEs3-C. La administración de VsEs3-C y LEV no presentó efecto alguno sobre el nivel de anticuerpos promedio en los grupos; sin embargo si incrementaron la actividad fagocítica de los heterófilos *in vitro* y presentaron mayor diámetro folicular en la bolsa de Fabricio, con diversos grados de depleción linfóide no sugestivos de infección.

INTRODUCCIÓN

La ENC continúa siendo un riesgo importante para la avicultura mexicana, la aplicación de vacunas ha sido considerada hasta ahora el mejor medio de prevención, teniendo como objetivo principal el

desarrollo de anticuerpos que protejan contra la infección del virus velogénico vicerotrópico.¹³ La importancia del adecuado desarrollo de la inmunidad activa contra esta enfermedad ha provocado que día a día se busquen alternativas que permitan favorecer o potenciar la respuesta posvacunal² y reducir al máximo los efectos negativos sobre la parvada durante el manejo de la vacunación.

Diversos investigadores han reportado el uso de sustancias como el levamisol (LEV), ácido acetoxibenzoico (AAB) y ác. ascórbico (AA) como coadyuvantes en la respuesta inmunológica.^{1,3,4,5,7,12,13} Barbosa (1981) y Chakraborty (1998) reportaron que aves vacunadas contra ENC y medicadas con LEV en el agua de bebida obtuvieron una media geométrica mayor de anticuerpos hemaglutinantes comparado con pollos únicamente vacunados.^{3,7} El uso del LEV como estimulante de la respuesta inmune es realizado con el objetivo de incrementar la producción de anticuerpos, diversos estudios han encontrado que el uso de LEV vía agua de bebida favorece la respuesta posvacunal a diferentes agentes como la ENC, Viruela aviar y Gumboro (IBF) entre otros.^{1,3,8} Aves vacunadas contra la IBF y tratadas con LEV, vitamina E y AA, solos y combinados al ser comparadas con el grupo solamente vacunado presentaron una mejor respuesta inmune, sugiriendo así un efecto inmunomodulatorio benéfico en los programas de vacunación.^{7,12}

Bendich (1990) reportó que la adición de AA en dietas de pollo de engorda favorece la fagocitosis y destrucción de organismos infecciosos y menciona, que durante una infección por virus o bacterias se presenta una disminución en el AA circulante seguido de inmunosupresión.⁵ Gross (1990) adicionó AA en la dieta de pollos de engorda y encontró un efecto lineal en la reducción del efecto estresante del calor conforme se aumentaba la cantidad de AA en la dieta. Se ha reportado que la mortalidad asociada con infecciones respiratorias posteriores a la exposición de un virus

vacunal de ENC cepa B1 y por presencia de *Mycoplasma gallisepticum* es menor en animales alimentados con dietas suplementadas de AA.⁹ Por otra parte la literatura reporta que la adición de AAB también favorece la fagocitosis y la actividad microbicida de los polimorfonucleares en animales y plantas, mejorando con esto la respuesta inmunológica, de igual forma el AAB también tiene la capacidad de inhibir el malestar y/o dolor por su efecto inhibitorio sobre las prostaglandinas o mediadores químicos del dolor a través de la ciclooxigenasa^{4,14}

Sabiendo que la aplicación de vacunas es un factor estresante para las aves, se busco comparar el uso de un inmunoestimulante (LEV[®]) y un producto antiestrés (VsEs3-C[®]) en la respuesta inmunológica pos-vacunal contra el virus de la ENC en pollo de engorda y su efecto sobre los parámetros productivos.

MATERIAL Y MÉTODOS

Se llevaron a cabo dos pruebas, una en el Centro de Enseñanza Investigación y Extensión en Producción Avícola de la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia de la UNAM, y la otra en la Unidad Experimental Proteco en Tlaquepaque, Jal., para tal efecto se utilizaron 480 (Prueba 1) y 300 (Prueba 2) pollos de engorda de un día de edad, de la estirpe Ross, asignados aleatoriamente en los siguientes tratamientos.[®] Marca Registrada

La Prueba 1 contó con 4 tratamientos: a) T - (No vacunado-No medicado), b) T + (vacunado-No medicado), c) Tratamiento Y (Vacunado + VsEs3-C[®]) y Tratamiento Z (Vacunado + LEV[®]). La Prueba 2 solo contó con los tratamiento Y y Z. En ambas pruebas se utilizaron las dosis recomendadas por el laboratorio. En la Prueba 1 la medicación se realizó durante 7 días, iniciando 3 días antes de la vacunación, durante y 3 días después de ésta, en la Prueba 2 las aves se medicaron durante 5 días, iniciando 1 día antes de la vacunación, el agua medicada se administró a libre acceso y como única fuente de bebida

Las aves fueron vacunadas contra la ENC vía ocular y subcutánea a los 8-10 días, revacunando vía agua de bebida a los 25 – 24 días, de igual forma recibieron agua y alimento a libre acceso a lo largo de la prueba. Los parámetros evaluados fueron: Mortalidad semanal, Peso promedio por semana, Consumo acumulado de alimento, Conversión alimenticia, Ganancia diaria de peso, Viabilidad, Índice de productividad, Serología HI-ENC, Actividad Fagocítica de Heterófilos e Histopatología (Diámetro folicular de la bolsa de Fabricio y Relación: Corteza-Médula en timo)

Análisis Estadístico: Los resultados obtenidos se sometieron a un ANOVA y la diferencia entre media se obtuvo mediante la prueba de Tukey. Previamente el porcentaje de mortalidad y los resultados serológicos se

sometieron a una transformación por raíz cuadrada del Arcoseno y logarítmica respectivamente.

RESULTADOS

La ganancia de peso semanal a pesar de no presentar diferencia estadística significativa ($P \leq 0.05$) en ninguna de las dos pruebas, presento diferencia numérica importante sobre todo en las aves tratadas con VsEs3-C ya que obtuvieron 117g mas de peso que las aves T+. En la *prueba 2* las aves medicadas con VsEs3-C presentaron pesos promedio mayores a todo lo largo del ciclo productivo aún cuando estos no son significativamente diferentes. En el Consumo de alimento y Conversión alimenticia se reportó significancia estadística ($P \leq 0.05$) entre el T- y el resto de los grupos, siendo el grupo medicado con VsEs3-C el que presentó menor consumo de alimento y mejor conversión alimenticia en ambas pruebas. En lo referente al Porcentaje de mortalidad, no se encontró diferencia ($P \geq 0.05$) entre tratamientos en ninguna de las pruebas. Las aves medicadas con VsEs3-C presentaron menor Consumo Semanal Acumulado de Alimento, Conversión Alimenticia y mejor Índice de Productividad en las dos pruebas.

La respuesta serológica reportó un logaritmo más con la prueba de Inhibición de la Hemoaglutinación para la ENC en las aves medicadas con LEV en la *Prueba 1* ($P \leq 0.05$), no así en la *Prueba 2*. En ambos casos la administración de VsEs3-C y LEV no presentaron efecto alguno sobre el nivel de anticuerpos promedio en los grupos.

En lo referente a la actividad fagocítica de los heterófilos, esta fue significativamente mayor ($P \leq 0.05$) en los grupos que fueron medicados con LEV y VsEs3-C.

Las mediciones del diámetro folicular reportaron diferencia estadística ($P \leq 0.05$) a partir de los 18 días de edad, encontrando mayor diámetro folicular en el grupo T-, posteriormente a los 28 días (después de las dos medicaciones) el diámetro folicular de la bolsa de Fabricio en los diferentes tratamientos se recupera, los grupos T- y T+ a los 35 días son significativamente ($P \leq 0.05$) menores que los grupos medicados

En la relación corteza: médula, aún cuando no se encontró significancia estadística después de los tratamientos, esta se vio numéricamente mas afectada en el T-, reportando un valor considerado como atrofia severa, mientras que el resto de los grupos presentaron una clasificación de moderada.

DISCUSIONES

Los parámetros productivos no se vieron afectados por el uso de estas sustancias; sin embargo es notorio que las aves no vacunadas presentaron menor consumo de alimento, mejor conversión alimenticia y

menor porcentaje de mortalidad. El grupo vacunado resulto mas afectado en estos parámetros que el resto de los tratamientos, debido quizá a la aplicación de una vacuna a virus vivo, ya que estas por lo general al causar viremia dejan a las aves mas susceptibles a otras infecciones, por lo cual la mortalidad fue mayor en este grupo afectando por consiguiente el resto de los parámetros, cabe hacer notar que este efecto negativo no fue tan notorio en los grupos tratados con VsEs3-C y LEV probablemente debido a la acción inmunomoduladora^{1,3,5} y antipirética⁹ de los componentes. Shadaksharappa y colaboradores en un trabajo realizado con sustancias inmunomoduladoras como la vitamina C, vitamina E y LEV afirman que el uso de este tipo de tratamientos preventivos en conjunto con los programas de vacunación tienen un efecto benéfico.¹⁰

Por otra parte, a pesar de que la respuesta serológica se incremento en un logaritmo en las aves que recibieron LEV en el agua de bebida antes y después de la vacunación, estos resultados no fueron repetitivos en la Prueba 2, Barbosa y otros investigadores mencionan que pollos de engorda medicados con un inmunomodulador vía agua de bebida después de la vacunación contra la ENC si presentan un incremento estadísticamente significativo en los títulos de HI-ENC comparados con el grupo testigo.^{3,7}

La actividad fagocítica de los heterófilos contra bacterias *in vitro* fue mayor cuando se medico con VsEs3-C y LEV, esto no presento efecto alguno sobre la respuesta serológica en la vacuna de ENC, pero de alguna manera forma parte de la respuesta inmunológica y por lo tanto de la resistencia de las aves hacia otras enfermedades reduciendo así el porcentaje de mortalidad.^{4,9,12} Estudios en medicina humana mencionan que la terapia con LEV en pacientes con leucemia linfoblástica aguda ayuda a restaurar la respuesta inmune por un incremento de la actividad fagocítica.⁶

Diversos reportes de la acción del virus de ENC sobre la bolsa de Fabricio indican que este ocasiona marcada degeneración de la bolsa así como destrucción de linfocitos en bazo y timo.² Las aves que recibieron VsEs3-C y LEV presentaron mayor diámetro folicular, sin embargo en todos los tratamientos se observo depleción linfoide en diversos grados, sin ser sugestivos de infección de la bolsa de Fabricio.

En timos normales se espera una relación corteza:médula de 2:1* cosa que no sucedió en este estudio; lo que sí se observo es que el T - desarrolló atrofia severa mas rápidamente.

CONCLUSIONES

- a) Los parámetros productivos al manejo por vacunación, son mejores cuando las aves son tratadas preventivamente con VsEs3-C
- b) La respuesta serológica no se incrementa significativamente de manera constante con el uso de LEV y VsEs3-C cuando las aves son vacunadas contra la ENC
- c) El uso de VsEs3-C y LEV de manera preventiva incrementan la actividad fagocítica de los heterófilos; no obstante se recomienda hacer mas estudios a este respecto para evaluar su papel en la resistencia de las aves.

REFERENCIAS

1. Aguilar, P. C. El levamisol como inmunomodulador en la vacunación de Gumboro. Tesis de Licenciatura. FES-Cuautitlan. UNAM. 1985.
2. Alexander, D. J. Newcastle diseases and other paramyxovirus infection . In: Diseases of Poultry. 9th ed. Iowa State University Press, ed. Calnek and cols. USA. pp. 1991.
3. Barbosa, E. J. Acción del levamisol como inmunoestimulante después de la vacunación y desafío con virus de la enfermedad de Newcastle en pollos de engorda. Tesis de Licenciatura. FMVZ-UNAM. 1981.
4. Bas, A. L. Traas, B., Elams, M., Keskin, E. and Yazar, E. The effect of acetylsalicylic acid on the phagocytic function on bovine neutrophils *in vitro*. (ABSTRAC) Revue de Medicine Veterinaire 148: 857 – 862. 1998.
5. Bendich, A. Ascorbic Acid and Immune Functions (Review). Proc. 2nd Symposium. Kartause Ittingen, Switzerland. Pp. 408 – 420. 1990
6. Boguslawska, J. J. Chybicka, A. and Pisarek, J. The study of T lymphocytes, granulocyte's phagocytic activity and adherent cells in patients with acute lymphoblastic leukemia during levamisole therapy. Imm. of the immunoproliferative dis. 855-858. 1978.
7. Chakraborty, D and Chatterjee, A. Studies on immunomodulatory effect of levamisole in Newcastle disease vaccinated chicks. Indian Jour. in Comp. Microbiology, 85 – 87. 1998.
8. Gokce, G.; Irmak, K.; Sural, E and Ozlu, E. Clinical observation on the therapeutic and prophylactic effects of immunomodulators in sheep pox. I. (ABSTRACT) Kafkas Universitesi Veteriner Fakultesi Dergisi Turkey. 211-215. 1997.
9. Gross, B. Effect of ascorbic acid on resistance of chickens to disease. Proc. 2nd Symposium. Kartause Ittingen, Switzerland. 429 – 436. 1990.
10. Guy, E. R. El levamisole y la inmunoregulación. Vet. Argentina. 660-674. 1988.
11. Hernández V.J. Efectos del levamisol en dosis subterapéuticas para pollo de engorda

administrado en el agua de bebida. Tesis de Licenciatura. FMVZ-UNAM. 1981.

12. Shadaksharappa, H. L. , Gowda, R. N. and Vijayasarithi, S. K. Effects of levamisole hydrochloride, vitamin E and C on bursa body weight (B:B) index on infectious bursal disease virus (IBDV) vaccination in broilers. Indian Jour. in Vet. Path. 109 – 112. 1997.

13. Solis, S. Situación de la campaña nacional contra la enfermedad de Newcastle. Memorias Curso

enfermedades emergentes: Enfermedad de Newcastle, ANECA, México. 20-28. 2000.

14. Yeo, W. H., Kim, Y. H., Park, E. K. and Kim, S. S. Physico-chemical characteristics and antiviral activity of acetylsalicylic acid, an antibiotic produced by actinomycetes B25. (ABSTRAC) Korean Jour. of Plant Path. 13: 1- 3. 1997.

(Comunicación personal Dr. Néstor Ledesma).

EVALUACION DE PROTECCION CONTRA LA ENFERMEDAD DE NEWCASTLE ANTE UN DESAFIO, UTILIZANDO DIFERENTES CALENDARIOS DE VACUNACION

PROTECTION AGAINST CHALLENGE USING DIFFERENT NEWCASTLE DISEASE VACCINATION PROGRAMS

Muñoz P. Patricia, Toscano C. Arnulfo, Chapa B. Joaquín.; Lucio D. Eduardo

Laboratorio de Biología. Investigación Aplicada S.A. de C.V., Tehuacán, Puebla, MEXICO 75700

SUMMARY

In Mexico, Newcastle disease is controlled through biosecurity measures, as well as through the administration of live or killed virus vaccines, using different vaccination schedules. The efficacy of four different vaccination programs was evaluated against pathogenic challenge. For this purpose, a potency/challenge test was performed under controlled laboratory conditions. Results showed that all four programs protected the birds against challenge. Protection was 100% with 3 programs, and 90% with the other program.

RESUMEN

La Enfermedad de Newcastle (ENC), se controla a través de medidas de bioseguridad y aplicación de vacunas a virus activo e inactivado, mediante diferentes calendarios de vacunación utilizados en México. Se evaluaron cuatro diferentes calendarios de vacunación para verificar su eficiencia ante un virus patógeno, esto se realizó mediante una prueba de potencia-desafío en condiciones controladas de laboratorio. De acuerdo a los resultados obtenidos los cuatro programas de vacunación protegieron a las aves contra el desafío de la ENC. Tres programas protegieron en un 100%; y otro en un 90%.

INTRODUCCION

La Enfermedad de Newcastle (ENC), es causada por un paramyxovirus. Entre los virus de la ENC, encontramos una gran variación en cuanto a su virulencia, existen cepas que producen infección sin

presentar signos clínicos de enfermedad, algunas otras producen enfermedad y mortalidad de hasta un 100%. Sólo se conoce un serotipo de virus el cuál se puede clasificar de acuerdo a su virulencia en tres cepas: lentogénicas (suaves), mesogénicas (medias) y velogénicas (virulentas) (5). También se pueden clasificar de acuerdo a la signología clínica que presentan las aves, como son las cepas neurotrópicas, que provocan signos clínicos de tipo nervioso y las cepas viscerotrópicas que provocan hemorragias severas en las vísceras, sin la presentación de signos de tipo nervioso; Estas diferencias permiten la identificación del virus de la ENC como cepa neurotrópica ó cepa viscerotrópica (2).

La prueba de Inhibición de la Hemoaglutinación (HI), tiene una gran aplicación práctica en la prevención y control de la ENC, ya que las aves que han sido expuestas a este virus (de campo ó vacunal), desarrollan anticuerpos inhibidores de la hemoaglutinación. Lo anterior permite que los calendarios de vacunación empleados sean evaluados en una forma periódica, rápida y económica, lo cuál es de gran ayuda para el médico de campo para la pronta toma de decisiones (2). Sin embargo es recomendable que cuando haya un cambio en el calendario de vacunación ó el tipo de vacuna se evalúe por medio de una prueba de potencia de desafío controlada.

MATERIAL Y METODOS

Diseño experimental. Se formaron cuatro grupos de aves de pollo de engorda (35 pollos por grupo), denominándolos Programa 1, 2 , 3 y 4;

provistos de agua y alimento *ad libitum*. Se utilizaron cuatro diferentes calendarios de vacunación que a continuación se detallan:

Programa 1: Al día 1 de edad se aplicó vacuna de Newcastle (NC) inactivada hiperconcentrada vía subcutánea a razón de 0.2 ml/ave; y vacuna NC cepa B1B1 virus vivo (vv), vía aspersión. Al día 10 de edad se aplicó vacuna combinada NC/BI cepas B1B1, Mass, Conn, vía aspersión. Al día 36 de edad, se desafió con un virus patógeno contra la enfermedad de Newcastle (VPENC), cepa chimalhuacan con una dosis de 10^4 DIE₅₀/ml, vía intramuscular, a razón de 0.2 ml/ave. Al día 54 de edad se sacrificaron las aves para ver lesiones a la necropsia.

Programa 2: Al día 1 de edad se aplicó vacuna de NC inactivada hiperconcentrada vía subcutánea a razón de 0.2 ml/ave; y vacuna NC cepa B1B1 vv, vía aspersión. Al día 10 de edad se aplicó vacuna combinada NC/BI cepas B1B1, Mass, Conn, vía aspersión. Al día 25 de edad, se aplicó vacuna NC cepa B1B1 vv, vía aspersión. Al día 40 de edad se desafió con VPENC, cepa chimalhuacan con una dosis de 10^4 DIE₅₀ / ml, vía intramuscular a razón de 0.2 ml/ave. Al día 54 de edad se sacrificaron las aves para ver lesiones a la necropsia.

Programa 3: Al día 1 de edad se aplicó vacuna de NC inactivada hiperconcentrada vía subcutánea a razón de 0.2 ml/ave; Y vacuna NC cepa B1B1 vv, vía aspersión. Al día 10 de edad se aplicó vacuna combinada NC/ BI cepas La Sota, Mass, Con, v.v., vía aspersión.. Al día 36 de edad se desafió con VPENC, cepa chimalhuacan con una dosis de 10^4 DIE₅₀ / ml, vía intramuscular a razón de 0.2 ml/ave. Al día 50 de edad se sacrificaron las aves para ver lesiones a la necropsia.

Programa 4: Al día 1 de edad se aplicó vacuna de NC inactivada hiperconcentrada vía subcutánea a razón de 0.2 ml/ave; y vacuna NC cepa B1B1 vv, vía aspersión. Al día 10 de edad se aplicó vacuna combinada NC /BI cepas La Sota, Mass, Conn, v.v., vía aspersión. Al día 25 de edad, se aplicó vacuna NC cepa B1B1 vv, vía aspersión. Al día 40 de edad se desafió con VPENC, cepa chimalhuacan con una dosis de 10^4 DIE₅₀ / ml, vía intramuscular a razón de 0.2 ml/ave. Al día 54 de edad se sacrificaron las aves para ver lesiones a la necropsia.

Se realizaron monitoreos serológicos a los 9, 17, 24, 31 y 39 días de edad para los cuatro programas, para esto se utilizó la prueba de Inhibición de la Hemoaglutinación (HI), con 10 UHA, método beta (suero diluido, virus constante), de acuerdo a la Norma Oficial.

Se colocaron 5 pollos de engorda sin vacunar en cada uno de los cuatro programas, de la misma edad en la que fueron desafiados cada uno, para tomarlos en cuenta como controles positivos.

Cada una de las vacunaciones por vía aspersión se realizó con un atomizador manual y al momento de la aplicación, se apagó el motor eléctrico de la unidad de aislamiento por un tiempo de 20 minutos, para que el aerosol de la vacuna no se escapara a través del sistema de aire filtrado.

En cada uno de los monitoreos serológicos se tomaron de a 5 pollos de cada programa y se iban eliminando. Esto se realizó para no sangrar varias veces a los mismos pollos y así evitar inmunodeprimirlos, ya que este es un factor importante en este tipo de pruebas.

RESULTADOS

Entre el 4° y 6° día post-desafío (PD), los 5 pollos no vacunados de cada programa (controles positivos) murieron, al igual que al 6° día PD, murió un pollo vacunado del programa 2, presentando a la necropsia lesiones características de la ENC cepa viscerotrópica, consistentes en hemorragias severas en proventrículo, tonsilas cecales y placas de Peyer.

Del 1° a los 14 días PD, los 10 pollos de engorda vacunados restantes, de los programas 1,3 y 4 y los 9 pollos restantes del programa 2, no presentaron ningún signo clínico, característico de NC.

En los programas 1,3 y 4 los pollos de engorda vacunados mostraron un 100% de protección al desafío.

En el programa 2 los pollos vacunados mostraron un 90% de protección al desafío.

Los porcentajes de protección al desafío, conferidos a las aves en los cuatro calendarios de vacunación se consideran SATISFACTORIOS, ya que los requisitos mínimos que marca la SAGARPA, son de un 80% de protección al desafío para que una vacuna sea considerada como efectiva.

En las gráficas 1 y 2 se analizan el comportamiento serológico de cada uno de los 4 programas de vacunación, durante el desarrollo de la prueba.

CONCLUSIONES

Todos los programas de vacunación contra la enfermedad de NC tienen como objetivos disminuir la incidencia, evitar pérdidas económicas por mortalidad, problemas respiratorios y secuelas ante un desafío de campo.

Existen diversos programas de vacunación contra la enfermedad de NC y en cada uno de ellos se espera una respuesta inmune diferente. Por esto es importante que al modificar ó renovar los calendarios de vacunación sean puestos a prueba, mediante las pruebas de potencia desafío en condiciones controladas en Unidades de Aislamiento.

En cuanto al nivel de anticuerpos es necesario recordar que aunque estos sean un buen reflejo de la

protección del ave contra la enfermedad de NC, existen otros factores de resistencia, así como de inmunidad local y celular y fenómenos de interferencia viral que coadyuvan en este proceso. Aves con títulos bajos pueden resistir a un desafío y aves con títulos elevados pueden sucumbir a este (5).

En estudios realizados para conocer el grado de protección conferido a las aves con diferentes títulos de anticuerpos, se determinó que las aves están protegidas contra la muerte cuando tienen un título mínimo de $5 \log_2$ (5), pero esto no indica que las aves no serán infectadas por el virus de campo, en cuyo caso el virus puede replicarse, producir secuelas respiratorias y ser eliminado por el organismo en diferentes grados dependiendo del título de anticuerpos circulantes previos a la infección.

Es conveniente que tanto el médico de campo como el avicultor se den cuenta de la gran importancia de llevar muestreos periódicos en sus parvadas no sólo para el caso de la enfermedad de NC, ya que además de otros beneficios, pueden llegar a comprobar eventualmente la calidad de los productos utilizados en su granja (4).

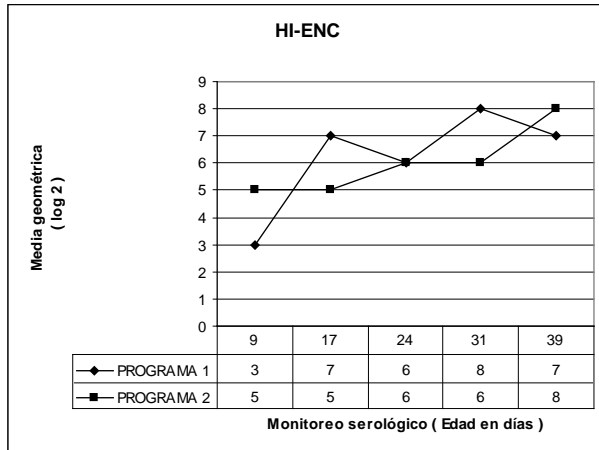
Por último cabe destacar que además de un programa de vacunación eficaz, es necesario considerar

las prácticas de buen manejo, bioseguridad y buena higiene en las granjas (1).

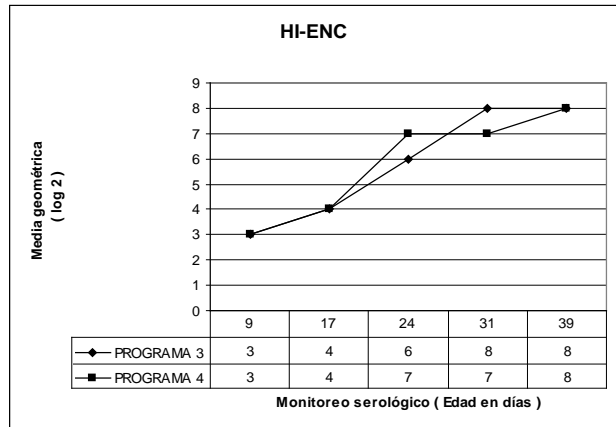
REFERENCIAS

1. B.W. Calnek, "Enfermedades de las aves" Manual moderno, 2ª. Edición, México, D.F.-Santafé de Bogotá 2000. P. 574.
2. Intervet, "Las enfermedades más importantes de las aves" 4ª. Edición, México, D.F. 1999. P. 14.
3. J.L. , García; G.D., Merino; J.Cabriaes; M.A., Márquez. Boehringer Ingelheim Vetmédica, S.A. de C.V. "Aspectos básicos de programas de vacunación contra la enfermedad de Newcastle" Memorias de la XXVI convención anual de ANECA, Acapulco, Gro. 2001. P. 117.
4. Lozano D., Bernardo; Morfín F., Rogelio; Lozano D., Jorge. "Comportamiento en el campo de las vacunas emulsionadas comerciales contra la enfermedad de Newcastle en pollos de engorda". Sarfati M., David.; Lucio M., Benjamín; Lozano D., Bernardo; Soto P., Ernesto. "Aplicación de la Inhibición de la Hemoaglutinación en el control de la Enfermedad de Newcastle". "Curso de actualización ANECA", Monterrey, N.L. 1985.p. 59,60 y 61.

Graficia 1



Graficia 2



SAFETY AND EFFICACY OF A NOVEL NEWCASTLE DISEASE VACCINE ADMINISTERED *IN OVO* TO SPF AND COMMERCIAL BROILER BIRDS

SEGURIDAD Y EFICACIA DE UNA NUEVA VACUNA CONTRA LA ENFERMEDAD DE NEWCASTLE ADMINISTRADA *IN OVO* A AVES *SPF* Y A POLLOS DE ENGORDA COMERCIALES

Eid E. Haddad^A, Craig E. Whitfill^A, Alan P. Avakian^A, Donald B. Link^B, and Patricia S. Wakenell^B

^AEMBREX Inc., P.O. Box 13989, Research Triangle Park, North Carolina 27709.

^BDepartment of Population Health and Reproduction, University of California, Davis, California, 95616

RESUMEN

Se desarrolló una nueva vacuna contra la enfermedad de Newcastle para administración *in ovo*, formulada mezclando cantidades apropiadas de las cepas B1 y LaSota, y de sus anticuerpos neutralizantes. Los virus y los anticuerpos se obtuvieron comercialmente. En experimentos separados la vacuna se administró *in ovo* a los 18 días del desarrollo, ya sea a embriones libres de patógenos específicos (*SPF*) o de pollo de engorda. Los parámetros usados para evaluar la seguridad fueron la incubabilidad y la mortalidad, mientras que para la eficacia se evaluó la protección contra el desafío estándar con la cepa GB de Texas. Los resultados de estos experimentos sugirieron que la vacuna es completamente segura y eficaz cuando se administra *in ovo* a los embriones ya sea *SPF* o de pollo de engorda con inmunidad pasiva contra dicho virus.

SUMMARY

A novel *in ovo* Newcastle Disease (ND) vaccine has been developed. The vaccine was formulated by mixing the appropriate amount of NDV B1/La Sota with the appropriate amount of its neutralizing antibodies. The ND virus and the antibodies were obtained commercially. In separate experiments, the vaccine was administered *in ovo* on day 18 of embryonic development to either Specific Pathogen Free (SPF) or broiler embryos. Safety and efficacy parameters were evaluated. Safety parameters included hatchability and mortality, while efficacy parameters included protection against a standard Texas GB challenge. Results of these experiments suggested that the vaccine was fully safe and efficacious when administered *in ovo* to either SPF or commercial broiler chickens with passive immunity to NDV.

INTRODUCTION

Newcastle disease is a highly contagious respiratory disease of chickens as well as other avian

species. The disease continues to be a major problem with a substantial economic impact on the poultry industry throughout the world. Good vaccination as well as sanitary veterinary measures are required to control the disease. Current ND vaccination practices are based on multiple vaccinations against the disease either through spray or drinking water during the life of the bird. The increasing problems associated with the control of the disease worldwide have emphasized the need for a better vaccine that would be easily applied and have a significant degree of effectiveness.

In recent years and due to the availability of an automated mass egg injection system, the poultry industry has adopted the use of the *in ovo* route of administration to administer vaccines and biologicals to broilers at the time of transfer around day 18 of embryonic development (5). Currently, vaccines that can be used *in ovo* include Marek=s disease (MD) and Infectious Bursal Disease Virus (IBDV) vaccines (3, 5, 10). (Commercial *in ovo* vaccines against Pox virus have also been approved in some countries of the world.) There have been several attempts at developing *in ovo* vaccines against Newcastle Disease Virus (NDV) (1-2, 6), Infectious Bronchitis Virus (IBV) (8-9), bacteria, and coccidiosis vaccines (reviewed in 5).

We have previously reported the successful development of an IBDV vaccine for post-hatch delivery (3, 10) which also can be delivered *in ovo*. Herein, we report on the successful application of the same concept towards the development of a ND vaccine that can be administered *in ovo*. The objective of this work was to evaluate the safety and efficacy of this novel ND vaccine in both SPF and commercial broilers with variable levels of maternal ND immunity.

MATERIALS AND METHODS

Vaccine preparation. The novel NDV vaccine was prepared as described previously (10). Briefly, the appropriate amount of NDA was mixed with the appropriate amount of NDV strain La Sota Type B1

(NDV - NDA complex vaccine), added virus stabilizer, dispensed into glass vials at 1000 doses/vial, then lyophilized. Virus titer (7) and anti ND activity in NDA (4) were determined prior to mixing. The vaccine was re-hydrated using commercially available MD diluent and injected at 1 dose/embryo/100 µl on day 18 of embryonic development.

Challenge virus. The NDV standard challenge virus (Texas GB strain of NDV; Lot #92-1, 10^{9.6} EID₅₀/ml) was used at 10^{4.7} EID₅₀/challenge dose, administered intramuscularly (IM) into the breast muscle.

Vaccine evaluation criteria. Safety was evaluated based on hatchability and post hatch mortality using SPF embryos. The vaccine was considered safe if the above parameters were within the values of the Vehicle (MD diluent alone) control values. Efficacy was evaluated by protection against the standard NDV challenge, administered according to the established guidelines.

Experimental design. Safety/Efficacy Experiment in SPF Birds. In this experiment, three groups were included; Group 1 receiving MD diluent, Group 2 receiving a 1X dose of the vaccine, and Group 3 receiving a 10X dose of the vaccine. Hatchability, post-hatch mortality (all groups) and day 21 of age protection against the Texas GB (Groups 1 & 2) were all evaluated. The efficacy part of this experiment was repeated to confirm the obtained results.

Efficacy Experiment in Commercial Broilers. In this experiment, two groups were included; Group 1 receiving MD diluent and serving as Vehicle Controls, and Group 2 receiving a 1X dose of the vaccine. Protection against weekly Texas GB challenge was evaluated. Weekly serology using a commercially available Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (ELISA) kit (IDEXX, Inc.,) was also determined. Additionally, Hemagglutination-Inhibition (HI) tests (HA=8) were conducted on serum samples collected on day 1 of age.

Statistical analysis. Descriptive statistics were used wherever appropriate. Titer values are presented as Geometric Mean Titer (GMT). HI titers are presented as Log₂ values.

RESULTS AND DISCUSSION

Results from Experiment 1 showed that overall hatchability was 95%, 91%, and 98% for the Vehicle Control Group 1, Group 2 (1X dose group), and Group 3 (10X dose group), respectively. Overall post-hatch mortality was within acceptable levels as stated in USDA 9CFR Guidelines. Vaccinated birds were fully protected (> 90% protected) against the standard Texas GB when administered on day 21 of age. These results clearly demonstrate that the vaccine was fully safe and efficacious in SPF birds.

In Experiment 2, birds (30 birds/challenge) were challenged on a weekly basis starting on day 7 of age. Full protection (>90% of the challenged birds) was observed as early as day 14 of age and continued through the life of the bird (day 42 of age). Level of passive immunity was variable but substantial. Birds were able to produce substantial levels of anti NDV antibodies as measured by ELISA.

In conclusion, the new NDV- NDA complex vaccine was shown to be both safe and efficacious in both SPF and commercial broilers with variable levels of passive NDV immunity. This novel vaccine offers the advantages over conventional commercial ND vaccines by being administered *in ovo* as the only ND vaccine, thus replacing the need for multiple ND hatchery and field vaccinations. The compatibility of this novel vaccine with other *in ovo* vaccines is currently under investigation. Preliminary data suggest that this vaccine will be compatible with other commercially licensed *in ovo* vaccines. The performance of this novel vaccine under field conditions is also under investigation. Normal field performance is expected based on our daily observations of the mentioned broiler study.

REFERENCES

1. Ahmad, J and J. M. Sharma. Evaluation of a modified live virus vaccine administered *in ovo* to protect chickens against Newcastle disease. Am. J. Vet. Res. 53:1999-2004, 1992.
2. Ahmad, J., and J. M. Sharma. Protection against hemorrhagic enteritis and Newcastle disease in turkeys by embryo vaccination with monovalent and bivalent vaccines. Avian Dis. 37:485-491, 1993.
3. Haddad, E. E., C. E. Whitfill, A. P. Avakian, C. A. Ricks, P. D. Andrews, J. A. Thoma, and P. S. Wakenell. Efficacy of a novel Infectious Bursal disease virus immune complex vaccine in broiler chickens. Avian Dis. 41:882-889, 1997.
4. Haddad, E. E., C. E. Whitfill, C. A. Ricks, T. Fredericksen, D. Rowe, L. Owen, A. Baldrige, L. Murray, and J. A. Thoma. Adaptation of the MTT (3-[4,5-dimethylthiazol-2-yl]-2,5-diphenyl tetrazolium bromide) assay for the determination of virus-neutralizing antibodies using the virus-neutralization assay. Avian Dis. 38:755-761. 1994.
5. Ricks, C. A., A. Avakian, T. Bryan, R. Gidersleeve, E. Haddad, R. Ilich, S. King, L. Murray, P. Phelps, R. Poston, C. Whitfill, and C. Williams. *In ovo* vaccination technology. Adv. Vet. Med. 41:495-515, 1999.
6. Stone, H. D. *In ovo* vaccination of chicken embryos with experimental Newcastle disease and avian influenza oil-emulsion vaccines. Avian Dis. 41:856-863, 1997.

7. Villegas, P. Titration of biological suspensions. In: A laboratory manual for the isolation and identification of avian pathogens, 4th ed. D. E. Swayne, J. R. Glisson, M. W. Jackwood, J. E. Pearson, and W. M. Reed, eds. University of Pennsylvania, PA . pp 248-253. 1998.

8. Wakenell, P. S., and J. M. Sharma. Chicken embryonal vaccination with avian infectious bronchitis virus. Am. J. Vet. Res. 47:933-938, 1986.

9. Wakenell, P. S., J. M. Sharma, R. F. Slocombe. Embryo vaccination of chickens with

infectious bronchitis virus: Histologic and ultrastructural lesion response and immunologic response to vaccination. Avian dis. 39:752-765, 1995

10. Whitfill, C. E., E. E. Haddad, C. A. Ricks, J. K. Skeeles, L. A. Newberry, J. N. Beasley, P. D. Andrews, J. A. Thoma, and P. S. Wakenell. Determination of optimal formulation of a novel infectious bursal disease virus (IBDV) vaccine constructed by mixing bursal disease antisera with IBDV. Avian Dis. 39:687-699. 1995.

EXPERIENCES WITH KILLED OIL EMULSION NEWCASTLE DISEASE VIRUS VACCINE ON DAY OLD TURKEY POULTS IN THE MIDWEST (U.S.A.)

EXPERIENCIAS CON UNA VACUNA INACTIVADA Y EMULSIONADA EN ACEITE, ELABORADA CON EL VIRUS DE LA ENFERMEDAD DE NEWCASTLE PARA USO EN PAVIPOLLOS DE UN DÍA EN EL MEDIO OESTE ESTADOUNIDENSE

Hugo A. Medina

Jennie-O Turkey Store, Inc. P.O. Box 778, Willmar, Minnesota 55201

RESUMEN

En algunos países ha sido difícil erradicar al virus de la enfermedad de Newcastle (*NDV*) mediante procedimientos de bioseguridad, limpieza y desinfección. En consecuencia, dichos países se han visto obligados a usar la vacunación como método de control. Las vacunas a virus activo se aplican comúnmente por aspersión, nebulización, en el agua de bebida, por instilación ocular, intranasal o aspersión sobre el alimento. Llevamos a cabo pruebas en Minnesota con una vacuna inactivada del virus de la enfermedad de Newcastle, inyectada al día de edad. Disertaremos sobre las comparaciones y las observaciones realizadas en los pavos vacunados al día de edad.

Newcastle Disease Virus (*NDV*) is a worldwide disease problem. *NDV* signs, symptoms and effects have been described elsewhere. *NDV* is a worldwide problem that infects a wide range of wild and domestic fowl. It has been pointed out that about half of the bird species are susceptible to *NDV*. The main objective of international, national, local or farm methods of control has as objective either prevent susceptible birds to become infected or to reduce the number of susceptible birds through vaccination. In general *NDV* has been very difficult to eradicate from some countries through biosecurity and sanitation procedures, as a consequence

they have been forced to vaccinate as method of control.

Over the years the poultry industry in the U.S.A has been exposed to the three pathotypes of the disease (Lentogenic, Mesogenic and Velogenic strains), which have been isolated from time to time. In general commercial fowl (layers, broilers, turkeys and all their parent and grand parent stocks) have been protected to the disease by vaccination. The most common isolates of *NDV* present in the U.S.A. belong to the Lentogenic pathotype group.

Ideally, vaccination against *NDV* would result in immunity against infection and replication of the virus; but in reality, vaccination would reduce more serious effects of the disease, although virus replication and shedding may still occur but at a lower degree.

Vaccination against *NDV* is widely used in the poultry industry. In the U.S.A. the most common methods of vaccination with live virus vaccines are spray, fogging, water, intra-ocular, intranasal, spray on feed or a combination of them. Live *NDV* vaccines used for these purpose have been isolates under the Lentogenic category; in particular virus strain most widely used have been B1, B1 and B1 La Sota and Clone 30 strains. Any of these methods of vaccination have been used on broilers, commercial layers, turkeys and their parent stocks.

In Minnesota and the Midwest NDV has been present for few decades. Apparently mass NDV vaccination in turkeys in Minnesota has been practiced since the early 1970's, up to the present time.

NDV inactivated vaccines has been in use since the 1970's. These vaccines have been manufactured using a Lentogenic or Mesogenic type of viruses. Other killed virus vaccines have been in use with other viruses or even in combination with bacterins. At the present time killed oil base emulsion vaccines have been manufacture with different oil base combinations; such as oil; water-in-oil and water-in-oil-in-water emulsion. The objective of these emulsions in combination with NDV and / or other antigens has been to provide a longer lasting and higher immune response.

Oil base killed vaccines are primarily provided by injection. Sites of injection have been subcutaneously (neck), intramuscularly (leg, breast or tail).

Turkey flocks can be, and in reality are, exposed to "field NDV challenges". These field challenges do not necessarily induce respiratory problems or secondary infections (primarily by E. coli). Flocks in the field can be exposed to NDV and as consequence respond immunologically to various levels of antibody titers (HI or ELISA tests) depending on the NDV exposure, degree of field challenge and/or complications due to that challenge.

There is an assumption that the constant use of live field NDV virus vaccines over the years has "seeded" the wild bird population, production farms and barns.

Day old or younger than ten days subcutaneous NDV killed oil emulsion vaccination has been in use for several years in Latin America, the Far East, and the Middle East to aid in the control and prevention of the disease. Day old killed NDV oil emulsion in the U.S.A. is a new concept. Although this is new, it appears to have a potential benefit in the turkey industry. Continual NDV field vaccination had induced a series of side effects, primarily respiratory problems. This procedure reduces the number of NDV field vaccinations and reduces respiratory problems.

Day old vaccination in poultry is not a new procedure. Day old subcutaneous vaccines have been used in chicken broilers and layer replacements (Marek's Disease) since the 1970's. NDV day old vaccination also has been in use for some time in chickens, pullet replacements and in turkey poults. Live NDV vaccines have been used in chickens and turkeys. In turkeys NDV recombinant live vaccines have been used during the 1990's. In the Midwest and in Minnesota in particular these day old vaccines have been in use. Field immune response to these vaccines has been variable in effectiveness.

Day old injected vaccination has been practice in poultry with the aid of single injectable machines. These machines handled by hatchery personnel vaccinate each bird individually. A new type (Nova-Tech, Inc.) of injector machine vaccinates subcutaneously 4 turkey poults at one time.

The Nova-Tech injector machine can vaccinate 4 chicks or poults at a time. This machine can inject different dosages (0.2; 0.3 or 0.5 ml./bird) with easy adjustments; also eliminates the potential of self-injection (finger). Another advantage of this procedure is the improved injection accuracy, correct injected bird counts, consistency on the site of injection, and the facility to visualize the site of injection.

Killed NDV oil base emulsion vaccines have been provided at different ages in chickens and turkeys. In Minnesota NDV was tested (day old) in 1988, but no mass vaccination was implemented at that time due to potential self-inflected injection by the hatchery personnel. In 1999 selected flocks were given oil killed Avian Pneumovirus and NDV vaccines at 4 weeks of age. The practice of this vaccination at 4 weeks of age increased stress on the birds, increased biosecurity problems (vaccination crews) on the presence of outside personnel, had low accuracy (about 60% of birds vaccinated), and increased the cost of vaccination.

Day old NDV live vaccination was used on some farms, followed by a live water-administered NDV field booster vaccination schedule. There are some killed NDV commercially available oil emulsion vaccines. Most of the turkey poults that received NDV at day old were vaccinated with a commercially available product.

A number of poults were vaccinated in a September 2000 trial, but mass vaccination was not initiated until February 2001. NDV day old vaccination has been provided to millions of turkey hens and toms since that date.

The following topics will be discussed: 1) A comparison between NDV killed day old vaccination with 0.1 and 0.2 ml./poults; 2) serologic profile post-NDV water field vaccination and response differences between HI and ELISA titers; 3) observations on the number of weeks that it takes the oil vaccine to be absorbed from the injection site; 4) possible side effects of NDV killed oil emulsion day old vaccination; and 5) benefits of NDV day old vaccination in turkeys.

REFERENCES

1. Calnek, B.W. Diseases of Poultry. Iowa State University Press, Ames, Iowa, USA. 10th Edition 2000.
2. Fukunoki, S., Iwakura, T., and others. Safety and efficiency of water-in-oil-in-water emulsion vaccines containing Newcastle disease virus

haemagglutinin-neuraminidase glycoprotein. Avian Pathology 30, 509-516, 2001.

3. Kumar, M.C. Turkey World May-June 1988.

4. Purchase, H.G., Arp, L.H., Domermuth, C.H. and Pearson, J.E. A Laboratory Manual for the Isolation and Identification of Avian Pathogens. American Association of Avian Pathologists. Third Edition 1989.

5. Samina, I., Khinich, Y., Gutter, B., Michael, A. & Peleg, B.A. Day-old vaccination with live-in-oil vaccines: Newcastle disease (ND) and infectious bursal disease (IBD) in chickens and ND in turkey poults. Avian Pathology 28, 73-78 1999.

6. Wesbury, Harvey. Newcastle disease virus: an evolving pathogen? Avian Pathology 30, 5-11. 2001.

THE ISOLATION AND CHARACTERIZATION OF AN AVIAN PNEUMOVIRUS ISOLATE FROM CANADA GEESE

R. S. Bennett, M. K. Njenga, K.V. Nagaraja and D. A. Halvorson

Department of Veterinary Pathobiology, College of Veterinary Medicine, University of Minnesota, 1971 Commonwealth Avenue, St. Paul, Minnesota 55108

INTRODUCTION

Avian pneumovirus (APV) infection in turkeys in the United States was first diagnosed in 1997 associated with a respiratory condition that first appeared in Colorado in 1996. It was subsequently diagnosed in Minnesota in 1997 (5). Avian Pneumovirus is a member of the metapneumovirus genus of the Pneumovirinae subfamily of the Paramyxoviridae family (2).

The epidemiology of APV infection is not well understood. The virus has been detected in some wild bird species (3), but their role as a vector of APV for turkeys has not been determined. Other paramyxoviruses have been isolated from waterfowl (1) leading us to consider the possibility that wild waterfowl could harbor APV. Experimental studies have shown that Peking ducks are susceptible to experimental infection with APV (4) and that the virus could be detected in sentinel Mallard ducks (*Anas platyrhynchos*) by reverse transcription polymerase chain reaction (RT-PCR) (3). The purpose of this study was to determine if an APV from Canada geese is pathogenic to turkeys.

MATERIALS AND METHODS

Sampling. The University of Minnesota College of Natural Resources and Minnesota Department of Natural Resources conducts an annual Canada goose roundup to remove nuisance geese from the Minneapolis/St. Paul metropolitan area during the period when the adult birds molt and before the juveniles (the current year's hatchlings) are fledged. The geese are captured and transferred to holding pens. Choanal cleft swab sampling is conducted as the geese are being loaded from the holding pens onto transport trucks.

Sample handling. All samples were pooled 10 per tube in minimal essential medium (MEM) containing 200 units/ml penicillin G sodium, 200 µg/ml streptomycin sulfate, 0.75µg/ml amphotericin B, and 150 µg/ml gentamicin. The tubes were placed on ice for transport to the laboratory. All samples were inoculated onto tissue culture immediately after arrival at the laboratory, but only samples that were APV positive by RT-PCR were continued for further passages.

Virus isolation. Choanal swab samples were inoculated onto chicken embryo fibroblasts (CEF) and QT-35 cells for one hour, removed, and replaced with MEM containing 1% fetal bovine serum, 100 units/ml penicillin G sodium, 100µg/ml streptomycin sulfate, 150 µg/ml gentamicin, 0.292 mg/ml L-glutamine, 0.1moles MEM non-essential amino acids. The third passages of CEF and QT-35 were analyzed for APV RNA by RT-PCR. The RT-PCR positive tissue cultures were continued until passage five, inoculated into Vero cells and monitored daily for cytopathic effect (CPE) consisting of patches of dead, sloughing cells and syncytia (multinucleated cells).

Design. Two groups of antibody-free male turkeys (14 and 15 birds) were reared in isolation. One group was inoculated with 200 µl of non-infectious tissue culture fluid via ocular route and the second group was inoculated with 200 µl of APV/Minnesota/goose/15A/01. Birds were observed daily for clinical signs; open mouth breathing, nasal discharge, watery or foamy eyes, and overall depression. Nasal turbinates, tracheas, and lungs, were collected periodically for RT-PCR and immunohistochemical staining specific for APV. At 14 days post inoculation serum was collected from all birds and submitted to the Veterinary Diagnostic

laboratory at the University of Minnesota, College of Veterinary Medicine for testing by ELISA specific for APV.

RESULTS

Virus isolation. Virus isolation was successful in five choanal swab pools collected from juvenile Canada geese from the fifth passage of CEF. The five isolates from CEF were inoculated onto Vero cells, only four viruses adapted to Vero cell culture. Two of the Vero cell adapted isolates from Canada geese show CPE, including syncytia, the other two isolates replicate in cell culture without CPE. The presence of APV in these four tissue cultures were confirmed by RT-PCR.

Clinical signs. The Canada geese the isolate was made from were not showing any clinical signs typical of an APV infection. For the turkeys infected with the Canada goose isolate, neither the control group or infected group showed any clinical signs during the 14 days of the experiment.

Gross examination and IHC. No gross examination was done on the Canada geese. No gross lesions were seen in either experimental group. The nasal turbinates of birds in the infected group were IHC positive for APV.

RT-PCR. Choanal swab samples from the control group were negative, but the choanal swabs from the infected group were positive.

Serology. At 14 DPI, all control birds were negative for APV antibodies, but the infected group was antibody positive.

DISCUSSION

The isolation of APV from wild Canada geese is evidence that this species may be a natural reservoir for APV. The geese sampled in this study were from a metropolitan area, far removed from domestic turkeys--the only other species from which APV has been isolated in the U.S.

The infected group did not show clinical signs but had detectable antibodies for APV. APV isolated from Canada geese appears to be infectious, but non-pathogenic to turkeys and may be useful as a vaccine for APV.

REFERENCES

1. Kelleher, D. J., D. A. Halvorson, J. A. Newman, and D. A. Senne. Isolation of avian paramyxoviruses from sentinel ducks and turkeys in Minnesota. *Avian Diseases*. 29:400-407. 1984.
2. Pringle, C.R. Virus Taxonomy. *Arch. Virol.* 144:421-429. 1999.
3. Shin, H., M. K. Njenga, B. McComb, D. A. Halvorson, and K. V. Nagaraja. Avian Pneumovirus (APV) RNA from wild and Sentinel Bird in the United States Has Genetic Homology with RNA from APV Isolates from Domestic Turkeys. *Journal of Clinical Microbiology* November. Vol. 38, 11:4282-4284. 2000.
4. Shin, J., M. K. Njenga, D. A. Halvorson, D. P. Shaw, and K. V. Nagaraja. Susceptibility of ducks to avian pneumovirus of turkey origin. *AJVR*. July. Vol. 62, 7: 991-994. 2001.
5. Senne, D. A., and R. K. Edson. Avian Pneumovirus Update. Proceedings of the Annual Convention of the American Veterinary Medical Association. Reno, Nevada, July 1997.

WILD BIRDS AND THEIR ROLE IN THE EPIDEMIOLOGY OF AVIAN PNEUMOVIRUS (APV) INFECTION IN DOMESTIC BIRDS

LAS AVES SILVESTRES Y SUS PAPEL EN LA EPIZOOTIOLOGÍA DE LA INFECCIÓN CON EL NEUMOVIRUS AVIAR (APV) EN AVES DOMÉSTICAS

B. T. Velayudhan*, H. J. Shin, V. C. Lopes, D. A. Halvorson, and K. V. Nagaraja.

Department of Veterinary Pathobiology, College of Veterinary Medicine,
University of Minnesota, St. Paul, Minnesota

RESUMEN

Varias especies de aves silvestres se sometieron a pruebas generales de escrutinio para detectar la presencia del genoma del APV. Se analizaron los homogeneizados de cornetes nasales mediante la reacción en cadena con polimerasa y transcriptasa inversa (RT-PCR) para la detección del ARN viral. El

ácido nucleico del virus se detectó en las muestras tomadas de gorriones, gansos, estorninos, golondrinas, patos mallard y gaviotas. La comparación de los nucleótidos y de las secuencias predichas de aminoácidos del gene M de los APV aislados de estas aves, reveló un alto nivel de identidad (más del 96%) con los aislamientos estadounidenses del APV de

pavos domésticos. Este hallazgo sugiere el posible papel de las aves silvestres en la transmisión de este virus a las aves domésticas.

INTRODUCTION

Avian pneumovirus causes an acute respiratory disease in turkeys. It is an enveloped, negative-sense, single-stranded RNA virus classified under the genus *Metapneumovirus* of the family *Paramyxoviridae* (7). APV was first reported from South Africa in 1978, and later it was diagnosed in the United Kingdom, France, Spain, Germany, Italy, Netherlands, Israel and other Asian countries (1). In United States, the disease first appeared in 1996 in Colorado and later in Minnesota in 1997. It is also reported from North and South Dakota (6). The US isolates of APV were reported to be different from the European isolates (8). The disease is characterized by coughing, nasal discharge, tracheal rales, foamy conjunctivitis, and sinusitis in young poults. The diagnostic tests include RT-PCR (14), *in situ* hybridization, immunohistochemistry (6), virus isolation and ELISA (2). The acute phase of APV infection lasts for about a week post-inoculation (4). The virus can survive a temperature of -70°C and -20°C for over 26 wk, 4°C for less than 12 wk, 20°C for less than 4 wk, 37°C for less than 48 hr and 50°C for less than 6 hr (16). A seasonal pattern was observed in the APV outbreaks in Minnesota with most of the outbreaks occurring in two periods, March through May and October through November (15). The role of wild birds in the transmission of APV is highly speculated. In order to pursue this speculation further, we initiated the screening of wild birds to see whether they harbor APV.

MATERIALS AND METHODS

Animals: Wild birds were collected from the Wild Life Rehabilitation center, Saint Paul, Minnesota. They were the birds brought to the center from all over the state. They included sparrows, geese, swallows, starlings, owls, crows, American gold finches, American robin, warblers, rock doves etc. The seagulls that found dead in the vicinity of a turkey farm were also included in the study. A total of 385 birds of different species were screened.

Samples: Nasal turbinate was collected from each bird. A 20% homogenate was prepared in minimum essential medium (GIBCO BRL) with penicillin 1000units/ml, streptomycin sulphate 1000 μg /ml, amphotericin B 25 μg /ml and gentamicin 150 μg /ml. The homogenate was then centrifuged at 3000 rpm for 10 min; the supernatant was collected and stored at -70°C for further use. This was used for the preparation of RNA.

RT-PCR: The RNA from the homogenate of nasal turbinates was extracted using a commercial viral RNA

extraction kit (Qiagen, Valencia, CA). RT-PCR was performed using the one step RT-PCR kit (Qiagen). The primers used in this assay for the detection of APV genome were those designed based on the matrix (M) gene of APV (Gene Bank). The forward primer used was 5'-ACAGTGTGTGAGTAAAAG-3' (M1), starting from base number 335 and the reverse primer was 5'-TGACTTCAGGACATATCTC-3' (M2), starting from base number 754 of the US isolate of APV. These primers would result in a PCR product of 438 bp. The RT-PCR was set with reverse transcription at 50°C for 30min, an initial denaturation at 94°C for 10min, followed by 35 cycles of annealing at 51°C for 1min, extension at 72°C for 2min and denaturation at 94°C for 1min and a final extension at 72°C for 10min. The products of RT-PCR amplification were run on a 1.2 % agarose gel stained with ethidium bromide and examined using Eagle Eye II (Stratagene) apparatus.

Controls: APV infected Vero cells were used as the positive control and APV uninfected Vero cells were used as the negative control in all the RT-PCR reactions.

Virus isolation: The samples which were positive for RT-PCR were thrown onto a 70 % confluent monolayer of human nasal septal sarcoma cells (RPMI-2650, ATCC). Five blind passages were made in this cell line followed by five blind passages in vero cells.

Sequence comparison: The samples which showed amplification with the above mentioned set of primers were subjected to the isolation of M gene. For this purpose forward primer (M3) starting from the base number 14 (5'-ATGGAGTCCTATCTAGTAG-3') and the reverse primer (M4) starting from base number 823 (5'-CTAAATAATATCAAGCTAGG-3') of the M gene of US isolate of APV were used. The conditions for RT-PCR were the same as mentioned above. The expected size of the amplification product was 825 bp. The M genes isolated from different wild birds were subcloned into pGEMT EASY vector and sequenced. Their predicted amino acid sequences were compared with the M gene of APV isolated from domestic turkeys (APV/Minnesota 2A).

RESULTS

RT-PCR: Of the 385 samples tested, 6 samples from sparrows, 2 from starlings, 2 from geese, 1 from swallows, 1 from mallard duck and 1 from seagull were positive for APV RNA. The RT-PCR amplified a DNA product of 438 bp, which was the expected size of the amplification product when the primers M1-M2 were used.

Virus isolation: The virus isolation attempts from samples positive for APV RNA are being continued.

Sequence comparison: The M gene of sparrow, geese, and seagull were sequenced. Their predicted amino acid sequences were compared with that of APV

M gene isolated from domestic turkeys. This sequence comparison showed a sequence identity of more than 96 % with the APV/Minnesota 2A isolates from domestic turkeys (Gene Bank accession numbers AF26673, AF26674, and AF26675).

DISCUSSION

In the present study nasal turbinate samples from various wild birds collected from the Wild Life Rehabilitation Center, St. Paul, Minnesota and also from the vicinity of turkey farms were screened for the presence of APV genome. For the amplification of the nucleic acid and for sequence analysis primers were designed based on the published M gene sequence of APV (Gene Bank). The M gene is reported to be conserved among the US isolates of APV (11, 12, 15). APV genome was detected in the samples collected from sparrows, starlings, geese, swallows, mallard duck, and seagull. There are various reports on the isolation of other paramyxoviruses from wild birds (4, 7, 13). The virus isolation from the samples is being continued. Virus isolation is thought to be cumbersome and rarely successful (1). In the detection of APV, RT-PCR is shown to be more sensitive and rapid compared to virus isolation (9). The nucleotide and predicted amino acid sequence comparison of the M gene isolated from wild birds revealed over 96 % identity with that of the APV isolates from domestic turkeys. This strongly suggests the role of wild birds in the transmission of APV among domestic birds. The seasonal trend in the disease pattern in Minnesota also favors this observation.

REFERENCES

1. Alexander, D.J. Newcastle disease and other *Paramyxoviridae* infections. In: Diseases of poultry, 10th ed. B.W. Barnes, H.J. Beard, C.W. McDougald, and L. Saif, Jr, eds. Iowa State University Press, Ames, IA. pp.541-569. 1997.
2. Chiang S, A. M. Dar, S. M. Goyal, M. A. Sheikh, J. C. Pedersen, B. Panigrahy, D. Senne, D. A. Halvorson, K. V. Nagaraja, and V. Kapur. A modified enzyme-linked immunosorbent assay for the detection of avian pneumovirus antibodies. *J Vet Diagn Invest* 12(4): 381-384. 2000.
3. Goyal, S. M., Shu-Ju Chiang, A. M. Dar, K. V. Nagaraja, D. P. Shaw, D. A. Halvorson and V. Kapur. Isolation of avian pneumovirus from an outbreak of respiratory illness in Minnesota turkeys. *J Vet Diagn Invest*. 12: 166-168. 2000.
4. Graham, D. A., A. German, D. Abernethy, S. J. McCullough, R. J. Manvell, and A. J. Alexander. Isolation of ortho- and paramyxoviruses from wild birds in Northern Ireland during the 1997 epizootic. *Vet Rec*. 145: 20-21. 1999.

5. Jirjis, F. F., S. L. Noll, D. A. Halvorson, K. V. Nagaraja, E. L. Townsend, A.M. Sheikh, and D.P. Shaw. Avian pneumovirus infection in Minnesota turkeys: Experimental Reproduction of the disease. *Avian Dis*. 44: 222-226. 2000.
6. Jirjis, F. F., S. L. Noll, K. V. Nagaraja, D. A. Halvorson, and D. P. Shaw. Immunohistochemical detection of avian pneumovirus infection in formalin fixed tissues. *J Vet Diagn Invest*. 13: 13-16. 2000.
7. Kelleher, C. J., D. A. Halvorson, J. A. Newman, and D. A. Senne. Isolation of avian paramyxoviruses from sentinel ducks and turkeys in Minnesota. *Avian Dis*. 29: 400-407. 1984.
8. Kleven, S.H. Report of the committee on transmissible diseases of poultry and other avian species. Proceedings of the 101st Annual Meeting of the U.S Animal Health Association, Richmond, VA. 1997.
9. Pederson, J. C., D. A. Senne, B. Panigrahy, and D. L. Reynolds. Detectiopn of avian pneumovirus in tissues and swab specimens from infected turkeys. *Avian Dis*. 45: 581-592. 2001.
10. Pringle, C.R. Virus taxonomy. A bulletin from the Xth International Congress of Virology in Jerusalem. *Arch. Virol*. 141:2251-2256. 2000.
11. Seal, B. S. Matrix protein gene nucleotide and predicted amino acid sequence demonstrate that the first US avian pneumovirus isolate is distinct from European strains. *Virus Res*. 58: 45-52. 1998.
12. Seal, B. S., H. S. Sellers, and R. J. Meinersman. Fusion protein predicted amino acid sequence of the first US avian pneumovirus isolate and lack of heterogeneity among other US isolates. *Virus Res*. 66: 139-147. 2000.
13. Shihmanter, E., Y. Weisman, R. Manvell, D. Alexander, and M. Lipkind. Mixed paramyxovirus infection of wild and domestic birds in Israel. *Vet Microbiol*. 58: 73-78. 1997.
14. Shin, H. J., G. Rajashekara, K. V. Nagaraja, F. F. Jirjis, D. P. Shaw, S. M. Goyal, D. A. Halvorson, and K. V. Nagaraja. Specific detection of avian pneumovirus (APV) US isolates by RT-PCR. *Arch Virol*. 145: 1239-1246. 2000.
15. Shin, H. J., M. K. Njenga, B. McComb, D. A. Halvorson, and K. V. Nagaraja. Avian pneumovirus (APV) RNA from wild birds and sentinel birds in the United States has genetic homology with RNA from APV isolates from domestic turkeys. *J Clin Microbiol*. 38(11): 4282-4284. 2000.
16. Townsend, E., D. A. Halvorson, K. V. Nagaraja, and D. P. Shaw. Susceptibility of an avian pneumovirus isolated from Minnesota turkeys to physical and chemical agents. *Avian Dis*. 44:336-342. 2000.

ACKNOWLEDGEMENTS

We acknowledge the support of Minnesota Turkey Research and Promotion Council and the co-

operation of the Wild Life Rehabilitation Center, St. Paul, Minnesota.

RECENT DEVELOPMENTS IN MYCOPLASMA DIAGNOSIS AND CONTROL

DESARROLLOS RECIENTES EN EL DIAGNÓSTICO DE *MYCOPLASMA* Y SU CONTROL

S. H. Kleven

University of Georgia, Department of Avian Medicine, Athens, Georgia 30602-4875

RESUMEN

A pesar de las mejoras en la tecnología para su diagnóstico y control, los micoplasmas que afectan a las aves continúan siendo un problema. Las grandes poblaciones avícolas concentradas en áreas pequeñas y la producción en sitios con edades múltiples hacen del control una tarea sumamente difícil. Los métodos mejorados de diagnóstico incluyen la prueba de *ELISA* y la reacción en cadena con polimerasa (*PCR*) para la detección rápida del ADN del germen, y contamos además con métodos mejorados para detectar la “huella digital” de las cepas. Tenemos vacunas vivas e inactivadas que se pueden usar en las situaciones apropiadas cuando no es posible el control de la infección mediante aislamiento y bioseguridad. Las cepas vivas presentan algunas variaciones en sus características pero todas ellas son valiosas si se usan correctamente.

Efforts in the United States to control *Mycoplasma gallisepticum* (MG) began in the 1960's, primarily as a response to high condemnations from airsacculitis after the initiation of USDA post mortem inspection of poultry. Somewhat later, *M. synoviae* (MS) and *M. meleagridis* (MM) were added to the program. Since then, significant progress has been made in controlling Mycoplasma infections in turkey and chicken breeding stocks. Voluntary MG control programs in the U. S. are administered under the National Poultry Improvement Plan; testing provisions and protocols are provided in their official publication (1). The majority of poultry production in the U. S. is mycoplasma-free; however, MG and MS infection are common in commercial egg production flocks. Unfortunately, in spite of increased efforts at control, outbreaks continue to occur.

There have been changes which have resulted in an evolving situation in MG control, both in the United States and world-wide. These include changes in the poultry industry itself, improved detection methods,

better understanding of the agent and its pathogenesis, and improved control methods.

CHANGES IN THE OF THE POULTRY INDUSTRY WHICH AFFECT MYCOPLASMA CONTROL

In most modern poultry producing areas of the world, the emphasis on the control of Mycoplasma infections has been centered around maintenance of Mycoplasma-free breeding stock and keeping parent and production flocks free of infection by utilizing single-age, all-in all-out farms with good biosecurity. In many parts of the world, this has been very successful, and the majority of broiler, turkey and egg production is free of infection. In contrast, areas with less-developed poultry industries tend to have high levels of contamination with MG and MS; this poses special problems for companies attempting to institute modern production methods.

With the rapid growth of poultry production world-wide, there has been concentration of large numbers of birds into small areas, leading to increased risk of exposure to pathogenic Mycoplasmas. In some areas, poultry production is so concentrated that from an epidemiological point of view, it is almost like a very large multi-age farm. Also, general improvements in disease control have sometimes resulted in decreased efforts in biosecurity, thus enhancing the possibilities for the spread of Mycoplasma infections.

There has been a tendency to drift away from all-in all-out production and to concentrate production on multi-age sites. This has been especially true for commercial egg production – the majority of egg production in the U.S. is now on multi-age sites, and this trend is developing around the world. Such multi-age production sites are mostly MS-positive, and many are also MG positive (21), even though grandparent and parent stocks are generally MG and MS-free.

In many locations, multi-age management of broiler breeders or broilers may occur. In turkey

production, multi-stage production farms, on which 2 or even 3 different ages are maintained, are becoming quite common.

Therefore, in spite of sometimes heroic efforts at biosecurity and improved understanding of the survival of Mycoplasmas outside the host, Mycoplasma outbreaks continue to occur.

IMPROVEMENTS IN DETECTION METHODS

The basis for control programs has centered around serological methods such as agglutination and hemagglutination-inhibition, with reactors often confirmed by isolation of the organism. More recently, commercial ELISA kits have become available (IDEXX Laboratories, Westbrook, Maine, USA; Kirkegaard and Perry Laboratories, Gaithersburg, Maryland, USA) and are becoming widely used. Such kits have excellent sensitivity and specificity, but non-specific reactions may still occur. Potential improvements in ELISA specificity may result from the utilization of highly purified antigens, or the use of a blocking ELISA utilizing a specific monoclonal antibody.

MG strains of low virulence typically produce a poor antibody response, and isolation from clinical specimens may be difficult (26). This may be especially true if the antigenic makeup of the MG strain involved is not a good match with the strains used to produce test antigens. Variability in strains and clinical responses have also been noted for MS. We have encountered situations where flocks have exhibited a low-level serological response with a low percentage of PCR reactions. Such flocks have been culture negative. It has been possible to transfer such reactivity by placing SPF chickens in contact with the principals. These observations suggest that there may be atypical strains which have been undetectable with traditional diagnostic methods.

Polymerase chain reaction represents a rapid and sensitive alternative to traditional culture methods, which require specialized media and reagents and are time consuming. At least one company (IDEXX Laboratories, Westbrook, Maine, USA) produces commercial PCR kits, which are being widely used. A PCR procedure developed by Dr. Lauerman at Auburn University (15) is also in wide use.

Such improvements in serological methods and rapid detection by PCR have done much to facilitate the rapid and accurate diagnosis of MG infection.

VARIABILITY AMONG AND WITHIN STRAINS OF *M. GALLISEPTICUM* AND *M. SYNOVIAE*

MG and MS strains are known to vary in pathogenicity and antigenicity (11, 13). Variability in pathogenicity among strains of MG has been recognized for some time (26). Significant antigenic

variability among MG strains also exists (13), which could affect the sensitivity of serological tests, depending on the strain infecting the flock and the strain used to prepare antigen. There are also significant differences in virulence among strains of MS. Recently, a strain of MS was encountered in turkeys which did not induce an antibody response even though birds were culture positive in the upper respiratory tract (14). Although this has not been well studied, this is also likely true for MM and *M. iowae* strains.

Restriction Length Polymorphism (RFLP) of whole-cell DNA has been shown to be useful for differentiating MG strains (13). However, the RFLP procedure is time-consuming and laborious, making identification of specific strains a tedious procedure. More recently, Random Amplified Polymorphic DNA (RAPD) has been developed for identifying specific strains (6, 7, 17). This procedure is very simple and rapid, and has provided a routine procedure for the rapid identification of MG strains. This has proven to be very useful for epidemiological studies and for identification of specific MG strains in field outbreaks. More recently, we have utilized a PCR for the PvpA (19), *mgc1* (*gapA*) (8, 10) and lipoprotein (22) genes, followed by RFLP or sequencing of the PCR product to identify specific MG strains. Using this method we have been able to more closely pinpoint the identity of field and vaccine strains.

Studies utilizing Western blots and monoclonal antibodies have shown a high degree of variability in expression of surface antigens among strains of MG; many of these proteins are variably expressed (2, 20). This has led to a large effort in characterizing the variable expression of surface antigens have shown that phase variation also occurs in vivo. Similar variability of surface antigen expression has now also been shown to occur among strains of MS. For example, clones of MS which are hemagglutinin negative are less virulent than clones which are hemagglutinin positive. The significance of such variability in the expression of surface antigens is not well understood; however, it seems logical that it would play a role in pathogenesis, serological responses, and evasion of the immune system of the host.

***M. GALLISEPTICUM* VACCINATION**

With the advent of multi-age commercial layer complexes, control by vaccination became desirable.

The first commercially available MG vaccines were oil-emulsion bacterins (9). Bacterins protect well against airsacculitis and egg production losses, but provide little protection against colonization by field strains of MG, thus providing little value in eradication programs. Major disadvantages of bacterins are the

need for 2 doses for optimal protection and the cost of administration.

Live MG vaccines include F strain (3), which has been available for some time through several manufacturers, strain 6/85 from Intervet America, Millsboro, Delaware (4, 5), and strain ts-11, developed and widely used in Australia and licensed in the U.S. by Select Laboratories, Gainesville, Georgia (24, 25).

F strain exhibits moderate virulence in chickens (it is virulent for turkeys), colonizes the upper respiratory tract efficiently, spreads relatively slowly from flock to flock, and offers protection against losses in egg production. It provides excellent protection against colonization by challenge strains, and displaces the wild-type field strains present in multi-age commercial egg operations. Unfortunately, F strain has been implicated in field infections in commercial turkeys (16).

Strains 6/85 and ts-11 offer significant advantages over F strain. They both offer protection against challenge, but are avirulent and have very limited potential to spread from bird to bird (18), thus presenting less risk to neighboring poultry flocks. F strain has better ability to displace challenge strains in pen trial studies than does 6/85 or ts-11 (12), but field experience in a commercial layer operation suggests that strain ts-11 may be able to displace F strain in multi-age commercial layers. After ts-11 vaccination was discontinued, the flock has remained MG-free (23). Similar data with the 6/85 strain is not available, but there are complexes which have used 6/85 which now are seronegative, suggesting that displacement of wild type strains is also possible with 6/85. If the wild-type strains are highly virulent, it may be necessary to vaccinate with F strain for 1 or more production cycles and then switch over to either 6/85 or ts-11.

One major concern about live MG vaccines is safety. There have been numerous instances of clinical respiratory disease caused by "escaped" F strain vaccine; this strain should probably not be used if there is potential danger of spread to turkeys, even though it is the most efficacious strain in chickens. The 6/85 strain has been shown to be very safe in chickens, and has never been detected in unvaccinated chicken flocks, to the knowledge of this author. However, there have been several instances of isolation of 6/85-like MG strains from turkeys showing clinical disease. In some cases there was a history of vaccination of nearby chickens or turkeys. The ts-11 strain has been detected on at least two occasions in unvaccinated chicken flocks. In both instances there is a history of possible use of contaminated vaccination equipment and in one of the instances, subsequent spread to neighboring broiler breeders. We also know that ts-11 can spread from vaccinated spike males to unvaccinated breeder females. These experiences suggest that even though

the newer vaccines are very safe, they do have the potential for spread, and their safety should be very carefully before a decision is made to vaccinate. An important rule for consideration in the use of these vaccines, is that high titered vaccine should be used and administered properly in order to give the vaccine strain little opportunity to spread from bird to bird. Table 1 summarizes the author's experience with the characteristics of the various vaccine strains.

MG vaccines have had less use in turkeys. The F strain is too pathogenic for consideration in turkeys, but 6/85 or ts-11 strains may have potential use under very limited circumstances. In one vaccination trial conducted by us, administration of 6/85 or ts-11 did not result in respiratory signs or lesions in turkeys. There was little or no measurable resistance against airsacculitis after heavy aerosol challenge, but there was some protection detected against lesions in the upper respiratory tract. The ts-11 strain appears to have limited ability to infect turkeys.

Field experiences utilizing live vaccines have been very favorable in commercial layers, and field experiences in multi-age broiler breeders has also been favorable. These experiences suggest that live vaccines may be viable tools for the eradication of MG infection on multi-age commercial poultry farms.

There has been relatively little work on MS vaccines. There has been one MS bacterin licensed in the U.S., but it apparently has had little field use. A temperature sensitive MS strain has been licensed for use in Australia, and is widely used there. It has been licensed in Mexico and some other countries, but is not available in the U.S.

REFERENCES

1. Anonymous, National Poultry Improvement Plan and Auxiliary Provision. Vol. APHIS 91-55-054. 2000, Washington, DC: USDA.
2. Boguslavsky, S., D. Menaker, I. Lysnyansky, T. Liu, S. Levisohn, R. Rosengarten, M. Garcia, and D. Yogev. Molecular characterization of the *Mycoplasma gallisepticum* pvpA gene which encodes a putative variable cytoadhesin protein. *Infect Immun.* 68:3956-3964. 2000.
3. Carpenter, T. E., E. T. Mallinson, K. F. Miller, R. F. Gentry, and L. D. Schwartz. Vaccination with F-strain *Mycoplasma gallisepticum* to reduce production losses in layer chickens. *Avian Diseases.* 25:404-409. 1981.
4. Evans, R. D., and Y. S. Hafez. Evaluation of a *Mycoplasma gallisepticum* strain exhibiting reduced virulence for prevention and control of poultry mycoplasmosis. *Avian Diseases.* 36:197-201. 1992.
5. Evans, R. D., Y. S. Hafez, and C. S. Schreurs. Demonstration of the genetic stability of a

- Mycoplasma gallisepticum* strain following in vivo passage. *Avian Diseases*. 36:554-560. 1992.
6. Fan, H. H., S. H. Kleven, and M. W. Jackwood. Application of polymerase chain reaction with arbitrary primers to strain identification of *Mycoplasma gallisepticum*. *Avian Dis.* 39:729-735. 1995.
 7. Geary, S. J., M. H. Forsyth, S. A. Saoud, G. Wang, D. E. Berg, and C. M. Berg. *Mycoplasma gallisepticum* strain differentiation by arbitrary primer PCR (RAPD) fingerprinting. *Molec. Cell. Probes*. 8:311-316. 1994.
 8. Goh, M. S., T. S. Gorton, M. H. Forsyth, K. E. Troy, and S. J. Geary. Molecular and biochemical analysis of a 105 kDa *Mycoplasma gallisepticum* cytoadhesin (GapA). *Microbiol.* 144:2971-2978. 1998.
 10. Hildebrand, D. G., D. E. Page, and J. R. Berg. *Mycoplasma gallisepticum* (MG) — laboratory and field studies evaluating the safety and efficacy of an inactivated MG bacterin. *Avian Dis.* 27:792-802. 1983.
 11. Keeler Jr., C. L., L. L. Hnatow, P. L. Whetzel, and J. E. Dohms. Cloning and characterization of a putative cytoadhesin gene (*mgc1*) from *Mycoplasma gallisepticum*. *Infect. Immun.* 64:1541-1547. 1996.
 12. Kleven, S. H., O. J. Fletcher, and R. B. Davis. Variation of pathogenicity of isolates of *Mycoplasma synoviae* with respect to development of airsacculitis and synovitis in broilers. *Am J Vet Res.* 163:1196-1196. 1973.
 13. Kleven, S. H., M. I. Khan, and R. Yamamoto. Fingerprinting of *Mycoplasma gallisepticum* strains isolated from multiple-age layers vaccinated with live F strain. *Avian Diseases*. 34:984-990. 1990.
 14. Kleven, S. H., C. J. Morrow, and K. G. Whithear. Comparison of *Mycoplasma gallisepticum* strains by hemagglutination-inhibition and restriction endonuclease analysis. *Avian Dis.* 32:731-741. 1988.
 15. Kleven, S. H., G. N. Rowland, and M. C. Kumar. Poor serological response to upper respiratory infection with *Mycoplasma synoviae* in turkeys. *Avian Dis.* In press. 2001.
 16. Lauerman, L. H. *Mycoplasma* PCR Assays. In: *Nucleic Amplification Assays for Diagnosis of Animal Diseases*, ed. L. H. Lauerman, eds. American Association of Veterinary Laboratory Diagnosticians, Auburn, AL. pp. 41-52. 1998.
 17. Ley, D. H., A. P. Avakian, and J. E. Berkhoff. Clinical *Mycoplasma gallisepticum* infection in multiplier breeder and meat turkeys caused by F Strain: Identification by sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis, restriction endonuclease analysis, and the polymerase chain reaction. *Avian Dis.* 37:854-862. 1993.
 18. Ley, D. H., J. E. Berkhoff, and S. Levisohn. Molecular epidemiological investigations of *Mycoplasma gallisepticum* conjunctivitis in songbirds by random amplified polymorphic DNA analysis. *Emerging Inf. Dis.* 3:375-380. 1997.
 19. Ley, D. H., J. M. McLaren, A. M. Miles, H. J. Barnes, S. H. Miller, and G. Franz. Transmissibility of live *Mycoplasma gallisepticum* vaccine strains ts-11 and 6/85 from vaccinated layer pullets to sentinel poultry. *Avian Dis.* 41:187-194. 1997.
 20. Liu, T., M. Garcia, S. Levisohn, D. Yogev, and S. H. Kleven. Molecular Variability of the Adhesin-Encoding Gene *vpvA* among *Mycoplasma gallisepticum* Strains and Its Application in Diagnosis. *J Clin Microbiol.* 39:1882-1888. 2001.
 21. Markham, P. F., M. D. Glew, J. E. Sykes, T. R. Bowden, T. D. Pollocks, G. F. Browning, K. G. Whithear, and I. D. Walker. The organisation of the multigene family which encodes the major cell-surface protein, pMGA, of *Mycoplasma gallisepticum*. *FEMS Microbiol. Lett.* 352:347-352. 1994.
 22. Mohammed, H. O., T. E. Carpenter, and R. Yamamoto. Evaluation of factors associated with infection of commercial layers with *Mycoplasma gallisepticum* and *Mycoplasma synoviae*. *Avian Dis.* 31:470-476. 1987.
 23. Nascimento, E. R., R. Yamamoto, K. R. Herrick, and R. C. Tait. Polymerase chain reaction for detection of *Mycoplasma gallisepticum*. *Avian Dis.* 35:62-69. 1991.
 24. Turner, K. S., and S. H. Kleven. Eradication of live F strain *Mycoplasma gallisepticum* vaccine using live ts-11 on a multiage commercial layer farm. *Avian Dis.* 42:404-407. 1998.
 25. Whithear, K. G., Soeripto, K. E. Harrigan, and E. Ghiocas. Immunogenicity of a temperature sensitive mutant *Mycoplasma gallisepticum* vaccine. *Aust Vet J.* 67:168-174. 1990.
 26. Whithear, K. G., Soeripto, K. E. Harrigan, and E. Ghiocas. Safety of temperature sensitive mutant *Mycoplasma gallisepticum* vaccine. *Aust Vet J.* 67:159-165. 1990.
 27. Yoder Jr., H. W. A historical account of the diagnosis and characterization of strains of *Mycoplasma gallisepticum* of low virulence. *Avian Dis.* 30:510-518. 1986.

Table 1. Comparison of live MG vaccine strains.

	F Strain	6/85	Ts-11
Form	Lyophilized	Lyophilized	Frozen
Route	Various	Spray	Eye Drop
Virulence	Moderate	None	None
Persistence	Excellent	???	Good
Antibody	Moderate	None	Weak
Transmission	Moderate	Poor	Poor
Displacement	Excellent	???	Good

ANIMAL WELFARE AND RELATED ISSUES

EL BIENESTAR DE LOS ANIMALES Y ASPECTOS RELACIONADOS

Richard Reynnells

National Program Leader, Animal Production Systems, US Department of Agriculture, Cooperative State Research, Education and Extension Service, 800 9th Street, SW, Room 3130 Waterfront Centre, Washington, DC 20250-2220
Telephone number: 202.401.5352; Fax number: 202.401.6156, email: rreynnells@reeusda.gov

RESUMEN

Las discusiones sobre el bienestar de los animales suelen girar alrededor de las condiciones de los mismos, pero el bienestar es más complejo que determinar su presencia o ausencia con base en diversos criterios. Las determinaciones del bienestar impactan nuestra opinión sobre los sistemas de manejo. Nuestro deseo de contar con alimentos económicos afecta la capacidad de los granjeros de competir y su necesidad de incrementar la eficiencia y los volúmenes de producción. Las filosofías de los derechos de los animales pueden estar basadas, cuando menos en parte, en doctrinas religiosas y son diferentes de los objetivos del bienestar. Los ciudadanos están convencidos de la necesidad de los derechos de los animales mediante argumentos de su bienestar. Los lineamientos del manejo y los programas de certificación obedecen a las preocupaciones de la sociedad respecto al bienestar animal. El terrorismo agropecuario es un problema de dicho bienestar.

BACKGROUND

Animal welfare is a complex set of issues, whose presence or absence is based on current scientific opinion, special interest ideology, and societal perceptions. These issues involve many factors that are often not considered as impacting animal welfare and society's interpretation of ethical behavior toward animals. By segregating these components, and making a less than holistic appraisal of the situation, manipulation of welfare issues to benefit select entities is possible. Rather than add more to the stockpile of opinions related to management's influence on animal well-being, this paper will focus on some of these collateral interactions.

There is considerable misunderstanding regarding the connection between having plentiful, inexpensive, high quality, and convenient food available to all Americans and for export, and the farming system that provides this bounty. A similar lack of appreciation by citizens exists regarding their role in how individual purchases affect the structure of rural society and animal production practices. Over time, these practices materialized into highly efficient intensive confinement farming systems, which are perceived to influence animal welfare. Some say the overall effect is an improvement, or at least no harm, and some say it is the devil incarnate. Most consumers have no idea how animals are raised and do not care. However, times are changing and activists are convincing youth and citizens that radical changes are necessary, in addition to those demanded by the marketplace. These converts may become public decision makers, legislators, and probably voters. By agriculturalists piously recognizing their economic and nutrient contributions to our society and global markets as a basic truism, and by urbanites and politicians unthinking acceptance of this reality, this disconnect between food production and animal well-being becomes a non-issue and is not effectively addressed. Except by activists attempting to change society. We apparently can not appreciate how simultaneously robust and fragile the agricultural system in America is today, so do not adequately address potential causes of our (de)evolution, or visualize the long term consequences. It would be beneficial if all concerned parties took a closer look at the broad array of issues related to food production and marketing, and long term food security issues. Animal welfare and well-being is an important component of

these discussions, as is the supporting Land Grant University system, as discussed by Smith (8).

Even though animal welfare issues are not confined to farm animals, many are. Therefore, it is important to remember that farmers are the original animal welfarists, environmentalists, and food safety advocates. Most retain that role today, even though the mantle of truth is given to activists, many of whom may have never met financial and other obligations similar to those of farmers. Society requires advocates for agriculture to remind its members of reality. To be an effective advocate, one must be able to honestly and objectively evaluate current situations against an ideal, and be willing to express concern if we do not meet those high standards of achievement. Advocacy should be a mentoring role, supportive of our agricultural system's capacity to improve the environment, safety and security of products, and enhance animal welfare. Our agricultural future requires mutual respect of competing entities and a search for truth, versus pandering to special or personal interests and agendas. Because the former does not appear to be our current reality, does not mean we can not move in that direction.

Cheap food policy, as demanded by consumers, enhanced by grocers, and reenforced by politicians for decades has created efficiencies of production and processing that result in food safety and security levels unheard of in history. These efficiencies have brought with them many hidden costs to society. Through their economic decisions to obtain cheap food at any cost (*e.g.*, purchases of "the best buy") consumers fostered a situation that helped "create the monster" of highly concentrated intensive confinement animal production. Some consider intensive confinement animal production to negatively impact animal welfare and our social fabric. Also, the infrastructure of rural communities, agriculture, and supporting Land Grant Universities has changed. Now many do not want to live with that decision because of religious, health, social, or other reasons. They do not understand that once an infrastructure is compromised, compensatory action is not an easy or automatic event.

RIGHTS VERSUS WELFARE AND WELL-BEING

Animal welfare and well-being can not be effectively discussed in the absence of rights. The concept of animal rights (legal standing equivalent to humans; a "right" to not be abused) continues to be confused with animal well-being (a holistic approach to defining welfare) or welfare (more geared to health and production relationships). In all cases of animal rights *versus* welfare/well-being, semantics should be emphasized, but in other cases (welfare *versus* well-being) probably at a practical level, merely add to the

mystique or perception of intellectual enlightenment of speakers/writers by the general public. The question of rights and the philosophical and religious basis for this concept must not be confused with well-being. Some extreme rights activists have openly stated animals are better off dead or to not exist than to be exploited (used as food, fur, research models, or as a pet---now modified to "companion animal"). Other rights activists willingly accept the realities of animal use. The extremist opinion is followed through on by activists who release mink, rabbits or other animals that have no knowledge of life outside the farm environment, and therefore have little ability to fend for themselves, or avoid hazards such as traffic. And die. To many, these actions are despicable due to the absence of respect for law abiding citizens, the capacity of activists to "play God" by deciding who can or can not raise animals in what manner. And to release animals that then are likely to die. Years of research based on hundreds or thousands of animals is often destroyed. Also, by intimidating farmers, researchers and others through threats to their family, their property, or themselves, extreme rights activists force their views on others. Careers or livelihoods are destroyed by activists. Quality of life or life-saving discoveries that impact humans and animals are lost. This may be intellectual specieism at its finest.

Animal welfare, well-being and rights is a complicated set of interdependent issues. Philosophies regarding animal rights and animal well-being represent a continuum of potential beliefs. And because we are human, there may be inconsistencies. Possibly the most troublesome aspect of understanding this situation are persons who use real, fictitious, or exaggerated problems to manipulate the genuine concern and goodwill of the public to achieve their ultimate goals of animal rights. Conversely, the animal industries often sell products from intensively raised animals as if they were from extensive (old-fashioned) facilities, or may not define how the animals are managed. Cartoons, sit-coms, comics, and other media present animal rights concepts to indoctrinate the child and influence the adult. These almost subliminal or perhaps grossly overt manipulations of events to modify society according to the hidden agendas and incremental goals of animal rights activists, and possibly even some welfare activists, also suggests intellectual specieism or perhaps cultural imperialism.

It is important, especially for industry members and university faculty to be conversant with a range of animal use philosophies, and to be able to recognize inconsistencies between public statements, actions and goals of organizations. In this way they can take any necessary corrective action and inform society and government decision makers of the basis for, and alternative interpretations of, the realities proposed by

rights activist's or some animal welfarist's. Many future leaders (young people in society) and legislators hear the messages of moderation created and delivered by professional and articulate activists and take heed. The base comments of the radical groups are nothing new to many in agriculture. However, listening to what activists say may provide the direction in which these organizations are going. Moderation in talk. Incrementalism in action. Is the true goal elimination of animal use, or merely enhanced treatment of animals in production and processing? Moderates "only concerned about the well being of animals" get laws passed. It is important to note that not all animal welfare or similar groups are the enemy of agriculture, and may only disagree with using intensive production systems. Therefore, many of these groups respect the right of farmers and citizens to use animals for food and other functions. Do animal rights activists respect human rights? Or are human's rights to use (not abuse) animals a transitory condition determined by the group with the best lawyers and ability to change laws and regulations?

There are many participants in the animal rights, welfare, and well-being controversy, not just activists who clamor for change. Major animal welfare issues each tend to have a related activist group in a leadership position---many of which are not supportive of animal rights doctrine. Albert Schweitzer is often quoted regarding respect for animals (7). The Animal Welfare Institute sponsors an annual award in honor of Albert Schweitzer, which recognizes exceptional work in the area of animal welfare. Most farmers have respect for their animals, even though these animals are raised for food or fur and are eventually killed to benefit humans. Most scientists have respect for the animals they use for research and teaching. Native American religious teachings, taught respect for animals and nature even though the result of their activities was consumptive. For example, Chief Seattle has been quoted as saying: "What is man without beasts? If all the beasts were gone, men would die from great loneliness of spirit. For whatever happens to the beasts...soon happens to man. All things are connected." Posewitz expressed the opinions of today's hunters (and those who fish) who show respect for animals and nature by following bag limits, taking shots having a high probability of a clean kill, and track and find a wounded animal (5). Anti-poaching programs exist in wildlife organizations---but would animal welfare/protection groups join with a wildlife/conservation organization to more effectively address poaching issues? Which is more important, perception and membership numbers (*i.e.*, profit) or solving problems and helping animals? Is this positional bargaining to promote egocentric or organizational goals, or the abandonment of a well-

being opportunity? Respect and the illusion of respect comes in many forms.

Even if there is scientific evidence (dependent on what is measured) that shows an intensive practice is acceptable relative to the result of a stressor, society may not accept it on anthropomorphic or emotional grounds. Can industry withstand the crucible of common decency in dealings with animals? Some activists equate poor management, insensitivity, and cruelty to biblical "dominion" issues and use this as one ploy to accuse the animal industries of cruelty. Notwithstanding sacrificial commands, nowhere is animal abuse condoned or promoted in the Bible (2). Good animal husbandry is the biblical command related to mankind having dominion over animals. Dominion is a stewardship situation, and relates to being a manager of resources, not an owner, and having responsibility to preserve these resources for the next generation.

Confusion is intentionally created to downplay the actual goals of animal rights activists. Concern for an animal's welfare, not their rights, is the public manta of many rights activists. The mandatory conversion of society to their religious or philosophical views may be via legislation very possibly created because of, or under the guise of, concern for animal well-being/welfare. There is also crossover of terminology, such as an animal's "right" to not be tortured or abused. This misnomer is pervasive in industry, academia and society. It is a bridge of respectability between rights and welfare that blends all philosophies into a product having broad acceptance, and is a huge problem. Society forgets that good farmers respect nature and the needs of their animals, and provide as optimal an environment as is economically feasible. This capacity is influenced by societal and individual decisions at the marketplace, and by most farmer's desire to provide this high level of care.

Some animal rights groups may even be considered a secular religion, and have been claimed to be so by one major activist group. As a secular religion, one must ask the basis for these religious teachings. The same question must be asked if the rights or even welfare group's doctrine uses a philosophical approach. If such a movement is based on a religion is it not camouflage for conversion to that religion? Can animal rights dogma be promoted to society as originally conceived and eventually intended by the activist groups (*e.g.*, legal standing and rights equivalent to humans, where any use of animals is exploitation), or must it be sold on welfare or a watered down version of "rights"? Should your family's conversion to another religion or guiding philosophy be a personal decision, or the equivalent mandated via animal rights based legislation?

CERTIFICATION AND SPECIALTY PRODUCTION

How much of the activist's clamoring for certification is a facade for ultimate goals and how much is reality? Does the public understand the issues over which activists protest? Is public concern genuine, and supported by their market dollars, or a mirage supported by regulations or market protection certification programs? If the latter situation, widespread public support for change does not exist and should not be presented as if it does to legislators and agency decision makers. Alternatively, many people believe support for specialty markets based on extensive production principles has been a non-issue for Land Grant Universities and government agencies, which has inhibited their ability to compete. Are certification programs warranted to satisfy a niche market, or are they a politically expedient and self-protecting gimmick or convenience by food marketing organizations?

As stimulated by the late Henry Spira and other activists, there are now demands by chain restaurants and others for animal products to be produced using prescriptive production practices (certification/guidelines), but no apparent intention to consistently and adequately compensate the farmer for extra expenses. This will further remove the smaller farmer from the capacity to market their products in this outlet. Single or minimal source purchases by chain food outlets and others also reduce or eliminate the capacity for small farmers to supply these markets. Companies will need to become increasingly efficient, within the confines of the certification contract, which may be detrimental to societal concerns of some activists and other citizens. Specialty programs may provide marketing incentives to producers through voluntary standards. Also to be considered (as seen in England), a significant amount of the niche market price differential may go to distributors and grocery chains rather than the farmer who makes the investment of land and labor and takes most of the risks. This situation is related to a historical concern of some activists and others regarding intensive/contract production that the farmer will become a serf on his/her own property (4). Certification programs provide specialized products which answer the concerns of a portion of society, but will result in significant conversion and other costs to farmers. Should not these costs be passed along to consumers rather than absorbed using the farmer's equity?

The Animal Welfare Institute has a certification program provided to swine producers at no charge, while others such as the American Humane Association provide certification for a fee. Chain restaurants now are involved in mandating production and slaughter criteria, as well as on-farm ammonia

levels. Certification programs and guidelines are also provided through commodity, allied industry and professional organizations. We have gone from essentially no certification programs for animal well-being and environmental concerns to the potential for layered programs that promote environmental protection, food safety, animal well-being or address multiple concerns. It would be beneficial to have an evaluation of animal well-being, and the cost:benefit situation for farmers before and after these conversions.

Development of niche markets has been a long struggle, with limited acceptance due to many factors. Those who claim small flock extensive production is superior regarding animal welfare must minimize inhibitory factors in the marketing system to see greater use of this system. Niche market extensive confinement producers may have increased costs or marketing potential *versus* intensive confinement enterprises having a corporate structure. Society should recall that for small or large farmers, activist organizations, professional organizations or individuals the profit motive is exactly the same. It must exist. Few of us can work for free. Low volume farmers require higher profit margins to survive. Another inhibiting situation is that as the market demand increases for specialty markets, larger firms will enter the market and create the same competitive situation (low prices, high volume) that eliminated small farmers in the first place. Consumers need to decide if animal well-being is a primary concern or a combination of well-being and rural structure issues. Society must also support enterprises that perpetuate the genetic diversity of our base stock of farm animals, many of which are rare or threatened with extinction (1). This situation also relates to the question of intensive versus extensive production, genetics related well-being issues, and capacity to transfer specific traits to current stock to address welfare issues.

What is animal agriculture doing to convince society that animal production practices, for which scientific evidence may indicate are not as severe as they seem, are necessary and properly conducted? Regardless of the source of public relations/educational packages and supporting scientific evidence, does society see some of these practices as morally wrong? If so, what will the industry do to address these issues? Decades of economic considerations and societal expectations have created the food production and technical assistance system of today (6, 8). The production and supply system can not readily be converted to meet the whims or concerns of any entity, except by force, particularly if all economic factors are not considered. Market demands may effectively drive production changes if so allowed.

Major animal welfare issues related to marketing include “downer” animals and slaughter practices. Activists such as Eisnitz (3) bring in labor union and human well-being issues in addition to claiming skinning and dismemberment of conscious livestock. The latter is repeated in the press and other books, and while an instance was formally documented, it appeared to have been a labor *versus* management problem. If true, there is zero excuse, with all parties culpable. In other cases, reflex activity may be honestly confused with viability. Better training, attention to detail and respect for animals as sentient beings seems appropriate.

AGRO-TERRORISM/EMERGING DISEASE CHALLENGE

I have worked in this area since about 1995, when asked by a government agency to evaluate a shipment of feedstuffs/equipment to a Middle Eastern country, assisted by Bob Norton (Auburn University; 334.844.2604) and others. After the September 11 attack, USDA no longer uses the term bio-terrorism, which was replaced by agro-terrorism, biological threat, or some other term which elicits less emotional responses and fear. There will be one high level USDA spokesperson in this area. I agree with this policy due to the highly emotional nature and capacity for creating rumors based on comments by “a government official” that detract from teamwork and getting the job done. I can report in my distribution lists, etc. what others are doing, but can not and will not have a public opinion in this area.

Norton, *et al.*, have been working for several years to have government and industry take a comprehensive approach to protecting crop and animal agriculture. They suggest government agencies, universities and industries develop a comprehensive prevention, and effective early detection and treatment system. This systematic approach would include effective bio-security measures to minimize potential disease spread and help address related diminished food security capabilities. They suggest: collaboration between Cooperative Extension System and local agricultural organizations, secure communications to/from state and federal personnel, and training for farmers and other local communication channels (*e.g.*, Farm Bureau, local veterinarians, consultants). Complete disease prevention is impossible, but stopping the spread of a food security challenge is possible, as is minimizing the effect of agro-terrorism, and thus the preferred course of action. Some in industry believe placing breeder stock in distant and protected areas is the preferred approach. This is good, but one can only hide so many breeding stock, and the risk still exists they can be contaminated and die, or

have to be destroyed. This threat is obviously a huge animal welfare issue.

It is interesting that animal rights activists that act as a conduit for publicity for the Animal Liberation Front have been relatively quiet since September 11. Note that the ALF has been determined by the US Federal Bureau of Investigation to have committed acts of terrorism. Also, bin Laden said in a statement when he denied involvement in the September 11 attack, said that he “did not do it but could certainly understand why someone would”. Sound familiar?

RESOURCES TO ADDRESS ANIMAL WELFARE ISSUES

A. USDA/CSREES/PAS will develop a national symposium on Animal Well-Being: Swine Housing and Management, and related training material for use with producers and in train-the-trainer programs. This symposium uses a portion of funds earmarked for USDA that are to be used to address animal well-being issues.

B. The electronic newsletter, *Farmed AnimalWatch* contains summaries of current articles primarily related to animal well-being and environmental issues from industry and activist publications, and numerous other sources. To subscribe or for more information, send a message to Info@FarmedAnimal.net.

C. Americans for Medical Progress produces an electronic newsletter, *AMP News Service*, for the research community. Summarized are animal welfare issues and activist actions. Contact AMP at amp@amprogress.org, or access <http://www.amprogress.org>.

D. The *Animal's Agenda* newspaper is an exceptional activist publication that provides detailed descriptions of national and international animal well-being campaigns and news items. Subscribe by contacting: Merritt Clifton, PO Box 960, Clinton, WA 98236-0960; anmlpepl@whidbey.com; www.animalpeoplenews.org.

E. The *Animal Welfare Issues Compendium* was edited by R. Reynnells and B. Eastwood, CSREES, and published through the USDA National Agriculture Library, Animal Welfare Information Center, and is available on their Internet site (<http://www.nal.usda.gov/awic>). The document contains 14 fact sheets which contain extensive references.

F. *Future Trends in Animal Agriculture* workshop is being revived. This annual workshop allows all sides to openly discussed animal well-being and rights issues. This is an attempt to reestablish dialogue and create opportunities to identify areas of mutual concern that translate into progress in animal well-being.

G. USDA/ARS and CSREES held a Stakeholders Meeting based on the Food Animal Integrated Research 2002 recommendations, to ascertain if USDA was meeting these goals. Progress toward meeting Goal 6, "Promote Animal Well-Being", was evaluated and recommendations made to how better meet this goal. Summary recommendations include: A. Measures to Assess Well-Being (multi-disciplinary team to develop an index of animal well-being; scientific basis for measuring pain, stress and distress and a baseline of care; develop and evaluate various production systems); B. Determine Impact of Systems (expand funding to address shortage of trained personnel, and research partnerships); C. Ethics (communication; database on animal welfare-ethics including international studies; social and psychological basis for animal well-being; animal welfare component in research; assess consumer attitudes and expectations; CSREES leadership).

H. Western Region Coordinating Committee 204, Animal Bioethics, is a multi-state research committee. Purposes include: bring researchers from all commodity areas and philosophers together to discuss points of contention, and to define common ground; promote a greater understanding by everyone of current well-being, rights issues and the basis for standard practices and concerns. Industry communication and understanding is encouraged.

WHAT TO DO?

A few items to consider include:

- Demand accountability. From activists. From industry. From everyone in the food production, processing and distribution system. From yourself.
- Recognize where activists are correct. Make changes in your professional and commodity area as appropriate. Activists must reciprocate. Understanding and honest communications can create mutual respect.
- Educate consumers, youth, and government decision makers using objective, science-based information and reduce the emotional and politicized arguments to win battles.
- Buy from farmers raising food animals under organic or extensive systems if you support these concepts.
- Refrain from displays of concern over how terrible it is that small businesses and farmers just can not survive...unless there is some personal follow through.
- Explain to your children where the cartoons, sitcoms, etc. are a facade for religious or philosophical proselytization, and how they (may) differ from your belief system.

- Support anti-terrorist legislation. Many good researchers have quit, changed areas of emphasis or lost years of research destroyed by terrorist activities such as arson. The situation is similar for some farmers.
- Professional organizations and industries must cooperate. Do not allow egos or rights groups to divide and conquer agriculture. Even small farms will be eliminated by rights groups, but promoted by welfare groups.
- Recognize welfare activist's differences with industry may be merely disagreement about how to raise animals.
- D.V.M.'s, Ph.D.'s and others should be considered equals in the animal well-being, public health, and environmental issues fields. We must work as a team to address these often intertwined issues. Prevention or amelioration of the effect of agro-terrorism is an example of the need for this type collaboration.
- County agents, local D.V.M.'s and farm organizations through to Federal and state agency personnel must create a seamless system to effectively and rapidly address bio-security challenges.

REFERENCES

1. American Livestock Breeds Conservancy, Box 477, Pittsboro, NC 27312.
2. Bible, King James Version. Example well-being/dominion references: Matthew 10:29-31; Luke 13:15; 14:5; 15:4 - 7; I Corinthians 7:31; 9:9; I Timothy 5:18; Deuteronomy 22:6; Genesis 1:26 - 30, and 2:15; Hebrews 2:6 - 8; Psalms 8:6 - 8.
3. Eisnitz, G. A. Slaughterhouse; The Shocking Story of Greed, Neglect, and Inhumane Treatment Inside the U.S. Meat Industry. Prometheus Books, Amherst, New York. 1997.
4. Halweil, B. Where Have All the Farmers Gone? In: World Watch, September/October Issue, pp. 12-28. 2000.
5. Posewitz, J. Beyond Fair Chase; The Ethic and Tradition of Hunting. Falcon Press Publishing Co. Inc., Helena and Billings, MT. 1994.
6. Schlosser, E. Fast Food Nation: The Dark Side of the American Meal. Houghton Mifflin Co. 2001.
7. Schweitzer, A. Reverence for Life. Sermons of Albert Schweitzer. Translated by Reginald Fuller. New York: Harper and Row. 1969.
8. Smith, P. Killing the Spirit: Higher Education in America. Published by Penguin Group, 375 Hudson Street, New York, New York 10014. 1990.

IN OVO ADMINISTRATION OF MAREK'S DISEASE VACCINE: IMPORTANCE OF VACCINE DEPOSITION SITE IN THE FERTILE EGG

ADMINISTRACIÓN *IN OVO* DE LA VACUNA CONTRA LA ENFERMEDAD DE MAREK: IMPORTANCIA DEL SITIO DONDE QUEDA DEPOSITADA LAVACUNA EN EL HUEVO FÉRTIL

Alan P. Avakian^A, Patricia S. Wakenell^B, Thomas Bryan^A, Jon L. Schaeffer^A, Christopher J. Williams^A
and Craig Whitfill^A

^AEmbrex, Inc., P.O. Box 13989, RTP, NC, 27709

^BDepartment of Population Health and Reproduction, University of California-Davis, Davis, CA, 95616

RESUMEN

Se encontró que el sitio de depósito de la vacuna contra la enfermedad de Marek *in ovo* afecta la eficacia de la misma, pues cuando quedó en la cámara de aire o en el líquido alantoideo generó una protección deficiente, mientras que su depósito en el líquido amniótico o en el cuerpo del embrión proporcionó una excelente protección. Se observó que a los 18 días de incubación, la máquina comercial de inyección *in ovo* (sistema Inovoject[®]) deposita un colorante ya sea en el líquido amniótico o en el cuerpo del embrión entre el 98.4 y el 100.0% de las inyecciones. Estos datos indican que la máquina de inyección *in ovo* usada en estos estudios realizó un trabajo excelente pues proporcionó una vacunación efectiva contra la enfermedad de Marek, en los sitios correctos, a los 18 días de incubación.

In the last decade the most obvious change in hatchery operations around the world has been the initiation of *in ovo* (in the egg) vaccination. The initial research that led to this change was conducted in the early 1980's (5,6). These studies and more recent ones have shown that administration of MD vaccines HVT (5,6), SB1 (6) and CVI988 (8) to the late-stage chicken embryo is safe and induces earlier immunity than post-hatch MD vaccine administration. The concept of *in ovo* MD vaccination was moved from the laboratory to the field by the development of an automated *in ovo* injection machine (4). Commercial *in ovo* vaccination began in the United States in late 1992 and today is occurring in hatcheries in more than 30 countries.

Efficacy of MD vaccine may depend upon the *in ovo* site in which the vaccine is delivered. The normal fertile egg on day 18 of incubation has five sites that are large enough to be accessed by the needle of the commonly used *in ovo* injection machine and manual *in ovo* injection using a syringe and needle. These compartments are the air cell, allantois, amniotic fluid

surrounding the embryo, the embryo body and the yolk sac. The effect of delivering MD vaccine to different sites *in ovo* and the frequency of injections into these different sites by the *in ovo* injection machine will be presented.

MATERIALS AND METHODS

Influence of *in ovo* site of injection on MD vaccine efficacy: Studies 1 and 2 were done with SPF eggs (Hy Vac Inc) and study 3 with broiler eggs (Cobb/Cobb). Eighteen-day-old embryonating eggs were candled and inoculated as described (7). Briefly, an entrance hole was punched with an 18-gauge needle. A 1 ml syringe with a 20 gauge needle was used to inoculate eggs with 0.1 ml MD vaccine HVT/SB1 (Merial Select). The technique for exclusive and reliable manual delivery to each embryonic compartment (air cell, allantoic fluid, amniotic fluid, body of embryo) was developed using dye inoculations. During technique development, injection onto the air cell membrane was confirmed by finding dye only on the top surface of the air cell membrane. Injection into the allantoic fluid was substantiated by finding dye located below the air cell membrane, but not in contact with the embryo. Injection into the amniotic fluid was confirmed by seeing dye on the embryo, while injection into the embryo was confirmed by seeing dye in the body of the embryo. For each of studies 1-3, a 10% sample of eggs/treatment was injected with dye and site of injection determined by egg examination. A 100% accuracy of placement was confirmed for the air cell, allantoic and amniotic sites. Embryo placement was at 97% accuracy. Chicks vaccinated at hatch were given 0.1 ml of the MD vaccine subcutaneously in the back of the neck.

The challenge virus used was the RB1B strain of MDV at passage level 9 in chick kidney cells. On day 5 of age, chicks were challenged by intra-abdominal injection of 500 pfu RB1B. Chicks were grown to 54

days of age. Gross lesions of MD including tumors, and/or nerve yellowing, loss of striations and enlargement were recorded (3).

Determination of injection site by an *in ovo* injection machine: The *in ovo* injection machine (Inovoject® system, Embrex, Inc.) was operated as recommended by the manufacturer and dye was injected rather than vaccine. Eggs were injected at incubation ages 18 days and 0 hours, 18 days and 12 hours and 19 days and 0 hours. Normal fertile eggs were carefully examined for dye localization as described above. Upside down eggs, upside down embryos and malformed embryos were excluded from the analysis because they are unlikely to result in normal hatched chicks. Cobb/Cobb, Ross/Hubbard and Ross/Arbor Acres broiler eggs from different commercial sources were used to determine site of dye injection. A total of 3,983 broiler eggs in approximately equal proportions from breeder flocks of 32, 36, 46, 48, 58, and 66 weeks of age were examined.

Efficacy of MD vaccine delivered at 18 days and 3 hours of incubation via an *in ovo* injection machine: Broiler eggs of five different breeder flocks were incubated and hatched in commercial hatcheries. Breeder flock matched broilers were vaccinated using either a commercially operating *in ovo* injection machine (Inovoject® system, Embrex, Inc.) or manual subcutaneous injection at hatch using a 1 ml syringe and 23 gauge needle. Bivalent HVT/SB1 (Merial Select) was administered at a dose of 4500 pfu HVT and 2500 pfu SB1. Unvaccinated chicks were included in each study. MDV RB1B challenges and examinations were as described above. Chicks were raised in isolation floor pens to 54 days of age.

Protective index (PI) was calculated for MD challenges using the formula: % MD positive in unvaccinated chickens minus the % MD positive in vaccinated chicks divided by the % MD positive in unvaccinated chicks and multiplied by 100 (5).

RESULTS

The effect of day 18 of incubation *in ovo* site of injection on MD vaccine efficacy is shown in Table 1. Overall, administration of MD vaccine to the air cell resulted in a PI of 0, administration to the allantois resulted in a PI of 28.3, while administration to either the amniotic fluid, embryo body or at hatch gave PI of 94.4, 93.9 and 95.2, respectively.

The frequency of injection into either the amniotic fluid or the embryo body by an automated *in ovo* injection machine was 98.4% at 18 days and 0 hours of incubation, 99.6% at 18 days and 12 hours of incubation and 100.0% at 19 days and 0 hours of incubation. The frequency of injection into the embryo body were 4.3% at 18 days and 0 hours of incubation,

21.7% at 18 days and 12 hours of incubation and 67.2% at 19 days and 0 hours of incubation.

In MDV challenged broilers HVT/SB1 delivered at 18 days and 3 hours of incubation via an *in ovo* injection machine resulted in PI of 86.5, 90.0, 100.0, 93.3 and 95.4 verses PI of manual at hatch MD vaccines of 88.7, 68.2, 85.7, 100.0 and 86.0, respectively. Unvaccinated challenged controls had MD positive rates of 28% to 62%, depending on the study.

DISCUSSION

Results of studies 1-3 indicate that *in ovo* site of injection is important. There was no protective immunity when MD vaccine was administered into the air cell and this confirmed earlier unpublished studies. Day 18 of incubation *in ovo* administration into the allantoic fluid was shown to provide an average PI of 28.3. In comparison, day 18 of incubation *in ovo* administration into the amniotic fluid or the embryo body resulted in PI of 94.4 and 93.9, respectively. These data indicate that air cell and allantoic fluid administration of MD vaccine is to be avoided, while injection into either the amniotic fluid or the embryo body is desirable and equivalent with laboratory post-hatch administration.

The *in ovo* injection machine injected dye into the two *in ovo* sites shown to be effective for MD vaccine administration (amniotic fluid and body of embryo) at a very high rate. This finding was demonstrated using a large number of eggs from young, mid and old breeder flocks representing three common breed crosses. The rate of amniotic fluid and embryo injections increased as injection age increased from 98.4% at 18 days and 0 hours of incubation to 100.0% at 19 days and 0 hours of incubation. Injections into the body of the embryo increased from 4.3% to 67.2% during the 24 hour period that constituted day 18 of incubation. The increasing size of the embryo during day 18 of incubation (2) is thought to be the primary reason for the increasing frequency of embryo injections.

It was recently reported (1) that “extra-embryonic” *in ovo* administration of MD vaccine is less effective than injection into the body of the embryo. These authors did not distinguish the amniotic fluid from the allantoic fluid. They may have preferentially injected MD vaccine into the allantois while manipulating the manual injection to miss the body of the embryo. In a series of MD vaccine efficacy studies using commercially operating *in ovo* injection machines, broiler eggs vaccinated at 18 days and 3 hours of incubation were found to have good protection (PI = 86.5 to 100.0) against an RB1B challenge. Data reported herein indicate that at 18 days and 3 hours of incubation one would expect less than 10% of injections to hit the embryo body when using the *in ovo*

injection machine. These data indicate that MD vaccine need not be administered into the body of the embryo for *in ovo* vaccination to induce good protective immunity. This conclusion is supported by the commercial success of *in ovo* MD vaccination that often occurs early on day 18 of incubation.

The commercial success of *in ovo* vaccination has recently been accompanied by a significant amount of experimental *in ovo* research. Much of this research is conducted using manual injection techniques. These techniques appear to differ from laboratory to laboratory and are sometimes manipulated to test certain hypothesis and therefore may not mimic the *in ovo* injection machine. This type of research is always productive and informative, but cannot always be directly related to commercial *in ovo* vaccination. Similarly, one cannot extrapolate results from the commercial *in ovo* injection machine used in these studies to other *in ovo* injection machines because of numerous and significant design differences between the machines.

REFERENCES

1. Islam, A.F.M.F., Walkden-Brown, S.W., Wong, C.W., P.J. Groves, Burgess, S.K., K. E. Arzey and P.L. Young. Influence of vaccine deposition site on post-vaccinal viraemia and vaccine efficacy in broiler chickens following *in ovo* vaccination against Marek's disease. *Avian Path.* 30:525-533. 2001.
2. Romanoff, A. The Avian Embryo. Structure and Functional Development. New York, McMillian Inc. 1960.
3. Payne, L.N., Frazier, J.A., and P.C. Powell. Pathogenesis of Marek's disease. *Int. Rev. Exp. Pathol.* 16:59-154. 1976.
4. Sarma, G., Greer, W., Gildersleeve, R.P., Murray, D.L., and A.M. Miles. Field safety and efficacy of *in ovo* administration of HVT and SB-1 bivalent Marek's disease vaccine in commercial broilers. *Avian Dis.* 39:211-217. 1995.
5. Sharma, J. M., and B. R. Burmester. Resistance to Marek's disease at hatching in chickens vaccinated as embryos with turkey herpesvirus. *Avian Dis.* 26:134-149. 1982.
6. Sharma, J.M., and R.L. Witter. Embryo vaccination against Marek's disease with serotypes 1, 2, and 3 vaccines administered singly or in combination. *Avian Dis.* 27:453-463. 1983.
7. Wakenell, P.S., Bryan, T., Schaeffer, J., Avakian, A., Williams, C. and C. Whitfill. Effect of *in ovo* vaccine delivery route on HVT/SB1 efficacy and viremia. *Avian Dis.* 46: in press. 2002.
8. Zhang, Y. and J. M. Sharma. Early posthatch protection against Marek's disease in chickens vaccinated *in ovo* with a CVI988 serotype 1 vaccine. *Avian Dis.* 45:639-645. 2001.

Table 1: Susceptibility of Chickens to a Marek's Disease strain RB1B challenge when vaccinated with MD vaccine HVT/SB1 *in ovo* on day 18 of incubation in different embryonic sites or subcutaneous at hatch.

MD Vaccine		MDV Challenge	No. Positive for MD lesions/No. Challenged			
Route	Site of injection		Study 1 SPF	Study 2 SPF	Study 3 Broiler	Total Studies 1-3 (Protective Index) ¹
None	None	No	0/50 ^a	0/43 ^a	0/50 ^a	0/143 (NA)
None	None	Yes	46/48 ^d	40/42 ^c	40/50 ^d	126/140 (NA)
<i>In ovo</i>	Air cell	Yes	45/49 ^d	NT	NT	45/49 (0.0)
<i>In ovo</i>	Allantoic fluid	Yes	39/49 ^c	23/43 ^b	29/49 ^c	91/141 (28.3)
<i>In ovo</i>	Amniotic fluid	Yes	2/48 ^b	1/42 ^a	4/49 ^b	7/139 (94.4)
In ovo	Embryo body	Yes	NT	2/43 ^a	3/48 ^b	5/91 (93.9)
At hatch	Neck	Yes	NT	1/42 ^a	3/50 ^b	4/92 (95.2)

^{a,b,c,d} Within study (columns), frequencies with the same superscript letter are not significantly different using chi-square analysis ($p \leq 0.05$).

¹ Number positive for MD lesions/number challenged totaled by site of injection for studies 1-3. Protective index for totaled frequencies by site of injection.

SPF = specific pathogen free, NT = not tested, NA = not applicable

THE ROLE OF MAREK'S DISEASE VIRAL IL-8 IN VIRAL PATHOGENESIS

EL PAPEL DE LA INTERLEUCINA 8 DEL VIRUS DE LA ENFERMEDAD DE MAREK EN LA PATOGENIA DE LA ENFERMEDAD

Portia Cortes¹ and Carol Cardona²

¹Microbiology Graduate Group, University of California, Davis

²Veterinary Medicine Extension, Surge III, Rm. 1383, University of California, Davis, Davis, CA 95616

RESUMEN

En el genoma del virus de la enfermedad de Marek se encuentra codificado un homólogo de la interleucina 8 (IL-8). Para determinar sus efectos en la patogenia de la enfermedad inoculamos un grupo de aves de la línea P (susceptibles a la enfermedad de Marek) y un grupo de aves de la línea N (resistentes a dicha enfermedad) ya sea con la cepa RB1B o con la cepa RB1B vIL-8ΔsmGFP (que es la RB1B pero carece de la IL-8). La patología macroscópica y el ensayo en placa indica que esta última cepa no se replica *in vivo*, sino a niveles inferiores en comparación con la RB1B. Nuestra hipótesis es que la IL-8ΔsmGFP viral puede ser crítica para la multiplicación del virus y para su transferencia de célula a célula durante las fases iniciales de la patogenia de la enfermedad de Marek.

A homologue of interleukin-8 (IL-8) is encoded in the Marek's disease virus (MDV) genome (1). To determine the effects of viral interleukin-8 (vIL8) on the pathogenesis of Marek's Disease (MD), we inoculated a group of P-line birds (MDV susceptible) and N-line birds (MDV resistant) with either the RB1B strain of MDV or RB1B vIL-8ΔsmGFP (2) (RB1B lacking vIL8). Two separate experiments were done and necropsies were performed at various time points starting at 3 days post-infection (dpi) and ending at 35 dpi, to follow the 4 phases of Marek's Disease. One hundred percent of the P-line birds given RB1B had tumors in two replicate experiments while only 6% of P-line birds given RB1B vIL-8ΔsmGFP and N-line birds given RB1B had grossly detectable tumors. No tumors were observed in N-line birds given RB1B vIL-

8ΔsmGFP. P-line birds inoculated with RB1B had a logarithmic rise in virus titer from 65 pfu (plaque forming units) at 5 dpi to 400,000 pfu at 21 dpi. Virus was isolated from N-line birds given RB1B although virus titers only reached a peak of only 8,500 pfu at 14 dpi and dropped to 30 pfu at 21 dpi. We isolated RB1B vIL-8ΔsmGFP virus from both P-line and N-line groups of birds. In the N-line birds given RB1B vIL-8ΔsmGFP, titers did not exceed 100 pfu and virus could not be isolated beyond 14 dpi. Viral titers remained low in P-line birds given RB1B vIL-8ΔsmGFP but the virus was isolated up to 28 dpi. In summary, these results indicate that RB1B vIL-8ΔsmGFP does replicate *in vivo* but at a much lower level compared to the RB1B. This limited capacity to grow was observed during the early cytolytic phase of MD leading us to believe that vIL8 may be critical in viral replication and cell to cell transfer during the initial phases of MD pathogenesis.

REFERENCES

1. Liu, J. -L., S. -F. Lin, L. Xia, P. Brunovskis, D. Li, I. Davidson, L. F. Lee, H. -J. Kung. Meq and v-IL8: Cellular genes in disguise?. *Acta Virol.* 43:94-101. 1999.
2. Parcels, M. S., S.-F. Lin, R. L. Dienglewicz, V. Majerciak, D. R. Robinson, H.-C. Chen, Z. Wu, G. R. Rubyak, P. Brunovskis, H. D. Hunt, L. F. Lee, and H.-J. Kung. Marek's disease virus (MDV) encodes an interleukin-8 homolog (vIL8): Characterization of the vIL-8 protein and a vIL-8 deletion mutant MDV. *J. Virol.* 75: 5159-5173. 2001.

REDEFINING A LATENCY MODEL FOR MAREK'S DISEASE VIRUS (MDV)

REDEFINICIÓN DE UN MODELO DE LATENCIA PARA EL VIRUS DE LA ENFERMEDAD DE MAREK

Arumugaswami, Vaitilingaraja, Vjollca Konjufca, Robert L. Dienglewicz, and Mark S. Parcells

Center of Excellence for Poultry Science, University of Arkansas, Fayetteville AR 72701

RESUMEN

La enfermedad de Marek es un cáncer de células T de los pollos causado por el virus del mismo nombre. La transformación de las células T por dicho virus está asociada con una infección latente. El estudio de los genes asociados con la latencia ha sido difícil en pollos. Nosotros utilizamos una línea de células T (la línea RECC-CU91) para el estudio de la infección latente con el virus de la enfermedad de Marek, toda vez que estas células adquieren al virus a partir de fibroblastos de embrión de pollo infectados en forma lítica. La latencia del virus de la enfermedad de Marek establecida en las células CU91 es indistinguible de la que se encuentra en las líneas celulares transformadas por el virus de la enfermedad de Marek en lo referente al estado del genoma, el patrón de metilación, la expresión de *MEQ* y la reactivación. Por lo tanto, este modelo permitirá el estudio de la latencia del virus que nos ocupa en ausencia de infección *in vivo*.

INTRODUCTION

Marek's disease is a T-cell cancer of chickens caused by an alphaherpesvirus, Marek's disease virus (MDV). The transformation of T-cells by MDV is associated with MDV latent infection (2, 13). The study of genes associated with the transformation mechanism of MDV has been difficult as viruses lacking these genes fail to establish substantial latent infections in chickens. We have re-examined the use of a REV-transformed T-cell line, RECC-CU91, for the study of MDV latent infection, as these cells take up MDV from lytically-infected chicken embryo fibroblasts (CEF) (9,12). This method provides a powerful model for the study of MDV latent infection in the absence of MDV-induced transformation. To better characterize this model, we have generated a number of MDV-harboring CU91-based cell lines (termed RE/MDCC for REV-transformed, MDV-harboring cell culture).

RESULTS SUMMARY

RE/MDCC cell lines were established using RB1B (11) and RB1BvIL8ΔsmGFP, a recently described recombinant MDV having a deletion of the

MDV IL-8 homolog (vIL8) and the insertion of a soluble-modified green fluorescent protein (smGFP) expression cassette (7).

We have characterized the latency established in these cell lines, RE/MDCC-UA30 (RB1B) and RE/MDCC-UA28 (RB1BvIL8ΔsmGFP) according to:

- 1) the genome state of the MDV genome (integrated vs episomal),
- 2) methylation status of the MDV genome,
- 3) the growth rate of CU91 cells and RE/MD cell lines,
- 4) the resistance of CU91s and RE/MD cell lines to apoptosis induced by serum starvation,
- 5) overall MDV genome expression,
- 6) inducible MDV genome expression,
- 7) Marek's EcoRI-Q (Meq) gene expression, and
- 8) the ability to reactivate MDV from this model for latency.

Using these cell lines, we have determined that:

- 1) The MDV genome is taken up by CU91 cells from MDV-infected fibroblasts within 24 hrs and is integrated into the chicken cellular genome within these cells.
- 2) Expression of MDV lytic genes is repressed in these cell lines in a manner indistinguishable from MDV-transformed, latently-infected cells. This repression is not based on methylation of MDV DNA sequences.
- 3) Uptake of the MDV genome by CU91 cells, decreases their doubling time (i.e., increases their growth rate).
- 4) Uptake of the MDV genome by CU91 cells also confers resistance to apoptosis induced by serum starvation.
- 5) Using probes spanning the entire MDV genome, the latency established in CU91 cells is comparable to that of MDV-transformed cell lines.
- 6) The pattern of meq expression (both sense and antisense) is indistinguishable in both forms of latency.
- 7) MDV early antigen pp38 and late antigen glycoprotein B are induced by treatment of these cell lines with bromodeoxyuridine.

- 8) Finally, the MDV genome can be rescued from the CU91-based cell lines via co-cultivation on CEF. The virus plaques induced on CEF monolayers are somewhat smaller than those caused by co-cultivation with MDV-transformed cell lines, but upon passage, show increases in virus titer indicating comparable virus yield per plaque. The initially small plaques induced on CEF monolayers upon reactivation from CU91 cells are likely due to the expression of IFN-II (g) by CU91 cells (6) and its effect on MDV lytic infection (15).

DISCUSSION

Our results really re-define what was previously disregarded as a model for Marek's disease virus latency. The major reason why this model has not been exploited lay in the initial cell line established using this method, CU210. The CU210 cell line harbors the MDV genome, but is a non-producer cell line that cannot be induced to express virus lytic antigens or reactivate virus (9). In our examination of the CU210 cell line in comparison to the cell lines that we established, we found that the CU210s contain an insertion into the Meq gene, and perhaps other mutations that affect the latency established in these cells. The mutation observed in the Meq gene, is nearly identical to one described for the vaccine virus CVI-988 (5), and previously described for another non-producer MDV-transformed T-cell line, MKT-1 (8,14). Interestingly, this mutation is an insertion of 177 nt in-frame with the Meq oncoprotein resulting in the reiteration of a proline-rich domain of Meq believed to be involved in transcriptional repression(10). The fact that this mutation has been observed in several, independently-isolated MDV genomes, suggests a functional significance to this reiteration. Perhaps this form of Meq functions as a "super-repressor" in blocking the expression and reactivation of the MDV genome. Previously, Pratt *et al.*, were able to induce MDV genome expression in CU210 cells after transfection of these cells with the BamHI-A region of the genome (9), a region encoding the ICP4 gene (a major immediate-early regulatory protein) (1). Still, the model seemed flawed, as the CU210s did not spontaneously reactivate virus in a manner similar to most MDV-transformed cell lines.

Our re-examination of this model has demonstrated that the CU210 example is an exception, rather than the rule. We have demonstrated that the CU91 cells rapidly take-up the MDV genome with the consequence that the CU91s grow more rapidly and are more resistant to apoptosis. There appears, therefore, to be a positive selection for the uptake of the MDV genome. Moreover, the MDV genome immediately

assumes a posture essentially identical to that seen in MDV-transformed cell lines. The MDV genome is largely shut down, with the notable exception of the latency- and transformation-associated regions, and the virus is integrated. Our results therefore confirm the observations of Delecluse and Hammerschmidt, that the MDV genome is integrated in tumors and in cell lines (3,4). What we have also determined, however, is that the "episomal-form" of the MDV genome described for the CU25 cell line, is more likely to be a replicative intermediate and not a true episome. This "circular" form was only found in cell lines from which virus could be reactivated and which also contained numerous linear fragments of the genome. Inclusion of lytically-infected fibroblasts in this study, demonstrates that this "episomal" form is present during lytic infection. Consequently, it is not likely an episomal form, but a circular intermediate present during "rolling circle" replication of the herpesvirus genome. Another interesting aside is that the MDV genome appears to also integrate into the chicken chromosome during lytic infection.

The induction of MDV gene expression and reactivation in this model are very important, as this demonstrates a clear method for studying aspects of MDV latency in the absence of immune selection. Ostensibly, MDVs having mutations affecting lytic, latent or transforming infections would be very difficult to study during *in vivo* replication. Even in birds infected with very virulent MDVs, the number of latently-infected cells is relatively small, making study of this important virus-cell interaction likewise very difficult. Our results, therefore, clearly outline the utility of this model for the study of MDV latency.

REFERENCES

1. Anderson, A. S., A. Francesconi and R. W. Morgan. Complete nucleotide sequence of the Marek's disease virus ICP4 gene. *Virology* 189:657-67. 1992.
2. Calnek, B. W., K. A. Schat, L. J. Ross, W. R. Shek and C. L. Chen. Further characterization of Marek's disease virus-infected lymphocytes. I. *In vivo* infection. *Int J Cancer* 33:389-98. 1984.
3. Delecluse, H. J. and W. Hammerschmidt. Status of Marek's disease virus in established lymphoma cell lines: herpesvirus integration is common. *J Virol* 67:82-92. 1993.
4. Delecluse, H. J., S. Schuller and W. Hammerschmidt. Latent Marek's disease virus can be activated from its chromosomally integrated state in herpesvirus-transformed lymphoma cells. *Embo J* 12:3277-86. 1993.
5. Lee, S. I., M. Takagi, K. Ohashi, C. Sugimoto and M. Onuma. Difference in the meq gene between oncogenic and attenuated strains of Marek's

disease virus serotype 1. *J Vet Med Sci* 62:287-92. 2000.

6. Lowenthal, J. W., M. R. Digby and J. J. York. Production of interferon-gamma by chicken T cells. *J Interferon Cytokine Res* 15:933-8. 1995.

7. Parcels, M. S., S. F. Lin, R. L. Dienglewicz, V. Majerciak, D. R. Robinson, H. C. Chen, Z. Wu, G. R. Dubyak, P. Brunovskis, H. D. Hunt, L. F. Lee and H. J. Kung. Marek's disease virus (MDV) encodes an interleukin-8 homolog (vIL-8): characterization of the vIL-8 protein and a vIL-8 deletion mutant MDV. *J Virol* 75:5159-73. 2001.

8. Peng, Q. and Y. Shirazi. Characterization of the protein product encoded by a splicing variant of the Marek's disease virus Eco-Q gene (Meq). *Virology* 226:77-82. 1996.

9. Pratt, W. D., R. W. Morgan and K. A. Schat. Characterization of reticuloendotheliosis virus-transformed avian T-lymphoblastoid cell lines infected with Marek's disease virus. *J Virol* 66:7239-44. 1992.

10. Qian, Z., P. Brunovskis, F. Rauscher, 3rd, L. Lee and H. J. Kung. Transactivation activity of Meq, a Marek's disease herpesvirus bZIP protein persistently

expressed in latently infected transformed T cells. *J Virol* 69:4037-44. 1995.

11. Schat, K. A., B. W. Calnek and J. Fabricant. Characterization of two highly oncogenic strains of Marek's disease virus. *Avian Pathol.* 11:593-605. 1982.

12. Schat, K. A., W. D. Pratt, R. Morgan, D. Weinstock and B. W. Calnek. Stable transfection of reticuloendotheliosis virus-transformed lymphoblastoid cell lines. *Avian Dis* 36:432-9. 1992.

13. Shek, W. R., B. W. Calnek, K. A. Schat and C. H. Chen. Characterization of Marek's disease virus-infected lymphocytes: discrimination between cytolytically and latently infected cells. *J Natl Cancer Inst* 70:485-91. 1983.

14. Sugaya, K., G. Bradley, M. Nonoyama and A. Tanaka. Latent transcripts of Marek's disease virus are clustered in the short and long repeat regions. *J Virol* 64:5773-82. 1990.

15. Xing, Z. and K. A. Schat. Inhibitory effects of nitric oxide and gamma interferon on in vitro and in vivo replication of Marek's disease virus. *J Virol* 74:3605-12. 2000.

CHARACTERIZATION OF THE MAREK'S DISEASE VIRUS PHOSPHOPROTEIN 38 (pp38) GENE FAMILY

CARACTERIZACIÓN DE LA FAMILIA DEL GENE DE LA FOSFOPROTEÍNA 38 (pp38) DEL VIRUS DE LA ENFERMEDAD DE MAREK

Prigge, Jon T¹ and Mark Parcels¹

Center of Excellence for Poultry Science, University of Arkansas, Fayetteville, AR 72701

RESUMEN

La enfermedad de Marek es causada por un virus herpes alfa conocido como virus de la enfermedad de Marek. El código genético de este virus incluye una familia altamente expresada de fosfoproteínas (pp24/pp38) cuya función es desconocida. Al construir virus de esta enfermedad recombinantes que presentan mutaciones en la región que codifica para la pp38, identificamos genes adicionales que pueden afectar su replicación *in vivo*. Adyacentes al *ORF* pp38 se encuentran dos *ORF* putativas denominadas *HEP* y *Mys2*. Utilizando la 3' *RACE* (amplificación rápida de los extremos del cADN) identificamos los factores de transcripción que codifican para cada una de estas *ORF*. Actualmente estamos construyendo líneas celulares que expresan estas *ORF* para determinar el papel que desempeñan en la infección con el virus de la enfermedad de Marek y su evasión del aparato inmunocompetente.

Marek's Disease (MD) is caused by Marek's Disease Virus (MDV), a highly cell-associated α -herpesvirus (reviewed in 3). MD is primarily characterized by lymphocyte infiltration of the nerves, and the development of lymphomas in visceral organs, muscle, and skin. Since the 1970's, MD has been effectively controlled through an extensive vaccination program using serotypically-related, apathogenic herpesviruses. Despite expensive vaccination programs, MD continues to remain of considerable economic importance due to condemnation losses at processing, the cost of continued vaccination programs, decreased production of immunosuppressed birds, and continually evolving hyper-virulent strains. It becomes apparent that a better understanding of the regulatory mechanisms of MDV is critical.

MDV's are comprised of three antigenically-related viruses (serotypes 1, 2, and 3, or herpesvirus of turkeys [HVT]), of which MDV serotype 1 (MDV-1) is oncogenic. MDV serotypes 2 and 3 were initially

isolated from healthy chickens (8) and turkeys (10), respectively, and today are used as vaccines. MDV-1 is unique in that it is the only acute-transforming alphaherpesvirus that causes tumors in its host.

The MDV-1 genome is approximately 178kbp and is organized similar to other alphaherpesviruses (9). MDV has two regions of unique sequence, the unique-long (U_L) and unique-short (U_S) regions, which are flanked by regions of internal and terminal repeat-short (IR_S and TR_S , respectively). Among the serotypes of MDV, the greatest divergence is seen in the repeated sequence flanking the U_L (IR_L and TR_L). Encoded at the junctions of the repeats flanking the U_L region of MDV are a family of highly-expressed phosphoproteins 24 (pp24) and 38 (pp38), respectively. These proteins were initially identified as tumor-associated antigens, but are now known to be associated with reactivation from latency (1,7) and lytic infection. The expression of pp38, albeit at a low level, in transformed cell lines appears to be important in the maintenance of the transformed phenotype, although the mechanism remains uncharacterized (11). To date, the function(s) of pp38 and pp24 remain enigmatic.

Transcription mapping of the pp38 region has demonstrated that pp38 may be encoded by a 1.8kb unspliced RNA transcript, (2,4,5) with minor transcripts of 0.67, 0.8, 3.1, and 3.8kb, also reported from MDV-1 infected fibroblasts. (2,4) Possibly encoded by the pp38 1.8kb RNA are also two other putative ORFs that we have designated as HEP (BamHI-H Encoded Protein) and Mys2 (Mystery 2), with yet uncharacterized functions. The HEP and Mys2 correspond to R-LORF13a and LORF10, respectively (6). All three serotypes of MDV have the HEP-like and Mys2 ORFs present in the viral genome, further suggesting that the HEP and Mys2 ORFs are not an artifact within the GA strain of MDV, although HEP is truncated in MDV-2 and HVT (Table 1). The open reading frames of HEP and Mys2 are highly basic (pI=12) and acidic (pI=4), respectively, and have no known homologs. We currently have no clear data regarding the cellular localization of HEP and Mys2 during infection, although fusion of GFP to HEP indicates that HEP may be localized to the nuclear membrane. Interestingly, HEP has a nuclear localization signal, thus further supporting the localization of GFP to the nucleus. Oddly, both HEP and pp38 are quite divergent among the serotypes in terms of size, homology, and charge.

In order to better understand the transcriptional expression of pp38, HEP, and Mys2 in MDV infection, transcriptional mapping analysis was performed on the BamHI-H/D region. The HEP and Mys2 ORFs may be encoded by the pp38 1.8kb RNA transcript and/or may be encoded by an RNA transcript other than the pp38

1.8kb RNA transcript. To determine if HEP and Mys2 are encoded by a transcript other than the 1.8kb pp38 RNA transcript, the pp38 region (including the HEP and Mys2 ORF) was transcriptionally mapped using 3' RACE (Rapid Amplification of cDNA Ends). The RACE products included the 1.8kb RNA transcript reported by Cui et al., (5) alternatively spliced transcripts that encoded for the full-length ORFs of HEP and Mys2, Mys2 alone, and non-spliced transcripts that encoded for HEP. Currently, cell lines of HEP, pp38, Mys2, and the RACE products are being developed to study cell growth and reactivation from latency.

REFERENCES

1. Baigent, S. J., L. J. Ross, and T. F. Davison. Differential susceptibility to Marek's disease is associated with differences in number, but not phenotype or location, of pp38+ lymphocytes. *J. Gen. Virology* 79: 2795-2802. 1998.
2. Bradley, G., M. Hayashi, G. Lancz, A. Tanaka, and M. Nonoyama. Structure of the Marek's disease virus BamHI-H gene family: genes of putative importance for tumor induction. *J. Virology* 63: 2534-2542. 1989.
3. Calnek, B. W., and R. L. Witter. Marek's disease. In: *Disease of poultry*, 10th ed. B.W. Calnek, ed. Iowa State University Press, Ames. pp. 369-413. 1997.
4. Chen, X. B., and L. F. Velicer. Multiple bidirectional initiations and terminations of transcription in the Marek's disease virus long repeat regions. *J. Virology* 65: 2445-2451. 1991.
5. Cui, Z. Z., L. F. Lee, J. L. Liu, and H. J. Kung. Structural analysis and transcriptional mapping of the Marek's disease virus gene encoding pp38, an antigen associated with transformed cells. *J. Virology* 65:6509-6515. 1991.
6. Lee, L. F., P. Wu, D. Sui, D. Ren, J. Kamil, H. J. Kung, and R. L. Witter. The complete unique long sequence and the overall genomic organization of the GA strain of Marek's disease virus. *Proc. Natl. Acad. Sciences* 97: 6091-6096. 2000.
7. Parcells, M. S., R. L. Dienglewicz, A. S. Anderson, and R. W. Morgan. Recombinant Marek's disease virus (MDV)-derived lymphoblastoid cell lines: regulation of a marker gene within the context of the MDV genome. *J. Virology* 73:1362-1373. 1999.
8. Schat, K. A., and B. W. Calnek. Characterization of an apparently nononcogenic Marek's disease virus. *J. Natl. Cancer Institute* 60: 1075-1082. 1978.
9. Tulman, E. R., C. L. Afonso, Z. Lu, L. Zsak, D. L. Rock, and G. F. Kutish. The genome of a very virulent Marek's disease virus. *J. Virology* 74: 7980-7988. 2000.

10. Witter, R. L., K. Nazerian, H. G. Purchase, and G. H. Burgoyne. Isolation from turkeys of a cell-associated herpesvirus antigenically related to Marek's disease virus. *Am. J. Vet. Research* 31: 525-538. 1970.

11. Xie, Q., A. S. Anderson, and R. W. Morgan. Marek's disease virus (MDV) ICP4, pp38, and meq genes are involved in the maintenance of transformation of MDCC-MSB1 MDV-transformed lymphoblastoid cells. *J. Virology* 70: 1125-1131. 1996.

Table 1. Comparison of open reading frames at the junction of the IR_L and U_L sequences of MDV-1 (GA and MD-5), MDV-2 and HVT serotypes.

Protein		MDV-1(GA)	MDV-1(MD-S)	MDV-2	HVT
HEP	aa	125	125	77	79
	pI	12.0	12.0	11.8	12.6
	m.w.	14.0	14.0	8.3	9.6
pp38	aa	290	290	221	8.4
	pI	4.75	4.79	5.58	11.7
	m.w.	31.1	31.2	23.4	8.6
Mys2	aa	126	127	129	130
	pI	3.73	3.73	4.0	4.14
	m.w.	13.9	13.9	14.5	13.8

SUSCEPTIBILITY OF ADULT CHICKENS TO MAREK'S DISEASE

SUSCEPTIBILIDAD DE LOS POLLOS ADULTOS A LA ENFERMEDAD DE MAREK

R. L. Witter

USDA, Agricultural Research Service, Avian Disease and Oncology Laboratory, East Lansing, MI

RESUMEN

La enfermedad de Marek se presenta en parvadas de ponedoras o reproductoras adultas, pero no está claro si éste es el resultado de la infección reciente con cepas de alta virulencia, o bien de una infección temprana exacerbada por la inmunodepresión resultante del estrés, u otros factores. Nosotros desafiamos a nuestras aves a las 18 ó 90 semanas de edad con un virus altamente virulento de la enfermedad de Marek y medimos las respuestas de lesiones y la transmisión horizontal. Los pollos libres de patógenos específicos fueron susceptibles a parálisis transitoria y tumores, y diseminaron al virus horizontalmente; sin embargo, los pollos previamente vacunados o expuestos resultaron altamente refractarios al desafío cuando adultos. Esto sugiere que no es probable que los brotes tardíos se deban a infecciones recientes.

INTRODUCTION

Age of the chicken at the time of exposure to Marek's disease virus (MDV) is known to influence the response to infection but only in chickens of genetically resistant lines (2). Virulence of the

challenge virus is also important, since highly virulent strains can induce high rates of lymphomas in nonvaccinated naïve older chickens (6). The effect of age has most frequently been evaluated by measurement of lymphoma responses. However, virologic responses are also influenced. Recent studies showed that in older chickens cytolytic infections were resolved more rapidly (1) and virus load is somewhat lower (3). However, little information is available on the influence of age on induction of transient paralysis.

Outbreaks of Marek's disease (MD) lymphomas in older layer flocks have been reported (5). Some outbreaks have occurred subsequent to molting, in preparation for a second laying cycle. However, the factors responsible for of these "late breaks" are poorly understood. One theory (new infection) suggests that old flocks are susceptible to de novo infection with highly virulent strains, which break through existing levels of immunity and cause lymphomas (4). An alternate theory (old infection) suggests that outbreaks are caused by virus strains long resident in the flock but exacerbated by an environmental factor, perhaps through an immunosuppressive mechanism (8). Since

chickens usually become infected early with MDV, and the virus remains present in the latent state for life, it is not easy to discriminate between these possibilities.

These studies are designed to examine the susceptibility of adult chickens to MD exposure. Both specific-pathogen-free (SPF) and previously vaccinated and exposed (VE) chickens of susceptible laboratory strains or commercial leghorn lines were used. Exposed chickens were evaluated for clinical signs of transient paralysis (TP) and for lymphoma development. In one trial, transmission of virus from inoculated older chickens to uninoculated contact birds was measured. Five trials were conducted.

RESULTS

In trial 1, 18wk SPF chickens of the susceptible ADOL line 15x7 were highly susceptible to both TP and MD lymphoma development when inoculated with or exposed by contact to 6 highly virulent strains of the vv or vv+ pathotypes. Responses approached 100% and median time to lymphoma mortality was 32-35 days post exposure (vv+ only). However, a comparable VE group vaccinated with HVT at hatch and exposed to the JM strain of MDV (v pathotype) at 5 weeks was very resistant to contact challenge at 18 wk. No TP was observed and only 1 of 109 birds had MD lesions.

Similar exposures of 18wk SPF birds in trial 2 with 5 additional MDV strains confirmed the high susceptibility to a vv+ strain (584A). In contrast, 4 strains of lesser virulence induced lesser responses. None induced TP and only one strain (JM) induced high rates of MD lesions. This suggested that TP and MD responses of 18wk SPF chickens were influenced by viral pathotype.

Trial 3 included laboratory (15x7) chickens and 3 different commercial layer strains that were hatched in the laboratory and reared under SPF conditions in isolators. Comparable VE groups were vaccinated with HVT at hatch and exposed to JM at 5wk. Exposure was by inoculation with a vv+ strain (648A) at 18wk. The 15x7 chickens responded as in previous trials. The commercial SPF lines were resistant to TP and fairly resistant to MD lymphomas (21-33%). All lines previously vaccinated and exposed developed no TP or MD subsequent to MDV challenge at 18wk.

Trials 4 and 5 utilized spent hens (60-90wk) from the laboratory flock (line 7₁). Most were SPF stock, but VE hens were included in trial 5 from a comparable flock vaccinated at hatch with HVT and again at 18wk with serotype 1 and 2 vaccines. In Trial 4, challenge of SPF hens with 648A induced high rates of acute TP and few birds survived. Challenge with JM or Md5 strains induced no or minimal TP responses, and the survivors developed low rates of MD lymphomas. In Trial 5, SPF hens challenged with 648A again

developed very high rates of acute TP (accompanied by death), which prevented measurement of lymphoma responses. However, SPF hens apparently shed virus prior to death as indicated by the appearance of acute TP in SPF contacts. Once again, VE hens were refractory to TP, developed no MD lymphomas and, with one exception, did not transmit virus to SPF contacts.

DISCUSSION AND CONCLUSION

In conclusion, SPF birds at 18wk or older are highly susceptible to TP, including the acute form. The response depends on the MDV strain, with strains capable of inducing high rates of TP in young chicks also able to induce high rates in old birds. SPF birds 18wks or older are susceptible to MD lymphomas when exposed to highly virulent strains, providing the exposure does not kill too many birds from acute TP. MDVs of lesser virulence induce only low rates of MD lymphomas in SPF birds. Commercial strains raised under SPF conditions are relatively resistant to MD lymphomas. Following challenge, old SPF hens also transmitted virus to SPF contacts.

In contrast, VE birds at 18wk or older were virtually refractory to TP or MD lymphomas when challenged with highly virulent MDV strains by inoculation or by contact. Furthermore, in 1 trial, VE chickens transmitted virus to SPF contacts with very low efficiency, suggesting that replication of the challenge virus in the feather follicle epithelium was limited. These results suggest that "late breaks" do not likely result from de novo infection of previously vaccinated and exposed adult chickens, even with highly virulent strains, and suggest that other factors are probably involved. Some immunosuppressive and stress factors that interfere with MD immunity are already known (7) but specific factors associated with "late breaks" have not yet been identified.

REFERENCES

1. Buscaglia, C., B.W. Calnek, and K.A. Schat. Effect of immunocompetence on the establishment and maintenance of latency with Marek's disease herpesvirus. *J. Gen. Virol.* 69:1067-1077. 1988.
2. Calnek, B.W. Pathogenesis of Marek's disease virus infection. In: *Current Topics in Microbiology and Immunology*. K. Hirai, ed. Springer-Verlag, Berlin. pp. 25-56. 2001.
3. Davison, T.F., S.J. Baigent, M. Rennie, and N. Bumstead. Age-and strain-related differences in the quantity of Marek's disease virus in different sub-populations of lymphocytes. *Avian Pathol.* 27:S88-S88. 1998.
4. Kreager, K. Marek's Disease: Clinical Aspects and Current Field Problems in Layer Chickens. In: *Diagnosis and control of neoplastic*

diseases of poultry. A.M. Fadly, K.A. Schat and J.L. Spencer, eds. American Association of Avian Pathologists, Kennett Square, PA. pp. 23-26. 1997.

5. Lucio-Martinez, B. Impact of vv Marek's disease on mortality and production in a multiple-age farm. In: Proceedings of the 48th Western Poultry Disease Conference. pp. 55-56. 1999.

6. Rosenberger, J.K., S. S. Cloud, and N. Olmeda-Miro. Epizootiology and adult transmission of Marek's disease. In: Diagnosis and control of

neoplastic diseases of poultry. A.M. Fadly, K.A. Schat and J.L. Spencer, eds. American Association of Avian Pathologists, Kennett Square. pp. 30-32. 1996.

7. Schat, K.A. Marek's Vaccination Breaks. Vineland Update February:1-4. 1992.

8. Witter, R.L. Protective efficacy of Marek's disease vaccines. In: Current Topics in Microbiology and Immunology. K. Hirai, ed. Springer-Verlag, Berlin. pp. 58-90. 2001.

INFLUENCE OF MAREK'S DISEASE VACCINES ON THE RESPONSE OF COMMERCIAL BROILER BREEDER CHICKENS TO INFECTION WITH SUBGROUP J AVIAN LEUKOSIS VIRUS

INFLUENCIA DE LAS VACUNAS CONTRA LA ENFERMEDAD DE MAREK SOBRE LA RESPUESTA DE LAS REPRODUCTORAS PESADAS A LA INFECCIÓN CON EL VIRUS DE LA LEUCOSIS AVIAR, SUBGRUPO J

Aly M. Fadly^A, Jody K. Dybing^A and Arun K. Pandiri^B

^AUSDA-Agricultural Research Service, Avian Disease and Oncology Laboratory, East Lansing, Michigan

^BDepartment of Pathobiology and Diagnostic Investigation, Michigan State University, East Lansing, Michigan

RESUMEN

Se inocularon líneas de reproductoras pesadas y líneas experimentales con la cepa ADOL-Hc1 del virus de la leucosis aviar, subgrupo J (ALV-J) al nacer, y también se vacunaron contra la enfermedad de Marek usando los serotipos 1, 2 ó 3. A las 32 semanas de edad, la incidencia de viremia con el ALV-J en los pollos vacunados con virus herpes de pavo (*HVT*) varió de 0 a 100%, dependiendo de la línea genética. Dicha incidencia, en los pollos de una línea comercial fue significativamente mayor en los grupos vacunados con una vacuna del serotipo 1 del virus de la enfermedad de Marek que en los que recibieron el *HVT* o vacunas bivalentes que contenían el serotipo 2. La incidencia de tumores causados por el ALV-J en los pollos de una de las tres líneas comerciales probadas fue significativamente mayor en los grupos vacunados con el serotipo 1 del virus de la enfermedad de Marek que en los otros tratamientos.

ABSTRACT

Chickens of three commercial broiler breeder lines and two experimental lines were inoculated with strain ADOL-Hc1 of subgroup J avian leukosis virus (ALV-J) at hatch; chickens were also vaccinated with

serotype 1, 2 or 3 Marek's disease (MD) vaccines. Vaccinated and unvaccinated, ALV-J-infected chickens were monitored for ALV-J induced infection and tumors through 32 weeks of age. At 32 weeks of age, the incidence of ALV-J viremia in chickens vaccinated with herpesvirus of turkeys (*HVT*), a serotype 3 MD vaccine virus varied from 0% to 100%, depending on line of chickens. Whereas, the incidence of ALV-J viremia in chickens of one commercial line was significantly higher in groups vaccinated with a serotype 1 MD vaccine virus than those vaccinated with *HVT* or bivalent vaccines containing serotype 2 MD virus.

Also, the incidence of ALV-J tumors in chickens of 1 of 3 commercial lines tested, was significantly higher in groups vaccinated with serotype 1 MD vaccine virus than in unvaccinated groups or groups vaccinated with *HVT* or bivalent vaccines. Results suggest that MDV vaccines may influence ALV-J infection and tumors, but only in certain lines of chickens.

(The full-length article will be submitted for publication in Avian Diseases)

CAPTURA DE ANTÍGENO CONTRA EL VIRUS DE LEUCOSIS AVIAR EN DISTINTOS ÓRGANOS DE POLLO DE ENGORDA

ANTIGEN CAPTURE AGAINST AVIAN LEUKOSIS VIRUS IN DIFFERENT BROILER ORGANS

Mireya Juárez¹, Víctor M. Petrone¹, Ruben Merino¹, Tamas Fehervari¹

¹Departamento de Producción Animal: Aves, Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia, UNAM

SUMMARY

Avian leukosis (LA) is retrovirus-caused disease that affects adult or sexually mature domestic birds. The most important viral subgroups are A, B, C, D, J and E. The purpose of this study was to determine the organ in which p27 antigen of LA virus is most frequently detected, using an antigen-capture ELISA kit in 1-7-week-old broilers. Results showed that the organ with the most frequent detection was the bursa of Fabricius, followed by the intestine and the spleen.

RESUMEN

La Leucosis aviar (LA) es una enfermedad viral que afecta a aves adultas o sexualmente maduras, esta enfermedad es ocasionada por un retrovirus en aves domesticas los subgrupos mas importantes son el A,B,C,D,J y E. El presente estudio tuvo como objetivo determinar el órgano en que con mayor frecuencia se detecta el antígeno p27 de LA, mediante el uso de un Kit ELISA de captura de antígeno, en pollos de engorda de 1-7 semanas de edad. Los resultados mostraron que el órgano donde se tuvo mayor porcentaje de detección fue la Bolsa de Fabricio seguido de intestino y bazo.

INTRODUCCIÓN

La Leucosis Linfoide (LL) es descrita como una enfermedad neoplásica, que se manifiesta en aves semi adultas o sexualmente maduras. La LL es una enfermedad producida por un virus de la subfamilia oncoviridae perteneciente a la familia retroviridae, que ha sido clasificado en 6 subgrupos A,B,C,D,J y E que son los causantes de las principales neoplasias en aves. El virus está presente en la saliva, heces, semen y albúmina de los huevos de las aves, los cuales son una fuente de infección que puede ser aprovechada por algunos fomités, como los artrópodos, para diseminar la infección en otras áreas. En los animales infectados con LL se observa una disminución en la producción de huevos, disminución en la calidad del semen e incremento de la mortalidad no específica. Los signos exteriores de la enfermedad no son específicos; la cresta puede estar descolorida, arrugada y ocasionalmente cianótica. La inapetencia y el

cansancio ocurren frecuentemente, el abdomen por lo general se encuentra expandido y las plumas a veces están punteadas con uratos o pigmentos biliares. El crecimiento del hígado, la bolsa de Fabricio y los riñones casi siempre pueden detectarse por palpación. La muerte del ave generalmente sobreviene por el crecimiento progresivo de las neoformaciones e infecciones bacterianas secundarias, toxemias, hemorragias o difusión de un órgano afectado por el tumor. La alteración más característica es un agrandamiento difuso del hígado, bazo y en menor grado de los riñones. Los tumores se observan generalmente en el hígado, bazo, bolsa de Fabricio y a veces en los riñones, gónadas y mesenterio; debido a una multiplicación anormal y migración de linfoblastos a estos órganos. Generalmente las aves retrasadas son inmunológicamente deficientes y potenciales focos de infección; el subgrupo J del virus de la Leucosis aviar (LA) ha coincidido con el incremento de este tipo de pollos en granjas y se le atribuye a este virus ser el causante del problema. No obstante, es también posible que este problema sea originado por otras causas, principalmente fallas de manejo. El objetivo de este estudio fue determinar el órgano en que con mayor frecuencia se detecta el antígeno p27 de LA, mediante el uso de un Kit ELISA de captura de antígeno.

MATERIAL Y MÉTODOS

Las muestras utilizadas fueron tomadas de pollos de engorda de 1-7 semanas de edad, correspondientes a casos aislados. Los órganos evaluados fueron hígado, bazo, bolsa de Fabricio, timo, médula ósea e intestino; estos órganos fueron macerados y diluidos con solución amortiguadora de fosfatos (dilución 1:10 peso:volumen) y mantenidos en congelación por 24 horas a -4°C. El sobrenadante fue utilizado para la detección de la p27 mediante el uso de un Kit ELISA de captura de antígeno para LA (Synbiotics Corporation). Además se analizaron los sueros de aves de la misma edad para la determinación de anticuerpos contra el subgrupo J de LA. Estos Kits comerciales de ELISA cuentan con placas de microtitulación revestidas con anticuerpos anti-p27. La prueba ELISA se llevó a cabo como se describe: del sobrenadante de

los macerados de los órganos diluidos 1:10, se transfirieron 50µl de cada muestra a la placa ELISA, donde se colocó previamente 50µl de solución buffer en cada micropozo. Después de 30 minutos de incubación y un proceso de lavado, se añadieron 100µl de conjugado a cada micropozo. Después de 30 minutos de incubación y otro proceso de lavado, se colocaron 100µl de cromógeno substrato a cada micropozo. Después de 15 minutos se agregaron 100µl de solución inhibidora para detener el desarrollo de color. La intensidad de color desarrollado se relaciona directamente con el nivel de antígeno presente en la muestra. Las placas ELISA se leyeron a 405nm con un lector ELISA Dynatech MR650. Los valores de densidad óptica (DO) se convirtieron en títulos ELISA con el software PROFILE para windows® (Synbiotics Corporation). Para la determinación de anticuerpos los sueros fueron diluidos 1:50 y el mecanismo de la prueba fue el descrito previamente.

RESULTADOS

Los resultados fueron expresados solo como positivos y negativos, en la semana 1 se analizaron 15 sueros de los cuales 1/15 resultó positivo, para esta semana se detectó la p27 de bazo (2/4), bolsa de Fabricio (6/14) y médula ósea (2/4). En la semana 2 se analizaron 8 sueros y 2/8 fueron positivos, la captura de antígeno fue positiva para bolsa de Fabricio (2/4) y médula ósea (1/4). Semana 3 se evaluaron 2 sueros los cuales resultaron negativos, para captura de antígeno fue positiva para: bazo (1/3), hígado (1/3), bolsa de Fabricio (1/3), timo (1/3) e intestino (2/3). Semana 4 se analizaron 3 sueros los cuales resultaron negativos, para captura de antígeno los órganos positivos fueron: bazo (2/3), hígado (1/3), bolsa de Fabricio (1/3), timo (1/3) e intestino (1/3). De la semana 5 a la 7 los resultados de ELISA tanto para detección de anticuerpos como para captura de antígeno fueron negativos. En esta evaluación fueron analizadas un total de 50 bolsas de Fabricio de las cuales 14 fueron positivas para la captura de antígeno representando este el 28%, de 40 bazos 7 fueron positivos representando el 17.5%, de 8 médulas óseas 3 fueron positivas representando 37.5%, de 30 hígados 5 fueron positivos

representando el 16.6% y de 30 muestras de intestino 7 fueron positivas representando el 23.3%. De 188 muestras de órganos el 7.4% de positivos correspondieron a bolsa de Fabricio, el 3.7% a bazo, 3.7% a intestino, 2.6% a timo, 2.6% a hígado y 1.5% a médula ósea.

CONCLUSIONES Y DISCUSIÓN

Los resultados obtenidos indican los órganos donde se detectó en mayor porcentaje el antígeno p27 fueron: bolsa de Fabricio, intestino, bazo. Sin embargo médula ósea fue el órgano en el que se observó mayor porcentaje de captura, aunque solo se analizaron 8 muestras de las cuales 3 fueron positivas representando el 37.5%. En cuanto a los resultados obtenidos de la semana 5 a la 7 de edad no se puede concluir si el virus de Leucosis aviar fue eliminado de las aves por el sistema inmune, ya que estos datos corresponden a aves de distintas casetas y granjas. Sin embargo estos datos pueden dar pie a la realización de una investigación controlada en donde se valore la respuesta inmune contra el virus de leucosis aviar y se correlacionen los títulos de anticuerpos obtenidos con los resultados de captura de antígeno.

REFERENCIAS

1. Fadly, A.M. and Witter R.L. Oncornaviruses: Leukosis/Sarcoma and Reticuloendotheliosis. In: A laboratory manual for the isolation and identification of avian pathogens, D.E. Swayne, J.R. Glisson, M.W. Jackwood, J.E. Pearson, W.M. Reed, eds. Kendall/Hunt Publishing Company, Pennsylvania. pp 185-196. 1998.
2. Payne L.N. and Purchase H.G. Leukosis/Sarcoma Group. In: Diseases of Poultry, Calnek, B.W. Barnes, H.J. Beard, C.W. Reid, W.M. Yorder, Jr. H.W. eds. Iowa State University Press, Ames, Iowa, USA. pp 386-439. 2000
3. Thayer S.G. and Beard C.W. Serologic Procedures. In: A laboratory manual for the isolation and identification of avian pathogens, D.E. Swayne, J.R. Glisson, M.W. Jackwood, J.E. Pearson, W.M. Reed, eds. Kendall/Hunt Publishing Company, Pennsylvania. pp 255-266. 1998.

MONITOREO DE SALUD GASTRO-INTESTINAL EN EL POLLO DE ENGORDA

MONITORING THE GASTROINTESTINAL (GI) HEALTH IN BROILERS

Carlos A. Vega Saldaña, MVZ, MAS, MSA, EPAA.

Alpharma. Av. Lazaro Cardenas 3478, Col. Jardines de los Arcos, Guadalajara, Jalisco. C.P. 44500. Mexico.
carlos.vega@alpharma.com

SUMMARY

Any agents able to alter the normal function in the digestive system will result in poor nutrient utilization. A method to monitor the GI health has been developed by Alpharma in order to evaluate and resolve birds' GI tract problems. The method uses bird necropsies as the basis to grossly observe GI organ traits, as well as the use of the Mc Master technique for *Eimeria* spp. oocyst detection. The methodology described herein allows us to provide information for the decision-making process within poultry companies.

RESUMEN

Cualquier agente que altere la función normal del sistema digestivo traera como consecuencia final una mala utilización de nutrientes. El monitoreo de salud gastro-intestinal ha sido desarrollado por Alpharma para evaluar y dar soluciones a problemas del tracto gastro-entérico de las aves. El método tiene como base la necropsia de las aves observando características macroscópicas de los organos del sistema gastro-intestinal y el uso de la técnica de Mc Master para la detección de oocistos de *Eimeria* spp. La metodología aquí descrita nos permite aportar información al proceso de toma de decisiones en las empresas avícolas.

INTRODUCCIÓN

Los insumos de mayor costo en la producción del pollo de engorda entran por el aparato digestivo. Ahí los nutrientes son preparados para ser absorbidos y posteriormente integrados a las necesidades de mantenimiento y producción de las aves. El sistema digestivo del pollo esta constantemente siendo desafiado por diversas etiologías. El organismo responde a estos agentes tratando de lograr un equilibrio sin alterar las funciones normales de este sistema.

Existen una gran diversidad de agentes patógenos que causan que se modifique el estado de homeostasis existente en el tracto gastro-intestinal del pollo de engorda. Cualquier agente infeccioso o no infeccioso que altere la función del sistema digestivo traera como consecuencia final una mala utilización del principal insumo usado en la producción avícola.

La salud aviar de las parvadas se evalúa en visitas rutinarias a granjas, sin embargo las observaciones rutinarias carecen de una metodología de evaluación e interpretación teniendo como consecuencia final la falta de registro del evento observado.

Desde 1993 se ha utilizado en México un sistema de monitoreo de la salud de la parvada (Necropsy Information Management System o NIMS). Este monitoreo tiene como método el ave indicadora aleatoria, escore de lesiones macroscópicas y técnica de Mc Master para detección de oocistos de *Eimeria* spp. En 1996 se ha comenzado a utilizar en México el Sistema de Monitoreo de Salud Aviar (SMS) como una herramienta para monitorear las tendencias de salud aviar y como una ayuda en el proceso de toma de decisiones.

En las visitas de campo que se realizan a gerentes de producción de las empresas avícolas ha surgido la necesidad de establecer una base de datos para monitorear la salud gastro-intestinal de las parvadas utilizando el método de necropsias como una herramienta de campo para analizar de manera rápida y efectiva la presencia de agentes dañinos en el sistema digestivo de las aves.

El monitoreo de salud gastro-intestinal ha sido desarrollado por Alpharma a partir del SMS para evaluar y dar soluciones a problemas del tracto gastro-entérico de las aves.

El objetivo del presente trabajo es el de ofrecer una metodología para evaluar y dar seguimiento a situaciones anormales en el tracto gastro-intestinal del pollo de engorda.

MATERIAL Y MÉTODOS

Granjas: Junto con los gerentes de producción y técnicos se realiza una selección de granjas a evaluar.

Animales: Las edades de evaluación comienzan desde los 14 días hasta aves que esten por salir a rastro. Se seleccionan de 6 a 10 aves sanas por caseta a evaluar. Se evita tomar aves enfermas o remolachas debido a que estas no son una muestra representativa del estado de salud de la parvada. El sacrificio de las aves se realiza por sangrado y se procede a la identificación de las aves.

Necropsias: Se retira desde esófago hasta recto colocando la muestra en agua. Se procede a tomar una muestra de contenido intestinal de recto y de sacos ciegos. Esta muestra se guarda individualmente en bolsas de plástico previamente identificadas. Una vez tomadas las muestras de contenido intestinal se almacenan en temperatura de refrigeración hasta su proceso.

Se realiza observación de cavidad oral, proventrículo, intestino anterior, intestino posterior, sacos ciegos e hígado. Es recomendable utilizar una lupa o vidrio de aumento para facilitar la exploración.

Para la evaluación de *Eimeria spp* se utiliza el método descrito por Johnson y Reid (1970).

Una vez realizadas las necropsias se procede a evaluar las muestras individuales de contenido intestinal con la técnica de Mc Master para realizar conteos de oocistos de *Eimeria spp*.

Preparación de la muestra de contenido intestinal: Se toman 2 gramos de contenido intestinal y cecal. Esto se coloca en el recipiente Mc Master identificado para la ave en evaluación. Al recipiente Mc Master se le adiciona solución salina saturada para evitar que los oocistos se destruyan. Se tapa el frasco y se agita suavemente. La muestra se deja reposar por 3 a 5 minutos, transcurrido este tiempo se coloca una gasa en el interior del recipiente para que se filtre el material que no permite analizar adecuadamente su lectura. Con un gotero se toma la parte superior del recipiente líquido que será vaciado en la cámara de Mc Master.

Evaluación microscópica: Se procede al recuento de oocistos por medio de un microscopio óptico con el objetivo de 10X. Los conteos son registrados en la hoja de captura de datos.

Hoja de captura de datos: Los datos de necropsias son capturados junto con los datos generales de la granja como son fecha de visita, nombre de la empresa, operación productiva, nombre o número de granja, hora de visita, identificación de la caseta, edad y sexo de las aves. En esta hoja se vacían los datos observados a partir de lesiones macroscópicas y de los resultados del Mc Master. Además se registran comentarios generales de lo observado durante la visita a las casetas evaluadas. Se registran muestras en caso de haber obtenido muestras o alimento para laboratorio.

Esta técnica se hace abarcando varias edades y el seguimiento adecuado es cada 30 días. Las necropsias y la colección de datos pueden ser realizadas en la granja en observación o bien en un laboratorio al que son transportadas las aves.

Es recomendable el integrar la mayor cantidad de datos de producción y sanitarios de las parvadas evaluadas.

Software: La base de datos funciona a base de Excel 97 (Ambiente Windows) debido a que es un

programa fácil de usar y que nos permite realizar tablas y gráficos de manera rápida.

INTERPRETACIÓN DE RESULTADOS

Lengua negra: 0= negativo, 1= positivo

Lesiones orales: 0= negativo, 1= positivo.

Consumo de Cama: 0= <25% de cama en molleja, 1= > del 25% de cama.

Erosiones de molleja: 0=normal, 1= 25% erosión, 2= 50% erosión, 3= 75% erosión, 4= lesiones en capa muscular.

Proventrículo: 0= normal, 1= glándulas inflamadas, 2= glándulas inflamadas y alargadas, 3= glándulas muy alargadas y flácidas.

Intestino: 0= normal, 1= enteritis ligera en parte anterior, 2= enteritis moderada hasta parte media, 3= enteritis severa hasta parte posterior.

Contenido mucoso: 0=negativo, 1= exceso de moco en intestino.

Contenido acuoso: 0= negativo, 1= positivo.

Alimento sin digerir: 0= negativo, 1= positivo (alimento sin digerir en recto).

Cicatrices intestinales: 0=negativo, 1= positivo.

Lesiones Macroscópicas de *Eimeria spp*:

E. acervulina: 0= normal, 1= <5 esquizontes por cm², 2= >5 esquizontes por cm², 3= esquizontes coalescentes, 4= esquizontes coalescentes y mucosa muy afectada.

E. tenella: 0= normal, 1= petequias en sacos ciegos sin sangre en contenido, 2= sangre en contenido cecal, 3= sangre en contenido cecal + tiflitis, 4= sangre + material caseoso en contenido cecal + tiflitis.

E. maxima: 0= normal, 1= enteritis + poco material amarillento en intestino, 2= enteritis + material amarillento en intestino + petequias, 3= enteritis + contenido naranja + moco y petequias, 4= enteritis + contenido naranja en mayor cantidad + moco + petequias.

Valores en conteo de oocistos en Mc Master individual (oocistos por gramo de heces): 0 – 2,000 = Buen control de coccidia, >2,000 – 20,000 = Infección +, >20,000 – 50,000= infección ++, >50,000 – 100,000= infección +++ y > 100,000= infección ++++.

Software: La aplicación en Excel realiza los cálculos estadísticos y reporta tablas de resultados por granja examinada. Se pueden obtener gráficos de manera inmediata.

CONCLUSION

El monitoreo de Salud-gastrointestinal debe de ser una de las actividades prioritarias de cada empresa productora de pollo de engorda. La correcta evaluación de lo observado con esta técnica nos ayudara a evaluar daños al sistema digestivo con consecuencias en desempeño productivo. La metodología aquí descrita nos permite aportar

información al proceso de toma de decisiones en las empresas avícolas. Se recomienda incluir esta metodología en los procesos de capacitación y entrenamiento de personal involucrado en producción de pollo de engorda.

REFERENCIAS

1. Acevedo, H. A.; Romero, C.E. y Quintero, M.M. Manual de prácticas de parasitología y enfermedades parasitarias. F.M.V.Z. - U.N.A.M. 1990.
2. Braunius, W.W. Monitoring the biological performance in broilers, with special regard to subclinical Coccidiosis. Arc. Gef. 44: 183-187. 1980.
3. Braunius, W.W. Management strategy and monitoring. World Poultry. Coccidiosis (2):11-12. 1996.
4. Conway, D. Effects of different levels of oocyst inocula of *Eimeria cervulina*, *E. maxima* and *E. tenella* on plasma constituents, packed cell volume, lesion scores and performance in chickens. Av Dis. 37: 118-123. 1993.
5. Long, P. and Reid, M. A guide for the diagnosis of Coccidiosis in chickens. University of Georgia. Research report 404: 1-17. 1982.
6. Payne, A.M., Ring, A.W., Watkins, K.L., Louw, P.J., Trites, J.D., Rings, B.S., Stayer, P.A. and Rossi, A.R. The use of computer managed databases to monitor enteric health trends in the U.S. broiler industry. Proc. 39th AAAP Annual meeting. Luoisville, KY. 9-10. 1996.
7. Vega, S.C.A. The use of a database for poultry health monitoring in Mexico. Proceedings WPDC. 11-12. 1998.
8. Vega, S.C.A. Una metodología para el monitoreo en campo de las especies de *Eimeria spp* que afectan al pollo de engorda. XVII Congreso Latinoamericano de Avicultura. 2001.
9. Voeten, A.C. and Braunius, W.W. Subclinical coccidiosis in broilers: A comparative investigation of detection methods. Archiv f Geflugelk. 45: 189-193. 1981.
10. Williams, R.B. The epidemiology of Coccidiosis in chickens. World Poultry. Coccidiosis (2):9-10. 1996.

COMPORTAMIENTO DE LA ELIMINACIÓN DE OOQUISTES COMO HERRAMIENTA EN LA EVALUACIÓN DE UNA VACUNA CONTRA LA COCCIDIOSIS AVIAR EN AVES REPRODUCTORAS

OOCYST SHEDDING AS A TOOL IN THE EVALUATION OF A COCCIDIAL VACCINE IN BREEDERS

José Jesús Cabriales Jiménez

Departamento Técnico. Boehringer Ingelheim Vetmedica, Calle 30 N° 2614 Zona Industrial, Guadalajara Jalisco.
44940, E-mail: jcabrial@gua.boehringer-ingelheim.com

SUMMARY

Fresh feces and litter samples from breeders vaccinated against coccidiosis in the hatchery were obtained. Vaccination was orally given using a gel containing viable *Eimeria spp.* oocysts. Oocyst shedding in fresh feces peaked by the 3rd week, and it decreased in subsequent samplings. Oocyst counts in litter did not show a consistent pattern as that observed in the feces. Oocyst counts together with productive performance of the birds can be used as an aid to predict whether immunity exists against different *Eimeria* species, and whether the flock is protected against coccidiosis.

RESÚMEN

Se tomaron muestras de heces frescas y cama de aves reproductoras vacunadas contra la coccidiosis en la incubadora. La vacunación fue vía oral con un gel que contenía ooquistes viables de *Eimeria spp.* El nivel máximo de eliminación de ooquistes en heces frescas fue alrededor de la tercer semana y disminuyó en subsecuentes muestreos. Los conteos de ooquistes en cama no mostraron un patrón constante como el observado en heces frescas. Estos conteos, junto con el comportamiento productivo de las aves, pueden ayudar a predecir si existe inmunidad contra las diferentes *Eimerias* y la parvada está protegida contra esta enfermedad.

INTRODUCCIÓN

La coccidiosis aviar es la enfermedad parasitaria más importante a nivel mundial debido a las pérdidas económicas que ocasiona a la industria avícola. Estas pérdidas son atribuibles a los altos costos de medicación, al pobre desarrollo de las aves y a la mortalidad resultante de la enfermedad.

A través de los años ha surgido un gran interés sobre la respuesta inmune de las aves hacia las coccidias y con base en esto se ha desarrollado el uso de vacunas con ooquistes vivos. El objetivo de estas vacunas es inducir inmunidad protectora durante la vida productiva del ave y el principio de la vacunación se basa en la administración de pequeñas cantidades de ooquistes a las aves, con el objeto de estimular al sistema inmune. En el estudio de esta enfermedad, no se cuenta con las herramientas comercialmente disponibles para evaluar el grado de inmunidad conferida por la exposición de campo o por la vacunación. Las técnicas utilizadas para estudiar la inmunidad de las aves contra la coccidiosis demandan equipo y reactivos muy costosos que son utilizados con fines de investigación. Debido a que no se cuenta con una prueba de diagnóstico que indique el grado de inmunidad de las aves contra la coccidiosis, en el presente estudio se evaluó el comportamiento de la eliminación de ooquistes en parvadas de aves reproductoras vacunadas al día de edad con una vacuna comercial. Esto con el objetivo de establecer un patrón que sugiera que las aves vacunadas desarrollan inmunidad contra la enfermedad.

MATERIAL Y MÉTODOS

Se colectó la información necesaria para evaluar la inmunidad conferida por una vacuna comercial [Immucox-Reproductoras (Vetech Laboratories Inc.)] en diferentes parvadas de aves reproductoras criadas en distintas regiones de México. La vacuna contiene las siguientes especies de coccidia: *Eimeria acervulina*, *E. brunetti*, *E. maxima*, *E. necatrix* y *E. tenella*. Para el seguimiento de dichas parvadas se procedió a colectar muestras de heces frescas a los 5, 6, 7, 12, 13, 14, 19, 20, 21, 29, 35 y 42 días post-vacunación. También se colectaron muestras de cama a los 12, 13, 14, 19, 20, 21, 29, 35 y 42 días post-vacunación.

Estas muestras se tomaron directamente de las aves ejerciendo ligera presión en la región abdominal cerca de la cloaca o bien, se colectaron heces recién evacuadas. También se tomaron muestras de heces acumuladas en la cama en los tiempos que se mencionaron.

Las muestras se recolectaron en recipientes o frascos limpios y fueron conservadas en solución de Dicromato de Potasio al 2% en una relación de 1:5 como mínimo; es decir, una parte de muestra de heces más cinco partes de solución de Dicromato de Potasio.

ANÁLISIS DE LAS MUESTRAS

Estas se enviaron a diferentes laboratorios de diagnóstico para realizar la detección y conteo de ooquistes de las heces recolectadas a través de la prueba de McMaster.

RESULTADOS

Los resultados emitidos por el laboratorio fueron procesados para su presentación gráfica y se muestran en la figura 1. El gráfico muestra la cantidad de ooquiste detectados por gramo de muestra evaluada tanto en heces frescas como en las acumuladas en la cama en las diferentes edades en que se colectaron.

DISCUSIÓN

Al administrar pequeñas cantidades de ooquistes esporulados a las aves, se estimula al sistema inmune para montar la protección ante un desafío en campo. A nivel experimental se han llevado a cabo trabajos donde se administran pequeñas dosis de ooquistes de *Eimeria spp* que afectan a las aves, y se sabe que cada especie solo estimula la respuesta inmune contra la cual se ha inoculado, es decir: La respuesta montada contra *E. acervulina* solo protegerá ante desafíos contra la misma especie y no contra *E. tenella*, *maxima*, *necatrix* o *brunetti*. Por esta razón es importante estimular la inmunidad contra las especies de coccidia que afectan comúnmente a las aves.

En lo que se refiere a este trabajo, el comportamiento observado en la eliminación de los ooquistes en las diferentes parvadas, se observa un incremento en la eliminación de este parásito conforme a la edad de las aves. Lo anterior hace evidente que los parásitos vacunales tienen la capacidad de replicarse y llevar a cabo su ciclo de vida y estimular al sistema inmune del ave. El pico de eliminación de ooquistes se detectó alrededor de la tercer de edad (20 días) y disminuyó en el subsecuente muestreo (29 días de edad). Esto nos indica que la replicación de las coccidias vacunales estimulan la respuesta inmune de las aves que limita al parásito en su replicación dentro del hospedero.

Con base en este comportamiento de la eliminación de ooquistes y en la información anteriormente mencionada, podemos esperar que:

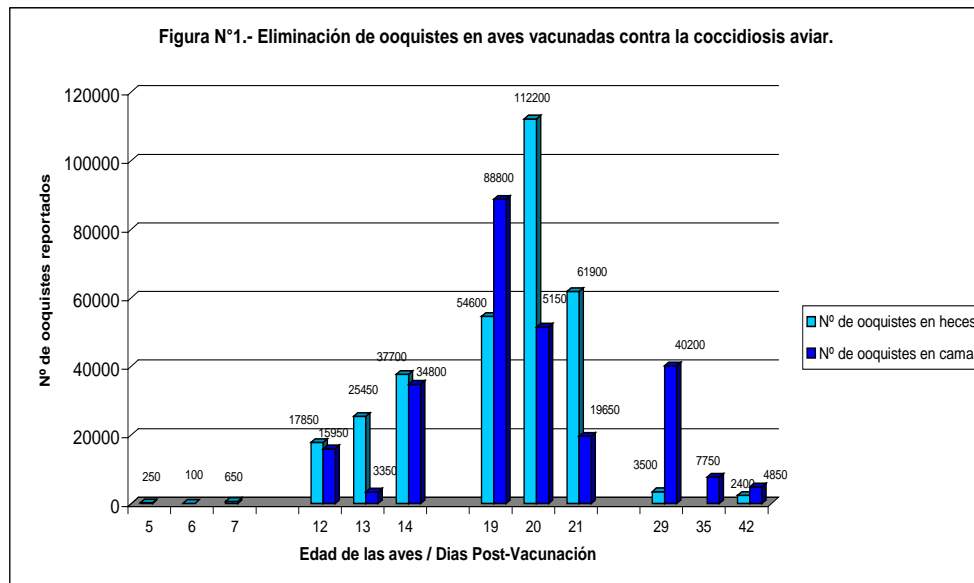
Las aves estén inmunes a posteriores desafíos por este parásito.

Las cepas vacunales de *Eimeria spp* presentes en la vacuna estén constantemente estimulando la inmunidad de las aves contra este parásito.

Que estas mismas cepas sustituyan a la población de coccidias presentes en la granja, es decir, cambiar la población nativa por cepas de baja patogenicidad que son sensibles a los anticoccidianos.

REFERENCIAS

1. Arakawa, A. and Xie, M. Q. Control of coccidiosis in chickens. *J. Protozool. Res.* 3 : 31 - 39. 1993.
2. Chapman, H.D. Biochemical, genetic and applied aspects of drug resistance in *Eimeria* parasites of the fowl. *Avian Path.* 26: 221 - 244. 1997.
3. Danforth, H.D.: Use of live oocyst vaccines in the control of avian coccidiosis: experimental studies and field trials. *International Journal for Parasitology* 28: 1099-1109. 1998.
4. Lillehoj, H.S. and Lillehoj, E.P. Avian Coccidiosis: a review of acquired Intestinal Immunity and vaccination strategies. *Avian Dis.* 44: 408 - 425. 2000.
5. Long, P.L.; Johnson, J.; McKenzie, M.E.; Perry, E.; Crane, M. ST. J. y Murray, P.K.: Immunization of young broiler chickens with low level infections of *Eimeria tenella*, *E. acervulina* or *E. maxima*. *Avian Path.* 15: 271 - 278. (1986).
6. McDougald, R.L. and Reid, M.W.: Coccidiosis. In *Diseases of Poultry*. Edited by Calnek, B.W. Barnes, H.J.; Berd, C.W.; Reid, M.W. and Yoder Jr., H.W. 10th edition. 865 - 883. *Iowa State University Press*. Ames Iowa. U.S.A. 1997.
7. Nakai, Y.; Uchida, T. y Kanazawa, K.: Immunization of young chickens by trickle infection with *Eimeria tenella*. *Avian Dis.* 36: 1034 - 1036. 1992.



EVALUACIÓN DE MORTALIDAD, LESIONES ENTÉRICAS Y COCCIDIOSIS EN POLLOS DE ENGORDA TRATADOS CON EXCLUSIÓN COMPETITIVA Y TOLTRAZURIL

EVALUATION OF MORTALITY, ENTERIC LESIONS, AND COCCIDIOSIS IN CHICKENS TREATED WITH COMPETITIVE EXCLUSION AND TOLTRAZUR

Jesús Corona^A, José Buitrón^A, Juan Carlos Rojas^B, Víctor M. Petrone^B.

^A Bayer de México SA de CV

^B Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia UNAM. 04510 México DF.

SUMMARY

Competitive exclusion using complete intestinal microflora in coccidia-vaccinated broilers at 1 day of age, together with toltrazuril, decreased coccidial numbers, and did not result in detrimental effects on the immune response. In addition, enteric lymphocyte infiltration in competitive exclusion-treated chickens suggests a higher level of protection against coccidia and other enteric pathogens like *Escherichia coli*, in the vaccinated chickens. Both the enteric immune response and the lower amount of coccidia resulted in lower mortality and a lesser use of antimicrobials in 7-week-old broilers.

RESUMEN

El uso de Exclusión Competitiva con microflora intestinal completa en pollo de engorda y vacunado contra coccidia al día de edad, junto con el uso de Toltrazuril disminuye las coccidias sin detrimento de la respuesta vacunal. Además la infiltración linfocítica entérica de los pollos con EC sugiere, una mayor protección contra coccidia en pollos vacunados y contra otros patógenos entéricos como *Escherichia coli*. La respuesta inmune entérica, y la menor cantidad de coccidias dio como resultado menor mortalidad y menor uso de antimicrobianos en pollos de engorda de siete semanas de edad.

INTRODUCCIÓN

La exclusión competitiva (EC) es la incapacidad de una población de bacterias patógenas para establecerse en el intestino del ave debido a la presencia de microflora natural normal, esta microflora forma un ecosistema balanceado y dinámico (bacterias, secreciones y peristaltismo) y esta formado principalmente por bacterias anaerobias. En los sistemas modernos de producción avícola es muy difícil desarrollar una microflora natural debido a la falta de contacto entre el pollito y la gallina madre, por lo tanto la colocación de pollitos en instalaciones

limpias y desinfectadas poco tiempo después de nacer brinda las condiciones para que las aves tengan poca oportunidad de adquirir la microflora intestinal que las protegería de una infección por enterobacterias patógenas como *Salmonella* spp (Nurmi & Rantala, 1973), el uso de la EC a base de microflora completa, es el único procedimiento basado en principios microbiológicos básicos que juega un papel integral en los programas de control, que es aceptado internacionalmente. Aun cuando el concepto se diseñó originalmente para controlar las infecciones por *Salmonella* spp, los experimentos han demostrado que los tratamientos de EC, con microflora completa, también protege a los pollos de engorde, reproductores y pavos, contra cepas patógenas de *Escherichia coli*, *Yersinia*, y *Campylobacter* spp. También se ha demostrado que disminuye la mortalidad atribuible a enteritis necrótica y a hepatitis, reduciendo los conteos de *Clostridium perfringens*.

Actualmente se destinan millones de dólares para el control de una de las enfermedades que resulta ser de las más importantes para la industria avícola como es el caso de la coccidiosis aviar, por lo que es de vital importancia evaluar nuevos métodos profilácticos como la vacuna contra coccidiosis para ayudar al control de este problema, un problema frecuente al que se enfrentan los usuarios de estas vacunas son las reacciones postvacunales y su repercusión en la inmunidad conferida al ave. El toltrazuril (TZ) es un potente coccidicida que se ha usado para tratar coccidiosis en pollo de engorda, ponedoras con crianza en piso, reproductoras y progenitoras, también se utiliza el TZ en programas para controlar las reacciones postvacunales, para cortar rápido el brote, el efecto del producto se fundamenta en la destrucción de todas las fases intracelulares del parásito, sin embargo existe también la preocupación errónea por parte del proveedor de la vacuna de que si acepta que se use TZ en reacciones postvacunales la vacuna sea totalmente destruida provocando una subexposición y

con ello una protección incompleta, según Sosa 1996 el mecanismo por el cual el TZ destruye todas las fases intracelulares es afectando la cadena respiratoria y a las enzimas involucradas en la síntesis de la pirimidina, sin modificar la estructura antigénica de las *Eimerias*. La exposición antigénica ante el sistema inmune se realiza y la protección se establece, por otro lado las fases extracelulares no se ven afectadas y pueden infectar a la célula del epitelio intestinal en cuanto el TZ ha sido ya eliminado permitiendo el refuerzo de la inmunidad

El objetivo del presente trabajo es evaluar el efecto de la EC y TZ sobre la mortalidad, conteo de ooquistes en heces e intracelulares, así como infiltración linfocitaria enterica en pollos de engorda vacunados contra coccidia

MATERIAL Y MÉTODOS

Se realizó un experimento de campo en una explotación comercial de pollo de engorda, con una duración de siete semanas. Los tratamientos fueron la aplicación de EC al día de edad en recepción asperjado con gota gruesa, aplicación de TZ y Amprolio en agua de bebida a partir del 12o. día de vida, el experimento abarcó del día de edad a las siete semanas de edad de los pollos

Instalaciones. Se utilizaron 6 casetas de ambiente natural de 10 x 140 m de una granja de crianza de pollo de engorda ubicada en el altiplano mexicano.

Pollos de engorda para la investigación. El experimento incluyó 84,800 pollos de estirpe Ross, vacunados contra coccidias en la incubadora vía aspersión. Los pollos se dividieron en las 6 casetas.

Inóculos. (EC). Flora intestinal completa proveniente de aves libres de patógenos específicos (Aviguard®. Bayer de México SA de CV, México DF) se utilizó 6.25 mg por pollo (media dosis recomendada por el fabricante). La flora de la EC se mezcló al 3% en agua potable libre de desinfectantes y se asperjó 1 litro para 4000 pollos. El Toltrazuril (Baycox®. Bayer de México SA de CV, México DF) se aplicó diariamente 7 mg/kg de peso vivo disuelto en el agua de bebida por dos días. *Amprolio* al 2.5% 1 lt./1000 lt de agua de bebida durante 4 días. *Sulfas con trimetropim* (ST) 180 g/1000 lt de agua durante tres días.

Diseño de tratamientos. Los se dividieron en dos grupos 1 y 2, de 42,600 pollos repartidos en tres casetas por grupo. Los se trataron de la siguiente manera. 1) EC al primer día de edad y TZ al día 12 de edad. 2) Amprolio y ST a los 12 y 21 días de edad respectivamente.

Recolección del dato de mortalidad y toma de muestras. Semanalmente se registro mortalidad y se tomó excretas para parasitología, así como órganos en formalina al 10% amortiguada a Ph 7.4. Los órganos tomados fueron secciones de parte media del asa proximal del duodeno, otra sección a un cm antes del

divertículo de Meckel y otra sección a dos cm antes del extremo de un ciego. También se hicieron un muestreo de la parte media transversal de la bolsa de cloacal (bolsa de Fabricio), el penúltimo lóbulo distal del timo, parte media trasversal del lóbulo derecho hepático y del lóbulo craneal renal.

Parasitología. Las muestras de excretas se evaluaron por medio de la técnica de Mac Master

Histología. Para la evaluación intestinal se dividieron los hallazgos en mucosas en: presencia de coccidias y infiltrado linfocítico. La presencia de coccidias se realizó el conteo del número de estructuras parasitarias presentes en el epitelio, subepitelio, glándulas y submucosa. De acuerdo al porcentaje de daño del tejido se asigno una calificación de 0-3, posteriormente se obtuvo el promedio de lesiones. Para la calificación final si esta se encontraba entre 0.1-1 el grado de daño era leve, de 1.1 a 2 moderado a, de 2.1 a 3 severo.

Análisis estadístico. La cantidad de aves muertas se evaluó por medio de la prueba de Xi cuadrada. La comparación de medias de la cantidad de coccidias en cama por medio de la prueba de T de Student. A los hallazgos histológicos se les aplico la prueba U de Mann Whitney. La significancia estadística se fijó con $P < 0.05$.

RESULTADOS

Mortalidad. La mortalidad a las 7 semanas de edad, fue significativamente mayor ($P < 0.05$) en el grupo 2 con 6.54.%, ya que en el grupo 1 fue de 5.34%.

Parasitología. El conteo de ooquistes en excremento mostró mayor cantidad ($P > 0.05$) en el grupo 2 en las semanas 2, 3, 6 y 7.

Histología. *Presencia de Eimerias intracelulares*. En duodeno, en el grupo 2 fue mayor solo en la semana 4 de edad. En yeyuno, el grupo 1 tuvo mayor cantidad de *Eimerias* intracelulares en la semana 1 de edad; sin embargo, el grupo 2 en las semanas 3 y 4. En la semana 4 del grupo 2 se observaron *Eimerias* intracelulares dentro de las glándulas del yeyuno. En ciego, el grupo 1 solo presentó escasa cantidad de *Eimerias* intracelulares en la semana 1. El grupo 2 presentó *Eimerias* intracelulares de la semana 4 a la 7, con cantidad significativa ($p < 0.05$) en las semanas 4 y 6.

Infiltrado linfocitario. En duodeno, en el grupo 1, se encontró mayor cantidad ($p < 0.05$) de infiltrado en la semana 1, mientras que en el grupo 2 se presentó mayor infiltrado ($P < 0.05$) en la semana 4. En yeyuno, en el grupo 1, se encontró infiltrado desde la semana 2 de edad; sin embargo, en la semana 4 el grupo 2 presentó mayor cantidad ($P < 0.05$) que el grupo 1. En ciego, el grupo 1 mostró infiltrado linfocitario desde la semana 1 de edad, siendo significativamente mayor en las semanas 1, 2 y 5; mientras que el grupo 2 exhibió

infiltrado desde la semana 3 de edad, presentando mayor cantidad ($p < 0.05$) en la semana 6.

DISCUSIÓN Y CONCLUSIONES

La diferencia en la mortalidad entre los grupos parece ser consecuencia del tratamiento aplicado al grupo 1, donde la combinación de la EC y TZ jugaron un papel importante en la protección del epitelio intestinal, la estimulación antigénica y la disminución de población de coccidias sobre todo en yeyuno y ciegos a partir de la tercera semana coincidiendo con Feeding Times 1997.

El conteo de ooquistes en excremento en el grupo 1 fue menor que en el grupo 2, en la mayoría de las semanas, con excepción de la semana 1. La escasa cantidad de ooquistes encontrada en el grupo 1 en la semana 1 favorece la inmunidad producida por la vacuna anticoccidial; sin embargo, a partir de la segunda semana se encontraron conteos bajos de ooquistes en el grupo 1, estos hallazgos son consecuencia del tratamiento con TZ; mientras que en el grupo 2 se observa conteo alto de ooquistes para pollos de tres semanas de edad, por consecuencia este grupo además de ser tratado con amprol recibió un tratamiento adicional con ST en la tercer semana para disminuir la población coccidial esperada en pollos de engorda vacunados contra coccidia, con lo que se logro tener cantidades de coccidias similares en excremento al grupo 1 en la semana 4.

En la cantidad de Eimerias intracelulares observadas en el análisis histológico, en duodeno del grupo 1 solo se observaron Eimerias intracelulares en la quinta semana, mientras que en el grupo 2 se observó en la cuarta y quinta. En yeyuno y ciego del grupo 1 se observaron Eimerias intracelulares en la primera semana, mientras que en el grupo 2 no se encontraron Eimerias intracelulares, esto sugiere que la inmunidad contra *Eimeria maxima* y *E. tenella* se favoreció en los pollos tratados con EC; ya que después de la semana 2 solo se encontró en el grupo 1 Eimerias intracelulares en la semana 5 en yeyuno, sin que hubiera diferencias significativas con las encontradas en el grupo 2; mientras que en el grupo 2 se encontraron Eimerias intracelulares en yeyuno de la semana 3 a la semana 5 y en ciego desde la semana 4 hasta el final del experimento. Además en el grupo 2 en yeyuno en la semana 4 se encontraron *E. maxima* invadiendo glándulas. La escasa presencia de Eimerias intracelulares entéricas en el grupo 1 se puede explicar por la inmunidad producida por la vacuna y por el tratamiento de EC con TZ, aparentemente la EC

favoreció la respuesta vacunal la primera semana, mientras que el TZ disminuyo la población de coccidias tanto en heces como intracelulares no afectó negativamente a la inmunidad en las semanas posteriores. También en el análisis histológico se encontró infiltrado linfocitario en duodeno, las dos primeras semanas en el grupo 1, lo que corresponde a una respuesta inmune vacunal ayudada por la EC, después de la tercera semana no hay diferencia en infiltrado entre ambos grupos. El infiltrado linfocitario en yeyuno en el grupo 1 apareció desde la segunda semana, mientras que en el grupo 2 inicio en la tercera semana. Este infiltrado en yeyuno en la semana 3 y 4 fue significativamente mayor en el grupo 2 comparado con el grupo 1, este hallazgo se debe a la invasión coccidiana intracelular que en la semana 4 incluso llevo a afectar las glándulas de la mucosa del yeyuno, la invasión intracelular de coccidias en ciego se observo en grupo 1 desde la primera semana siendo su maxima cantidad en la semana 5. Esta gran cantidad de coccidias intracelulares cecales en la semana 5 del grupo 1 se observa con ausencia de coccidias lo que sugiere que es debido a l tratamiento con EC. en este hecho la EC pareció jugar un papel importante para la nula colonización de coccidias en ciego.

Mientras que en el grupo 2 a pesar de los tratamientos anticoccidiales se observaron coccidias de la semana 4 a la 7 en ciego, y en la semana 6 se encontró mayor infiltrado linfocitario en ciego lo que parece corresponder a la mayor cantidad de coccidias cecales y no a una respuesta vacunal.

REFERENCIAS

1. Nurmi, E. and M. Rantala. New aspects of *Salmonella* infection in broiler production. Nature 241:210-211. 1973.
2. Sosa, J. J., R. Espinosa y M..A. Rebollo. Efecto de Toltrazuril sobre la protección contra coccidiosis en gallinas reproductoras pesadas: prueba de campo. 45 th World Poultry Disease Conference; 1996 3-6 mayo; Cancún. México. Asociación Nacional de Especialistas en Ciencias Avícolas y World Poultry Disease Conference. pp. 438-440, 1996.
3. Victoria G., E. Pavon, M. Rebollo, C.A. de Torres y R. Vazquez. Efecto del toltrazuril como tratamiento postvacunal de coccidiosis aviar en pollo de engorda en comparación con amprolio, y su consecuencia sobre la inmunidad. 45th Western Poultry Disease Conference; 1996 3-6 mayo; Cancún. México. Asociación Nacional de Especialistas en Ciencias Avícolas y WPDC. pp. 112-115. 1996.

Cuadro 1. Media de ooquistes de *Eimeria* spp en heces e intracelulares entericas, asi como infiltrado linfocitario en mucosa entérica de pollos de engorda tratados con exclusión competitiva, toltrazuril, amprolio y Sulfas con trimetoprim.

	Ooquistes en Heces	Eimerias spp intracelulares Entéricas			Infiltrado linfocitario En mucosa entérica		
		Duodeno	Yeyuno	Ciego	Duodeno	Yeyuno	Ciego
Semana 1							
EC ¹ y TZ ²	200	0	0.2 ^a	0.16	0.3 ^a	0	0.4
AP ³ y ST ⁴	200	0	0b	0	0b	0	0
Semana 2							
EC ¹ y TZ ²	617 ^a	0	0	0	0.1 ^a	0.5 ^a	0.5 ^a
AP ³ y ST ⁴	3767b	0	0	0	0a	0b	0b
Semana 3							
EC ¹ y TZ ²	983 ^a	0	0a	0	0.5	0.2 ^a	0.5
AP ³ y ST ⁴	8800b	0	0.15b	0	0.4	0.9b	0.7
Semana 4							
EC ¹ y TZ ²	7400	0	0.05 ^a	0a	0.5 ^a	0.4 ^a	0.8
AP ³ y ST ⁴	7083	0.3	0.83b	1b	0.8b	0.7b	0.6
Semana 5							
EC ¹ y TZ ²	2350	0.15	0.6	0	0.8	0.9 ^a	2 ^a
AP ³ y ST ⁴	3966	0.1	0.42	0.16	0.8	1.3b	0.6b
Semana 6							
EC ¹ y TZ ²	263	0	0	0a	0.7	1	0.8 ^a
AP ³ y ST ⁴	400	0	0	1.5b	0.7	0.7	1.3b
Semana 7							
EC ¹ y TZ ²	33 ^a	0	0	0a	0.5	0.6	0.5 ^a
AP ³ y ST ⁴	267b	0	0	0.5b	0.7	0.8	0.9b

Literales distintas dentro de la misma semana y columna indican diferencia estadísticamente significativa (p<0.05). ¹ Exclusión competitiva. ² Toltrazuril. ³ Amprolio. ⁴ Sulfas con Trimetoprim.

USE OF DICLAZURIL FOR THE PREVENTION OF COCCIDIOSIS IN TURKEYS

EL USO DEL DICLAZURIL PARA LA PREVENCIÓN DE LA COCCIDIOSIS EN PAVOS

Lanny M. Howell

Schering-Plough Animal Health, 77 Kensington Dr., Bella Vista, AR. 72714

RESUMEN

El diclazuril es un potente compuesto sintético que produce un efecto coccidicida sobre las especies de *Eimeria*. Recientemente se aprobó su uso en pavos en Estados Unidos bajo el nombre comercial Clinacox*. Los resultados de las pruebas realizadas en batería y de los trabajos confirmatorios, demostraron que el

diclazuril a razón de 1 ppm en el campo es efectivo contra infecciones sencillas o mixtas de especies de *Eimeria* en pavos. Los estudios de seguridad demostraron que los pavos cuya ración estaba medicada continuamente con 25 ppm de diclazuril durante 16 semanas, o con 100 ppm durante 7 días consecutivos, no mostraron signos anormales ni efectos

colaterales. En las especies para las cuales no está diseñado el producto (patos, caballos, conejos, bovinos y perros) los estudios de tolerancia con diclazuril a dosis de 1 ppm o más no revelaron efectos adversos.

Recently Clinacox™ was approved in the United States for the prevention of coccidiosis in growing turkeys caused by *Eimeria adenoeides*, *E. gallopavonis*, and *E. meleagrimitis*. The active ingredient of Clinacox is diclazuril, which is a potent synthetic compound that produces a cidal effect on the *Eimeria* species.

EFFICACY

Nineteen battery trials were conducted in two geographic locations to evaluate the efficacy of diclazuril in turkeys against single and mixed infections of three *Eimeria* specie. Two-week-old turkey poults were fed diets containing 0.0 ppm, 0.5 ppm, 1.0 ppm or 1.5 ppm diclazuril. Each treatment was replicated at least four times and contained 10 birds per treatment group. Birds were experimentally infected with the appropriate *Eimeria* species and necropsied six days later. Variables evaluated to determine anticoccidial efficacy were reduction in fecal scores, weight gains, feed consumption, and coccidiosis mortality. A subjective scoring system to evaluate the litter fecal consistency which assigned a score of 1 when being normal, 2 when being slightly watery, 3 when being moderately water and 4 when being severely watery were used to score fecal droppings.

The results from these trials demonstrated that diclazuril is effective at 0.5 ppm, 1.0 ppm and 1.5 ppm against single or mixed infections of *Eimeria* spp in turkeys. The lowest dose to provide optimal anticoccidial efficacy is 1.0 ppm.

Two floor pen trials were conducted to confirm the efficacy of 1.0 ppm diclazuril against mixed *Eimeria* species under simulated commercial conditions. In each trial, turkeys were infected with different field isolates of *E. adenoeides*, *E. gallopavonis* and *E. meleagrimitis* at 14 or 21 days of age. Turkeys were fed non-medicated diets until the days of challenge, and then 0 or 1.0 ppm diclazuril were administered in their diets until market weight was reached.

In both trials the fecal scores of diclazuril-medicated group were statistically lower ($P \leq .001$) than scores in the non-medicated group. Weight gain was calculated from the time of inoculation to seven days post infection. Weight gains were significantly improved in both trials when birds were medicated with diclazuril over the non-medicated group. The diclazuril treated birds exhibited no mortality due to coccidiosis, while the birds in the non-medicated groups exhibited an average mortality due to

coccidiosis of 14.75% and 17.6% at the locations respectively.

Two studies were conducted to confirm the safety and efficacy of diclazuril under commercial conditions. In the first trial, approximately 57,000 mixed-sex (29,000 toms and 28,000 hens) were divided between two brooder houses. At 5 weeks of age they were moved to four growout houses. One-half of the turkeys were fed 1.0 ppm diclazuril from day one of age until slaughter. The other half received the standard anticoccidial and growth promotion feed medication program used at the site. Hens were slaughtered at 14 weeks and toms were slaughtered at 20 weeks of age. In the second trial approximately 11,200 tom turkeys were involved and were marketed at 18 weeks of age.

In both trials, mortality, average market weight, net weight marketed and feed conversion were improved in the diclazuril treated birds in spite of the presence of a growth promotant in the control ration. No adverse reactions or evidence of coccidiosis were observed in any of the groups.

SAFETY

An experiment was conducted to evaluate the tolerance and safety of diclazuril in growing males and female turkeys under simulated field conditions. Diclazuril was administered in the feed at 1.0 ppm, 12.5 ppm, and 25 ppm for 16 week commercial growing period. Turkeys treated with diclazuril were compared to untreated control birds. Tolerance and safety were evaluated and based upon: clinical observations, mortality, hematology, serum biochemistry and histopathology. No significant drug-related adverse effects were observed in any of the treatment groups.

In another study, 30 turkeys were divided into 3 groups of 10 birds each, and dosed in the feed at 0 ppm, 10 ppm or 100 ppm for 7 consecutive day. Prior to, during and after the treatment period, no abnormal signs or side-effects were observed in any of the birds.

Additional studies performed in broiler breeders and broiler chickens demonstrated diclazuril to be safe. In non-target species tolerance studies were conducted in ducks, horses, rabbits, cattle, and dogs at use level and higher. In all the studies it was concluded that diclazuril caused no adverse effects.

CONCLUSIONS

Based on the results of the battery and confirmatory studies, it is concluded that diclazuril at the 1.0 ppm level administered in the feed is highly effective in preventing coccidiosis in turkeys. In addition, the results from the safety studies in turkeys as well as non-target species demonstrate that diclazuril is highly safe.

CONTROL OF HISTOMONIASIS IN CHICKENS AND TURKEYS

CONTROL DE LA HISTOMONIASIS EN POLLOS Y PAVOS

L. R. McDougald

Department of Poultry Science, University of Georgia, Athens GA 30602 USA

RESUMEN

Parece que el resurgimiento reciente de brotes de cabeza negra en pollos y pavos no se debe a un cambio en la virulencia de *Histomonas* ni a un aumento en la exposición al vehículo biológico (gusano cecal). La virulencia para el pollo se exagera mediante la exposición concurrente a dosis bajas de coccidia cecal. No existen vacunas ni tratamientos efectivos contra la cabeza negra. Una prueba realizada con los antibióticos y los anticoccidianos disponibles mostró poco valor contra esta enfermedad en pollos, o bien su valor fue nulo. Los programas de restricción alimenticia en reproductoras contribuyen a diseminar la infección en toda la parvada debido a una modificación en el pH del buche y la molleja, permitiendo la transmisión directa de ave a ave.

Blackhead disease, caused by *Histomonas meleagridis*, is a common parasite of chickens, turkeys, and pet birds in the Americas, and to a lesser extent, in other countries. Until recently, the disease was held under control by a combination of management, separation of chicken and turkey flocks, and highly effective medications available for treatment. In the mid-late 1990s, clinical outbreaks of blackhead became common in chickens, particularly broiler-breeder pullets and layer pullets. More recently, devastating outbreaks were reported in growing turkeys and turkey breeder hens. The reasons for these outbreaks remain unclear, but have prompted renewed research to address the causes and to look for possible remedies. Several possible causes of increased outbreaks were considered:

Increased virulence of *Histomonas* Isolates?

Several isolates of *H. meleagridis* were obtained from field outbreaks in Georgia in breeder pullets and layer pullets, cultured *in vitro*, and tested by rectal inoculation of 2-wk-old broiler chicks or turkey poults. These isolates behaved as expected: Turkeys died of infection after 2-3 weeks, with severe cecal and liver lesions. Chicks developed severe cecal lesions, but only occasional mild liver lesions. At this point, there is no evidence for a change in virulence.

Increased exposure to *Heterakis* worm eggs?

The cecal worm is widespread and common in facilities used for rearing broiler breeder pullets and layer pullets, as reported by other workers (2). There is

no reason to think that this situation has changed in the last 30 or so years. Turkeys are typically kept free of blackhead by eliminating exposure to carriers of cecal worms (chickens). Thus, outbreaks have been rare and involved only a small number of birds. Recent outbreaks, wherein blackhead disease spread explosively through flocks of turkeys resulting in extremely high mortality, suggest that unknown factors are influencing the horizontal spread of infection once introduced into a flock. Some have suggested that previously unreported, non-cecal worm, carriers might be involved, because it is difficult or impossible to isolate *Heterakis* worms from turkey flocks suffering blackhead disease, but experimental efforts have thus far been unsuccessful (5).

Interaction with other diseases: The marked increase in clinical outbreaks in breeder pullets came at a time when the industry was being ravaged by other diseases known to affect immune competence. At this time, we do not have any experimental results to support this supposition. However, a considerable body of research indicates that *H. meleagridis* needs certain microflora for full virulence (1,6). On this basis, there is every reason to suspect that other intestinal diseases which disrupt the normal microflora may somehow aid *H. meleagridis* in colonization or in spread to the liver. Recent work in our laboratory demonstrated that small doses (1000 oocysts) of the cecal coccidium, *Eimeria tenella*, when given to young chicks concurrently with exposure to cultured *H. meleagridis*, increased the number and severity of liver lesions, and the % of birds showing liver lesions. We used this interaction as a model for subsequent studies, for induction of liver lesions in chickens (4). The reason for this interaction was unclear, as treatment with highly effective anticoccidials to prevent development of the coccidia beyond the sporozoite stage was generally ineffective in preventing this interaction (Table 1). The possible interaction of blackhead with coccidia in turkeys has not been reported, but these studies are underway in our laboratory.

Management: On the surface, it would seem like a long shot, but there have actually been changes in management of broiler breeder pullets in recent years which could contribute to susceptibility to blackhead. A research report by Lund (3) examined the potential

for bird-to-bird spread of blackhead disease in chickens and turkeys. He found that oral administration of droppings from diseased birds rarely initiated disease. The trophozoites of *H. meleagridis* present in droppings are fragile, and easily destroyed in the crop or gizzard. The only way disease could be transmitted in this way was to *starve the birds for several hours prior to inoculation, totally altering the pH of the crop and gizzard*. He concluded that bird-to-bird transmission in this way was unlikely *as long as birds were well-fed* and cared for. Obviously, Lund did not consider the (future) use of feed restriction or skip-a-day feeding as a management program for breeder pullets. Research is underway in our lab to measure the potential for these practices to contribute to the bird-to-bird spread of blackhead disease in young chickens and turkeys. The reliance on feed deprivation as a management tool in breeder pullets for both chickens and turkeys, and the lack of drugs to treat these infections, does not bode well for future control of blackhead in these birds.

Treatment: At present there are no effective products available for treatment of clinical outbreaks of blackhead in chickens or turkeys. Histostat (nitarsonic or 4-nitrophenylarsonic acid) is still available and works well as a preventive. Attempts to use 3-Nitro (roxarsone or 3 nitrophenylarsonic acid) are not founded on scientific evidence. In fact, Dr. Neal Morehouse, the discoverer and developer of arsenical compounds at Salsbury Laboratories wrote in 1955 (report to the Iowa Academy of Sciences) that while 4-Nitro was a highly effective preventive for blackhead, 3-Nitro had no demonstrable activity. Recent tests in our laboratory confirm this finding (Table 1).

Possible Treatment with Existing Products: We recently conducted a series of tests to determine whether any commonly available feed or water additives offered any protection against blackhead disease in chickens. We tested several feed and water preparations of antibiotics, as well as representative types of anticoccidials, in the feed. The model described above was used, wherein concurrent inoculations with the cecal coccidium *E. tenella* was given with *H. meleagridis* to induce liver lesions in chickens. The antibiotics tested were bacitracin, virginiamycin, sarafloxacin, penicillin, chlortetracycline, tylosin, and apramycin. Anticoccidials tested were salinomycin, roxarsone, lasalocid, nicarbazine, and diclazuril. The results are summarized in Table 1. None of the products had any appreciable or consistent effect on cecal lesions due to histomoniasis, and most had little or no effect on liver lesions or weight gains. Bacitracin and nicarbazine, for reasons that were not clear, had a small but consistent effect on liver lesions, but were not curative. Previous studies had shown that apramycin, an antibiotic used

mostly in swine, at high levels had strong preventive effects on experimental histomoniasis in turkey poults, but here did not protect chickens. Carbadox, a product used mostly for growth promotion in swine, had significant antihistomonal activity *in vitro*, but did not protect chickens from blackhead.

Other experimental chemotherapy: New products are needed for control of blackhead disease in chickens and turkeys. Toward this end, we are testing compounds reported in the literature as having antiprotozoal activity, particularly against *Entamoeba* and *Trichomonas*. Most of these compounds, some of which are currently used in human medicine, also possess antihistomonal activity *in vitro*. Tests are underway to characterize these compounds *in vivo*, but unless commercial sponsors are attracted, they are unlikely to be available for use in food-producing animals.

Summary and Conclusions:

1. The recent outbreaks of blackhead disease in chickens and turkeys do not appear to be caused by a change in virulence of *H. meleagridis* or of a change in exposure to the carrier *Heterakis gallinarum*.

2. Virulence of *H. meleagridis* is enhanced by the concurrent light infection with other organisms, such as cecal coccidia (*Eimeria tenella*), possibly by altering cecal microflora, or disruption of the mucosa.

3. There are no approved drugs for treatments of outbreaks in chickens or turkeys, and vaccination is not possible for *H. meleagridis*.

4. Tests with roxarsone failed to show any beneficial effects on blackhead in chickens.

5. Tests with 5 representative anticoccidials and 7 antibiotics administered in feed or water failed to show any important benefits on blackhead in chickens, with the possible exception of bacitracin when used at high levels (100-300 g/ton in feed).

6. Feed restriction programs in broiler breeder pullets and turkey hens may contribute to the susceptibility of these birds to blackhead disease, and may contribute to spread of disease through a flock.

REFERENCES

1. Bradley, R.E., and W.M. Reid. Histomonas meleagridis and several bacteria as agents of infectious enterohepatitis in gnotobiotic turkeys. *Exp. Parasitol.* 19: 91-101. 1962.
2. Hegngi, F.N., J. Doerr, T.S. Cumings, R.D. Schwartz, G. Saunders, A. Zajac, C.T. Larsen and F.W. Pierson. The effectiveness of benzimidazole derivatives for the treatment and prevention of histomoniasis (blackhead) in turkeys. *Vet. Parasitol.* 81: 29-37. 1999.
3. Lund E.E. Oral transmission of Histomonas in turkeys. *Poultry Sci* 34: 900-904. 1956.

4. McDougald, L.R. and J. Hu. Blackhead disease (*Histomonas meleagridis*) aggravated in broiler chickens by concurrent infection with cecal coccidiosis (*Eimeria tenella*). *Avian Dis.* 45: 307-312. 2001.

5. Norton, R.A., F.D. Clark, and J.N. Beasley. An outbreak of histomoniasis in turkeys infected with a

moderate level of *Ascaridia dissimilis* but no *Heterakis gallinarum*. *Avian Dis* 43: 342-348. 1999.

6. Springer, W. T., J. Johnson, and W. M. Reid. Histomoniasis in gnotobiotic chickens and turkeys: Biological aspects of the role of bacteria in the etiology. *Exp. Parasitol.* 28: 383-392. 1970.

Table 1. Test of anticoccidials and antibiotics against *Histomonas meleagridis* in chickens *

Treatment ^A			Infection ^B	Wt Gain(g)	Liver Score ^C	Cecal Score ^D
Product	Route	Level(ppm)				
Unmed	-	-	-	749	0	0
Unmed	-	-	His + Coc	616	0.93	3.66
Bacitracin	Feed	50	His + Coc	604	0.51	3.44
"	"	100	His + Coc	622	0.34 *	3.76
"	"	200	His + Coc	647	0.31 *	3.71
"	"	300	His + Coc	636	0.44 *	3.69
Unmed	-	-	-	858	0	0
Unmed	-	-	His + Coc	770	1.37	3.74
Apramycin	Water	75	His + Coc	703	0.77	3.63
"	"	150	His + Coc	787	1.18	3.56
"	"	300	His + Coc	701	0.47 *	3.40
Unmed	-	-	-	721	0	0
Unmed	-	-	His + Coc	588	0.93	3.64
Carbadox	Water	100	His + Coc	602	0.50 *	3.67
Unmed	-	-	-	716	0	0
Unmed	-	-	His	609	0.58	3.67
Unmed	-	-	His + Coc	587	0.82	3.63
Penicillin	Water	100	His + Coc	649 *	0.78	3.44
Chlortetracycline		100	His + Coc	618 *	1.14	3.68
Tylosin	Water	110	His + Coc	658 *	0.91	3.90
Sarafloxacin	Water	40	His + Coc	656 *	1.06	3.21
Unmed	-	-	-	702	0	0
Unmed	-	-	His	641	0.18	3.59
Unmed	-	-	His + Coc	617	0.84	3.63
Diclazuril	Feed	1	His + Coc	557	0.78	3.74
Salinomycin	Feed	66	His + Coc	514	0.54	3.78
Roxarsone	Feed	50	His + Coc	577	0.61	3.43
Lasalocid	Feed	100	His + Coc	594	0.68	3.86
Nicarbazine	Feed	125	His + Coc	524	0.48 *	3.52

* Means with asterisk indicate significant improvement in comparison with mean from control group in the same column.

^A Treatments were given in the feed or water from 2 days pre-exposure to termination 14 days post-exposure.

^B Infections consisted of 1×10^3 sporulated oocysts of *Eimeria tenella* and/or 1×10^5 cultured cells of *H. meleagridis* given when birds were 14 days old.

^C Liver lesions caused by *H. meleagridis* were graded on a subjective scale of 0-4, where 1=1 or few small lesions, 2=several small-mid sized lesions, 3=moderate number of mid-sized lesions, and 4=many lesions of all sizes mottling the organ.

^D Cecal lesions caused by *H. meleagridis* were graded on a subjective scale of 0-4, where 1= some thickening of the mucosa with scattered petechial foci, 2= moderate thickening of cecal mucosa, with pronounced reddening and sometimes blood, 3= pronounced thickening of mucosa, with sloughing of mucosa, and formation of a caseous core, and 4= ceca enlarged and engorged with a caseous core made up of sloughed mucosa and serous exudates. These lesions are accompanied by dark red inflammation of the mesenteries around the intestine.

PRIMER HALLAZGO EN MÉXICO DEL ÁCARO *PTERYGOCRUSOLICHUS CHANAYI* EN GUAJOLOTES DE MÉXICO

FIRST REPORT IN MEXICO OF THE MITE *PTERYGOCRUSOLICHUS* *CHANAYI* IN TURKEYS

Ma.Teresa Quintero M.

Departamento de Parasitología, Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia, U.N.A.M. Coyoacán, C.P. 04510
México D.F.

SUMMARY

This paper reports the presence of mites characterized as *Pterygocrusolichus chanayi* (Trouessart), family *Pterolichidae*, in turkey feathers. Mites were found in turkeys in Palizada, Campeche, Mexico, suffering feather loss. Mites were fixed using Hoyer's fluid, to be further analyzed under the light microscope. This particular mite has been isolated elsewhere from both domestic and wild turkeys. Nevertheless, this is the first report of its presence in Mexican turkeys.

RESUMEN

En el presente trabajo se comunica la presencia de ácaros en plumas de guajolotes, a los que se determinó como *Pterygocrusolichus chanayi* (Trouessart) pertenecientes a la familia *Pterolichidae*, los ácaros fueron encontrados en guajolotes de Palizada, Campeche, México, que presentaban caída de plumas, con los ácaros encontrados se realizaron preparaciones empleando líquido de Hoyer y más tarde se observaron al microscopio compuesto. Estos ácaros, han sido aislados de guajolotes domésticos y silvestres sin embargo esta la primera vez que se comunica presencia en guajolotes de México

INTRODUCCIÓN

Los ácaros de las plumas de guajolotes constituyen una gama de diversos géneros y especies pertenecientes a diversas familias, entre las que se encuentra la familia *Pterolichidae* en la que se incluyen al género *Pterolichus* entre otros. En el presente trabajo se comunica la presencia de ácaros en plumas de guajolotes a los que se determinó como *Pterygocrusolichus chanayi*

MATERIAL Y METODOS

El material consistió en plumas separadas de guajolotes criados en Palizada, Campeche, los guajolotes mostraban caída de plumas, dichas plumas

fueron transportadas al laboratorio a donde se les examinó bajo el microscopio, estereoscópico, de las plumas positivas a ácaros se fueron separando éstos y se les montó entre porta y cubreobjetos empleando líquido de Hoyer

RESULTADOS

Al realizar la observación de las preparaciones obtenidas, bajo el microscopio compuesto, se llegó a la conclusión de que se trataba de ácaros de la familia *Pterolichidae* y se les identificó como *Pterygocrusolichus chanayi* (Trouessart and Megnin) se encontraron ácaros en todas sus fases evolutivas. Según Gaud y Atyeo, 1996 estos ácaros se caracterizan por presentar epímeros libres no articulados, asimismo presentan un par de sedas verticales; una característica sobresaliente en el macho es que presentan los fémures de las patas I Y II expandidos, así como que las patas posteriores son sublaterales, estos ácaros han sido encontrados en guajolotes domésticos y en silvestres.

DISCUSION Y CONCLUSIONES

La importancia de esta comunicación, radica en el hecho de que estos ácaros pudieran estar provocando la caída de plumas; los ácaros encontrados se caracterizan. Al parecer esta es la primera vez que se identifica a este ácaro en México por lo que deberá ponerse atención sobre el diagnóstico de estos ácaros a fin de no confundirlos con otros muy cercanos como son los del género *Pterolichus* y asimismo establecer el daño que estos organismos causen en las plumas de guajolotes.

REFERENCIAS

1. Gaud, J. and Atyeo W. Feather mites on the world (Acarina, Astigmata) Ann Zoologische Wetenschappen 277:100 1996.

USING GEOGRAPHIC INFORMATION SYSTEM (GIS) TECHNOLOGY TO DETERMINE THE LOCATION OF COMMERCIAL POULTRY FLOCKS, SUPPORT INDUSTRY AND LIVE BIRD MARKET SYSTEM COMPANIES, DEALERS AND MARKETS IN PENNSYLVANIA

USO DE LA TECNOLOGÍA DEL SISTEMA DE INFORMACIÓN GEOGRÁFICA (GIS) PARA DETERMINAR LA UBICACIÓN DE LAS PARVADAS COMERCIALES Y APOYAR A LA INDUSTRIA, LAS COMPAÑÍAS, LOS DISTRIBUIDORES Y LOS MERCADOS DE AVES VIVAS EN PENNSYLVANIA

Sherrill Davison, Robert J. Eckroade, Susan W. Casavant, Stephen Gallo

University of Pennsylvania, School of Veterinary Medicine, Laboratory of Avian Medicine and Pathology, New Bolton Center, 382 West Street Road, Kennett Square, PA 19348

RESUMEN

La tecnología *GIS* es una herramienta computarizada para el mapeo y análisis de datos que permite ayudar a predecir los resultados y a planear estrategias de control. Históricamente se han presentado brotes de enfermedades capaces de afectar a numerosas parvadas en toda un área geográfica. Para determinar el área potencial de diseminación de una enfermedad, antes era necesario que una persona localizara las granjas cercanas a las parvadas infectadas recorriendo el área en automóvil y detectándolas visualmente. El uso de la tecnología *GIS* permite el acceso más fácil y rápido para localizar e identificar las instalaciones avícolas circundantes, pudiendo crear con facilidad las zonas de acción preventiva alrededor de las parvadas para propósitos cuarentenarios. Esta información permitirá obtener una respuesta más rápida en los esfuerzos de control.

Geographic Information System (GIS) Technology is a computer-based tool for mapping and analyzing data to assist in predicting outcomes and planning control strategies. This technology has been used not only in city and county governments but also in farming, public safety, marketing, and telecommunication companies. Parameters such as soil types, crime patterns, and customer sales have been tracked and analyzed.

Historically, the Pennsylvania poultry industry has experienced outbreaks of diseases such as avian influenza, *Mycoplasma gallisepticum*, and infectious bronchitis. These outbreaks have affected many flocks throughout a wide geographical area. To determine the potential area spread of a disease in the past a person needed to locate poultry flocks near infected flocks by

driving in the area and visually locating poultry facilities. The use of GIS technology allows for easier and quicker access to the location and identification of surrounding poultry facilities. This information will allow a more rapid response in control efforts for avian influenza or other diseases. Buffer zones around infected flocks for quarantine purposes are easily created. In addition, this system will allow for the analysis of data such as the type of bird affected or the companies involved. Trucking routes for feed, bird and egg trucks, and schedules of service personnel may be integrated into the program. This data analysis is essential to understanding whether spread of disease is mechanical in nature (i.e. personnel or vehicles).

GIS technology also graphically presents features that may either be beneficial or detrimental to disease control. The relational mapping of physical barriers such as rivers, mountains or highways can show limitations to disease spread. On the other hand, during the most recent outbreak of avian influenza, wind was a factor in the transmission of disease to neighboring poultry premises. Wind direction can be included as part of an epidemiological study. Temperature and humidity data may also be useful parameters in the analysis of spread of disease.

This is a unique application of GIS technology. We are aware of only a few other states that have used this for the control of poultry diseases. Other applications of GIS related to poultry have included the use of GIS in making management decisions regarding poultry facility housing design and placement when compared with the regional temperature humidity index (4). Additionally, GIS was used to understand the outcome of broiler litter application to land in an agricultural watershed (8).

There have been limited applications of GIS to other animal species such as pigs, cows and horses. The majority of epidemiological work involves vector-borne diseases such as Lyme disease (6) and West Nile (WN) encephalitis (1). The variables that influence the epidemiology of cattle disease in Africa caused by a protozoal parasite were assessed using a GIS (5). Other applications included predicting forest songbird habitat and tracking an urban rodent control program (3, 7).

The 1997 - 1998 outbreak of nonpathogenic avian influenza H7N2 was estimated to cost the industry approximately 3.5 million dollars (2). Several costs related to the outbreak were not calculated. These costs included state personnel who visually located farms and questioned companies about similarities between farms and subsequently analyzed the data without the use of a computer-based database. GIS technology saves money and effort by decreasing the number of hours spent in determining the flocks at the highest risk of infection in addition to protecting a segment of our food supply.

The recent outbreaks of Foot and Mouth disease and Bovine Spongiform Encephalopathy (Mad Cow disease) in other parts of the world, emphasize the growing need for GIS technology implementation in the agricultural community to control disease, limit economic losses, and protect elements of our food supply. The beef cattle, dairy cows, swine, and sheep industries are all prime candidates for GIS technology.

REFERENCES

1. Conrad, E.R., Tracking Diseases with GIS. ArcUser, July – September 2001.
2. Davison, S., D. Galligan, T.E. Eckert, A.F. Ziegler, and R.J. Eckroade. Economic analysis of an outbreak of avian influenza, 1997 – 1998. JAVMA 214:1164 – 1167, 1999.
3. Dettmers, R. and J. Bart. A GIS modeling applied to predicting songbird habitat. Ecological Applications 9:152-163, 1999.
4. Gates, R.S., H. Zhang, D.G. Colliver, and D.G. Overhults. Regional variation in temperature humidity index for poultry housing. Transactions of the ASAE 38:197 – 205, 1995.
5. Lessard, P., R. L'Eplattenier, R.A.I. Norval, K. Kundert, T.T. Dolan, H. Croze, J.B. Walker, A.D. Irvin, and B.D. Perry. Geographical information systems for studying the epidemiology of cattle diseases caused by *Theileria parva*. Vet Record 126:255-262, 1990.
6. Nicholson, M.C. and T.N. Mather. Methods for evaluating Lyme disease risks using geographical information systems and geospatial analysis. J. of Med. Entomology 33:711-720, 1996.
7. Von Wahlde, M. and B.A. Colvin. Using geographical information systems for tracking an urban rodent control program. Proceedings of the Vertebrate Pest Conference, pp. 327 – 334, 1994.
8. Xu, F., T. Prato, and C. Fulcher. Broiler litter application to land in an agricultural watershed: A GIS approach. Water and Science Technology 28:111-118, 1993.

STRATEGIES FOR THE CONTROL OF AVIAN INFLUENZA IN ITALY

Ilaria Capua^A, Stefano Marangon^B, Giovanni Cattoli^A and Calogero Terregino^A

^ANational Reference Laboratory for Newcastle Disease and Avian Influenza,

^BCentro Regionale per l'Epidemiologia Veterinaria, Istituto Zooprofilattico Sperimentale delle Venezie, Via Romea 14/A, 35020 Legnaro, (PD), Italy.

SUMMARY

The present paper describes the control measures applied during the 1999-2001 Italian avian influenza epidemic. The epidemic was caused by a low pathogenicity avian influenza virus of the H7N1 subtype that mutated into a highly pathogenic avian influenza virus, after circulating in the industrial poultry population for approximately nine months. Following the emergence of the HPAI virus, that caused death or culling of over 13 000 000 birds, and the implementation of the measures indicated in Directive 92/40/CE, the LPAI virus re-emerged twice.

In order to control the re-emergence of LPAI virus and to develop a novel control strategy, a "DIVA" (Differentiating Vaccinated from Infected Animals) strategy was developed and combined to a strict territorial control programme. The "DIVA" strategy was based on the use of an inactivated oil emulsion vaccine containing the same haemagglutinin (H) subtype as the field virus, but a different neuraminidase (N). The possibility of using the diverse N group, to differentiate between vaccinated and naturally infected birds, was achieved through the development of an "ad hoc" serological test based on the detection of specific anti- N1 antibodies.

The control of the field situation was ensured through an intensive sero-surveillance programme aiming at detecting the circulation of the LPAI virus, through the regular testing of vaccinated and unvaccinated flocks, the latter located both inside and outside the vaccination area. In addition, the efficacy of the vaccination schemes was evaluated in the field through regular testing of selected flocks.

After the first year of vaccination, the epidemiological data collected, indicating that the H7N1 virus was not circulating in the vaccinated poultry, was considered to be sufficient by the EU Commission to lift the marketing restrictions on meat obtained from vaccinated poultry.

The experience gained during the Italian 1999-2001 AI epidemic, suggest that the combination of a “DIVA” control strategy with a territorial monitoring system under official control can represent an effective tool for the control of avian influenza infections in poultry. In addition, the application of a “DIVA” vaccination policy, as opposed to a conventional policy enabled veterinary public health organisations to establish that infection was not circulating any longer, and ultimately resulted in the possibility of marketing meat obtained from animals vaccinated against an OIE List A disease.

INTRODUCTION

Highly pathogenic avian influenza (HPAI) is a viral disease of poultry included in OIE List A, and in the European Union its control is imposed by EU Directive 92/40/EEC (4). The disease may have devastating effects on the poultry industry particularly when it affects industrial poultry rearing systems, and its presence in a given territory results in restrictions on animal movements, marketing and trade of poultry and poultry products. Similar restrictions are enforced if vaccination for HPAI is implemented in a given territory.

THE ITALIAN 1999-2001 H7N1 EPIDEMIC

During 1999 and 2000 north-eastern Italy has been affected by a devastating epidemic of HPAI, caused by a type A influenza virus of the H7N1 subtype that originated from the mutation of a low pathogenicity avian influenza (LPAI) virus of the same subtype (1). The HPAI epidemic caused directly or indirectly the death or culling of over 13 million birds that inevitably determined the disruption of the marketing system and great economic losses to the poultry industry and to the social community. Following depopulation and restocking of the HPAI infected areas, LPAI re-emerged twice, thus determining the poultry industry to request, through the Italian veterinary authorities, and obtain vaccination against avian influenza of the H7 subtype.

VACCINATION POLICY

Following the second LPAI epidemic wave, a vaccination policy against avian influenza was, strongly requested by the farmers and by the poultry industry. However, document Sanco/B3/AH/R17/2000 of the EU Scientific committee on animal health and animal welfare, stated that a vaccination programme could be approved provided that the vaccine administered was a non genetically modified vaccine, and that it could be possible to discriminate vaccinated from infected birds.

The strategy proposed by the Italian reference laboratory was that of using an inactivated oil emulsion vaccine containing a strain with a homologous haemagglutinin (H) group and a heterologous neuraminidase (N) group. The reason for this is the possibility of using it as a natural “marker” vaccine, or more correctly a DIVA [Differentiating Infected from Vaccinated Animals] vaccine. In fact it is well known the neutralizing antibodies to influenza A viruses are induced primarily by the haemagglutinin molecule (4) and that vaccination with a vaccine containing a homologous H group also reduces the amount of infectious virus shed in the environment (4). Therefore the use of a vaccine containing the H7 antigen would ensure protection against clinical signs and, in case of infection the reduction of virus shedding. The presence of a different neuraminidase (N) subtype, which induces the production of specific antibodies, would enable official veterinary authorities, with the aid of an “*ad hoc*” diagnostic test, to discriminate between infected and vaccinated flocks, and to monitor and follow the evolution of the situation.

Following the satisfactory results of cross-protection studies against the Italian H7N1 virus, (Capua, unpublished) the vaccine that has been used in the field has been prepared from an inactivated H7N3 virus (A/CK/Pakistan/95/H7N3). The discrimination between infected (N1 positive) and vaccinated (N1 negative) birds was achieved by an indirect immunofluorescence test (iFAT), based on a recombinant N1 protein expressed in a baculovirus vector (3).

A control strategy based on the combination of a complex field monitoring system, and on the application of strict vaccination protocols complying to those evaluated in the laboratory and on the implementation of the “DIVA” strategy was drawn up and approved by the, EU commission (2000/721/EC).

The vaccination program began on November 15th 2000 and will last until May 2002. Approximately 12 000 000 birds [only meat type birds and table-egg layers (that apply the all-in all-out system)] raised in a restricted zone (1156 km²) south of Verona will be involved in the vaccination programme. The vaccine is being marketed only under strict official control, and

until November 30th, 2001 no vaccinated live birds or poultry products that originated from the vaccination zones were authorised for intra-community trade.

TERRITORIAL STRATEGY

The territorial strategy was drawn in order to constantly monitor the situation in the field through official controls and voluntary notification. Briefly, the identification of any LPAI infected farms relied on the notification of suspected cases by farmers and field veterinarians. In addition, official veterinarians carried out regular serological testing of poultry flocks at risk of infection. Once an infected flock was identified, an epidemiological investigation was carried out in the affected farms by means of a standardized questionnaire to establish the possible origin of the infection and to identify flocks directly or indirectly at risk of infection. In case of the identification of an outbreak, although no compulsory eradication or compensation for LPAI is provided for in EU legislation, the Italian Ministry of Health opted for eradication. This was achieved by stamping out or by controlled marketing of slaughterbirds, on infected farms. In addition, the prohibition of restocking of poultry farms, and the enforcement of restriction measures on the movement of live poultry, vehicles and staff were imposed in the areas at risk.

Official monitoring of the areas at risk was implemented with the aim of identifying undiagnosed outbreaks and to evaluate the efficacy of the vaccination program in the field.

The control of the vaccinated farms was achieved both through regular testing of sentinel birds and through the application of the N1-N3 discriminatory test. In fact, each vaccinated flock contained at least 1% of unvaccinated birds, that were appropriately identified to distinguish them from vaccinated animals. In vaccinated flocks at least 10 sentinel birds (95% probability to identify at least one positive bird if the prevalence of seropositive animals is $\geq 30\%$) were serologically tested every 45 days. Alternatively 10 serum samples were collected from each shed and processed for the N1-N3 discriminatory test.

In addition, a monitoring program to evaluate the efficacy of the vaccination protocols in the field was also carried out, with the regular serological testing of 20 vaccinated animals in at least 30 randomly selected vaccinated farms (95% probability of identifying at least one non-immunized flock if their frequency is $\geq 10\%$). In order to adhere to the vaccination campaign, farmers had to comply with strict biosecurity measures, and undergo regular inspections under official control.

RESULTS

Following the implementation of the vaccination policy, the third LPAI epidemic wave was detected in a

non-vaccinated meat-type turkey farm located in the vaccination area. A total of 23 outbreaks (22 meat-type turkey and 1 layer farms) were identified and the last affected flock was stamped out on the 26th of March 2001. During this epidemic wave, only 3 meat-type turkey farms were infected inside the vaccination area and among these, only one vaccinated flock was affected. The presence of infection was promptly identified through the laboratory investigations performed on the sentinel birds. The farm was located in close proximity (200 m) to an unvaccinated farm and the infection did not spread further to neighboring (0.8 - 1 km) vaccinated farms

The intensive sero-surveillance programme, applied to poultry farms located outside the vaccination area in the Veneto region, following the eradication of the last LPAI outbreak, determined the sampling and processing of over 35.000 blood samples with negative results.

The N1-N3 discriminatory test was also used to assess whether serological positivity to the HI test detected in sentinel birds was truly determined by infection or was due to sampling of vaccinated birds instead of sentinels. All samples were tested with negative results.

The data obtained from the intensive monitoring program were considered sufficient by the EU Member States, to demonstrate that the LPAI virus was not circulating any longer in the naïve or in the vaccinated poultry population. The application with negative results, of the N1-N3 discriminatory test, was considered as an additional guarantee for Member States, and on 30th November 2001, commission decision 2001/847/CE, authorized the marketing of meat obtained from vaccinated birds for intra-community trade.

DISCUSSION

With reference to control of avian influenza infections, the data presented herein indicate that the strategy implemented in Italy, i.e., the association between a territorial strategy under official control, strict biosecurity measures including restriction on animal movements and a "DIVA" vaccination program can be successful in controlling LPAI. In addition, the emergence of a HPAI strain was avoided.

The comparison between the rates of spread observed during the 1999-2000 H7N1 LPAI epidemics, which occurred prior to the enforcement of this control strategy, and the limited LPAI spread observed in the vaccinated area supports the association between restriction, bio-security, surveillance and vaccination as effective tools for the control of LPAI.

Critical points for the application of this strategy appear to be, firstly, the development and validation of a tailored discriminatory test (in this case N1- N3) that

enables the differentiation between infected and vaccinated birds, in a relatively short period of time. Secondly, the great amount of work on public officials that is required in order to develop a complex territorial approach, market and distribute the vaccine, collect blood samples for monitoring programs, inspect farms on a regular basis, perform laboratory tests and collect and analyze data must be carefully organized and planned for.

In addition, prompt diagnosis and the implementation of a stamping out or a controlled marketing policy on affected farms are fundamental to the eradication of LPAI infections.

In our opinion it is imperative that the results obtained from the territorial control strategy are made available to support decision-making and this can only be achieved if there is extensive collaboration between farmers, official and field veterinarians, poultry industry, the diagnostic laboratories, the epidemiology units and the central and local governments. Only in this way it will be possible to establish a network of collaboration able to make the best of the data and

tools available in the effort to control avian influenza infections in poultry.

REFERENCES

1. Capua I., and S. Marangon. Avian influenza in Italy (1999-2000) a review. *Avian Pathol.* 29: 289-294. 2000.
2. Cattoli G., C. Terregino, V. Brasola, J.F. Rodriguez, and I. Capua. Development and preliminary validation of an "ad hoc" N1-N3 discriminatory test for the control of avian influenza in Italy. In: Proc. 5th International Symposium on Avian Influenza Georgia. Center for Continuing Education, The University of Georgia, Athens Georgia USA. In press.
3. CEC. Council Directive 92/40/EEC of 19 May 1992 introducing Community measures for the control of avian influenza. *Official Journal of the European Commission*, L167: 1-15. 1992.
4. Swayne, D. E., J. R. Beck, M. Garcia and H. D. Stone. Influence of virus strain and antigen mass on the efficacy of H5 avian influenza inactivated vaccines. *Avian Pathol.* 28: 245-255. 1999.

CAMBIOS HEMATOLÓGICOS EN AVES LEGHORN INFECTADAS CON EL VIRUS H5N2 DE INFLUENZA AVIAR DE ALTA PATOGENICIDAD

HEMATOLOGICAL CHANGES IN LEGHORN BIRDS INFECTED WITH HIGHLY PATHOGENIC H5N2 AVIAN INFLUENZA VIRUS

Ramírez Díaz Guadalupe¹, Calderón Apodaca Norma², Fehervari Tamas², Fortoul Van Der Goes Teresa³

¹Departamento de Patología, Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia, UNAM. Tel. 56 22 58 78. Email: ramirezd servidor.unam.mx.

²Departamento de producción animal: Aves, Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia, UNAM. Tel. 56 22 58 67. Email: nlca servidor.unam.mx

³Facultad de Medicina, UNAM. Tel. 56 23 23 60

SUMMARY

Some avian influenza viral strains cause lymphoid tissue and blood lymphocyte destruction. The purpose of this research was to determine hematological changes in 4-week-old birds of both sexes, challenged with A/CK/Querétaro/14588-19/95 (H5N2) strain. Changes observed after comparison with the controls included anemia starting at 36 hours post inoculation (hpi), leukocytosis, heterophilia, lymphopenia, monocytosis, and basophilia, starting at 24 hpi. Hematological findings demonstrate the presence of the virus in challenged animals.

RESUMEN

La influenza aviar es una enfermedad viral, algunas cepas causan destrucción de tejido linfóide y

de linfocitos en sangre. El objetivo de este trabajo es determinar los cambios hematológicos en aves de 4 semanas de edad, de ambos sexos, desafiadas con la cepa A/CK/Querétaro/14588-19/95 (H5N2). Los cambios que se presentaron con respecto al grupo testigo fueron anemia a partir de las 36 hpi; leucocitosis, heterofilia, linfopenia, monocitosis y basofilia a partir de las 24 hpi, los hallazgos hematológicos demuestran la presencia del virus en los animales desafiados.

La influenza aviar es una enfermedad viral de gran importancia en las granjas de producción avícola por las pérdidas económicas producidas por cepas altamente patógenas, ya que afecta a aves de todas las edades y principalmente a aquellas que no han tenido

exposición al virus.^{1,2,3} Los estudios hematológicos realizados en la enfermedad de influenza aviar son pocos, en los cuales se describe que aves infectadas con la cepa H5N9 presentan destrucción de tejido linfoide y de linfocitos en sangre.⁴ Otros estudios mencionan que puede existir la proliferación e hiperplasia de la células hematopoyéticas en pollos infectados experimentalmente a los 3 y 4 días post-infección (dpi) sin embargo estos hallazgos no correlacionaron con cambios hematológicos⁵; ningún estudio describe los cambios presentes en diferentes períodos del curso de la enfermedad que pueda aportar información para el estudio de la enfermedad. El presente estudio tiene como objetivo determinar los cambios patológicos en sangre de pollos infectados con la cepa viral A/CK/Queretaro/14588-19/95 (H5N2) de alta patogenicidad.

METODOLOGÍA

Se utilizaron 51 aves leghorn, libres de patógenos específico (SpF) de 4 semanas de edad, de ambos sexos. Se constató la ausencia de anticuerpos sanguíneos contra la el virus de la Influenza aviar mediante prueba serológica específica de inhibición de la hemoaglutinación, los animales fueron divididos en dos grupos, uno de ellos constituido de 42 animales, que se inocularon vía oral con la cepa de influenza aviar A/CK/Queretaro/14588-19/95 (H5N2) de alta patogenicidad (título 10⁶ DLEP 50/0.2ml), al que se le denominó grupo A y el otro constituido de 9 aves testigo el grupo B. Las aves infectadas y testigo se alojaron en diferentes unidades de aislamiento del Instituto Nacional de Investigaciones Forestales y Pecuarias (INIFAP) bajo condiciones controladas y recibieron alimento comercial y agua de bebida a libre acceso.

Para obtener la muestra sanguínea se realizó una punción vía yugular de un grupo de 6 aves cada 12 horas post inoculación (hpi) hasta las 96 hpi . Se realizaron muestreos de las aves testigo a las 24, 60 y

96 hpi, se extrajo de cada ave 1ml de sangre y se colocó en microtainers que contenían sales de etilendiaminotetracético (EDTA) en proporción de 1:10 (0.1 ml por cada ml de sangre) para la realización del hemograma. Las técnicas hematológicas empleadas fue con base a lo descrito por Campbell.⁶ Se realizó el diferencial de los glóbulos blancos evaluando los frotis sanguíneos y posteriormente se determinaran las cifras absolutas.

RESULTADOS

Los cambios observados en el hematocrito se presentaron a partir de las 36 hpi con una disminución del 12.5% con base al grupo testigo y que llego hasta el 18.7% a las 84 hpi.

Para la hemoglobina se presentaron cambios desde las 24 hpi, donde se observó una disminución de 12.01% y que llego hasta el 36.68% a las 96 hpi.

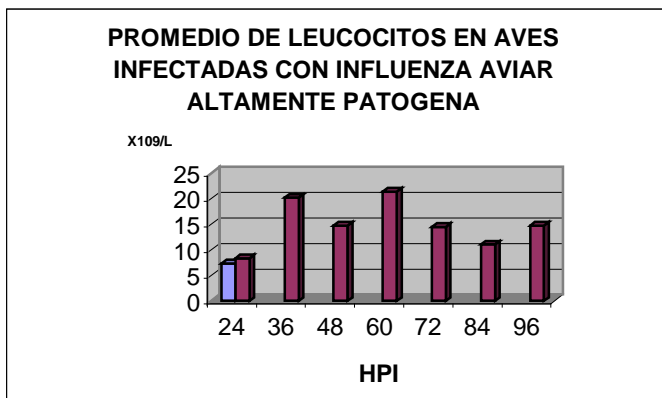
En los glóbulos rojos se observa una ligera disminución a partir de las 48 hpi del 12.05% y llego hasta el 30.80 a las 84 hpi.

En las proteínas totales se observó una disminución del 2.86% a partir de las 48 hpi, y que llego hasta el 24.77% a las 72 hpi.

Cambios leucocitarios, se presentó leucocitosis en la mayoría de los grupos desafiados y fue muy fluctuante, por ejemplo a las 24 hpi se presentó un incremento del 13.64% y para las 36 hpi se observó un incremento del 176.26%, que varió para las 96 hpi a 101.23%, gráfica No. 1. Fue evidente la heterofilia en los diferentes grupos, que para las 24 hpi fue de 56.71% y con fluctuaciones entre las diferentes tomas, llegando hasta el 353.68% a las 96hpi. La linfopenia fue evidente a partir de las 24 hpi con una disminución del 23.23% y que llego hasta el 42.03% a las 96 hpi. Se observó monocitosis a partir de las 24 hpi con un incremento del 304.34% y que llego hasta el 1039% a las 96 hpi.

Se observó basofilia del 18.51% para las 24, 36 y 60 hpi.

Grafica No.1, primera barra a la izquierda corresponde al grupo testigo.



DISCUSIÓN

La disminución del hematocrito, la hemoglobina y los eritrocitos, que se define como una anemia, en algunos grupos con respecto al grupo testigo, puede estar presentando por las hemorragias que reporta la literatura y que se presentaron en aves inoculadas con cepas altamente patógenas; indirectamente estas pérdidas sanguíneas pueden estar involucradas con la hipoproteinemia de algunos grupos.²

La linfopenia en los grupos que la presentan se atribuye a linfotoxicidad por destrucción directa del tejido linfóide y de los linfocitos circulantes, la cual se relaciona a la alta patogenicidad de la cepa H5N2 de influenza aviar utilizada en el experimento, aunque la literatura informa que la linfopenia no se presenta en los animales inoculados con todas las cepas altamente patógenas de influenza aviar.⁴ La heterofilia que se observó con respecto a los testigos no supera el $14.7 \times 10^9/L$, lo que no descarta que algunos animales hayan presentado conteos superiores a $25 \times 10^9/L$, lo que nos refiere un estado de estrés de las aves por la presencia de la enfermedad y que hace constatar la presencia de la misma; la literatura considera heterofilia conteos mayores a $15 \times 10^9/L$ y conteos mayores a $25 \times 10^9/L$, los relaciona a la liberación de catecolaminas y corticosteroides.⁶ La monocitosis se asocia a necrosis tisular y la basofilia al proceso inflamatorio, este cambio será verificado al realizar el estudio histológico de los diferentes órganos.⁶

Los cambios hematológicos observados corroboran la presencia del virus y es una muestra de que en animales inoculados con cepas altamente

patógenas pueden llegar a presentar alteraciones hematológicas.

CONCLUSIÓN

Los cambios hematológicos observados en los grupos desafiados con respecto al testigo fueron notorios y de relevancia lo que hace constatar la presencia y severidad del virus. Se observó anemia a partir de las 36 hpi e hipoproteinemia a las 48 hpi. Los cambios en el leucograma más evidentes fueron heterofilias asociadas a la patogenicidad del virus y linfopenias por linfotoxicidad a partir de las 24 hpi.

REFERENCIAS

1. The american association of avian pathologist. Avian diseases manual. 3rd ed. Philadelphia: Kendall/Hunt Publishing Company, 1979: 16-20.
2. Calnek BW. Diseases of poultry. 9 ed. USA: Iowa State University Press, 1991: 532-551.
3. Capua I, Marangon S. The avian influenza epidemic in Italy, 1999-2000: a review. Avian Pathology 2000; 29: 289-294.
4. Campen VA, Easterday CB, Hinshaw SV. Virulent avian influenza a viruses: Their Effect on Avian Lymphocytes and macrophages in vivo and in vitro. J.gen.Virol. 1989; 70:2887-2895.
5. Barnes JH. Hemic system. In: The american association of avian pathologists. Avian histopathology. 2d ed. Canada. American Association of Avian Pathologists, 1999:1-17.
6. Campbell WT. Avian hematology and cytology. 2d ed. USA: Iowa State University Press, 1995:3-19.

ISOLATION OF LOW PATHOGENICITY AVIAN INFLUENZA VIRUS (H6N2) FROM CHICKENS IN CALIFORNIA, 2000-2001

AISLAMIENTO DE UN VIRUS DE LA INFLUENZA AVIAR DE BAJA PATOGENICIDAD (H6N2) DE POLLOS EN CALIFORNIA, 2000-2001

Woolcock, P. R.^A, Suarez, D. L.^B and Kuney, D.^C

^ACalifornia Animal Health and Food Safety Laboratory System, University of California, Davis, Fresno Branch, 2789 S Orange Ave., Fresno, CA 93725

^BSoutheast Poultry Research Laboratory, 934 College Station Rd., Athens, GA 30605

^CDepartment of Animal Sciences, Cooperative Extension, University of California, Riverside, 21150 Box Springs Road, Moreno Valley, CA 92557

RESUMEN

Se aisló un virus de la influenza aviar de pollos en 10 diferentes lugares de California. Los aislamientos se tipificaron como H6N2 y se determinó que eran de baja patogenicidad para el pollo. Siete de los aislamientos procedían de parvadas de postura comercial y tres de

instalaciones mixtas donde existían otras especies de aves. Estos aislamientos se agruparon en forma separada de otros virus de la influenza con base en los datos de secuencia de los genes de la H6, la neuraminidasa (N2) y la matriz (MA). El análisis de la secuencia del gene no estructural (NS) indicó

introducciones de dos orígenes separados. Los genes N2, MA y NS están relacionados con los aislamientos norteamericanos, pero el gene H6 está relacionado con un aislamiento de Eurasia.

Reports of avian influenza virus (AIV) isolations from chickens have been relatively rare when compared to the number of reports from domestic turkeys and ducks (1). In the 1990's there were no isolations reported of high pathogenic avian influenza (HPAI) virus in chickens in North America and the number of reported isolations of low pathogenic AIV was low; an H10 subtype was isolated in 1992, H 5N2 and H6 subtypes were isolated in 1993 and an H7N2 subtype in both 1995 and 1996 (4). No isolations were reported in 1997 or 1998 other than from live bird markets (2,3).

In California, the first and only AIV isolated from chickens in the 1990's was in 1999 from layers; it was an H10N7 subtype (5). During 2000-2001, 10 separate incidences of AIV infections occurred in chickens. All the AIVs isolated were identified as subtyped H6N2. This number of isolations from several locations was unusual. It has provided an opportunity to relate the clinical and epidemiological observations from these outbreaks to some of the genetic characteristics of these virus isolates.

The layer flocks from which virus isolations were made were located in an area approximately 40 x 20 miles in Southern California; the remaining birds from which viruses were isolated were elsewhere in the state of California. In the layers, the main clinical signs observed were a slight drop in egg production and mild respiratory distress.

In terms of time, 3 separate outbreaks appear to have occurred, the first was in February/March 2000 (4 cases), the second in January/February 2001 (2 cases), and the most recent in June to September 2001 (4 cases). The first 4 cases occurred within 6 weeks of each other; 3 were in closely located layer flocks but one isolate was from a rooster in a backyard flock of 20 birds located near the Pacific coast in Los Angeles County, about 60 miles away. In January/February 2001 2 cases occurred more than 300 miles apart; one in a mixed flock where other species were also present, the other in Southern California layers, close to the outbreaks of the previous year. The outbreaks later in 2001 occurred over a 10-week period. In June, the first case occurred in San Diego County, more than 80

miles from the concentration of commercial layer operations. This was at a mixed operation where ducks were also present. The remaining 3 cases were geographically more closely linked but still 10 to 30 miles apart from each other.

Four different genes from the H6N2 isolates from all ten outbreaks were sequenced and compared. This included the HA1 gene sequence from all ten isolates, and the full coding sequence from the neuraminidase (N2), nonstructural (NS), and matrix (MA) gene segments. For the H6, N2 and MA gene segments, all the isolates clustered as a unique group separate from other influenza viruses. The NS gene had two completely separate groups, with 5 isolates belonging to NS subtype (group) A, and 5 isolates belonging to subtype (group) B. The NS gene difference was interesting in that the isolates did not completely separate based on the year of isolation. The NS subtype B isolates included all the 2000 isolates but also one of the 2001 isolates.

Phylogenetic analysis as well as pair wise sequence analysis with the index case, CK/CA/431/00, showed that the N2, MA and NS gene clusters were more closely related to other North American isolates. The H6 was more closely related to a Eurasian isolate; however, few H6 sequences are available to definitively prove the origins of the H6 gene.

REFERENCES

1. Alexander, D. J. A review of avian influenza in different bird species. *Vet. Microbiol.* 74:3-13. 2000.
2. Committee on Transmissible Diseases of Poultry. Avian Influenza. Proceedings of the 102nd Annual Meeting of USAHA. Minneapolis, MN. p. 618. 1998.
3. Committee on Transmissible Diseases of Poultry and other Avian Species. Avian Influenza. Proceedings of the 101st Annual Meeting of USAHA. Louisville, KY. pp. 497-498. 1997.
4. Pearson, J. E., D. A. Senne, and B. Panigrahy. Avian Influenza in the Western Hemisphere including the Pacific Basin 1992-1996. Fourth International Symposium on Avian Influenza. R. D. Slemons, ed. Athens, GA. pp. 14-17. 1997.
5. Woolcock, P. R., M. D. McFarland, S. Lai, and R. P. Chin. Enhanced recovery of avian influenza virus isolates using a combination of chicken embryo inoculation methods. *Avian Dis.* 45: 1030-1035. 2002.

USO DEL ENSAYO ELISA PARA DETECTAR ANTICUERPOS CONTRA *SALMONELLA ENTERITIDIS* EN YEMA DE HUEVO Y ESTABLECER EL ESTADO DE INFECCION EN GALLINAS DE POSTURA

THE USE OF ELISA TO DETECT *SALMONELLA ENTERITIDIS* (Se) ANTIBODIES IN THE YOLK SAC, AND TO ESTABLISH INFECTION STATUS IN LAYING HENS

Esmeralda Chápero, Rubén Merino y Odette Urquiza

Departamento de Producción Animal: Aves, FMVZ, UNAM, México, D. F., 04510

SUMMARY

The purpose of this research was to rule out the presence of Se in table eggs, and to detect Se antibodies in the yolk sac using the ELISA, plate agglutination, and microagglutination tests. Bacterial isolations from both internal and external sampling of 180 eggs were negative to Se in all groups. The ELISA test showed a range of 3.3 - 20 positive yolks. Microagglutination yielded 0-3.3% positive results. All samples were negative to the plate agglutination test.

RESUMEN

El objetivo de este trabajo fue descartar la presencia de *Salmonella enteritidis* en huevos para consumo humano, así como detectar anticuerpos contra ésta en la yema del huevo, con las pruebas ELISA, Aglutinación en Placa y Microaglutinación. El aislamiento bacteriano a partir del muestreo externo e interno de 180 huevos para el aislamiento de Se fue negativo a Se en todos los grupos. Se evaluó la yema por AP, MA y ELISA. Por ELISA se encontraron yemas positivas entre 3.3% y 20%; en la MA los resultados positivos fueron del 0% al 3.3%. Todas las muestras fueron negativas por AP.

INTRODUCCIÓN

La avicultura es un ejemplo de eficiencia productiva, alcanzar las metas productivas ha requerido forzar el organismo de las aves de una manera constante, lo que implica la predisposición a enfermedades diversas, como el síndrome ascítico, salmonelosis, etc. (falta referencia)

La salmonelosis aviar ha tenido grandes repercusiones económicas en avicultura, debido principalmente ha que los medios de publicidad han divulgado la posible asociación de *Salmonella enteritidis* (Se) y la revelación de que algunos fagotipos de esta pueden transmitirse a través de huevos al humano (6). La contaminación de productos avícolas con salmonela (carne y huevo), ha provocado

que la legislación nacional e internacional realicen constantes monitoreos en las aves. El procedimiento de rutina es el aislamiento bacteriano, sin embargo, el Ensayo Inmunoabsorbente de Enzima ligada (ELISA) se usa para detectar dichas infecciones, debido a que es práctica, sensible a la detección de anticuerpos (1,2).

El objetivo de este trabajo fue descartar la presencia de Se en huevos para consumo humano, así como, la detección de anticuerpos contra ésta en muestras de yema de huevo por medio de las pruebas ELISA, Aglutinación en Placa y Microaglutinación.

MATERIAL Y MÉTODOS

Se obtuvieron 180 huevos, de 6 procedencias, 30 huevos por procedencia, 150 fueron comprados en la Central de Abastos de la Ciudad de México y 30 adquiridos en el mercado de Chalco Estado de México.

Aislamiento Bacteriano.

Muestreo externo: Cada huevo se identificó individualmente. Cada uno fue colocado individualmente en bolsas de plástico estériles, empleando guantes para evitar contaminar el cascarón con las manos. La búsqueda de *Salmonella sp* se realizó de acuerdo con la técnica descrita por Gentry, 1972.

Muestreo interno: El cascarón se secó y se limpió con alcohol al 70%, cada huevo se abrió con tijeras estériles (NOM-005-ZOO-1993), de cada uno se tomó 1ml de yema, la cuál fue depositada en tubos con 10ml de Caldo tetracioneto (CT), se homogeneizaron y se incubaron durante 24 horas a 37°C, sembrando posteriormente 1 asada de CT en agar de Mac Conkey (McC) con el mismo método que en el muestreo externo (Gentry, 1972).

Al tiempo de tomar la yema para muestreo interno, se obtuvo 1/2ml de yema para la prueba ELISA y otro 1/2ml para la prueba de microaglutinación, cada muestra se mezcló con 1/2ml de PBS, las muestras fueron mantenidas bajo congelación y refrigeración respectivamente.

ELISA: Durante la toma de muestras, las yemas fueron diluidas 1:2, con PBS. Posteriormente de la dilución 1:2, se agregó 0.2ml de yema a un tubo que contenía 1.8ml de PBS para obtener una dilución final de 1 en 20.

Se utilizó un kit comercial de acuerdo con las instrucciones del fabricante. Las muestras se diluyeron 1/400 y se incubaron en las placas absorbidas con antígeno Lipopolisacarido (LPS) de Se, después de un período de incubación, las placas fueron lavadas y se les agregó el conjugado, por último se agregó la solución STOP, y se leyó a 405nm en el espectrofotómetro, (MR 650, DINATECH Laboratories, Inc). Títulos de 0 fueron considerados negativos, de 750 a 1795 sospechosos y títulos mayores a 1796 positivos.

Aglutinación en Placa (AP): En una placa se colocó 0.1ml de cada muestra de yema diluida previamente 1:2, a éstas se les agregó una gota de antígeno de *Salmonella*, VINELAND, (Laboratories of immunogenetics, Inc. Affiliate of 461). Se incubó a temperatura ambiente durante 2 minutos, en espera de observar reacción de aglutinación durante ese tiempo.

Microaglutinación (MA): Las muestras diluidas 1:2 fueron posteriormente diluidas en forma serial (1: a 1:64) en microplacas de titulación de fondo en "U". Se colocaron 100µl de antígeno (de elaboración local) en cada pozo. Las placas se incubaron en cámara húmeda a 37°C durante 24 horas. Las muestras se consideraron positivas cuando tuvieron título de microaglutinación superior a 1:20.

RESULTADOS

El aislamiento bacteriano demostró la ausencia de Se en todos los grupos. La prueba de AP resultó negativa para todas las muestras de todos los grupos. La figura 1 muestra la reacción porcentual de casos positivos, negativos y sospechosos, identificados por las pruebas ELISA y MA. Por ELISA se encontraron positivos que fluctuaron entre 3.3% y 20%, los negativos variaron del 63.3% al 90%, mientras que los sospechosos estuvieron en el rango del 6.7% al 20%. En la MA los resultados positivos fueron del 0% al 3.3%, los negativos del 56.7 al 100% y los sospechosos del 0 al 40%.

DISCUSIÓN

En el presente trabajo no se aisló Se, sin embargo, se aislaron *E.coli* y *Enterobacter cloacae* en la mayoría de los grupos, bacterias que muy probablemente provienen del medio ambiente, estos resultados coinciden con los de Padrón (1992) quien en un estudio de campo realizado en granjas comerciales, encontró que el 12% de los huevos limpios puestos en nidos fueron penetrados y contaminados por diferentes bacterias.

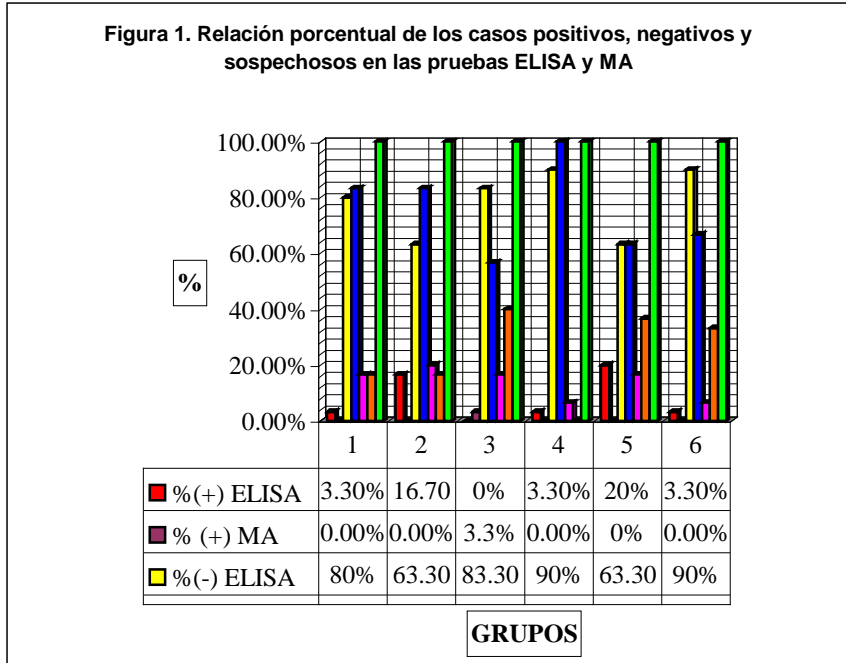
Durante los últimos años se han hecho progresos en la detección de anticuerpos Se, *Salmonella typhimurium*, incluso *S. arizonae*, *S. berta*, *S. gallinarum* y *S. pullorum* (1), sin embargo, los resultados dependen de la calidad del antígeno así como del manejo que se le da (Gast, 1997).

Los resultados de este trabajo, donde la AP de todas las muestras fue negativa, mientras que por ELISA y MA se encontraron tanto muestras sospechosa como positivas, estas últimas en baja proporción. Lo anterior coincide a los resultados de otros investigadores, quienes encontraron diferencias entre los resultados obtenidos por AP y aquellos obtenidos con ELISA en muestras de suero de una parvada infectada con Se. Estas diferencias consistieron en que de algunas muestras que no aglutinaron, al realizar la ELISA se obtuvieron valores de Densidad Optica (DO) relativamente altos, mientras que sueros que aglutinaron tuvieron DO bajas (1). Lo anterior puede deberse a reacciones falso positivas o reacciones cruzadas, las cuáles se deben al uso de muestras muy diluidas, a una mala elección en el kit ó por la misma muestra de yema, la cuál contiene grasa que puede interferir con los resultados (1,2).

Lo anterior sugiere que es necesario conocer la historia clínica de la parvada, calendario de vacunación, % de postura y manifestaciones clínicas de enfermedad, para descartar salmonelosis por aislamiento bacteriano y/o por serología, y recordar que Se puede ocasionar infecciones subclínicas y si la parvada tiene buen manejo no habrá eliminación de salmonela (5).

REFERENCIAS

1. Barrow, P.A.: The paratyphoid salmonellae. Rev. sci. tech. off. Int. Epiz, 19 (2): 351-375 (2000)
2. Barrow, P.A.: Use of ELISAs for monitoring *Salmonella* in poultry. Vet. Rec., 22:99 (1994)
3. García Meneses, A., Téllez-Isaias, G., García-Espinoza, G., Valladares-de la Cruz, J.C. y Urquiza-Bravo, O.: Determinación de la existencia de *Salmonella enteritidis* serotipo *enteritidis* de 95 aislamientos de cepas de campo de *Salmonella* en aves domésticas. Vet. Méx. 27: 343-345 (1996).
4. Gast, R.K and Holt, P.S.: Experimental horizontal transmission of *Salmonella enteritidis* strains (Phage 4,8, and 13A) in chicks. Avian Dis., 43: 774-778 (1999).
5. Gast, R.K, Porter, R.E, JR., and Holt, P.S.: Assessing the sensitivity of egg yolk antibody testing for detecting *Salmonella enteritidis* infections in laying hens. Poultry sci., 76: 798-801 (1997)
6. Gentry, R.F., y Quarles, C.L.: The measurement of bacterial contamination in egg shell. Poultry sci. 51:930-933 (1972).



ASPECTOS RELEVANTES DEL PROCESO DE COAGULACIÓN EN LAS AVES

RELEVANT ASPECTS OF THE BLOOD CLOTTING PROCESS IN BIRDS

M.V.Z. Esp. María de la Luz Vilma Charles Noriega.

Departamento de Producción animal: Aves F.M.V.Z. U.N.A.M. (E-mail: madelaluzch@yahoo.com.mx)

SUMMARY

Hemostasis in birds has important differences when compared with that in mammals and man. The importance of thrombocytes in the formation of the hemostatic clot and their phagocytic activity have been recognized. Thrombocyte counts can show alterations in blood clotting process, septicemic/toxic processes, and bone marrow hipoplasia. During the biochemical stage the production of tissue thromboplastin and prothrombin is more efficacious. Prothrombin has shown to be the most sensitive parameter in the detection of hemostasis alterations resulting from mycotoxin (i.e. aflatoxin, fumonisin) toxicity.

RESÚMEN

La hemostasis aviar presenta diferencias significativas con respecto a los mamíferos y el hombre.

Es reconocida la acción de los trombocitos para la formación del tapón hemostático, así como su actividad fagocitaria. El conteo de trombocitos indica alteraciones en el proceso coagulativo y asimismo

procesos septicémicos, tóxicos o de hipoplasia medular. En la etapa bioquímica es más eficaz la producción de tromboplastina tisular y protrombina. Esta última ha demostrado ser el parámetro más sensible para detectar alteraciones de la hemostasis que pueden presentarse durante la intoxicación con micotoxinas como aflatoxinas y fumonisina.

Algunos estudios sobre la coagulación sanguínea de las aves se han publicado hace muchos años. En 1934 se publicó un trabajo sobre la diátesis hemorrágica de los pollos. Desde entonces los conocimientos acerca de la vitamina K y su metabolismo, comenzaron a cobrar mayor importancia, no sólo en las aves sino también, en los mamíferos y el hombre.

Wartelle, en 1957, estudió las diferencias existentes en el proceso de coagulación en las aves, encontrando que la generación extrínseca de la tromboplastina tisular es más importante que la de tromboplastina intrínseca (plasmática).

De hecho, la presencia de pequeñas cantidades de jugos tisulares en contacto con el plasma, afectan de

manera muy importante los tiempos de coagulación en las aves.

Este sistema depende de la mezcla de los jugos tisulares con la sangre y no así de las superficies de contacto.

El hematólogo que trabaje con la sangre de aves, debe pensar que éstas poseen una temperatura corporal de 41 grados C y un sistema tegumentario distinto en el que las plumas constituyen una barrera temporal que interactúa con la sangre coagulada. (Archer, 1965).

El fenómeno de la coagulación se realiza mediante la interacción del tejido de los vasos sanguíneos, los trombocitos y ciertas proteínas del plasma (factores de la coagulación).

Etapas de la hemostasis:

- a) Primaria o celular
- b) Secundaria o bioquímica.

HEMOSTASIS PRIMARIA

En esta etapa, intervienen principalmente las plaquetas, en los mamíferos y los trombocitos en las aves.

El papel de los trombocitos de las aves en el proceso de coagulación, es incierto. Estos se caracterizan por ser células ovales, nucleadas, con uno o dos gránulos azurófilos a uno y otro polo del núcleo de la célula y citoplasma claro, ligeramente vacuolado.

Estas células tienen pseudópodos y función fagocítica. Usualmente, se encuentran de uno a dos trombocitos por campo con el objetivo seco fuerte y en total hay aproximadamente de 20 000 a 30 000/ul.

Estas células, después de la exposición del subendotelio y la vasoconstricción durante el daño vascular, se encargan de formar el tapón hemostático gracias a la acción de la proteína de Von Willebrand que favorece la adherencia plaquetaria.

HEMOSTASIS SECUNDARIA

Por la interacción con el factor III trombocitario, se activan los factores bioquímicos de la coagulación, que son proteínas que se producen en el hígado, con excepción del Calcio (Factor IV).

Esta consta de la vía intrínseca y de la vía extrínseca y su finalidad principal es formar la malla de fibrina. La vía intrínseca se llama así por llevarse a cabo a partir de elementos que se encuentran en la sangre solamente a diferencia de la vía extrínseca, en la que actúa la tromboplastina tisular.

El objetivo final de la vía intrínseca, es la formación de la tromboplastina plasmática, en la que actúan en forma consecutiva los factores XII, XI, IX, VIII, IV (Ca⁺⁺), V y X.

Esta etapa en las aves, se realiza de manera muy rápida y de hecho, se sabe que éstas poseen cantidades mínimas de factores XII, IX, (Sturkie y Butler, 1983) V, VII y X. (Doerr y Hamilton, 1974). La interacción

de todos estos factores se ve favorecida por su adhesión al Factor 3 trombocitario y tisular.

En el hombre y los mamíferos actúan de manera igualmente importante los 12 Factores bioquímicos, que se producen en el hígado, con excepción del IV (Ca⁺⁺).

En las aves, la vía extrínseca es la más importante. La finalidad de ésta es la formación de la tromboplastina tisular (Factor III), en la que actúan los factores II, (fibrinógeno) V, VII y X (Stuart), que son dependientes de la vitamina K.

La vitamina K se encuentra en el hepatocito de manera que es indispensable para que se agregen los grupos carboxiglutámicos de ésta a la molécula de los factores dependientes gracias a lo cual estos adquieren carga eléctrica negativa para adherirse a los trombocitos por medio de las cargas eléctricas positivas de los iones de Ca⁺⁺ y poder interactuar con otros factores de la coagulación.

Esto explica por qué cualquier circunstancia en que exista deficiencia de vitamina K produce sangrados anormales.

Valoración de la hemostasis primaria:

En las aves, la cuenta de trombocitos, descrita por Campbell (1988). La cantidad normal de trombocitos oscila de 20 000 a 30 000/ul.

Su cantidad aumenta durante enfermedades tóxicas y septicémicas y disminuye cuando hay enfermedades virales graves, procesos leucémicos y toxemias.

Tiempo de sangrado:

Esta prueba se realiza para valorar la cantidad y calidad de los trombocitos, así como la integridad de el endotelio vascular, una posible deficiencia hepática, procesos tóxicos o presencia de anticoagulantes.

El tiempo de sangrado en aves es aproximadamente de 5 min . (Juárez y cols. (1997).

Valoración de la hemostasis secundaria:

Tiene por objeto detectar alteraciones en las vías intrínseca, extrínseca y común de la coagulación a partir de plasma citratado (con el calcio precipitado e inactivo, que lo vuelve incoagulable) en un tubo de ensayo y en determinadas condiciones para medir cuánto tiempo tarda en producir fibrina.

En este fenómeno, como es bien sabido, intervienen los doce factores de la coagulación, que en su mayoría, con excepción del factor IV (calcio) se producen en el hígado.

La vía intrínseca tiene por objeto producir la tromboplastina plasmática, mediante la activación de los factores XII, XI, IX, VIII, X y V en orden secuencial.

Este proceso es de menor relevancia en las aves. Didisheim (1959) reporta que esta etapa es "ineficiente" al ser comparada con los estándares aplicados para los mamíferos, puesto que en aves,

existen en muy poca cantidad los factores V y VII, pero sin embargo, Stopforth, (1970), confirmó la presencia de factor X. pero se puede utilizar la medición del tiempo parcial de tromboplastina activada para explorar los factores XII, XI, IX, X, VIII y V. (Archer, 1965).

El tiempo normal de tromboplastina parcial activada es de 29 a 37 seg. En las aves se considera que es más importante la valoración de la vía extrínseca, por medio de la prueba de el tiempo de protrombina, (Método de Quick de un solo paso), que trabaja con sangre citratada y tromboplastina homóloga (Factor 3 tisular).

La fibrina tarda en formarse de 12 a 14 seg aproximadamente, para ésto se requiere la presencia de los factores dependientes de la vitamina K, (II, V, VII y X).

En las aves, la deficiencia de vitamina K no es común puesto que se encuentra en los componentes de la dieta y además, se sintetiza en el intestino pero se puede presentar por el uso inapropiado de antibióticos de amplio espectro, como sulfas, cefalosporinas y salicilatos sin el apropiado aporte vitamínico, enteritis y malabsorción. Asimismo, la dieta deficiente en grasas, la deficiencia hepática y/o colestasis, donde no hay suficiente aporte de sales biliares para la absorción de grasas, necesarias para el transporte de vitamina K.

Para realizar el tiempo de protrombina, se requiere de tromboplastina homóloga, obtenida a partir de un macerado de cerebro de pollitos de menos de 3 semanas de edad. (Doerr y Hamilton, 1975).

El tiempo de protrombina normal es de 9-11seg. (Quick, 1938).

Grimminger (1970) indica que la nutrición con vitamina K influyó en la actividad trombotica del polvo de extracto de cerebro, dado que en la sangre remanente del cerebro de aves, contiene factores VII, IX y X en forma muy escasa.

El tiempo de coagulación, (Método de Lee-White modificada) (Juárez y cols.1997) permite diferenciar las alteraciones de tipo trombocitopénico de aquéllas de origen bioquímico, puesto que en las primeras, el tiempo de coagulación es normal. También evalúa en forma general la deficiencia de vitamina K, fibrinógeno, protrombina y la presencia de anticoagulantes. Según lo reportado por Juárez y cols., el tiempo de coagulación en aves se logra dentro de un intervalo de 3.60 a 6.40 min.

Espada, (1996) reportó que la micotoxicosis por Fumonisina en pollos de engorde produce cambios en la concentración de las proteínas plasmáticas y en la coagulación con una dosis de 10 mg /kg. Los pollos problema comparados con los testigo, mostraron

disminución en el tiempo de protrombina. La protrombina resultó ser el elemento más sensible.

Fernández, en 1995, corrobora que la medición del tiempo de protrombina es un buen indicador de la presencia de aflatoxicosis en las aves, demostrando que con la adición de 2.5 – 5.0 ug/g de aflatoxina, hay incremento en el TP (de 13.2 seg en las aves control a 15.7 seg en las aves intoxicadas con 5 ug /g de aflatoxina.), con disminución de la albúmina, alfa y beta globulinas.

Stopforth, en 1970, demostró que la inyección con warfarina a dosis de 10 mg/kg provocó un incremento notable en el tiempo de protrombina a las 48 horas después de la primera inyección.

Según Didisheim et al. (1959), hay ausencia o gran escasez de factores VII y X y muy escaso factor IX en las aves. La warfarina actúa principalmente sobre el factor VII, explicando así la gran cantidad de Warfarina requerida en las aves para prolongar el tiempo de protrombina. Según el autor, las aves tienen el 5% de factor V comparado con el hombre. La presencia de factor X se confirma con la disminución del tiempo de protrombina tras la adición de plasma normal a las aves después de 48 horas de adicionar warfarina.

REFERENCIAS

1. Archer. R.K. Blood coagulation In: Physiology and Biochemistry of the domestic Fowl. Academic Press, New York. 897-911. 1971.
2. Campbell, T. Avian Hematology and Cytology. Iowa State University Press/Ames.1:12. 1988.
3. Doerr, J.A., Wyatt, R.D. and Hamilton, P.B. Investigation and Standardization of prothrombin times in chickens. Poultry Science 54: 969-980. 1975.
4. Doerr, J.A.; Hamilton, P.B.. Aflatoxicosis and intrinsic coagulation function in broiler chickens. Poultry Science, 60: 1406-1411. 1981.
5. Espada, Y., Ruíz, G.R., et al. Fumonisin mycotoxicosis in broilers. Plasma proteins and coagulation modifications. Avian diseases, 41: 73-79. 1997.
6. Grimminger, P.. Blood coagulation. In: Sturkie, P.D. Avian Physiology. Cornell Univ. Press. N.Y. 21-31. 1965.
7. Quick, A.J. The hemorrhagic diseases. Lea and Febiger, Philadelphia. 1957.
8. Stopforth, A. A study of coagulation mechanisms in domestic chickens. J. comp. path. vol.80. 1970.
9. Villanueva, J.V. Orientación diagnóstica en las hemorragias. Revista de posgrado de la cátedra Via Medicina No. 106. 1-7. 2001.

FEEDING EARLY MATURING COMMERCIAL LAYERS

ALIMENTACIÓN DE PONEDORAS COMERCIALES DE MADUREZ TEMPRANA

Bernie Beckman, DVM

Hy-Line International, 2583 240th Street, P.O. Box 310, Dallas Center, IA 50063

RESUMEN

La selección genética de las ponedoras tipo Leghorn se ha enfocado hacia la madurez sexual temprana y ha mejorado la eficiencia alimenticia. Al mismo tiempo se ha incrementado en forma importante el número y la masa de huevo. No obstante, mientras se han realizado todos estos cambios, el peso corporal del ave ha permanecido sin cambios o incluso ha disminuido. Para lograr el potencial de estos mejoramientos genéticos, es necesario definir los requerimientos diarios de nutrimentos de estas variedades de aves. Presentaremos a discusión un resumen de las necesidades nutricionales de una estirpe Leghorn de madurez temprana utilizando como ejemplo la Hy-Line W-98. Ilustraremos con casos de campo la importancia de los niveles de calcio y fósforo para evitar deformaciones esqueléticas, fatiga de jaula y mala calidad del cascarón.

Genetic selection for earlier sexual maturity in commercial pullets has occurred at the same time egg numbers and case weights have increased. This challenges the nutritionist and producer to formulate feeds that deliver the required nutrients within the constraints of the actual flock feed consumption. Earlier sexual maturity and lower feed intakes in these modern varieties has made it difficult to formulate feeds containing enough calcium, phosphorus, energy and protein to meet the hens' needs on a daily intake basis. High demand for eggshell formation in these laying hens can lead to the progressive loss of structural bone during the laying period leading to osteoporosis. To be discussed will be the nutritional needs for early maturing hens and field cases to illustrate the importance of calcium, phosphorus, and Vitamin D₃ in avoiding skeletal deformities, cage layer fatigue (CLF), and poor eggshell quality in layers. See Table 1 for current W-98 nutritional recommendations.

Inadequate intakes of Calcium, Phosphorus and Vitamin D₃ can result in the following clinical signs:

1. **Mortality** from soft bones, prolapse, or lung congestion
2. **Decreased rate of lay** with poor peak or a post peak dip.

3. **Loss of shell quality** particularly late in lay. Eggshell quality usually declines only after many weeks of low calcium or phosphorus intake.
4. **Erratic egg production** from birds that cycle in and out of production.
5. **Cage layer fatigue (CLF)** (osteoporosis) starting at any time during the production period. The signs of CLF are crooked keels often in a characteristic S-shape. Often the tip of the keel bone is bent or tipped. A collapsed rib cage with beaded ribs is another common finding. Soft, rubbery keel bones suggest the bird is presently in a negative calcium and phosphorus balance. Deformed but firm bones and beaded ribs suggests the condition occurred previously and is now recovered.

Reasons for an increase in CLF:

1. **Genetic.** Selection for smaller body weight, high rate of lay and earlier sexual maturity has made it difficult to maximize bone mass prior to the onset of egg production. Selection for feed efficient birds having low feed intake has made it more difficult to formulate feed with adequate calcium, phosphorus, energy, and protein.

2. **Environment and Behavior.** High-density housing and lack of feeder space causes a 15-20% difference in feed intake among birds within a cage. Decreased feed consumption during times of heat stress results in marginal intakes of calcium and phosphorus. High environmental temperatures causing birds to pant results in decreased plasma carbonate available for eggshell formation along with loss of phosphorus in the urine. Lack of exercise for birds housed in cages has been shown to result in reduced bone mass and breaking strength of long bones.

3. **Nutrition.** Inadequate intake of calcium and phosphorus in the feed can occur at the onset of lay for a number of reasons. The flock feed consumption can be slow to increase compared to requirements as egg production begins. Incorrectly formulated feed, use of poor quality feed ingredients, and mistakes in feed formulation and mixing can also occur.

4. **Low Feed consumption.** It is important to monitor the actual flock feed consumption and make frequent feed formulation adjustments based on actual feed consumption. Feed consumption of a flock

depends on many factors such as the house temperature, feeder space, or the type of feeding system. Seasonal heat stress can lower feed intake. Economics of feeding for production cost alone can be costly if not monitoring all the other factors that go into the net return.

PREVENTION

A. Nutrition.

1. **Pullets grown to maximize frame size to 12 weeks of age.** Use pullet feeding programs that maximize the development of skeletal structure and lean body tissue. Rations using excessive fat may result in onset of egg production before skeletal frame development is completed. Use a prelay ration to build medullary bone when light stimulation or the first signs of sexual maturity occur (usually 3 weeks prior to egg production).

2. **Begin a Pre-peaking diet one week before egg production starts.**

3. **Strain maturity differences** must be considered when programming prelay and peak formulas. For example, Strain A may require Prelay ration at 16 weeks and a layer ration at 18 weeks, while Strain B requires Prelay at 17 weeks and a layer ration at 19 weeks because of later sexual maturity. First step in preventing CLF is the proper programs for this period.

4. **Peaking diet.** Genetic progress has increased egg mass output by 180-190 grams/hen/year. This increase requires 15-20 more grams of calcium i.e. 50 mg calcium per Hen/Day, or 0.5% calcium in a formula based on 100 grams per bird feed consumption (20 lb/100 birds/day). A ration that is consumed at 82 grams/bird/day (18 lbs/100 birds/day) providing 4 grams calcium/hen/day must contain 4.9% calcium. Large particle size of calcium ensures the slow release of calcium during the night when eggshell is formed. Solubility of the calcium source must also be considered.

5. **Phosphorus Intake.** Bone contains 18.5% phosphorus and 39% calcium. Pullet

rations must contain adequate phosphorus to build maximum skeletal structure and for the remodeling of bone. Intakes of phosphorus should be 300-500 mg/hen/day. Younger hen's phosphorus requirement is higher. Low phosphorus intake can occur when phosphorus availability of feed ingredients is overestimated.

6. **Vitamin D and 25 OHD₃.** Vitamin D is important for the movement of feed calcium from intestine to the blood and the mobilization of calcium from the bones for shell formation. D₃ is an inexpensive feed ingredient and it is usual for a large safety factor of 8 to 12 times the actual requirement.

B. **Environment.** The cage design and feeder system management should provide adequate amounts of feed to all birds in a cage. The evening feeding should be within two hours of lights out. Lower house temperatures can be used to stimulate feed consumption, 68°-73° F. A midnight feeding of 1 hour may increase feed consumption during hot weather by 2 or 3 grams/bird/day.

C. **Treatment of osteoporosis.** The incidence of osteoporosis can range from a small portion of the daily mortality to large numbers of hens with deformed keels and beaded ribs. Flock problems can lead to low production or poor shell quality. A problem with treatment is that hens are unable to reform cortical bone when in lay. Research shows little benefit to increasing dietary Ca, P and D₃ levels when CLF is diagnosed when measuring bone ash and calcium content.

CONCLUSION

Osteoporosis (CLF) causes economic loss to the egg industry from increased mortality, reduced shell quality, loss of egg production (H/H eggs) and decreased fowl value. The condition is preventable with proper introduction of prelay and prepeak feeds. Formulation of feeds based upon the actual feed intake of the flock is critical in accurately delivering the daily requirements of nutrients.

Table 1. Current W-98 Ca and AvP Nutritional Recommendations

	Age	Ca	AvP
Starter	0-6 weeks	1.0%	.50%
Grower	6-8 weeks	1.0%	.48%
Developer	8-16 weeks	1.0%	.46%
Prelay	16-18 weeks (5%)	2.75%	.50%
Prepeak	5-50% egg production	4.00%	.50%
Peaking	50%-32 weeks	4.10 gm	.50 gm
A	32-44 weeks	4.25 gm	.45 gm
B	44-58 weeks	4.40 gm	.40 gm
C	>58 weeks	4.55 gm	.35 gm

DIGESTIBILIDAD APARENTE ILEAL DE PROTEINA Y AMINOACIDOS EN POLLOS DE ENGORDA CON LA ADICION DE FITASA EN LA DIETA

APPARENT ILEAL DIGESTIBILITY OF PROTEINS AND AMINOACIDS IN BROILERS AFTER ADDITION OF PHYTASE TO THE DIET

Cortes Cuevas Arturo ^{*1}, Fuente MB¹, Avila GE¹, Mojica MC², Alvarez M³

¹Centro de Enseñanza, Investigación y Extensión en Producción Avícola de la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia de la UNAM, ²Productos Roche S.A, ³Degussa, México S.A.

SUMMARY

Peniophora lycii-derived phytase was evaluated in low calcium/low phosphorus, sorghum-soybean broiler diets. Treatment groups were: 1) Normal diet; 2) same as 1 + 750 phytase units/kg; 3) Low Ca/Low P diet (0.1%); and 4) same as 3 + 750 phytase units/kg. Weight gain and feed conversion rate results after 19 showed the effect of phytase ($P < 0.05$). Feed intake and apparent ileal digestibility of both protein and amino acids were similar among treatment groups ($P > 0.05$). The use of phytase resulted in increased ($P < 0.15$) apparent metabolizable energy increased.

RESUMEN

Se evaluó una Fitasa a partir de (*Peniophora lycii*) en dietas sorgo + soya bajas en calcio y fósforo para pollos de engorda. Los tratamientos fueron: 1.- Dieta normal, 2.- Como 1 + 750 unidades/kg de fitasa, 3.- Dieta con menor contenido de calcio y fósforo (0.1%), y 4.- Como 3 + 750 unidades/Kg de fitasa. Los resultados en 19 días para ganancia de peso y conversión alimenticia indicaron efecto a la fitasa ($P < 0.05$). El consumo y la digestibilidad aparente ileal para proteína y aminoácidos fueron similares entre tratamientos ($P > 0.05$). La energía metabolizable aparente aumentó con la fitasa ($P < 0.15$).

INTRODUCCIÓN

Los ingredientes que en mayor porcentaje se emplean en alimentos balanceados para aves son de origen vegetal. Aproximadamente el 70% del fósforo en estos ingredientes está presente como fósforo fítico, el cual es deficientemente utilizado por las aves. La incapacidad para utilizar el fósforo fítico origina problemas de tipo económico y medio ambientales; grandes cantidades de fósforo (P), se eliminan a través de las excretas, lo que ocasiona contaminación de lagos y ríos. Otro aspecto relacionado, es que los alimentos balanceados se tienen que suplementar con fosfatos inorgánicos, para poder cubrir el requerimiento de P del ave y esto resulta ser costoso. En base a lo anterior una mejora en la utilización del fósforo fítico por el

animal, reducirá los costos de producción y la contaminación por P.

MATERIAL Y MÉTODOS

Se emplearon 160 pollos mixtos de un día de edad alimentados con dieta sorgo + pasta de soya con y sin menor contenido de calcio y fósforo inorgánico (0.1%) y con y sin 750 unidades/Kg de fitasa, utilizando como marcador al cromo. Se utilizó un diseño completamente al azar con un arreglo factorial 2x2; donde un factor fue la dieta normal y con menor contenido de calcio y fósforo (0.1%), el otro factor fue con y sin la adición de fitasa. Los tratamientos fueron: 1.- Dieta normal, 2.- Como 1 + 750 unidades/kg de fitasa, 3.- Dieta con menor contenido de calcio y fósforo (0.1%), y 4.- Como 3 + 750 unidades/Kg de fitasa. Se evaluó además la ganancia de peso, consumo de alimento y conversión alimenticia.

RESULTADOS

Los resultados obtenidos en 19 días de experimentación para ganancia de peso (530.7^a, 571.2b, 503.5^a, 522b g) y conversión alimenticia (1.50^a, 1.41b, 1.56^a, 1.46b) indicaron efecto a la adición de fitasa ($P < 0.05$). El consumo de alimento (796.2, 804.2, 788.2 y 763.0 g) fue similar entre tratamientos ($P > 0.05$). La energía metabolizable aparente (2976^a, 3058b, 2946^a, y 3060b Kcal/Kg) aumentó con la adición de fitasa ($P < 0.15$). Los resultados de la digestibilidad aparente ileal para proteína y aminoácidos fueron similares entre tratamientos ($P > 0.05$).

CONCLUSIONES

De los resultados obtenidos en el presente trabajo se puede inferir que la adición de 750 unidades/Kg de fitasa a partir de *P. lycii* en dietas a base de sorgo + pasta de soya, permite reducir el contenido de Ca y P (0.1%), además se mejoró la ganancia de peso y conversión alimenticia, debido a una mayor liberación de energía metabolizable aparente en las dietas. (Este trabajo de investigación posteriormente se publicará en la revista *Veterinaria México*).

EFFECTO DE LA ADICIÓN DE FITASA COMO FUENTE DE FÓSFORO INORGÁNICO EN DIETAS PARA GALLINAS DE POSTURA

THE EFFECT OF PHYTASE ADDITION AS A SOURCE OF INORGANIC PHOSPHOROUS IN LAYER DIETS

Fuente MB, Cortes CA, Avila GE.

Centro de Enseñanza Investigación y Extensión en Producción Avícola. Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia de la UNAM. Correo electrónico: bfuente@correo.unam.mx

SUMMARY

Peniophora lycii-derived phytase was evaluated using low calcium (Ca)/low phosphorus (P) sorghum-soybean layer diets. A total of 288 45-week-old hens were used. A 2x2 factorial design was applied. Factors were the level of inorganic P supplemented as dicalcium phosphate in the diet, and the inclusion of phytase. The addition of a microbial phytase was sufficient to alleviate deficiency signs in available P-deficient diets.

RESUMEN

Se evaluó una fitasa a partir de (*Peniophora lycii*) en dietas sorgo + soya bajas en calcio y fósforo para gallinas de postura. Se emplearon un total de 288 gallinas de 45 semanas de edad al inicio de la prueba. Se usó un diseño factorial de 2 x 2 ; siendo un factor el nivel de fósforo inorgánico suplementado con fosfato dicálcico, en la dieta, y la inclusión de fitasa. La adición de una fitasa microbiana fue suficiente para aliviar los signos de deficiencia en dietas deficientes en fósforo disponible.

INTRODUCCIÓN

La importancia del fósforo en dietas para gallinas, radica en que este mineral es uno de los nutrimentos más caros, después de la energía y la proteína en la formulación de raciones. Una causa de ello es que el fósforo (P), en las plantas está unido en forma de fitatos y no es totalmente disponible para las aves. Sólo entre el 30 y el 40% del P total que consumen las aves a través de ingredientes de origen vegetal es fósforo disponible (Pd) y el resto no se aprovecha. En el caso de las aves esto es un problema, debido a que no cuentan con fitasas para hidrolizar el ácido fítico haciendo disponible el fósforo para el animal. Por lo tanto es necesario la adición de fuentes de fósforo inorgánico en las dietas para cubrir las necesidades de Pd y obtener óptimos comportamientos biológicos en las aves. Las necesidades de Pd en las aves son un problema de índole económico y ecológico ya que una gran cantidad del fósforo consumido por el animal es

excretado en las heces y la orina, estos residuos animales se depositan en el suelo y son lavados y drenados por acción del agua de lluvias contaminando estanques, arroyos, lagos, ríos y océanos. Durante la última década los avances en biotecnología han resultado en la producción a gran escala de fitasas microbianas capaces de hidrolizar el ácido fítico y liberar el fósforo ligado a los fitatos. Estudios realizados en gallinas de postura han demostrado que la adición de enzimas fitasas exógenas a las raciones mejoran la utilización del fósforo por lo que puede reducirse el fósforo que se adiciona a las raciones para gallinas de postura y por ende reducir la eliminación del fósforo al medio ambiente. El objetivo del presente trabajo fue evaluar el comportamiento productivo y el grosor de cascarón en gallinas de postura al suplementar con una fitasa a partir de (*Peniophora lycii*) en dietas sorgo + pasta de soya, sin adición de una fuente concentrada de fósforo inorgánico.

MATERIALES Y MÉTODOS

Se realizó en el Centro de Enseñanza Investigación y extensión en producción Avícola de la Facultad de Medicina veterinaria y Zootecnia de la UNAM. Se emplearon un total de 288 gallinas de la línea Isa Babcock-B300 de 45 semanas de edad al inicio de la prueba. Las aves se distribuyeron al azar en 4 tratamientos con 6 repeticiones de 12 gallinas cada una. Se empleó una dieta basal sorgo + pasta de soya deficiente únicamente en Pd, a partir de la cual se hicieron los siguientes tratamientos: T1.- Dieta basal sorgo + pasta de soya sin adición de una fuente concentrada de fósforo inorgánico; T2.- Como T1 + 460 unidades/Kg de alimento; T3.- Dieta basal sorgo + pasta de soya con 0.1% fósforo inorgánico y T4.- como T3 + 460 unidades/Kg de alimento. En el Cuadro 1, se muestra la composición de las dietas basales con base en sorgo + pasta de soya y en el análisis calculado se nota que la dieta sin fosfato dicálcico adicionado aportó 0.1 % de fósforo inorgánico y con fosfato dicálcico 0.2 %. Se usó un diseño factorial de 2 x 2 ; siendo el primer factor el nivel de fósforo inorgánico

suplementado con fosfato dicálcico, en la dieta (0 y 0.1 % de fósforo inorgánico), el segundo la inclusión de fitasa (0 y 460 unidades/kg de alimento); cada tratamiento tuvo seis repeticiones. Se llevaron registros semanales, durante las siete semanas, de los parámetros productivos (porcentaje de postura, consumo de alimento, peso de huevo, conversión alimenticia y masa de huevo). Además se midió el grosor de cascarón al final del experimento.

RESULTADOS

El análisis estadístico de los resultados obtenidos en 49 días de experimentación, mostró interacción estadísticamente significativa ($p < 0.05$) en el porcentaje de postura, el cual se mejoró al adicionar fitasa en la dieta sin suplementación de fósforo inorgánico (68.9^a, 80.3^b, 79.7^b y 78.8^b). Existió diferencia estadística significativa ($p < 0.05$) en peso promedio del huevo (63.4g y 65.2), consumo de alimento por ave (107.3 y 111.9g) y masa de huevo (47.13 y 51.89 g) siendo mejores los resultados con la suplementación de 0.1% de fósforo inorgánico (0.2% de fósforo disponible) en la dieta. En porcentaje de postura, conversión alimenticia y grosor no se encontró efecto a el fósforo o a la adición de la fitasa.

DISCUSIÓN

Los resultados de este experimento muestran que aquellas dietas a las cuales fue adicionado 0.1% de

fósforo inorgánico y la fitasa, fueron mejores en el porcentaje de postura y consumo de alimento, con respecto a aquellas sin adición de fósforo orgánico. Estos resultados coinciden con trabajos publicados de Van der Klis et al. Quienes concluyeron que dietas que contenían 0.12% de fósforo disponible no era suficiente para mantener un óptimo comportamiento productivo en gallinas de postura. La información obtenida indica que la adición a dietas sorgo + pasta de soya de una fuente de fósforo inorgánico o suplementación de una fitasa microbiana puede cubrir una deficiencia de fósforo en gallinas de postura; la adición de fitasa microbiana a dietas de gallinas de postura puede sustituir un 0.1% del fósforo inorgánico de la ración debido a que esta enzima es capaz de liberar parte del fósforo presente en forma de ácido fítico de los ingredientes.

CONCLUSIÓN

La adición de una fitasa microbiana a partir de (*Peniophora lycii*) 460 unidades/Kg de alimento, fue suficiente para aliviar los signos de deficiencia (disminución de consumo de alimento, del porcentaje de postura) en dietas deficientes en fósforo disponible (0.1% de la dieta). La mejora pudo deberse no solo al incremento en la disponibilidad de fósforo sino de otros nutrimentos como energía y otros minerales como calcio, lo cual no fue determinado.

Cuadro 1. Composición y aportes nutricionales de las dietas basales

Ingredientes (%)	Dieta con 0% de Pi	Dieta con 0.1% de Pi
Sorgo	70.79	71.09
Pasta de soya	18.40	18.35
Carbonato de calcio	8.87	8.63
Azúcar	0.54	0.05
Aceite	0.50	0.50
Fosfato dicálcico	0.00	0.49
Otros*	0.90	0.89
Nutrimento	Análisis calculado	
Proteína cruda %	15.0	15.0
EM Aves Kcal/kg	2800	2800
Lisina	0.694	0.693
Metionina + Cistina	0.615	0.615
Calcio total %	3.500	3.500
Fósforo disponible	0.099	0.200

* Vitaminas y minerales por Kg. Vitamina A (4,000 MUI), Vitamina D3 (1,1000 MUI), Vitamina E (4,000 MUI), Vitamina K₃(0.9 g), Vitamina B1 (0.5g), Vitamina B2 (2.0g), Vitamina B6 (0.5 g), Vitamina B12 (4.0 mg), Acido Fólico (0.2g), Biotina (20.0mg), Ac. Pantoténico (6.0g), Niacina (0.9g), Hierro (110g), Zinc(50g), Manganeso (110g), Cobre (12g), Yodo (0.30g), Selenio (100mg), Cobalto (0.20g) Antioxidante (10.0g), sal, metionina, pigmento, cloruro de colina 60%, promotor de crecimiento, antioxidante.

Nota: Este trabajo de investigación solo tiene resultados preliminares por lo que posteriormente se publicara en la Revista Veterinaria México.

ASEGURAMIENTO DE CALIDAD EN DETERMINAR EL NIVEL DE VITAMINA A EN ALIMENTOS BALANCEADOS

QUALITY ASSURANCE IN THE QUANTIFICATION OF VITAMIN A IN FINISHED FEEDS

Medina B. J.C., Lara A. J., Muñoz S. J. y Altamirano C. M

NUTEK S.A. de C.V. 7 Norte 416 Tehuacán, Pue. 75700 México nutek@grupoidisa.com

SUMMARY

Premix and balanced feed manufacturers must guarantee that their products actually contain label-declared concentrations of nutrients and additives. In recent years lack of agreement between vitamin A results obtained in our laboratory and those specified by premix/feed suppliers has been repeatedly experienced. In order to have international arbitrage, our laboratory entered the Association of American Feed Control Officers's (AAFCO) result verification program. This paper describes the results obtained in this quality assurance program.

RESUMEN

Los fabricantes de premezclas y alimentos balanceados deben garantizar que sus productos contienen las concentraciones de los nutrientes y aditivos que especifican en sus etiquetas respectivas, durante los últimos años se han presentado, en diferentes ocasiones, la no concordancia entre los resultados de vitamina A emitidos por este laboratorio contra los especificados por los proveedores de premezclas y alimentos. Para tener un arbitraje internacional, este laboratorio se incorporó al programa de verificación de resultados de la Association of American Feed Control Officials (AAFCO). En este trabajo se presentan los resultados obtenidos en este programa de aseguramiento de calidad.

INTRODUCCIÓN

Hasta la fecha no existe ningún método oficial, por cromatografía de líquidos (HPLC), para la determinación de vitamina A en premezclas y alimentos terminados, pero es la técnica de elección en prácticamente todos los laboratorios que analizan esta vitamina, lo que origina que se presenten diferencias importantes cuando se realizan ensayos entre los laboratorios de los productores y los de constatación. El AOAC internacional sólo ha publicado el método 974.29 (1), que es colorimétrico. Esto significa que tanto los fabricantes de vitaminas como los productores de premezclas o alimentos terminados no han considerado necesario establecer un método que sea validado y sometido a un arbitraje internacional

para que el de referencia. La determinación de vitamina A en alimentos terminados es difícil al grado tal que los proveedores han establecido variaciones analíticas del 50% al 30 % en alimentos terminados, de 1000 a 5000 UI/t y de 5000 a 10000 UI/t respectivamente (Manz et al., (2).

Ante esta situación nuestro laboratorio decidió participar en el programa de verificación de resultados que es promovido por el AAFCO (Association of American Feed Controls Officials). Este programa consiste en el envío de una muestra mensual de alimento balanceado para que cada laboratorio realice los ensayos proximales, macrominerales, microminerales, aditivos y vitaminas (AAFCO (3)). Los resultados obtenidos se remiten al AAFCO y posteriormente se recibe la evaluación del trabajo realizado.

MATERIAL Y MÉTODOS

Muestras: 15 muestras de alimento balanceado y premezclas vitamínicas para diferentes especies animales enviados por el AAFCO. El procedimiento analítico fue reportado previamente en el AOAC International y en la FAO.

Procedimiento analítico: La muestra se somete a molienda, de modo tal que pase a través de malla 20, se pesan 10 g y se transfieren a un matraz volumétrico de 100 mL, se adicionan 5 mL de agua destilada y se homogeniza, se adicionan 30 mL de la solución de extracción (hexano-acetona-alcohol absoluto-tolueno (10:7:6:7)), se homogeniza, se deja en reposo por 30 minutos, se adicionan 10 mL de solución de KOH (40 % en metanol), se homogeniza y el matraz se lleva a un baño maría, previamente calentado a 55 °C, se coloca un refrigerante en la boca del matraz, y se saponifica por 20 minutos. Se retira del baño y se deja en reposo hasta que alcance la temperatura ambiente, se adicionan 30 ml de hexano, se afora con una solución acuosa al 10 % de sulfato de sodio. Homogeneizar y dejar en reposo por una hora. Se trasfiere una alícuota de 10 ml de la fase superior del extracto, se evapora, utilizando nitrógeno y se disuelve en un mL de solución de la fase móvil (metanol HPLC – agua HPLC (95:5)), se inyecta en el cromatógrafo de

líquidos, que previamente se ha estabilizado con la fase móvil y se ha calibrado con una solución de referencia de vitamina A que contenga 30 UI/mL. La concentración de vitamina A es función de la relación de las áreas de las señales detectadas de la muestra sobre la del estándar, multiplicado por la concentración de la solución estándar y multiplicando por la relación de la epifase (50 mL) sobre el peso de la muestra (Medina et al., (4), Muñoz et al. (5)).

RESULTADOS

En la tabla No. 1 se presenta la evaluación del AAFCO de los ensayos de vitamina A realizados por este laboratorio, se especifica la calificación otorgada en términos de la desviación estadística Z. La norma ISO 17025 acepta como válidos todos los valores de $\pm 2 Z$. También se incluye el rango de desviaciones lograda por todos los laboratorios participantes, en este programa participan más de 200 laboratorios, pero menos de 20 analizan la vitamina A. Todos los ensayos fueron realizados por cromatografía de líquidos.

DISCUSIÓN Y CONCLUSIÓN

El método oficial del AOAC International para la determinación de vitamina A es un procedimiento que requiere mucha manipulación y tiempo, se suelen presentar interferencias. Esto ha obligado a cada laboratorio a desarrollar métodos instrumentales, más rápidos, precisos y exactos. Actualmente en la mayoría de los laboratorios se utiliza el procedimiento por cromatografía de líquidos (HPLC), lo que falta por estandarizar es el procedimiento de preparación de

muestras y el peso de muestra, tanto para alimentos como para premezclas. Todos los laboratorios certificados y de constatación, que ofrecen sus servicios de manera independiente deben contar con un programa de aseguramiento de calidad, para cada determinación analítica, el programa que ofrece el AAFCO es el mejor de los que tenemos referencia, porque permite que cada laboratorio participe con todas las determinaciones analíticas que pueda realizar. En el caso de la vitamina A y de cualquier otro analito este programa nos permite garantizar los resultados emitidos.

REFERENCIAS

1. AOAC International. Official Methods of Analytical Chemist. Arlington VA. 2000.
2. Manz U. and Phillips K. Determination of vitamin A in complete feeds, premixes and vitamin concentrates with HPLC. Analytical methods for vitamins and carotenoids in feed. Basle, Switzerland. 5-7. 1988.
3. AAFCO. Oficial Publication. 2001.
4. Medina B., J.C.; Castillo E. Problemas en la cuantificación de vitaminas liposolubles en premezclas y alimentos terminados. Documento de Campo No. 16. Proyecto Aquila II. FAO. Santiago de Chile. 235-239. 1994
5. Muñoz J. and Lara J. Analysis and dispersion of vitamin A in premix. 111th AOAC, International Annual Meeting. San Diego. CA. USA. 88. 1997.

Tabla N°. 1. Concentración de vitamina A en las muestras remitidas por el AAFCO de febrero del 2000 a diciembre del 2001.

Tipo de muestra	Calificación para NUTEK , valor Z	Laboratorios participantes	Laboratorios con evaluación aprobatoria	Z Intervalo de variación entre todos los laboratorios.
Premix Vitaminas y minerales	Z = -0.5	19	18	5.19 a -1.72
Dieta de primates	Z = -0.32	18	17	6.84 a - 1.43
Dieta para caballos	Z = 0.10	16	15	34.04 a - 1.98
Dieta de iniciación bovinos	Z = - 0.50	16	13	4.43 a - 2.24
Dieta para borregos	Z = -0.26	17	15	608 a -1.63
Dieta para ganado de engorda	Z = -1.20	18	16	3.59 a - 1.55
Dieta para cerdos	Z = -1.02	10	9	6.14 a -1.32
Dieta iniciación aves	Z = 0.24	10	7	9.30 a - 2.14
Dieta finalización cerdos	Z = 0.36	12	11	12.14 a 1.67
Dieta crecimiento aves	Z = - 0.46	11	10	5.19 a -1.72

Dieta para becerras	Z = -0.77	17	17	2.0 a - 1.43
Dieta para cerdos	Z = -0.51	9	7	48.96 a -0.85
Dieta para perros	Z = -0.39	17	15	3.02 a - 1.16
Dieta para pollo finalizador.	Z = -0.42	11	10	1.46 a -4.01
Dieta para ganado de engorda	Z = -0.8	20	19	12.51 a -1.49
Premix vitamínico	Z = -0.34	24	18	19-07 a -2.29

BENEFICIOS DE LA EXTRUSIÓN Y LA MALTA SOBRE LOS PARÁMETROS PRODUCTIVOS DE POLLOS DE ENGORDA

BENEFITS OF EXTRUSION AND MALT ON BROILER PRODUCTIVE PARAMETERS

T. Quezada,¹ J. D. Figueroa,² E. Rebollar,³ A. Valdivia,¹ y G. Acero¹

Centro de Ciencias Agropecuarias¹ de la Universidad Autónoma de Aguascalientes. Tquezada@correo.uaa.mx ó teodulo_quezada@latinmail.com Centro de Investigaciones Avanzadas Unidad Querétaro (CINVESTAV- Qro.)². Estudiante de maestría del Programa Interinstitucional en Ciencias Pecuarias Universidad de Colima³.

SUMMARY

With the purpose of evaluating the benefit of both extrusion and the addition of malt to broiler diets to improve productive parameters, four 7-week experiments including 1,400 Ross male broilers were carried out. Diets were: starter, 1-4 weeks; finisher, 5-7 weeks, in accordance with NRC requirements, with 22 and 19% protein, respectively, and 3,000 kcal/kg feed in both phases, with the exception of experiment 4, where the energy level was decreased to 2,800 kcal/kg. Some beneficial changes were observed in major broiler parameters.

RESUMEN

Con propósito de evaluar el beneficios del uso de la extrusión y la adición de malta a la dieta de pollos de engorda para mejorar los parámetros productivos, se realizaron cuatro experimentos con 1400 pollos machos Ross, alimentados durante siete semanas, iniciación (1-4 semanas) y finalización (5-7 semanas) de acuerdo a los requerimientos del NRC, con 22 y 19% de proteína y 3000 kcal/kg de alimento en cada etapa respectiva y con una disminución de energía (2800 kcal/kg de alimento) en el cuarto experimento. Se observaron algunos cambios benéficos en los parámetros principales de los pollos de engorda.

INTRODUCCIÓN

Proporcionar los nutrientes óptimos al pollo de engorda en un ciclo de producción corto, es motivo de constante investigación, ya que se tienen condicionantes adicionales que deben de tomarse en cuenta, como la baja disponibilidad y el alto costo de

las fuentes de proteínas que obligan a utilizar en forma óptima estos recursos⁽¹⁾. Dentro de esta posibilidad se encuentra el uso de la extrusión y enzimas que tiendan a mejorar los niveles de digestibilidad de las dietas y reducir los efectos detrimentales de factores antinutricionales presentes en diversos ingredientes^(2,4). Figueroa, (1985) describe el malteo como proceso físico químico controlado, durante el cual los granos desarrollan y activan sus sistemas enzimáticos y modifican suficientemente sus reservas alimenticias. La malta obtenida de granos como la cebada es una fuente barata de enzimas *β-amilasa*, *α-amilasa*, *β-glucanasa*, etc., que se pueden producir en granjas y aprovechar en alimentos balanceados para los animales domésticos⁽³⁾. Las *α-amilasas* y las *xilanasas* potencializan la disponibilidad de nutrientes de las principales fuentes de energía⁽⁸⁾. La adición de enzimas en la fabricación de alimentos para el ganado tiene como principal objetivo favorecer la digestibilidad y así lograr la utilización óptima de los nutrientes⁽⁹⁾. El uso de la extrusión y la adición de enzimas a partir de la malta en los alimentos balanceados de los pollos de engorda, permiten suponer la mejora de la utilización y optimización de los nutrientes de los alimentos, mediante la evaluación de los principales parámetros productivos de las explotaciones de pollos de engorda.

MATERIALES Y MÉTODOS

Se llevaron a cabo cuatro experimento, en cada uno se recibieron 7000 pollos sexados de un día de edad y con un peso promedio de 40.0 g ± 2.0 g, en la caseta de la Unidad de Pollos de engorda del Centro de Ciencias Agropecuarias, se seleccionaron en forma

aleatoria 1400 pollos machos, se pesaron y se repartieron en 18 grupos en forma aleatoria, se asignaron seis tratamientos en dos etapas simultaneas; primera etapa, dieta uno control (CTL), dieta dos con maíz extrudido en la fase de iniciación (MEI), dieta tres con maíz extrudido en la fase de iniciación y finalización (MEIF), segunda etapa, dieta cuatro maíz extrudido solo en la fase de iniciación más 2% de malta en la fase de iniciación y finalización (MEI 2%), dieta cinco maíz extrudido solo en la fase de iniciación más 4% de malta en la fase de iniciación y finalización (MEI 4%) y dieta seis maíz extrudido solo en la fase de iniciación más 6% de malta en la fase de iniciación y finalización (MEI 6%), con tres repeticiones cada uno, quedando un total de 79 aves por tratamiento y repetición. Se recibieron con agua medicada con antibióticos y electrolitos por tres días y vacunados de la incubadora contra Marek, Newcastle y Bronquitis. Se vacunaron en el agua de bebida contra Gumboro a los cuatro días de edad, contra Newcastle en vía ocular y mixta Newcastle-Bronquitis subcutánea a los 10 y 22 días de edad y solamente contra Newcastle vía subcutánea a los 32 días de edad. Se alimentaron *ad libitum* las aves con dietas en base a los requerimientos del NRC⁽⁵⁾, con un 22% de proteína y 3000 kcal/kg de alimento en la fase de iniciación y 20% de proteína con 3000 kcal/kg de alimento en la fase de finalización. La diferencia con el cuarto experimento solo fue la disminución de energía a 2800 kcal/kg de alimento en la fase de iniciación en todos los tratamientos a los que se les adiciono la malta. El agua de bebida fue administrada *ad libitum*. Se registro diariamente el consumo de alimento, la mortalidad, se pesaron los pollos semanalmente. Se obtuvo el porcentaje de mortalidad y viabilidad, el consumo total de alimento (CTA), consumo de alimento diario por ave (CADA), ganancia diaria de peso (GDP), los pesos promedio, los índices de conversión alimenticia (IC), los índices de eficiencia (IE), la eficiencia alimentaria (EA), los índices de productividad (IP) y el punto de desenvolvimiento (PD). Se organizaron los datos y se sometieron un análisis de varianza (ANOVA) y una prueba de medias de comparación múltiples Tukey y Krhamer con un paquete computarizado de SAS⁽¹⁰⁾

RESULTADOS

En los resultados de las ganancias diarias de peso correspondientes a los primeros tres experimentos con sus dos etapas respectivas se pudo apreciar una tendencia mayor de GDP para los pollos que se alimentaron con cualquiera de los tratamientos de extrusión y de adición de enzimas a los tres niveles utilizados (2, 4 y 6 %). Por otra parte, en el experimento No. 4, no se mostró esta tendencia como en los anteriores, esto fue debido probablemente a la

disminución de energía que se realizó a las dietas en la fase de iniciación.

Los pesos promedio finales que se registraron para cada uno de los primeros tres experimento en la primera etapa las aves alimentadas con MEI y MEIF muestran un mejor peso que los controles pero entre estos son muy similares por lo que sugiere que uno u otro que se utilice tiene el mismo efecto en el peso, y en la segunda etapa se mostró la misma situación con la característica de que los animales más pesados en forma constante en los tres experimentos fueron los MEI 2%, MEI 4% y MEI 6% respectivamente. Para el caso del cuarto experimento fue el mismo comportamiento con la ventaja de que este ultimo no contaba con el mismo nivel de energía de en los anteriores.

Los valores de los índices de conversión en la primera etapa también fueron mejores para los MEI y MEIF con respecto a los CTL, sin embargo presentan una tendencia a la mejora de la conversión alimenticia por parte de los pollos alimentados con el MEI que con el MEIF. Para la segunda etapa en este parámetro se observo que los animales alimentados con MEI 2%, MEI 4% y MEI 6% fueron mejores que los CTL, sin embargo también se marca una tendencia de menor a mayor índice de conversión de la siguiente manera 6%, 4% y 2% respectivamente, esto indica la probabilidad de usar o recomendar una concentración de malta al 6% para obtener un mayor beneficio. El cuarto experimento también mostró la misma tendencia aunque de menor grado que en los anteriores.

La eficiencia alimentaria para la primera etapa de los experimentos 1, 2, 3 y 4 se mostraron con un valor mayor para todos con respecto al CTL, y con una tendencia de que el MEI es mejor que el MEIF por consecuencia produce una mayor cantidad de kg de carne por tonelada de alimento consumido. Mientras que, en la segunda etapa de los mismos cuatro experimentos en general los MEI 2%, MEI 4% Y MEI 6% mostraron ser mejores que los CTL y en particular el MEI 6% presenta una tendencia de ser el mejor tratamiento recomendado para la alimentación de los pollos.

El índice de eficiencia durante la primera etapa de todos los experimentos incluyendo el cuarto, fueron mayores para todos los tratamientos con respecto al CTL, no encontrándose una tendencia clara entre los MEI y MEIF indicando de esta manera que uno u otro que se utilice da el mismo resultado. Mientras que, para la segunda etapa de los experimentos 1, 2, y 3 se detecta una clara tendencia a que cualquier tratamiento es mejor que el CTL e igualmente esta tendencia se manifiesta en que el MEI 2% y MEI 6% son las mejores e inclusive en el cuarto experimento se observa la misma situación. Cabe mencionar que los valores obtenidos de los índices de eficiencia en

nuestros experimentos se clasifican de buenos a excelentes por su rango de 130 a 140.

Con el índice de productividad se puede comentar que todos los valores obtenidos de ambas etapas (1ª y 2ª) están clasificados entre buenos y excelentes con rangos de 250 a 350.

EL punto de desenvolvimiento mostrado en los cuatro experimentos durante la primera y segunda etapa fue que en todos los tratamientos se manifestaron con un mejor rango con respecto a los CTL. Su clasificación corresponde a una categoría de regular a bueno obteniendo valores entre un rango de 350 a 400 puntos, mientras que los CTL registraron rangos inferiores a 300 puntos.

REFERENCIAS

1. Arce, M. J., C. C. López y G. E. Avila. Sistemas de alimentación en pollo de engorda. Tecnología Avipecuaria. Año 14, No. 166. pp 6-10. 2001
2. Durán, D. C. La extrusión alcalina una tecnología útil para procesar granos. Industria Alimentaria. Vol. 18 No. 6 Nov - Dic. pp. 20-32. 1996
3. Figueroa, C. J. D. Métodos para evaluar la calidad maltera en cebada. Secretaria de Agricultura y Recursos Hidráulicos. Tema didáctico. No. 17. México. 1995
4. Gómez, A. C. A. Efectos del procesamiento de extrusión CINVESTAV sobre los componentes

Químicos y características nutricionales de harinas instantáneas de maíz para la elaboración de tortillas. Tesis de maestría Universidad Autónoma de Sinaloa. México. 1995

5. National Research Council. Nutrient Requirements of Poultry, Eight revised edition, National Research Council. Washington, D.C. 1984

6. Ortiz, M. A., H. F. Ingalls, P. F. Alonso y G. J. Nuñez. Índices de productividad en pollo de engorda. Tecnología Avipecuaria en Latinoamérica. 10; 118: 3 - 8. 1997

7. Quintana, L. A. Avitecnia, manejo de las aves más comunes. Ed. Trillas. 3ra edición. México, D. F. 1999

8. Rob, F. B. and R. M. Ronald. Las enzimas en alimentos balanceados: Pasado, Presente y Futuro. Temas de actualidad para la Industria de alimentos balanceados. Ed. Midia Relaciones S.A. de C. V. México pp. 152 - 156. 1997

9. Sears, A., G. Walsh y G. Hoyos. Enzimas: Generalidades acerca de las Aplicaciones, clasificación mecanismos de acción y resultados en nutrición animal. Temas de actualidad para la industria de alimentos balanceados. Ed. Midia Relaciones S.A. DE C.V. México, D.F. pp. 158 - 166. 1997

10. Statistical Analysis System (SAS). SAS User's guide. Version 6 edition the Institute Cary NC. 1997.

UNIFORMIDAD EN ALIMENTOS BALANCEADOS

BALANCED FEED UNIFORMITY

Joel Muñoz*, Rubén Pérez, Alicia Bringas y Juan Carlos Medina.

Nutek S.A. de C.V. 7 Norte 416. Tehuacán, Pue. E-mail: nutek@grupoidisa.com

SUMMARY

Birds need various nutrients like protein, fat, carbohydrates, minerals, and vitamins. Nutrient requirements are proportional to expected performance. Different factors affect the uniformity of balanced feeds⁴. This study evaluated the quality of layer feeds. Ten samples from different production batches were obtained under normal working conditions, and both zinc and manganese levels were determined y atomic absorption. Protein, fat, calcium, and phosphorus variations in feeds manufactured by a feed mill during the second half of 2001 are also reported.

RESUMEN

Las aves necesitan varios nutrientes como proteínas, grasa, carbohidratos, minerales y vitaminas, la demanda de los cuales está en proporción con el

rendimiento esperado. Diversos factores afectan la uniformidad de los alimentos terminados(4). En este trabajo se evaluó la calidad de mezclado de alimentos de postura. Se tomaron 10 muestras de diferentes lotes de producción, en condiciones normales de trabajo y se cuantificó el zinc y manganeso por la técnica de absorción atómica. También se reporta la variación en el contenido de proteína, grasa, calcio y fósforo en alimentos elaborados en una empresa durante el segundo semestre del 2001.

INTRODUCCIÓN

Los programas de control de calidad en una planta de alimentos pueden generar una amplia cantidad de datos, que si no se usan adecuadamente para mejorar la producción, el tiempo y los recursos gastados para obtener esta información son desperdiciados. Un

programa de calidad puede ser complejo y muy extensivo o relativamente simple e inextenso, dependiendo de nuestras necesidades. Pero por simple que sea un programa de calidad, avances tecnológicos como es la automatización de las plantas de alimentos, la adición de ingredientes en forma líquida, el número de ingredientes que se incorporan a la dieta y las distintas fases de alimento que se elaboran lo hacen complejo.

La base para el establecimiento de un programa de calidad son las especificaciones requeridas tanto de las materias primas como de los alimentos terminados. Las especificaciones nutricionales de los ingredientes se establecen de acuerdo a la propia naturaleza del producto, el precio y la disponibilidad en el mercado; por otro lado, las especificaciones de los alimentos son las que corresponden a la etapa de la vida de los animales y se diseñan para cumplir requerimientos específicos. La formulación de un alimento se realiza con el propósito de que contenga los requerimientos nutricionales de las aves. Por lo tanto se debe tener la seguridad de que los alimentos estén perfectamente homogeneizados. Se acepta como criterio de uniformidad el 10 % del coeficiente de variación. En condiciones óptimas, cada muestra que se analice debe ser idéntica en contenido de atributos a cualquier otra muestra del mismo lote.

Se considera que un alimento no está bien homogeneizado cuando uno o más ingredientes, no están presentes en el mismo porcentaje o relación, en que estaban antes de efectuar el proceso de mezclado. Los alimentos mal procesados, a menudo pueden ser corregidos por ajuste de las mezcladoras, o por reemplazo de los componentes que se han desgastado. La secuencia de adición de los ingredientes y aditivos en la mezcladora, afecta el proceso de mezclado. Aumentar los tiempos de mezclado no siempre mejora la uniformidad de un alimento en particular. Entre las causas de la obtención de un alimento fuera de especificaciones, son la realización de una pesada incorrecta o fallas en alguna operación de la cadena de producción, como el no haber agregado las cantidades correctas de algún ingrediente. Cuando el análisis de una muestra de alimento indica que no cumple las especificaciones, la investigación inicial para descubrir la causa debería incluir una revisión sobre la exactitud o mal funcionamiento de los equipos de pesada y del sistema de bombeo de los ingredientes líquidos.

METODOLOGÍA

Se evaluaron dos parámetros: el primero fue para determinar la uniformidad del mezclado, con tiempo preestablecido de homogenización, este proceso se llevó a cabo 10 veces, en un periodo de tiempo de dos meses y el segundo fue para determinar la variación de

los lotes de alimento para aves de postura, durante un semestre.

Se seleccionaron 10 puntos de muestreo en la mezcladora, una vez terminado el proceso de mezclado. El peso de cada muestra fue de un kg. Las muestras fueron sometidas a un proceso de reducción de tamaño, por cuarteo y molienda. En cada muestra se cuantificó el contenido de zinc y de manganeso, por absorción atómica (2). Al final se calculó el coeficiente de variación de cada lote analizado.

Los análisis de proteína cruda, grasa cruda, calcio y fósforo se efectuaron en 152 muestras, de alimento postura elaborado durante el segundo semestre del 2001. Los ensayos se realizaron de acuerdo con los métodos oficiales del AOAC Internacional, (2).

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

El cuadro 1 presenta los resultados correspondientes a la variación en el contenido de proteína, grasa, calcio y fósforo en las muestras analizadas. Se observa que los parámetros analizados en donde hubo mayor variación es el contenido de grasa y calcio. Probablemente debido a variaciones en las fuentes de grasa y calcio durante el periodo considerado, por lo que se considera importante, incluir en el programa de aseguramiento de calidad, los análisis de los principales ingredientes incluidos en la ración.

Con lo que respecta a las pruebas de mezclado la media de las medias de los 10 lotes ensayados es de 65 ppm de manganeso con un coeficiente de variación global del 13.5 %. En el caso del zinc, la gran media fue de 115 ppm con un coeficiente de variación del 19.7 %. Ambos coeficientes están fuera de la variación recomendada. Podemos suponer que la homogenización de los minerales es difícil y por lo tanto es común encontrar estos niveles de coeficiente de variación, en nuestra experiencia los coeficientes de variación que se obtienen con amino ácidos en solución varían desde 5.0 hasta 35.0 %, y la variación es atribuible a todo el proceso desde la adición hasta el mezclado final.

CONCLUSIÓN

1.No se puede evaluar la calidad de mezclado analizando un solo parámetro, ya que se estará evaluando solamente la homogenización del mismo.

2.La concentración de cada uno de los nutrientes puede variar de lote a lote y provocar que en algunos casos se obtengan parámetros fuera del rango permitido

3.En los sistemas de introducción de ingredientes líquidos se debe verificar continuamente el volumen bombeado y la homogenización de estos ingredientes.

4.Se considera como aceptable las variaciones analíticas que especifica el AAFCO (Association

American of Feed Control Official)(1) para la evaluación de los principales parámetros con los que formulan los alimentos balanceados para animales. Solo que para efectuar los cálculos es necesario conocer los valores teóricos de formulación, situación que no es común para un laboratorio certificado que trabaja de manera independiente.

2. AOAC International. Official Methods of Analytical Chemist. Arlington VA. 2000

3. R. A. Mccoy, K. C. Behnke, J. D. Hancock, and R. R. Mcellhiney. Effect of Mixing Uniformity on Broiler Chick Performance. Poultry Science. 73:443 – 451. 1994

4. Wicker, D.L. and D.L. Poole. 1991. How is Your Mixer Performing. Feed Management, 42 (9) 40, 43.

REFERENCIAS

1. AAFCO. Official Publication. 2001

Cuadro 1. Promedio de resultados de proteína, grasa, calcio y fósforo

Identificación	n	% de proteína			% de grasa cruda			% de calcio			% de fósforo		
		med	D. E.	C. V.	med	D. E.	C. V.	med	D. E.	C. V.	Med	D. E.	C. V.
Fase A	23	20.4	2.4	11.8	6.0	1.55	25.8	1.45	0.23	15.9	0.71	0.068	9.6
Fase B	51	19.4	1.05	5.4	6.6	0.79	12.0	4.0	0.42	10.5	0.54	0.044	8.1
Fase C	62	17.4	1.40	8.0	4.5	0.76	16.9	4.3	0.79	18.4	0.51	0.042	8.2
Fase D	16	17.0	0.93	5.5	4.0	0.93	5.5	4.0	0.91	22.8	0.54	0.051	9.4

DIETAS FORMULADAS A PROTEÍNA IDEAL Y RESTRICCIÓN ALIMENTICIA, SOBRE LA HIPERPLASIA E HIPERTROFIA DEL TEJIDO GRASO ABDOMINAL EN POLLOS DE ENGORDA

EFFECT OF IDEAL PROTEIN-FORMULATED DIETS AND FEED RESTRICTION ON FAT PAD HYPERPLASIA AND HYPERTROPHY IN BROILERS

Camacho-Fernández D.¹; Chagoya de Sánchez V.²; Ávila G. E.³; López C. C.¹; Vásquez P. C.⁴; Cuarón I. J.⁵

¹ Departamento de Producción Animal Aves; FMVZ-UNAM; C.U., México, D.F., 04510. Tel: (01 55) 56225867;

Fax: 56225868; e-mail: camachofernandez@yahoo.com.mx, ² Laboratorio de Biología Celular (305-sur) del Instituto de Fisiología Celular, UNAM; C.U., México, D.F., 04510. Tel: (01 55) 56225614, ³ Centro de Enseñanza, Investigación y Extensión en Producción Avícola (CEIEPA); UNAM; Salvador Díaz Mirón s/n Zapotitlán, México, D.F., 13209. Tel: (01 55) 58450029; Fax: 58451530, ⁴ Secretaría de Investigación; División de Estudios de Posgrado e Investigación; FMVZ-UNAM; C.U., México, D.F., 04510. Tel: (01 55) 56225852 al 57; Fax: 56162342

⁵ Centro Nacional de Investigación en Fisiología y Mejoramiento Animal (INIFAP), Ajuchitlán, Qro., Tel: (01 442) 2920249; Fax: 2920033

SUMMARY

Broiler diets were studied regarding total lysine/crude protein: 5.0 (treatment 1; T1) and 5.6 (treatment 2; T2); diets were formulated following the ideal protein concept; a feed restriction program (T3) was also evaluated. Performance parameters i.e.: carcass yield, lipid profile, and abdominal fat pad hyperplasia/hypertrophy were evaluated. Females deposited more lipids than males. Higher breast yield was observed with T1. A better body weight was obtained with T2. Feed restriction results in reduced incidence of ascites syndrome, and increased lipid deposition.

RESUMEN

En pollos de engorda se estudiaron dietas con relación a lisina total/proteína cruda: 5.0 (tratamiento 1; T1) y 5.6 (tratamiento 2; T2); formuladas sobre proteína ideal; y un programa de restricción alimenticia (T3). Se evaluaron variables zootécnicas, rendimiento en canal, perfil de lípidos, hiperplasia e hipertrofia del tejido graso abdominal. La mayor acumulación de lípidos es para hembras sobre los machos. Se encontró un mayor rendimiento de pechuga con el T1 y un mejor peso corporal con el T2. Al aplicar una restricción alimenticia se disminuye el síndrome ascítico, mejorando la conversión alimenticia y se tiende a acumular más lípidos.

Se estudiaron dos dietas diferentes en la relación lisina total/proteína cruda (LT/PC), formuladas en base a proteína ideal para las fases alimenticias de crecimiento y finalización, y en un programa de restricción alimenticia en pollos de engorda, evaluando las variables zootécnicas, el rendimiento en canal, el perfil de lípidos en sangre y la acumulación, hiperplasia e hipertrofia del tejido graso abdominal. Se utilizaron 792 pollos de engorda de un día de edad (396 machos y 396 hembras), distribuidos aleatoriamente en 24 lotes experimentales de 33 aves cada uno y mantenidos en producción hasta el día 49 de edad. El diseño experimental fue un arreglo factorial 3 X 2, con tres tratamientos alimenticios por sexo y con cuatro repeticiones por tratamiento. En la fase de iniciación (0-21 días), todos los pollos recibieron la misma dieta formulada con base en el perfil de aminoácidos digestibles (23% PC; 3,100 kcal/kg de EM); para las fases de crecimiento (22-35 días) y finalización (36-49 días), las dietas fueron formuladas con base a los aminoácidos azufrados digestibles con porcentajes de 0.72 y 0.68 respectivamente; de estos, se obtuvieron los valores de lisina digestible, lisina total y proteína cruda, obteniendo de esta forma, los tratamientos: T1) LT/PC= 5.0, consumo a libre acceso; T2) LT/PC= 5.6, consumo a libre acceso; T3) LT/PC= 5.0, programa de restricción alimenticia con acceso al alimento por 8 horas diarias del día 15 al 35. Todos los tratamientos fueron isocalóricos, siendo para la fase de crecimiento 3,100 kcal/kg de EM y para la fase de finalización 3,200 kcal/kg de EM. Los resultados indican que el cambio en la relación LT/PC de 5.0 a 5.6 bajo el concepto de proteína ideal y aplicar un programa de restricción alimenticia, se modifican las curvas de crecimiento, que bien las representa un modelo cuadrático con un coeficiente de determinación alto ($R^2=0.9965$). La restricción alimenticia disminuye ($p<0.05$) el consumo de alimento, la mortalidad total (MT) y la causada por síndrome ascítico (SA), mejorando la conversión alimenticia, sin lograr un crecimiento compensatorio a los 49 días de edad. El consumo de alimento acumulado es mayor ($p<0.05$) en el T2; obteniendo el mayor peso corporal sin llegar a ser estadísticamente significativo del T1, pero sí del T3. Las hembras del T2 obtuvieron el mayor ingreso neto en análisis económico; no ocurriendo esto, en los machos del mismo tratamiento, debido al alto costo de los aminoácidos sintéticos y al obtener la mayor MT y por SA. Los machos obtienen mayor peso de la canal ($p<0.05$) que las hembras, los valores de las piezas con

relación a la canal (g/100g), para pechuga resultaron mayores en las hembras, favoreciéndose este valor en el T1; y para piernas, los valores de machos fueron mayores, siendo mejor el obtenido en el T3, encontrándose intermedio el valor del T2 para ambos sexos en las dos piezas. Las hembras acumulan más grasa abdominal ($p<0.05$) en relación a los machos para cada tratamiento, los valores del T2 resultan ser los mayores y los del T1 los más bajos. En el perfil de lípidos en sangre, sólo se encontraron diferencias ($p<0.05$) de los triglicéridos (TGC) al día 35 y de las lipoproteínas de alta densidad (LAD) al día 49; específicamente los TGC son mayores al día 35 para el T3 en ambos sexos, pero al día 49, se observó que los TGC y las LAD fueron más elevados en las hembras. Los valores de lípidos por gramo de tejido seco, son mayores en el T3 para ambos sexos, desde la quinta a la séptima semana, presentando los coeficientes semanales más altos en las ecuaciones de regresión. El ADN por gramo de tejido seco, alcanza su valor más alto a la segunda semana de edad (machos 622.67

□g y hembras
□g), disminuyen

hembras desde la tercera semana, menor en relación a los machos. A través del cálculo de la relación ADN/peso vivo en las condiciones experimentales empleadas, no se obtuvo una respuesta clara de la hiperplasia del tejido graso abdominal; sin embargo, en la relación lípidos/ADN, se observó una clara respuesta sobre la hipertrofia de este tejido, iniciando en machos en promedio a los 11.1 días y para las hembras a los 10.8; siendo mayor, desde la quinta hasta la séptima semana para machos y hembras del T3. Se concluye, que el T1 y el T2 no presentaron diferencias en la acumulación de lípidos y cantidad de ADN por gramo de tejido graso abdominal seco, ni para la hipertrofia de éste tejido; encontrando mayor rendimiento de pechuga con el T1 y un mejor peso corporal con el T2. Es eficiente el uso de la restricción alimenticia como paliativo para disminuir el SA y por ende la MT, mejorando a la vez la conversión alimenticia, más sin embargo, tanto hembras como machos no alcanzaron el crecimiento compensatorio a los 49 días de edad y presentaron mayor acumulación de lípidos por gramo de tejido graso abdominal seco y una mayor hipertrofia medida por la relación lípidos/ADN.

(El artículo completo se enviará a una revista con arbitraje que está por definirse).

CASE REPORT: DEFECTIVE DOWN IN A COMMERCIAL BROILER FLOCK

PLUMÓN DEFECTUOSO EN UNA PARVADA COMERCIAL DE POLLO DE ENGORDA

Neil S. Ambrose

Canadian Poultry Consultants, 30325 Canary Court, Abbotsford BC, V4X 2N4, Canada

RESUMEN

Informe de un caso de síndrome de plumón defectuoso en una parvada de 15,000 pollos de engorda Hubbard HI-Y, procedente de un lote conocido de reproductoras que había presentado deficiencias en los parámetros de producción desde el principio del ciclo de postura. La elevada mortalidad que se observó desde los primeros días en la granja de engorda requirió una visita de campo y una serie de trabajos diagnósticos que no revelaron ninguna patología significativa. Una revisión metódica de las medidas zootécnicas, del ambiente de la caseta y de la dieta de las reproductoras reveló un error en los niveles de inclusión de microingredientes que, una vez rectificadas, hicieron que cesara por completo el problema de plumón defectuoso en los nacimientos subsecuentes.

Defective down syndrome in newly hatched broiler chicks has occurred sporadically in the Fraser Valley of British Columbia since 1987. This syndrome has also been termed "clubbed down syndrome" in the field but, the literature associates this specifically with riboflavin deficiency and this has not been conclusively proven in British Columbia (1). In this syndrome there can be a range of down abnormalities from a complete absence of down on ventral parts to down takes on the appearance of grains of wheat with pointed ends (2). Often, other physical abnormalities are noted at hatch such as deformed limbs, red hocks, and yolk sacs that are not absorbed. As a result, defective down has caused significant economic losses to the chicken industry at all levels. Many theories have been discussed in the field with respect to an etiology and none have been proven conclusively. This report describes a case where practical epidemiology and application of basic flock husbandry principles led to positive conclusion.

CASE HISTORY

In the fall of 2001, a Hubbard X Hubbard 32wk old broiler breeder flock was encountering below standard egg production and proportionally, small egg size. Birds were laying at 72% as against an expected peak of 83% for their age. Average egg weight from a

random sample of 180 eggs was 53gms when it should have been 59gms (3). Eggs that had been set in the incubators three weeks previously from this particular breeder flock hatched at 65% and the chick cull rate on the grading line was 20% for defective down and other abnormalities. Breakout of hatch residue presented an overall fertility rate of 94% however, there were early deads of 7% and late deads of 9%. 10% of fertile eggs contained full term chicks that had pipped the shell but not hatched. The average chick weight from a sample of 30 was 36g.

From 25200 eggs set 16257 non-sexed chicks were delivered to a local broiler producer and placed in one triple decker barn with similar layout on each floor.

A farm visit on the second day of placement found chicks to be generally lethargic. Few chicks could be seen actively eating or drinking and most huddled in large groups under the brooders. Attempts made to stir the chicks had little effect. Close physical examination of the chicks found many to be displaying defective down on their ventral or dorsal body surfaces. Several had red or swollen hocks making ambulation difficult. Other chicks were missing an eye, had crossed beaks, abnormal limb anatomy, or improperly healed navels. A general trend was small chick size. A sample of 50 chicks had an average weight of 39g that may have been exacerbated by dehydration and lack of feed intake. Mortality at this point was normal. Gross necropsy revealed no infectious process and diagnostic testing of selected tissues was negative.

A second visit to the same flock at one week of age found the birds to be much more active. Poor uniformity was readily apparent with an inordinate number of small chicks. Mortality at seven days was 7%, which included a culling rate of 1%. The flock was subsequently shipped to the processing plant at 36 days with a livability of 86.6%. Average bird weight was 1.63kgs with a condemnation rate of 2.6%. Condemnation categories were unremarkable. Feed conversion was 1.92. These production parameters would be considered below industry standards for the Fraser Valley. An average bird weight for 36 days would be 1.75 - 1.90kgs.

During the broiler production cycle an investigation of the source breeder flock was made. It was found that the pullets were moved from a light tight grow barn to a non-light tight lay house at 17 weeks during a time of rapidly increasing natural day length and light intensity. The birds controlled day length and intensity were not increased until 23 weeks of age. Additionally, pullets were housed at an average body weight of 1540g, 90g below target for age. Uniformity for the flock was 60%, which is very poor. Although barn environment was adequate there were concerns over water quality on the farm as bell drinkers were heavily stained despite regular cleaning. A water treatment system had been previously installed with an emphasis on the removal of iron. However, a water sample taken that day indicated that iron was still above acceptable levels for poultry at 0.3mg/l. High iron can cause bacterial growth, bad taste, precipitate and can be toxic to poultry (4).

Perhaps most significantly, it appeared that nutrient specifications as set out by the primary breeder company were not being followed for the given age of bird. In essence birds were under fed at a time of rapidly progressing sexual maturity and onset of egg production. As this topic was being investigated it came to light that the inclusion level of vitamin B12 had been only 10% of required for the previous eight weeks. B12 is involved in nucleic acid synthesis and carbohydrate and fat metabolism. It is an important enzyme in metabolic pathways and so with a deficiency such pathways would fail. Signs of deficiency include reduced egg size and hatchability, myelin degeneration, and increased late embryonic mortality (1).

There was a major review of diet being fed following this field call. The ration was switched from a wheat based diet to a corn based diet, amino acid levels were increased, and vitamin B12 levels were rectified plus an additional 20% for all micro-ingredients was added. Within ten days the flock had increased egg production to within 2% of standard, egg size was markedly increased, and birds were gaining weight on less feed being fed. Hatching eggs produced from this time period produced defective down chicks of only 0.5% and an overall hatchability of 86%. It appeared that the defective down syndrome had been resolved in progeny form this breeder flock.

DISCUSSION

In this authors opinion, this case of defective down would appear to have a multi-factorial etiology. Although the mistake in diet formulation would be of significance in the overall nutritional status of the flock, other physical and husbandry factors in all probability contributed to the clinical syndrome of defective down in the broiler chicks. It is common practice in British Columbia to move pullets at 16wks of age, and in some cases, as early as 14wks, to the lay house. In most instances the birds go from a light tight growing barn to a non-light tight lay house. The birds are usually kept on a growing ration until coordinated light stimulation at 23wks. In this case, underweight birds were moved into an environment that could have prematurely stimulated them both physically and reproductively. As the birds aged there nutritional demands may not have been met and the birds came into production at much cost to their ability to produce good quality hatching eggs. Defective down was the clinical manifestation of a poor quality chick that was underweight and without the required ability to survive in the competitive environment of a commercial broiler barn.

This case of defective down emphasizes the critical importance of following the primary breeding company recommendations for nutrition and management of the broiler breeder to ensure that the commercial broiler chick produced carries the physical and metabolic requirements necessary to realize their genetic potential.

REFERENCES

1. Austic, R.E., and M.L. Scott. Nutritional Diseases. In: Diseases of poultry, 10th ed. B.W. Calnek, H.J. Barnes, C.W. Beard, L.R. McDougald, and Y.M.Saif, eds. Iowa State University Press, Ames, IA. Pp. 56-62. 1997.
2. Whitehead, C.C., J.S. Rennie, J.S. McCormack, and P.M. Hocking. Defective down syndrome in chicks is not caused by riboflavin deficiency in breeders. *Br. Poult. Sci.* 3:619-623. 1993.
3. Hubbard HI-Y Breeder management guide. Hubbard ISA.
4. Weltzein, E. Water quality for poultry. Poultry Industry Council. Fact sheet 111.

HEXAMITA MELEAGRIDIS INFECTION IN CHUKAR PARTRIDGES ASSOCIATED WITH HIGH MORTALITY AND INTRACELLULAR TROPHOZOITES

INFECCIÓN CON *HEXAMITA MELEAGRIDIS* EN PERDICES CHUKAR, ASOCIADA CON ALTA MORTALIDAD Y TROFOZOÍTOS INTRACELULARES

G.L. Cooper, B.R. Charlton, A.A. Bickford and R. Nordhausen

California Animal Health and Food Safety Laboratory System, Turlock Branch Laboratory,
University of California, Davis, P.O. Box 1552, Turlock CA 95381

RESUMEN

Se presentó un brote de hexamitiasis o enteritis catarrhal debida a *Hexamita meleagridis* (*Spironucleus*) en una parvada de perdices chukar en California. La enfermedad comenzó en el verano y afectó a las aves jóvenes, principalmente de 5 a 6 semanas de edad. Las heces de los animales afectados eran húmedas y sueltas, y los animales mostraron depresión y acinamiento. En las etapas terminales de la enfermedad muchas aves presentaron coma. Las tasas de mortalidad fueron inusitadamente elevadas, alcanzando el 50 a 60% en algunas casetas.

An outbreak of hexamitiasis, or infectious catarrhal enteritis, due to *Hexamita meleagridis* (*Spironucleus*) occurred in a flock of chukar partridges in California. The disease began in the summer, and affected young birds between the ages of five and six weeks primarily. Affected birds had loose wet droppings, and appeared listless and huddled. Many birds became comatose in the terminal stages of the disease. Mortality rates were unusually high, approaching 50-60% in some houses.

The affected ranch is a well-managed operation, located in the central valley of California, where summers are hot and dry, and temperatures routinely exceed 100 F. The grower is an experienced producer of game birds, and raises about 30,000 birds per year for hunting clubs (primarily chukar partridges, quail, and pheasants). The birds are housed in 30 X 60 foot wood-framed sheds, which have been divided into 6 separate pens. Each pen is enclosed by wire, and is raised off the ground with wire flooring to reduce fecal contamination. The houses are generally clean and well ventilated, however some fecal contamination of the open feeder pans and drinkers used in brooding the young birds was evident, as well as fecal contamination of the surface of the cross beams that support the wire floor.

The most obvious lesions noted on post-mortem examination were catarrhal enteritis and dermatitis. The skin around the face and eyes and the corners of the mouth was thickened, dry, and scaly, possibly as a result of mal-absorption or vitamin deficiency. The skin on the bottoms of the feet were thickened and cracked as well. The upper 2/3 of the GI tract was distended with fluid, and gas bubbles, and numerous small (8-10um) flagellated protozoan parasites were seen in the jejunum and duodenum. The parasites appeared very active in fresh wet mount preparations, and darted across the field in a rapid manner. Other potential disease problems noted in individual birds included tapeworms, intestinal cryptosporidia, and rotavirus-like virus particles found in pooled gut samples. These were individual bird findings, however, and were not present consistently as were the flagellated protozoans.

On scanning and transmission electronmicrographs the parasite appears as a small (8-12um) flagellated protozoan with a slender elongated body. It has 8 flagella, and 2 prominent nuclei, which are characteristic of the genus *Hexamita* (3). The parasites can be found free in the lumen of the intestine, and clustered in the intestinal crypts. On scanning EM's parasites can be found partially burrowed between enterocytes, or in some cases fully enveloped within host cells (enterocytes, or possibly paneth cells). Affected cells appear discolored, and an apparent trail of tissue damage was seen along the path of migration. Over the years there have been a number of reports of intracellular trophozoites of various species of *Hexamita* (5,7,2). An intracellular schizogonous reproductive cycle has even been suggested for *Hexamita salmonis* and *Hexamita meleagridis* (5). The reports have been disputed, however, and the observations dismissed as phagocytosis by paneth cells in the intestinal crypts (3). More recently, intracellular trophozoites were reported in laboratory rodents infected with *Hexamita muris* (2).

The parasites were reportedly not associated with digestive vacuoles, and apparent disruption of epithelial cells was observed along the path of invasion.

Infectious catarrhal enteritis was once a very common disease problem in turkeys in the US and Canada (4,6), and has had a significant economical impact on turkey production. USDA estimates from 1954 showed an annual loss of \$667,000 from hexamitiasis in turkeys from 1942 to 1951 (4). Since then, however, the incidence of the disease has dropped off dramatically. Figures for 1980 showed only 10 cases in the entire United States (4), although an apparent upsurge in cases has been occurring in recent years since the banning of furazolidone from poultry feeds in the late 1980's (1). During those early years, turkey growers noted a tendency for outbreaks of infectious catarrhal enteritis to occur in birds even when raised on wire (6). Given the many unanswered questions surrounding this disease in poultry, including the lack of significant lesions to explain the severity of symptoms and the high mortality, perhaps we should examine this disease more closely, and consider the possibility of tissue invasion by *Hexamita meleagridis*.

REFERENCES

1. Charlton, B.R., C.R. Gustafson, A.A. Bickford, G.L. Cooper, and E.M. Johnson. Hexamitiasis: Reappearance of an old disease? Proceedings 45th Western Poultry Disease Conference. Cancun, Mexico. 209-210. 1996.
2. Flatt, R.E., J.A. Halvorsen, and R.L. Russell. Hexamitiasis in a laboratory mouse colony. Lab animal Sci. 28:1. 63-65. 1978.
3. Kulda, J., and E. Nohynkova. Flagellates of the human intestine and of intestines of other species. In: Parasitic Protozoa, Vol II. Julius P. Kreier, ed. Academic Press, New York. 36-38. 1978.
4. Reid, M.W., P.L. Long, and L.R. McDougal. Protozoa. In: Diseases of Poultry, 8th ed. H. John Barns, B.W. Calnek, W.M. Reid and H.W. Yoder, Jr., eds. Iowa State University Press, Ames, Iowa. 725-726. 1984.
5. Slavin, D., and J.E. Wilson. Hexamita meleagridis. Nature. 172:1179. 1953.
6. Vance, H.N., and C.H. Bigland. Hexamitiasis: a report of cases in Alberta turkey flocks. Canadian J. Comp. Med. and Vet. Sci. 20:337-341. 1956.
7. Wilson, J.E., and D. Slavin. Hexamitiasis of turkeys. Vet. Record. 67:236-242. 1955.

HIGH MORTALITY IN LAYERS AS A RESULT OF CLOSTRIDIAL ENTERITIS

A. Singh Dhillon; L. H. Lauerman; Parimal Roy;
Dennis Schaberg; Daina Bandli and Sylvia Weber

Avian Health Laboratory, Washington State University -Puyallup 7613 Pioneer Way East, Puyallup, WA 98371-4998 E-mail: asdhillon@wsu.edu

High mortality was present in a new high-rise lay farm, with a capacity of 180,000 birds per house. The gross and histopathologic lesions were consistent with clostridial enteritis. *Clostridium perfringens* was isolated from the affected intestine. In addition, *Escherichia coli*, and on occasion *Pasteurella hemolytica*, was isolated from the liver and peritoneal surfaces. Mild coccidiosis infection was also present. Five houses were affected but mortality was high in one house. The four-week mortality was 6.56 percent with a loss of 10,898 chickens. The four-week mortality rate in the other houses ranged from a low of 0.237 percent to a high of 1.107 percent. The affected houses were treated with amprolium for coccidiosis, and household bleach was added to water at a dilution of one part of bleach to 1,040 parts of water to eliminate bacterial infection.

The fly population was out of

control and *C. perfringens* was isolated from the alcohol-washed macerated flies caught from the affected poultry house. Dead flies were often seen in the feed troughs. The chickens consumed the dead flies along with feed resulting in ingestion of *C. perfringens*. The serum samples of affected birds and the macerated alcohol-washed and clarified fly extract caused illness, paralysis and death in the inoculated mouse. The *C. perfringens* isolated from the chicken and flies was identified as *Clostridium perfringens* type A by PCR. The disease was brought under control after straw was added and mixed in with litter. As a result, the litter temperature increased causing fly population to decrease. This study suggests that flies in the poultry-houses may not act solely as mechanical transmitters of *C. perfringens* to chickens but may cause the disease by ingestion of the bacteria within the body of flies.

VENEREAL COLIBACILLOSIS (ACUTE VAGINITIS) IN TURKEY BREEDER HENS

COLIBACILOSIS VENÉREA (VAGINITIS AGUDA) EN PAVAS REPRODUCTORAS

Peter Gazdzinski^A and John Barnes^B

^ACuddy Farms, Strathroy, Ontario, Canada, ^BCollege of Veterinary Medicine, NCSU. USA

RESUMEN

Las pavas reproductoras tienen un gran peso corporal al principio de la producción de huevos, por lo que el manejo adecuado en esta época resulta crucial para lograr los mejores niveles de producción y fertilidad. El grado de madurez sexual es muy importante al momento de la primera inseminación artificial. Este trabajo describe dos parvadas afectadas por colibacilosis venérea (vaginitis aguda) causada por la inseminación de pavas inmaduras con el himen intacto. La punción de esta membrana con la pajilla de inseminación produjo severas lesiones en la vagina y la cloaca lo cual causó postura abdominal y peritonitis. Durante las primeras 5 semanas de postura murió el 3% de estas hembras y fue necesario desechar a un 3 ó 4% adicional.

SUMMARY

As turkey breeder hens are heavier at the start of egg production, proper management at this time becomes critical to achieve the best egg production and fertility. The degree of sexual maturity is very important at first artificial insemination (AI). This paper describes two flocks affected by venereal colibacillosis (acute vaginitis) caused by insemination of immature hens with intact hymens. Puncturing of the hymen membrane with insemination straw caused severe lesions in the vagina and cloaca leading to internal laying and peritonitis. In the first 5 weeks of lay, 3% of hens died and another 3-4% had to be culled.

Increased early mortality due to peritonitis and a high number of cull hens was observed in two flocks of turkey breeder hens. The affected flocks had approximately 16,000 hens each. Each was lit for egg production in March and April at the age of 30 weeks and artificial insemination (AI) started at 32 weeks. Each flock was inseminated 3 times in the 10-day period. At the third and fourth AI (33 weeks of age) increased mortality and hen culling was observed. In the first 5 weeks of lay, 3% mortality was recorded and 3-4% of hens had to be culled. In non-affected flocks the mortality in the same period is normally 1-1.3%. There were mainly three categories of culled and dead

hens. The first and most significant category of hens had cheesy core protruding from the cloaca and vagina. The second had hens with partial prolapse of cloaca (pasty vents- vent gleet), while the third category (minority) were hens with prolapse of intestines. In affected flocks the peak of egg production was very poor - 60 % in fourth week vs. 72% in normal flocks. In the first week of egg production, the number of cull eggs increased up to 27% vs. 15% in normal flocks. The increased number of cull eggs was due to small eggs (below 72 g).

Post-mortem examination of hens with cheesy core in the cloaca showed that those hens had fibrinous pseudomembranes in the vagina and cloaca adherent to mucosa. The thickness of these membranes was so great that they obstructed the lumen of the vagina and thus inhibited the passage of eggs. All affected hens had one or two eggs present in the oviduct and many oviducts in the abdominal cavity causing development of peritonitis.

Microscopically, the upper reproductive tract (magnum) was normal whereas the vagina and cloacal areas were acutely inflamed. Earliest lesions consisted of mucosal thickening due to edema, fibrin and heterophils in the submucosa. There was no visible etiologic agent in acutely inflamed tissues. In the more advanced lesions, the mucosal surface was ulcerated and had been replaced by a diptheritic caseous necrotic membrane. Numerous bacterial colonies, morphologically consistent with *E.coli*, were present in the necrotic membranes.

Numerous swabs were taken from lesions in the cloaca and vagina and upper parts of the oviduct. The media were incubated in aerobic and anaerobic conditions. Swabs from the vagina and cloaca produced numerous colonies of *E.coli* whereas swabs taken from upper parts of the oviduct did not produce any colonies. *E.coli* isolates tested from the two farms were found sensitive to all tested antibiotics (Ampicillin, Cephalothin, Enrofloxacin, Gentamicin, Neomycin, Spectinomycin, Sulfisoxazole, Tetracycline and Trimethoprim-Sulfa). Both isolates were also tested for virulence factors by a panel of PCR tests at Purdue University, West Lafayette, IN. These tests

showed no presence of any of 8 virulent genes (F18, 987P, F41, LT, STb, Sta, Stx2e, and eae).

A pair of blood samples taken from affected flocks was tested for PMV-2, PMV-3, PMV-6, PMV-7 (by HI test), Newcastle, Pasteurella, Bordetella, Hemorrhagic enteritis (HE) and Influenza (by ELISA test). All sera were positive for Newcastle, Pasteurella, HE and PMV-3 as a result of vaccination. PMV-2, PMV-6, PMV-7 and Influenza tests gave negative results.

Further investigations of the cause of this unusual vaginitis showed that insemination crews on these two farms were mistakenly inseminating all hens that they were able to crack. Consequently, hens with the presence of hymen were inseminated like those without, by breaking the membrane with insemination straw. The number of hens with the presence of hymen at first AI was found to correspond to the number of cull and dead hens with vaginitis and peritonitis. When the same AI crews inseminated the other flock and left

the hens with intact hymen for the next AI, mortality and the number of cull hens decreased dramatically. Also the number of partial prolapses of the cloaca were reduced.

Based on the above finding one can suggest the following pathogenesis. As a result of breaking hymen in immature turkey hens a wound was created that became infected with E.coli bacteria. The inflammatory process developed diptheritic pseudo-membranes obstructing the lumen of the vagina. Eggs formed in oviduct were therefore unable to pass through the vagina which lead to internal laying and peritonitis. The degree of maturity of turkey breeder hens seems to be very important for the first insemination. Since the body size of turkey breeders is bigger each year, it is much easier to crack even immature hens. If an AI crew doesn't pay attention to the presence of hymen it is possible to create vaginitis leading to high mortality and culling rate in the beginning of egg production.

PROVEN TRICULITIS/POOR FEED CONVERSION: A CASE STUDY

Sharon Heins Miller, DVM, Diplomate ACPV

Merial Select, PO Drawer 2497, Gainesville, GA 30503

A top performing integrated poultry company in the Southeast United States slipped from number four in Agristats® to below 50%. The primary performance problem was poor feed conversion. Their primary complaint in the field based on clinical and gross necropsy findings was feed passage and enlarged proventriculi. Reovirus was suspected to be the root of their problems. This case study will concentrate on the malabsorption syndrome of reovirus.

Reovirus is found worldwide. The virus can be found in clinically normal chickens and turkeys. Even in the presence of birds with clinical signs, isolation of reovirus may not be significant unless it can be proven to be causing the disease syndrome. The most commonly recognized disease syndromes are viral arthritis and malabsorption syndrome. The common clinical signs of the malabsorption syndrome are stunted growth, pale pigment of the feet, skin, and beak, broken or abnormally shaped feathers, feed passage, and poor feed conversion. Necropsy lesions may reveal: enlarged proventriculus, small atonic gizzard, orange mucus in the intestinal tract, swollen friable intestines, and poorly digested feed in the intestines.

CASE STUDY – HISTORY

- Two years of chronic problems throughout the

company complex

- Performance declined from top 4 of Agristats® to below 50% on Agristats®
- Feed conversion was off by 10 points (1.88 on 4.15 lb. in February 2001)
- Clinical signs in birds - pale in color
- Post-mortem lesions - enlarged proventriculus, moderate to severe feed passage; variable sized bursae

Causes of proventriculitis

- Reovirus
- Mycotoxin in the feed
- Infectious Bursal Disease
- Unknown

Case Investigation

- Vaccination Program
 - Breeders - Lack of reovirus live priming in the breeder program; inactivated reovirus vaccination given
 - Broilers – Mareks/IBD standard & variant at one day of age, ¼ dose; IBD standard vaccine via the water
- Diagnostic Work-up
 - Serology – breeder reovirus titers were very high
 - Histology – some proventriculi lesions

- suggested viral challenge, some did not suggest viral challenge; some bursae lesions suggested challenge between 20 and 30 days
 - Virus isolation – reovirus isolated by two university laboratories
 - Challenge work – virus fed back to birds did not re-create the proventriculus
 - Feed
 - Poor quality fat source
 - Undercooking the soybean meal resulting in low urease (0.01-0.03)
 - High free fatty acids (10-15%)
 - High peroxides (>10%)

Recommendations/Changes

- Vaccination
 - Breeders - live reovirus priming - recommendation not taken
 - Broilers - one-day-old reovirus vaccination - recommendation followed week on/week off
 - Mareks/IBD vaccination – stay on day-old IBD - recommendation followed every week
- Feed
 - Poor grade fat changed to pet grade fat (decreased peroxides to under 10%)
 - Fat tank in feed mill cleaned out
 - Increased the urease levels to 0.05-0.07

- Decreased free fatty acids to 2.5%

Improvements

- Proventriculus size and thickness decreased to normal appearance
- Bursae size and health improved
- Mild or no feed passage noted with changes noted above
- Feed conversion improved by 12 points from the beginning of the investigation in August 2001 (1.82 on 4.17 lb. one year comparison to above February 2002)

SUMMARY/CONCLUSIONS

Recently, several United States poultry integrators have experienced performance issues and clinical signs suggestive of reovirus infection and challenge. Once those companies started exchanging information, everyone assumed they had the same problems. When we first started investigating the performance problems of this complex, we thought reovirus was the primary agent. As the questions were asked and the operation evaluated, we realized there was more to this situation than originally thought. Adjustments in the quality and handling of the feed ingredients played a major role in improving the performance in this company. This case study reminds us that there may be more to a problem than initially perceived.

MAGNESIUM INTOXICATION IN BROILER BREEDER CHICKS

INTOXICACIÓN CON MAGNESIO EN POLLAS REPRODUCTORAS PESADAS

Ziv Raviv^A, Shmuel Berenhime^B, Henrike Borohovich^C, Noam Winkler^A, Nurit Sapir^A, Yochi Rulf^A

^AY. Brown and Sons Ltd., P.O.Box 23 Hod-Hasharon, Israel, ^B Alonim Poultry Farm, Kibbutz Alonim, Israel.

^CAfula Poultry Disease Laboratory, Afula, Israel

RESUMEN

Recibimos el informe de una parvada de reproductoras Cobb 500 de 10 días de edad que presentaba severos problemas de patas y anomalías en la deambulaci3n. El examen cl3nico de la parvada revel3 depresi3n del crecimiento, diuresis, rechazo a caminar y consistencia ahulada en el tarso, el metatarso y el pico. El diagn3stico fue raquitismo. El tratamiento incluy3 el cambio inmediato de la raci3n y la administraci3n de f3sforo y vitaminas en el agua de bebida. El an3lisis del alimento mostr3 un elevado contenido de cenizas (8.8%) con niveles adecuados de calcio, f3sforo y vitamina D, adem3s de 16,000 ppm de

magnesio. La parvada respondi3 bien al tratamiento. Las investigaciones en la planta de alimentos revelaron que se hab3a agregado por error 3xido de magnesio a la raci3n.

SUMMARY

A ten day-old Cobb 500 parent flock was reported as suffering from severe leg problems and gait abnormalities. Clinical examination of the flock revealed growth depression and a reluctance to move, and when forced to do so the birds walked with a shaky gait (walking on hot coals). The litter was very wet for a flock of this age, and water consumption was five

times greater than normal. Mortality was within the normal range. Clinical examination of individual birds revealed rubbery tarsometatarsal bones and beaks. On postmortem examination of sacrificed birds the only abnormality seen was enlargement of the costo-vertebral articulation. An immediate diagnosis was made of rickets. Lesions were examined histopathologically and the feed was sent for analysis. Recommendations for treatment included an immediate replacement of the ration and phosphorus and vitamin supplementation in the drinking water. The feed analysis showed a high ash level of 8.8%, with adequate levels of calcium, phosphorus and vitamin D, but 16,000ppm magnesium. Histopathological findings were inconclusive with a normal growth plate adjacent to fibrotic areas. A feeding trial was initiated with a hundred, one day-old chicks using the suspected ration. The feeding trial yielded identical clinical signs within one week of its initiation. The flock responded well to the new feed and supplements, and its recovery was uneventful and rapid. Investigations at the feed mill revealed that magnesium oxide was added by mistake to the breeder chick ration. This case demonstrates: a. the sensitivity of rapidly growing broilers to high magnesium levels in the ration, b. high magnesium levels should be included in the differential diagnosis of rickets.

INTRODUCTION

The detrimental effect on growth and egg production of high magnesium (Mg) levels in poultry feed is well documented, (Buckner 1932; Milby 1934; Chicco 1967; McWard 1967; Lee 1980^{5,6}). In the last couple of decades, however, there were very few any reports of this syndrome. The main source of high Mg levels in poultry diets is a contaminated mineral supplement. The usual culprit is dolomitic limestone that can contain up to 13% Mg (McWard 1967), while rock phosphate and animal by-products can also contain high levels of Mg (Lee 1980). The exclusion from poultry diets of raw materials with high Mg levels made Mg toxicity an uncommon occurrence.

This report describes a unique accidental feed - born Mg intoxication in a very young broiler breeder flock.

CASE REPORT

Case History. On May 25, 2001, the owner of a broiler breeder pullet farm reported many birds with leg problems in a ten days old Cobb 500 parents flock of 16,500 females and 2350 males. He noticed red blisters on the hocks of both sexes, presumably a result of a hard hatch. He also mentioned that the flock was treated with Baytril^R for three days, but its condition continued to deteriorate. A visit to the farm revealed a retarded flock that was reluctant to move, and when

disturbed they walked with a shaky gait (walking on hot coals). The litter was very wet for such a young flock. It transpired that the amount of drinking water used for the Baytril^R medication (200-250ml/bird/day), was five times higher than normally consumed by a one-week-old flock. In the first week female chick losses were 0.2% mortality and 0.3% culls, and the male losses were 0.9% mortality and 1.1% culls. A clinical examination of individual birds revealed rubbery tarsometatarsal bones and beaks. The clinical diagnosis was made of rickets.

Necropsy. In an examination of sacrificed birds, rubbery femurs, tarsometatarsal bones and beaks were presented. The visceral organs were normal, and the only skeletal abnormality was enlargement of the costo-vertebral articulation.

Biological assay. In order to try and reproduce the syndrome with the suspected ration we set up a feeding trail with a hundred one day-old males (out of 7,000) that were housed in another unit on the same farm. These were fed with the suspect ration while the hatch mates received a normal commercial ration. The males developed the pathological signs within one week, while the rest of the flock remained normal.

Feed analysis. A sample of feed was sent for analysis and the initial result was a high ash level of 8.8% (the normal level is 6.0-7.0%). The levels of the other nutrients: protein (20.7%), calcium (1.18%), phosphorus (0.66%), sodium (0.18%), chloride (0.25%), potassium (1.0%), manganese (116ppm), fat (3.4%), fiber (3.56%), moisture (10.5%), vitamin A (12500U) and vitamin D (3400U) were within normal limits. In an attempt to solve the ash level enigma a ration Mg analysis was requested. This yielded 16,000 ppm (the minimum requirement is 600 ppm, and the normal range is 1000-2000 ppm). An inquiry at the feed mill revealed that magnesium oxide was added by mistake to the breeder chick ration.

Treatment. Based on the clinical diagnosis of rickets, the initial recommendations for treatment included an immediate replacement of the feed and vitamin supplementation in the drinking water. Following the high ash values we assumed that the ration calcium level was adequate or high, and available phosphorus was added in the drinking water. There was an obvious improvement in the flock condition within 48 hours of treatment, and it took a further 2-3 weeks for most of the flock to recover fully. Approximately 3.5% of the females and 4.0% of the males did not recover a normal gait or growth and had to be culled out.

Histopathology. The femur and tarsometatarsal bones were removed, cut sagittally, and fixed in 10% buffered formalin. The pathological findings of a normal growth plate adjacent to fibrotic areas and a

bone cortex without clear calcification were inconclusive.

DISCUSSION

Rickets from all causes is quite a rare occurrence in feed-restricted broiler breeder flocks in Israel. High Mg levels in the ration is even rarer mainly because other products now replace magnesium-containing limestone in poultry diets. Since there is hardly any information on this condition, this case report is a reminder of the sensitivity of the modern broiler breeder, and presumably, its broiler progeny to high Mg levels in the diet. The dual appearance of gait abnormality, rubbery long bones and beak with wet litter and diuresis are features of the uniqueness of this presentation. With regard to treatment, on receipt of the high ash result we added phosphorus to the diet. The positive effect of the treatment including the phosphorus supplementation, is supported by an early publication indicating the curative effect of dietary phosphorus and chloride on excessive dietary Mg (Lee et al.,1980).

REFERENCES

1. Buckner, G. D., Martin, J. H. & Insko, W. M. Jr. The effect of magnesium carbonate when added to diets of growing chicks. *Poult. Sci.* 11: 58-62. 1932.
2. Milby, T. T. Factors influencing the malformation of the leg bones of growing chickens. *Iowa Agr. Exp. Sta. Res. Bull.* 172. 1934.
3. Chicco, C. F., Ammerman, C. B., Van Wallegghem, P. A., Waldroup, P. W. & Harms, R. H. Effect of varying dietary ratios of magnesium, calcium and phosphorus in growing chicks. *Poult. Sci.* 46: 368-373. 1967.
4. McWard, G. W., Magnesium tolerance of the growing and laying chicken. *Poult. Sci.* 46: 91-99. 1967.
5. Lee, S. R., Britton, W. M. & Rowland, G. N. Magnesium toxicity: bone lesions. *Poult. Sci.* 59: 2403-2411. 1980.
6. Lee, S. R. & Walter, M. B. Magnesium toxicity: effect on phosphorus utilization by broiler chicks. *Poult. Sci.* 59: 1989-1994. 1980.

ACKNOWLEDGMENTS

We thank Professor Martin Malkinson for his help to edit this article.

GASTRIC INTUSSUSCEPTION IN LAYING HENS

INTUSUSCEPCIÓN EN PONEDORAS

Nancy Reimers and H. John Barnes

College of Veterinary Medicine, North Carolina State University, Raleigh, NC 27606

RESUMEN

Se realizaron necropsias cada semana en toda la mortalidad de una caseta de postura, durante un año entero. Cinco de las 789 gallinas sometidas a necropsia presentaron una intususcepción gástrica resultante de la introducción del proventrículo en el ventrículo, a la manera de un telescopio. La intususcepción creó una constricción del lumen del tracto gastrointestinal y, consecuentemente, estas aves estaban anovulatorias y severamente emaciadas. La edad de las aves afectadas varió de 110 a 121 semanas, al momento de la necropsia. El examen macro y microscópico de los tejidos no logró sugerir la etiología en esta ocasión.

Intussusception is the invagination of one portion of the gastrointestinal tract into the adjacent portion. Intestinal intussusception has been noted as a cause of mortality in both ratites and gallinaceous birds (1-3). Predisposing conditions include coccidiosis and gastrointestinal impaction, particularly in young birds. Although less common, idiopathic gastric

intussusceptions have been seen in both peafowl and chickens (4, 5). Intussusceptions in most species are associated with an alteration of normal peristaltic activity.

Weekly post mortem examinations were conducted on all mortality from a house of laying hens for the period of a year. In five of the seven hundred eighty-nine birds necropsied, the proventriculus telescoped into the ventriculus to form a gastric intussusception. The intussusception created a constriction of the lumen of the gastrointestinal tract consequently the hens were anovulatory and severely emaciated. Affected birds ranged from one hundred ten to one hundred twenty-one weeks of age at the time of examination. Gross and histologic examinations of the tissues have failed to suggest an etiology for the condition at this time.

(A full-length article will be submitted for review and consideration for publication in *Avian Diseases*).

REFERENCES

1. Mushi, E., J.M. Kamau, J.W. Isa, M.G. Binta, and L. Modisa, *Intussusception in the small intestine of a farmed ostrich (Struthio camelus) chick in Botswana*. Trop Anim Health Prod, 1998. 30(5): p. 325-6.
2. Frasca, S., Jr. and M.I. Khan, *Multiple intussusceptions in a juvenile rhea (Rhea americana) with proventricular impaction*. Avian Dis, 1997. 41(2): p. 475-80.
3. Bandyopadhyay, A.C. and S.K. Jain, *A case of intussusception in a fowl*. Indian Vet J, 1967. 44(2): p. 117-9.
4. Rao, A.T. and L.N. Acharjyo, *Intussusception of proventriculus in a common pea fowl (Pavo cristatus)*. Vet Rec, 1979. 104(4): p. 76.
5. Sharma, U.K., *Intussusception of the proventriculus of chickens*. Avian Dis, 1972. 16(2): p. 453-7.

AN OUTBREAK OF INCLUSION BODY HEPATITIS IN BROILER CHICKENS

UN BROTE DE HEPATITIS CON CUERPOS DE INCLUSIÓN EN POLLO DE ENGORDA

H. L. Shivaprasad, G. Senties-Cue, P. R. Woolcock, and R. P. Chin

California Animal Health and Food Safety Laboratory System, Fresno Branch, University of California, Davis, 2789 South Orange Avenue, Fresno, CA 93725

RESUMEN

Se diagnosticó hepatitis con cuerpos de inclusión en pollo de engorda de 19 a 26 días de edad con base en la patología, la microscopía electrónica y el aislamiento del virus. El cuadro clínico se caracterizó por aumento en la mortalidad, signos respiratorios y falta de uniformidad en el tamaño de las aves. Presentaremos información sobre la historia de la vacunación de las reproductoras y de su progenie, los signos clínicos, la mortalidad, la serología, la bacteriología, la patología, el aislamiento del virus y la caracterización del adenovirus aislado.

During the summer of 2001, an outbreak of inclusion body hepatitis (IBH) due to adenovirus group I occurred in commercial broiler chickens. Clinical signs included unevenness in the flock, respiratory signs, and increased mortality of 0.5 to 1% per day for several days. Total mortality of 8.15% was observed in some flocks by the time the chickens were marketed at around 47 days of age. The chickens had been vaccinated for Marek's disease at 1 day of age and for Newcastle disease (ND) and infectious bronchitis (IB) at 12 days of age and for infectious bursal disease (IBD) at 18 days of age. The chickens had not been vaccinated for chicken infectious anemia (CIA).

A total of 37 broiler chickens between the ages of 19 and 26 days were submitted for laboratory evaluation. Significant gross lesions included mild to moderately enlarged pale livers with a reticular pattern (5 birds), enlarged livers with petechiae (3 birds), and livers with tan to brown or greenish discoloration (5

birds). Five birds had increased pericardial fluid and 14 birds had enlarged pale kidneys. Bursa of Fabricius and thymus were mildly to severely atrophied in most of the birds examined. One bird had pale bone marrow. Other significant findings included fibrinous exudate in the pericardium, air sac, on the capsule of the liver, and pleura, and increased mucus in the trachea.

Microscopic lesions included acute multifocal coagulation necrosis of hepatocytes with mild inflammation, and many hepatocytes contained basophilic intranuclear inclusion bodies. There was mild to moderate infiltration of lymphocytes in the interstitium of the kidney and many tubules were dilated and some contained eosinophilic material within their lumens. Bursa and thymus had mild to severe lymphoid depletion. Other changes included mild to severe fibrinosuppurative inflammation of the air sacs, capsule of the liver, pericardium, and pleura. Proventriculi in a few birds had mild to moderate infiltration of lymphocytes in the interstitium of the glandular portions. Adenovirus, alone or in combination with adeno associated viruses were isolated from the liver, kidney, trachea/lung and bursa of Fabricius from several birds. Thin section electron microscopy of the liver revealed typical hexagonal viral particles, ranging in size from 70 and 90 nm in the nucleus of hepatocytes consistent with the morphology of adenovirus.

E. coli was cultured from organs that had fibrinosuppurative inflammation including air sac, pericardium, capsule of the liver, and trachea.

Bordetella avium was isolated from the trachea of a few birds. The birds cultured for *Mycoplasma gallisepticum*, *Mycoplasma synoviae*, and salmonella were negative. Serologically, all the birds were negative for MG, MS, reovirus, IB, and most were negative for ND and IBD. Only two sera out of 28 sera examined were positive for CIAV.

The broiler chickens originated from the same breeder flock that was about 37 weeks of age. Egg production in the broiler flock was excellent. The breeders had been vaccinated for Marek's disease, ND,

IB, IBD, infectious laryngotracheitis and cholera. The breeders had not been vaccinated for CIA, but the CIAV titers of the breeders at 11 and 18 weeks were adequate. IBDV titers in the breeders were adequate at 25, 29 and 35 weeks of age. The progeny of these breeder chickens were housed in 80 houses, only 5 houses broke with IBH. However, a lack of uniformity in the size of the birds was observed in almost all the houses.

Adenoviruses isolated from the broiler chickens are being further characterized.

CASE REPORT: ZYGOMYCOSIS IN LAYER PULLETS AND COCKERELS

ZIGOMICOSIS EN POLLAS PARA POSTURA Y GALLOS JÓVENES

Sara Throne Steinlage, J. E. Sander, T. P. Brown, A. Martinez

RESUMEN

Un caso de pollas para postura y machos de 8 semanas de edad presentados al laboratorio de diagnóstico con historia de aumento en la mortalidad, plumaje erizado, problemas de patas y vacunación reciente. A la necropsia se encontraron grandes granulomas multifocales en diversos tejidos. Al cultivo bacteriológico se observó sólo un ligero crecimiento. La histopatología reveló una población mixta de hongos como zigomicetos y *Aspergillus*, siendo los primeros mucho más numerosos. No se logró obtener el cultivo puro de los zigomicetos debido a la coinfección con *Aspergillus* y *Penicillium*. No se logró aclarar la fuente de origen de los hongos zigomicetos. Se realizaron pruebas serológicas para evaluar el estado inmunológico de la parvada.

A case of eight week old layer pullets and cockerels presented to the diagnostic lab with a history of increased mortality, ruffled feathers, leg problems, and recent vaccination. At necropsy the birds had large, multifocal granulomas in multiple tissues. Only light bacterial growth was seen on culture. On histopathology, a mixed population of fungi was seen including Zygomycete and *Aspergillus*, with the zygomycetes being much more numerous. Pure culture of the zygomycetes was unsuccessful due to the coinfection with *Aspergillus* and *Penicillium*. The source of the zygomycete fungi remains unknown. Serology was performed to evaluate the flock's immune status.

(A full report of this study will be submitted for publication in *Avian Diseases*).

ESTUDIO DE UNA SERIE DE CASOS DE CUADRO DE COMPLEJO RESPIRATORIO TEMPRANO EN POLLOS DE ENGORDA

STUDY OF A SERIES OF CASES OF EARLY RESPIRATORY COMPLEX IN BROILERS

Mariano Salem, A. Ziegler, J. Rosenberger, S. Cloud, J. Gelb, M. Troeber, C. Pope, B. Sample

Animal and Food Science, University of Delaware, Georgetown, DE, 19947

SUMMARY

A series of more than 33 cases of respiratory complex in 8-25 day-old broilers is reported. Infectious bursal disease virus (IBDV) was not a consistent finding. Histopathology of the bursa of Fabricius,

thymus, and other organs was non conclusive. Polymerase chain reaction (PCR) showed a small number of thymuses positive to chicken anemia virus (CAV). Many chickens showed packed cell volumes <27, and they were serologically negative to CAV.

CAV was isolated in 22% of the cases. Primary/predisposing etiological agents could not be clearly defined.

RESUMEN

Se reporta una serie de más de 33 casos de cuadro de complejo respiratorio en pollos de engorda de 8 a 25 días de edad . No se encontró presencia constante de cepas del virus de la Infección de la Bolsa de Fabricio(VIBF) , la histopatología de la Bolsa de Fabricio, timo y otros órganos, no fue concluyente. Un reducido número de timos resultaron PCR positivos para el virus de la Anemia Infecciosa de los Pollos (VAIP) . Hubo muchos pollos con valores de hematocrito menor que 27 y con serología negativa para VAIP. Se aisló VAIP en 22% de los casos . No se pudo definir claramente la etiología inicial o predisponente.

INTRODUCCIÓN

El complejo respiratorio de las aves (CRA) es de las enfermedades mas diagnosticadas en el mundo avícola.generalmente es de etiología múltiple pero el cuadro clínico es similar. En las aves afectadas se observa perihepatitis, pericarditis ,peritonitis y aerosaculitis fibrinopurulenta. Además se pueden ver lesiones exudativas en articulaciones así como procesos infecciosos subcutaneous en diferentes partes de cuerpo.

Entre las etiologías virales iniciadoras se encuentran el virus de la Bronquitis Infecciosa(VBI), el de la Enfermedad de Newcastle (VEN)de campo o vacunal, pneumovirus, virus de la Laringotraqueitis Infecciosa(VLTI) etc. Entre las etiologías predisponentes virales se encuentran sobretodo las causantes de inmunodeficiencias . De éstas últimas las más communes son las causantes de la Infección de la Bolsa de Fabricio(IBF), la de la Anemia Infecciosa de los Pollos (AIP) , la reovirus, la Enfermedad de Marek (EM) y la Leucosis Aviar (LA). Las enfermedades predisponentes bacterianas mas communes son Micoplamosis gallisepticum (Mg) y Micoplamosis sinoviae (Ms) y Ornitobacteriosis rhinotraqueale .

Para determinar las etiologías involucradas cuando se presenta una serie de casos es necesario intentar el aislamiento del /los agentes iniciadores y predisponentes o determinar la infección por estos agentes por serología o pruebas moleculares.

REPORTE DE LA SERIE DE CASOS

Durante el año 2001 se presentaron mas de 33 casos de pollos de engorda de entre 8 y 25 días de edad siendo la mayoría de entre 10 y 13 días de edad, con cuadros típicos de CRA. Todos los casos fueron del mismo complejo avícola y se registraron de febrero a

Mayo del año 2001. Las lesiones observadas en todos los casos fueron las típicas del complejo respiratorio incluyendo: pericarditis, perihepatitis, peritonitis, aerosaculitis y en algunos casos lesiones articulares . Los cultivos bacteriológicos mostraron crecimiento de la bacteria Escherichia coli (E.coli) en todos los casos y solamente se encontró la presencia de A. fumigatus en uno y la de E. fecalis en otro caso. Se compararon los patrones de antibiograma además de hacer pruebas de patogenicidad de las cepas de E.coli aisladas para investigar la posible existencia de un mismo tipo de cepa involucrada. No se encontró evidencia que indicara que alguna cepa de E. coli predominara en los aislamientos. Se observó hipoplasia del timo en 26 / 33 casos e hipoplasia de la Bolsa de Fabricio en 16/33 de los casos. No se observó palidez de la médula osea o hemorragias subcutáneas.

HISTOPATOLOGÍA

Aunque se enviaron muestras de organos en 24/33 de los casos, solamente se vieron lesiones semejantes pero no idénticas a las producidas por VAIP en timo en 6/23 casos.. En 15/ 23 de los casos se observó hipoplasia del timo y en 14 /23 se observó hipoplasia de la Bolsa de Fabricio. Por otro lado se se reportó hiperplasia de la médula osea en 14/14 muestras enviadas.

SEROLOGÍA

Una observación interesante es que cuando se probaron los sueros contra VAIP mediante el método de Elisa se encontró que solamente 11/ 67muestras (16.4%) , del total de 13 parvadas probadas dieron resultados positivos. Es decir 83.5 % de las muestras no tenían niveles detectables de anticuerpos contra VAIP.No se encontraron muestras positivas a las pruebas de aglutinacion en placa o de Elisa contra Micoplasma gallisepticum (Mg) o Micoplasma sinoviae (Ms).

VALORES DE HEMATOCRITO

Muestras de sangre de 16/33 de los casos fueron sometidas a la prueba de hematocrito. De 72 muestras totales se encontró que 37/72 dieron lecturas de menos de 27. Indicando que el 51 % de las avesmuestradas tenían niveles indicativos de anemia.

PRUEBAS DE CAPTURA DE ANTÍGENO CON ANTICUERPOS MONOCLONALES (PCAAM) CONTRA EL VIBF

Con el propósito de determinar si el VIBF estaba presente y por consecuencia ser factor predisponente en esta serie de casos, se probaron Bolsa de Fabricio de 21/33 de los casos utilizando la prueba de captura de antígeno por anticuerpos monoclonales . Resultó que 20 / 21 casos fueron negativos a la presencia antígenos

del VIBF y en un sólo caso de detectó la presencia de la cepa RS-593 del VIBF.

AISLAMIENTO VIRAL

Se intentó aislamiento viral de muestras de timo y pulmón de 17 /33 casos y se obtuvieron 11/17 resultados positivos para el VBI,y 3/17 para el VENC, todos los aislamientos fueron obtenidos al primero o segundo pase en embrión . Además , 22% de los casos muestreados fueron positivos para el aislamiento del VAIP(1) . Uno de los aislamiento de del VBI fue secuenciado y mostró ser del tipo Ark DPI, igual al de la vacuna empleada contra VBI al día de edad.

PRUEBAS DE LA REACCIÓN EN CADENA DE LA POLIMERASA (PCR) PARA VAIP

Se investigó la presencia del VAIP por el método de PCR en timos de 10 /33 de los casos . Se encontró que 8/ 10 (80%) fueron negativos. Solamente 2/10 fueron positivos a esta prueba..

CONCLUSIONES

A pesar de el gran número de pruebas diagnósticas hechas para determinar la etiología/ s causante en esta serie de casos de CR temprano, no se pudo con certeza determinarlas.

La mayoría de las aves no mostraron tener niveles detectables contra VAIP, lo que puede indicar una falta de protección adecuada contra la AIP.

Por los resultados obtenidos en las PCAAM se puede concluir que el VIBF no parece estar presente en las Bolsas de Fabricio de aves afectadas.

Los aislamientos del VBI y el de ENC son muy probablemente de origen vacunal.

El porcentaje alto de aislamiento de VAIP unido a los niveles bajos de anticuerpos y el porcentaje alto de aves con muestras de anemia pueden indicar que la infección por este virus pudiera tener un papel importante en esta serie de casos. Por otro lado, en ninguno de los casos clínicos se presentaron las lesiones típicas de la infección por VAIP cuando la infección ocurre por transmisión vertical del virus. Es decir , no hubo casos de “ala azul o dermatitis gangrenosa”, no se observaron casos de palidez obvia en la médula osea o en otros órganos. Además no se observó correlación entre las lesiones histopatológicas y las pruebas de PCR con los aislamientos virales.

REFERENCIAS

1. G.Donald Ritter.Unusual Colisepticemia in Young Broilers. Proceedings of the 36th National Meeting on Poultry Health and Processing. Pp. 124,126. 2001

AGRADECIMIENTO

La Sra. Stephanie Mengel-Wheareat, Kathy Hamilton,y los Sres. Colby Smith y Joshua Litten hicieron el magnífico trabajo técnico en esta serie de casos, por lo cual les estoy profundamente agradecido.

A STUDY OF *PSEUDOMONAS AERUGINOSA* CONTAMINATION IN A COMMERCIAL POULTRY HATCHERY

ESTUDIO DE CONTAMINACIÓN CON *PSEUDOMONAS AERUGINOSA* EN UNA INCUBADORA COMERCIAL

Jean E. Sander

RESUMEN

La contaminación de la incubadora con *Pseudomonas* puede tener un impacto adverso sobre la calidad de la salud del pollo recién nacido y, debido a la resistencia típica de esta bacteria, la contaminación no se elimina con facilidad. Se inocularon cinco aislamientos de *P. aeruginosa* a pollos de un día de edad, encontrando grandes variaciones en la virulencia. El número de bacterias en el saco vitelino fue bajo pero la severidad de la enfermedad fue extrema. Todos los aislamientos fueron resistentes a los antibióticos, excepción hecha de la gentamicina. A una concentración de 10^9 , todos los aislamientos fueron resistentes a los desinfectantes a base de amonio cuaternario o de fenol. La dosis de las bacterias y la

adición de *EDTA-Tris*, estuvo fuertemente asociada con la eficacia de los desinfectantes.

Contamination of a hatchery by *Pseudomonas* can have an adverse impact on chick quality and health and due to the typical resistance and hardness of this bacterium, contamination is not easily alleviated. Five isolates of *P. aeruginosa* were inoculated into 1-day old chicks, with a large variation in virulence. The number of bacteria in the yolk sac was low, and severity of disease extreme. All isolates were resistant to antibiotics with the exception of gentamycin. All isolates at 10^9 were resistant to quaternary ammonium and phenolic disinfectants. Bacterial dose and the addition of EDTA-Tris was strongly associated with disinfectant efficacy.

MORTALITY PROBLEMS IN HATCHERIES: HAVE THEY DISAPPEARED DUE TO MODERN TECHNOLOGY?

PROBLEMAS DE MORTALIDAD EN LA INCUBADORA: ¿HAN DESAPARECIDO GRACIAS A LA TECNOLOGÍA MODERNA?

Franz Sommer, Bruce Charlton

CAHFS, Turlock Branch, 1550 N. Soderquist Ave, Turlock, Ca, 95380

RESUMEN

Se encontró que diferentes bacterias son agentes causales de mortalidad en las plantas de incubación, causando pérdidas dramáticas (*Enterobacter cloacae*, *Proteus* sp., *Escherichia coli*). Después de medio año de haber experimentado mortalidad en el pollo recién nacido, se volvió a presentar un caso similar. Se determinó que las bacterias (*P. aeruginosa* y *E. coli*) habían sido las causantes de las pérdidas en este caso también. El hallazgo común a los dos problemas fue la tasa comparable de mortalidad y la falta de aplicación de un antibiótico *in ovo*. Los hallazgos *postmortem* y los resultados bacteriológicos fueron diferentes.

Due to modern technology, hatchery-related accessions are not a frequent type of case in the CAHFS system. Consequently, when they occur, they are not only challenging, but offer an excellent opportunity for learning.

In late fall, 2000, live and dead day-old chickens were submitted from a broiler hatchery to the diagnostic laboratory along with 60 unhatched eggs. On the previous day, a different ventilation regimen was being tested for the first time and it was noticed that hatchery mortality had increased. When the increased mortality extended into the 2nd day, submission of samples was made. The total mortality in these two days was excessive.

Postmortem examination found all chicks had swollen yolk sacs, containing greenish or reddish contents, and additional fluid in the abdominal cavity. The eggs contained dead in shells with a massive omphalitis and hernias. Bacteriology findings in the live and dead chickens included various degrees of mixed flora, *Enterobacter cloacae*, *Escherichia (E.) coli* and *Providencia sp.* out of livers and yolk sacs. In the submitted eggs or dead in shells, mainly *Proteus sp.*, *Enterobacter cloacae* and *Klebsiella oxytoca* were found. Similar results with the addition of *Pseudomonas sp.* were present in the livers. Histopathological examination found slight

inflammatory reactions in livers (necrotic foci, microthrombosis) and yolk sacs.

In late spring of 2001, an additional case was received from the same hatchery. Dead chicks and cracked and uncracked eggs were submitted. Again, the case history included problems with high mortality and unhatched eggs.

In these chicks, either hatched or dead in shells, large, edematous yolk sacs were found. The navels were not closed, so parts of the yolk sacs were still extra corporal. Bacteriology findings included various degrees of mixed flora, *Enterococcus sp.*, *Escherichia coli* and *Proteus sp.* out of livers and yolk sacs, but the predominant bacteria found was *Pseudomonas (P.) aeruginosa*, even out of the brain. Histopathological examination found inflammatory reactions in livers and yolk sacs.

In case one, hatchery protocols revealed that in both days the mortality was found in hatchers opened at the end of the day. Routine procedures had been performed as usual. Parameters like parent stock or egg storage seemed uninvolved. Bacteriological examination of different samples of vaccines, diluents and vials containing a competitive exclusion product that had been administered in the hatchery did not show any unexpected growth.

A common factor related to both days' mortality appeared to be one group of machines used for *in ovo* vaccination. So one possible explanation is that the machine may have run out of disinfectant solution used to disinfect each injector between eggs and thus contaminated serial trays of eggs.

P. aeruginosa was the leading bacteriological finding in case two. Although contamination of a vaccine with *P. aeruginosa* has been described by Mireles and Alvarez (2) as a cause of high mortality, in this case the same batch of vaccine was used on other eggs without any signs of increased mortality. Temperature recordings of the hatchers did not show any abnormality and there were affected and unaffected hatchers in the same row of hatchers. One connection

between the affected hatcheries seemed to be a delivery of hatching eggs, but eggs from another origin had also been affected.

Although it was not possible to determine a source for the intake of *P. aeruginosa* into these hatcheries, improper temperature conditions during egg transport could have been an underlying problem. Generally, nest clean eggs that have 500 or fewer bacteria on the shell are not considered a severe contamination risk, unless they sweat. Unfortunately, it is common for moisture to form on the shells after eggs are removed from a cool egg storage room, creating a serious hazard (3). And, in distinction to case one, neither a competitive exclusion product nor an antibiotic was used during the vaccination.

Common finding in these two cases was the comparable mortality rate and the absence of an *in ovo* application of an antibiotic. Postmortem findings and bacteriology results were slightly different. In the first case, mainly *Enterobacter* and *E. coli* were the predominant bacteria, while in the second case, the leading bacteriological finding was *P. aeruginosa*.

Since mortality seemed to be related to the vaccination process during egg transfer, egg surface contamination could have been the predominant factor in both cases. In case one, a competitive exclusion product was used, while in case two neither a competitive exclusion product nor an antibiotic product was used. Obviously, in case one the competitive exclusion product was not able to suppress bacterial growth to a satisfactory degree. In case two, it appears that high numbers of bacteria on the eggshells, without being inhibited either by an antibiotic or a competitive exclusion product, resulted in embryo contamination and subsequently mortality.

Because of a hole punched into the eggshell during the *in ovo* vaccination process, they are more

susceptible to infection. Realizing this, the company leasing *in ovo* vaccination equipment requires that participating hatcheries have an excellent sanitation program (4).

In ovo application of antibiotics is an opportunity to control contamination problems. Research has demonstrated that there are competitive exclusion products available that appear to have the potential to control many enteric pathogens in poultry when administered *in ovo* singly or in combination with an antibiotic (1). The worldwide movement to reduce antibiotic use in poultry due to microbial resistance perceptions to antibiotics, these types of hatchery problems may become more and more important.

Although modern technology has reduced the likelihood of hatchery mortality, it has also created some pitfalls.

REFERENCES

1. Edens, F.W., Parkhurst, C.R., Casas, I.A., and Dobrogosz, W.J.: Principles of Ex Ovo Competitive Exclusion and *In Ovo* Administration of *Lactobacillus reuteri*. Poultry Sci. 76, pp 179-196. 1997.
2. Mireles, V., C. Alvarez, C.: *Pseudomonas aeruginosa* infection due to contaminated vaccination equipment. Proc. 28th West. Poult. Dis. Conf. and 13th PHS, Sacramento, California, pp. 55-57. 1979.
3. Mauldin, J.M.: Maintaining Hatching Egg Quality. In: Bell, D.D., Weaver, W.D.: Commercial Chicken Meat and Egg Production, 5th ed., Kluwer, pp 707-725. 2002.
4. Mauldin, J.M.: Operating the Hatchery. In: Bell, D.D., Weaver, W.D.: Commercial Chicken Meat and Egg Production, 5th ed., Kluwer, pp 775-800. 2002.

EL EFECTO DE HUMEDAD INCUBATORIA EN LOS PARÁMETROS PRODUCTIVOS DEL POLLO

THE EFFECT OF INCUBATION HUMIDITY ON HATCHABILITY AND EMBRYO MORTALITY, AND ON MAJOR BROILER PRODUCTIVE PARAMETERS

Prado-Rebolledo OF¹, Juárez-Estrada MA², Arce-Menocal J³, Cabrera-DueñasJ⁴

¹ Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia. Universidad de Colima. Autopista Colima-Manzanillo Km. 40. Crucero de Tecomán Col. CP 28100 E-mail: omarpr@ucol.mx, ² Departamento de Producción Animal: Aves, Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia. Universidad Nacional Autónoma de México, ³ Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia. UMSNH. Ecuador 120. Frac. América. CP. 58270. Morelia Michoacán, México. ⁴ Majahual SPRL de CV. Prolongación Hidalgo # 940. Arboledas del Carmen. Villa de Álvarez, Colima. CP. 28978

SUMMARY

The purpose of this research was to determine the effect of relative humidity during incubation on hatchability, embryo mortality, and broiler productive parameters in summer. One thousand four hundred and sixty four eggs laid by 38-week-old Ross x Ross breeders. Eggs were incubated in two setters at the following temperatures: 37.5 ± 0.5 °C dry bulb. 28.3 ± 0.5 °C y 30 ± 0.5 °C wet bulb, respectively. Data were subjected to Variance Analysis. Results suggest that at 28.5 ± 0.5°C more moisture is lost, with no statistical significance on the parameters evaluated.

El objetivo fue determinar el efecto de la humedad relativa durante la incubación y parámetros productivos del pollo en época de verano. Se utilizaron

1 464 huevos de la estirpe Ross x Ross con 38 semanas de edad. Se incubaron en dos máquinas incubadoras con temperatura de 37.5 ± 0.5 °C bulbo seco. 28.3 ± 0.5 °C y 30 ± 0.5 °C bulbo húmedo respectivamente. Los datos se sometieron a un Análisis de Varianza. Los resultados sugieren que a 28.5 ± 0.5 °C se obtiene una mayor pérdida de humedad sin observarse significancia en las diferentes variables medidas.

(El trabajo completo se pretende publicar en la revista *Veterinaria México*).

IMPACT OF POULTRY HOUSE AIR QUALITY ON HUMAN HEALTH

IMPACTO DE LA CALIDAD DEL AIRE EN LAS CASSETAS AVÍCOLAS SOBRE LA SALUD HUMANA

Trisha Marsh Johnson

Jones-Hamilton Co., 1 Plaza East, Suite 702, Salisbury, MD 21801

RESUMEN

La calidad del aire en las casetas avícolas es sumamente deficiente. Los niveles de polvo, endotoxinas y amoníaco son superiores a los valores límite del umbral para el humano, y son mucho más elevados que en cualquier otra instalación pecuaria. Subsecuentemente, los trabajadores de la industria avícola sufren más daño respiratorio que cualesquier otros trabajadores a cargo de animales. Disertaremos sobre los problemas respiratorios más comunes y sobre

cómo seleccionar el equipo apropiado de protección personal.

Much attention has been paid to the air quality of poultry housing in regards to its impact on poultry health and performance. However, little thought within the industry has been focused on how air quality affects the health of poultry workers. The only notable exception is the absolute wealth of data generated within the former Soviet Bloc countries but only

available in Russian. The data that does exist is quite clear and unequivocal. Air quality within poultry housing is poorer than in confinement facilities for any other species. Subsequently, poultry workers suffer from more respiratory damage than any other workers in animal agriculture. Because much of the damage is insidious in nature and/or delayed in onset, its connection to occupational exposure is often overlooked.

The most common respiratory disorders encountered in poultry workers are Hypersensitivity Pneumonitis (HP), Organic Dust Toxicity Syndrome (ODTS), occupational asthmas, and acute or chronic bronchitis. Mucous Membrane Irritation syndrome and non-specific, non-asthmatic chronic airflow obstructions also occur with relative frequency but are less well-defined syndromes. Dust, endotoxin, and ammonia (NH₃) exposure all contribute to these syndromes.

HP is the only of the respiratory symptoms encountered in animal agriculture almost exclusively in poultry workers. HP is caused by the sensitization to and repeated inhalation of organic antigens, in this case, poultry feathers and fecal material. The most well known type of HP is Farmer's lung, which is caused by exposure to moldy hay. Approximately 5-15% of individuals exposed to poultry will develop HP and it is more common in non-smokers than smokers (Gudmundsson,2001). This suggests the host immune response is a large factor in the development of the disease. Lung changes are the result of cellular infiltration into the alveoli and small airways followed by granuloma formation. Cytokine release is important in the pathogenesis of the disease. In acute HP, symptoms develop approximately 4-6 hours after exposure and consist of a combination of dyspnea, cough, chills, fever, headache, and malaise. Symptoms last for 12-24 hours and usually resolve spontaneously. Acute episodes are often written off as viral "flu-like" events. With continuing exposure, chronic disease may develop resulting in changes consistent with other interstitial lung disease. Breathlessness, dyspnea upon exertion, and cough are common. Fatigue, poor appetite, and weight loss are also seen. The only treatment is avoidance of the antigen and the lung damage is usually irreversible.

ODTS also occurs frequently and presents much like HP causing it to be written off as a "touch of the flu." ODTS is a delayed hypersensitivity reaction to the high levels of endotoxin present in poultry house dust. Headache, dizziness, nausea, and breathlessness occur 3-8 hours after exposure. In more severe, acute episodes fever and vomiting can occur. Full recovery, especially from the fatigue and malaise, can take 48-72 hours. Repeated episodes of ODTS can result in permanent lung damage and fibrosis. ODTS can occur

on the first exposure or it may take ten years of exposure to become sensitized(Bar-Sela et al. 1984).

Occupational asthma most often occurs in poultry workers who already exhibit allergic symptoms. However, many farmers still develop occupational asthma without previously known allergies. The prevalence rate is around 10% of all animal workers. Mild allergic reactions include sneezing, runny nose, and skin hives. As many as 50% of the workers who exhibit these mild symptoms will go on to develop the coughing, wheezing, and tightening of the chest most often associated with asthma. Symptoms can occur almost immediately or be delayed for up to 8 hours (NIOSH, 1998). In poultry workers, the asthma symptoms tend to persist even after the workers have left the poultry facilities (Bar-Sela et al. 1984).

High levels of dust and NH₃ in poultry facilities also cause chronic respiratory irritation. The Threshold Limit Value (TLV) for ammonia is 25 ppm, which is almost always exceeded in modern confinement facilities. This chronic exposure results in chronic bronchitis, bronchial reactivity, and/or bronchiolitis obliterans as well as generalized mucous membrane irritation. Because the ability to smell ammonia is dramatically reduced even after minimal exposure, the nose should never be relied upon as an appropriate monitoring tool.

The development of modern confinement and animal handling systems has greatly reduced the majority of occupational injuries in animal agriculture. Unfortunately, this progress has come at the expense of increased exposure to and concentration of respiratory hazards. The levels of these hazards are higher in poultry buildings than in facilities in any other sector of animal agriculture. Louhelainen et al. (1987) compared the TLV of organic dust (5mg/m³) with the actual dust concentration on 20 Finnish farms, four of which raised poultry. The mean concentration of dust exceeded the TLV in all farm buildings with the highest concentrations recorded in the poultry houses at 12.8 mg/m³. Dust concentrations in a wide variety of poultry houses ranged from 0.02-81.33 mg/m³ in a separate study with the lowest dust concentrations occurring in the cage layer facilities (Ellen, 2000). In turkey grow out houses, dust levels averaged 9.3 mg/m³ and NH₃ levels averaged 35ppm in the human breathing zone. During tilling of the litter, the NH₃ concentration often exceeded 100ppm (Mulhasen, 1987). While the levels of NH₃, dust, and endotoxin reported in poultry houses vary widely in the literature, they always exceed the human TLVs by significant amounts and are often 5-10 fold higher than in other animal facilities (Golbabaie, 2000; Dutkiewicz, 1978; Hartung, 1998; Iverson, 2000).

The increased respiratory hazards documented in poultry housing are also clearly demonstrated in its

effect on poultry workers. Poultry workers have significantly higher prevalence of chronic cough, chronic phlegm, chronic bronchitis, and chest tightness than non-exposed controls. FVC, FEV1, and FEF25 were significantly lower in poultry workers than predicted normal values. Workers exposed for ten years or more had even lower respiratory capacity test results than workers with shorter exposures (Zuskin, 1995). Significant dose-response relationships between exposure and a decrease in pulmonary function over a work shift have also been documented. The following exposure levels resulted in a decrease of respiratory function: 2.4 mg/m³ total dust, 0.16 mg/m³ respirable dust, 614 EU/m³ endotoxin and 12 ppm NH₃ (Donham, 2000). As noted in the earlier mentioned studies, conditions in poultry housing far exceed these levels. The available literature consistently documents respiratory damage in poultry workers whether it is through increased incidence of disease or decreased respiratory function tests (Danuser, 1988; Nielsen, 1995; Tudor, 1985; and Thelin, 1984).

The key to preventing respiratory illness is the selection and usage of appropriate personal protection equipment (PPE) capable of mitigating the exposure to both dust and ammonia. Single strap nuisance dust masks provide no protection and should never be used in poultry facilities. Either disposable or reusable air purifying respirators equipped with NH₃/methylamine cartridges should be worn. The selection of a half or full-face mask is up to the wearer. A full-face mask will also protect the eyes from ensure the proper fit and to conduct regular maintenance of the respirator. Otherwise, a false sense of security may develop. The following checklist of rules should always be used (Murphy, 1993):

- Always inspect and test fit with new cartridges. Do not use a respirator that has been sitting around since last season.
- Clean the respirator daily according to manufacturer's instructions. To extend cartridge life, store the respirators and cartridges in an airtight bag.
- Store the respirator in a sealable plastic bag away from contaminants, not in a machine shop or livestock confinement building. The cartridges in the respirator continue to absorb the gases in the storage area until the charcoal; has reached its absorption capacity.
- Follow the test fit instructions.
- Do not use respirators with beards or other facial hair that pass between the sealing flange of the respirator and the face.

The nature of poultry housing lends itself to poor air quality that can negatively impact human health. Often there is a dose response relationship between the

levels of dust, endotoxin, and NH₃ and the level of respiratory dysfunction present. The usage of appropriate PPE can mitigate the damage caused by respiratory hazards.

REFERENCES

1. Danuser, B., Wyss, C. Hauser, R., von Planta, U., and D. Folsch. Lung Function and symptoms in employees of poultry farms. *Soz Praventivmed* 33 (6): 286-91. 1988.
2. Donham, K.J., Cumro, D., Reynolds, S.J., and J.A. Merchant. Dose-Response relationships between occupational aerosol exposures and cross-shift declines in poultry workers: recommendations for exposure limits. *J Occup Environ Med* 42(3): 260-9. 2000.
3. Dutkiewicz, J. Exposure to dust-borne bacteria in agriculture. I. Environmental Studies. *Arch Environ Health* Sep-Oct; 33(5): 250-9. 1978.
4. Ellen, H.H., Botcher R.W., von Wachenfelt E., and H. Takai. Dust levels and control methods in poultry houses. *J Agric Saf Health* Nov; 6(4): 275-82. 2000.
5. Golbabaee, F. and F. Islami. Evaluation of workers' exposure to dust, ammonia and endotoxin in poultry industries at the province of Isfahan, Iran. *Ind Health* Jan;38(1): 41-6. 2000.
6. Gudmundsson, G. and J. Wilson. Pulmonary Core Curriculum: Hypersensitivity Pneumonitis (farmer's lung disease). *Virtual Hosp.org*, 2001.
7. Hartung, J. Nature and amount of aerial pollutants from livestock buildings. *Dtsch Tierarztl Wochenschr* Jun;105(6):213-6. 1998.
8. Iversen, M., Kiryuchuk, S., Drost, H., and L. Jacobson. Human health effects of dust exposure in animal confinement buildings. *J Agric Saf Health* Nov;6(4): 283-8. 2000.
9. Louhelainen, K., Kangas, J., Husman, K., and E.O. Terho. Total concentrations of dust in the air during farm work. *Eur J Respir Dis Suppl*152:73-9. 1987.
10. Mulhausen, J.R., McJilton, C.E., Redig, P.T., and K.A. Janni. Aspergillus and other human respiratory disease agents in turkey confinement houses. *Am Ind Hyg Assoc J* Nov;48(11):894-9. 1987.
11. Nielsen, B.H., and N.O. Breum. Exposure to air contaminants in chicken catching. *Am Ind Hyg Assoc J* Aug;56(8):804-8. 1995.
12. Preventing Asthma in Animal Handlers. NIOSH Publication No. 97-116. Jan 1998.
13. Thelin, A., Tegler, O., and R. Rylander. Lung reactions during poultry handling related to dust and bacterial endotoxin levels. *Eur J Respir Dis* May;65(4):266-71. 1984.

14. Tudor, A., Racoveanu, C., Gheorghiu, M., Georgescu M., and C. Pecec. Study of respiratory and immunologic changes in the workers of a poultry farm. *Med Interne* Apr-Jun; 23(2):129-34. 1985.

15. Zuskin, E., Mustajbegovic, J., Schachter, E.N., Kern, J., Rienzi, N., Goswami, S., Marom, Z., and S. Manyani. Respiratory function in poultry workers and pharmacological characterization of poultry dust extract. *Environ Res.* Jul;70(1):11-9. 1995.

MANEJO PARA LA Ponedora Comercial

MANAGING THE COMMERCIAL LAYER

M.V.Z Sergio G. Mata Lecourtois

Incubadora Mexicana S.A. de C.V., 7 Norte # 416 Tehuacán Pue. Tel (238) 3-11-40,
E-Mail-incumex@grupoidisa.com

SUMMARY

For the egg industry to be truly profitable, efficiency is a must. For this purpose we should pursue the guidelines issued by the different genetic companies. All of them agree that, in order to obtain excellent results, the application of major management practices (cleaning, disinfection, good house conditions at bird placement, good temperature management, and proper beak trimming) during both the rearing and the production periods is essential.

RESUMEN

Actualmente para que en la industria avícola del huevo se obtengan verdaderas ganancias es primordial que se sea lo bastante eficaz y eficiente, para esto nos debemos abocar sobre lo que nos marcan los lineamientos de las diversas líneas genéticas aviares; en donde todas coinciden que para lograr excelentes resultados es necesario la aplicación de los principales manejos tanto en crianza como en producción, tales como limpieza, desinfección, buenas condiciones de las casetas para la recepción de las aves, con un buen manejo de las temperaturas. y la realización de un adecuado despique

A continuación se describen los puntos básicos:

ALIMENTO	Proteína	E.M. Kcal/Kg.	Calcio min-max	Fósforo min-max
Iniciación	21.5 %	2950	1.1- 1.2 %	.48- .50 %
Crecimiento 1	17.5 %	2900	1.1- 1.2 %	.48- .51 %
Crecimiento 2	16.5 %	2800	1.1- 1.2 %	.45- .48 %

4) **Pesos corporals.** Durante el crecimiento, se necesita hacer en forma precisa el monitoreo semanal del peso corporal y uniformidad, para poder realizar los cambios de fórmula, así como tener el peso adecuado para el inicio de postura. (Se recomienda pesar 100 aves en jaula o bien 100 % aves atrapadas en piso por caseta). La obtención de los pesos meta semana a semana y conjuntamente con la uniformidad va a ser un

INTRODUCCION

Los principales manejos que deben tener las ponedoras son:

I. CRIANZA

1) **Limpieza y desinfección:** Las unidades de crianza deberán previamente estar en buenas condiciones, lavadas y desinfectadas, revisadas que se encuentran en buen funcionamiento las instalaciones y equipo.

2) **Recepción.** Es importante además del manejo correcto de las temperaturas, suministrar alimento durante los primeros cuatro días en el interior de la jaula. (cuando se trate de crianzas en jaula).

3) **Despique.** Se recomienda revisar este manejo, para lograr uniformidad en la realización, recomendamos realizarlo a partir de los 21 días en donde se hace un sólo corte de precisión. Y en las operaciones en donde se realizan dos despiques, efectuar el primer corte o despunte a los 7-10 días de edad y el segundo corte de pico a las 8 semanas de edad.

indicativo de manejo y a la vez un reflejo de lo que la parvada va a ser en su etapa de postura que es el punto más importante en el manejo de las pollas comerciales para lograr todos los objetivos productivos.

5) **Tipos de Alojamiento y Requerimientos de Espacio para la Pollita Comercial.**

5.1 Espacio: Ofrezca una distribución adecuada de agua, alimento y espacio de piso. Ya que dar

cantidades deficientes de estos durante el período de crecimiento afecta adversamente tanto a la tasa de crecimiento como a la uniformidad.

6) **Temperaturas en Crianza.**

7) **Programa de vacunación.**

8) **Programa de Luz en Crianza para Ponedora Comercial Babcock B-300.**

8.1 Intensidad. Se recomienda en casetas abiertas de 20 a 40 Lux, con luz artificial en crianza. Intensidades de luz mayores a las recomendadas, provocan que las aves se muestren más nerviosas

8.2 Color. El color de luz recomendado es amarillo, anaranjado, rojo; esto puede ser proporcionado por focos incandescentes o fluorescentes.

9) **Selección de aves**

La selección de aves retrasadas es una buena medida para lograr pesos y uniformidad de la parvada, ya que reduce la competencia de espacio y comida. Todas las aves que se encuentran todavía en condiciones físicas pueden ser seleccionadas hasta con un 25% abajo del peso meta. Aves con problemas de locomoción deben ser sacrificadas. Esta medida debe ser implementada tanto en crianza como en postura.

9.1 La estimulación. La estimulación del consumo de alimento es de gran beneficio para incrementar el consumo y por ende para lograr los pesos meta, esto se puede realizar después de un despique, reacción postvacunal, épocas de calor, traslado o cuando el peso se encuentra abajo del estándar y se puede realizar conjuntamente con la adición de un suplemento vitamínico.

10) **Transferencia de aves de crianza a unidades de producción.** Es de suma importancia que el traslado sea a las 16 semanas de edad. Un mal traslado de aves será responsable de un 80 % del total de la mortalidad en las primeras 6-8 semanas de producción. Esto ocurre sobre todo cuando las parvadas se encuentran en más de un 2-10% de producción diaria antes de ser transferidas. Causado en un 70% por la ruptura interna de los folículos ováricos o huevos en ponedoras al instalarse, ocasionando una infección por E. Coli, peritonitis y muerte

Un 30% en ponedoras bajo estrés de producción es incapaces de adaptarse a una nueva jaula y de encontrar agua a tiempo consecuentemente hay mortalidad por deshidratación. Un mal trato a las aves al momento del traslado, nos ocasiona también alta mortalidad.

RECOMENDACIONES DE MANEJO PARA LA PONEDORAS II. POSTURA

1) Limpieza y Desinfección:

Las unidades de producción deberán previamente estar en buenas condiciones, lavadas y desinfectadas,

revisadas que se encuentran en buen funcionamiento las instalaciones y equipo.

2) Recepción. Es importante además del manejo correcto, suministrar tipo de alimento y cantidad adecuadas para que el ave identifique donde se encuentra el alimento, así como para que disponga de una cantidad suficiente de alimento y recuperar el peso perdido durante el traslado. Poner atención para que el ave pueda disponer de el agua en el bebedero (estimular el consumo de agua, picando copa) durante los primeros 15 días de recepción.

3) Alimentación.

3.1 Utilización de alimentos. Actualmente recomendamos realizar los cambios de formulación de la siguiente manera.

a. Postura (Booster) de 16-1 semanas a 40 semanas de edad (hasta que la producción baja del 90 %).

b. Postura fase 1, de 41 semanas a 60 semanas de edad (abajo del 80 % de producción).

c. Postura fase 2, de 61 semanas a 70 semanas de edad.

d. Postura fase 3, de 71 semanas hasta la venta.

3.2 Pesos Huevo. Se recomienda pesar semanalmente una muestra de 100 huevos por lote para identificar las ganancias de peso así como para detectar cualquier problema que se presente.

Pesos corporales. Durante el crecimiento, se necesita hacer en forma precisa el monitoreo semanal del peso corporal y uniformidad, para poder realizar los cambios de fórmula, así como tener el peso adecuado para el inicio de postura. (Se recomienda pesar 100 aves en jaula por caseta).

4) Programa de vacunación.

5) Programa Preventivo para Ectoparásitos.

6) Programa de Luz en Producción para Ponedora Comercial Babcock B-300.

7.1 Intensidad. Se recomienda en producción de 2 a 10 Lux, con luz artificial. Intensidades de luz mayores a las recomendadas, provocan en las aves mayor nerviosismo.

7.2 Color. El color de luz recomendado es amarillo, anaranjado, rojo; esto puede ser proporcionado por focos incandescentes o fluorescentes.

7) Elaboración e Interpretación de la información obtenida en granja.

1. Registro y Gráficas.

A) Pesos Corporales y uniformidades.

B) % Mortalidad.

C) Consumo de Alimento.

D) Peso de huevo.

E) No. de Huevos Acumulados.

F) Masa de huevo Acumulado.

G) Índice de Producción

H) Programa de Luz.

- D) Programa de Vacunación.
- J) Tratamientos.

REFERENCIAS

1. Mata Lecourtois Sergio G. Comportamiento de las reproductoras. Seminario Babcock, Teh. Pue. 2001 CD.
2. Mata Lecourtois Sergio G. Control de la viabilidad en las ponedoras Babcock. Seminario Babcock, Teh. Pue. 1999 19-22.
3. Mata Lecourtois Sergio G. Controlando la mortalidad mediante dos despiques y parámetros productivos. Seminario Babcock, México, D.F.. 1997 37-45.
4. Leeson Steve Dr. Programa de alimentación de la ponedora. Seminario Babcock Tehuacán, Pue. 2001 5-9
5. Clive Board Dr. Nutrición y manejo de la Babcock. Seminario Babcock Tehuacán, Pue. 1995 41-50.
6. Macf O.North Manual de producción Avícola, manejo de crianza 223-350 3ª. Edición.
7. Guía de manejo Babcock requerimientos de espacio, jaula, piso etc. 2002.
8. Adjanohum Ephrem Dr. Manejo de las características de la luz en ponedoras y su adaptación para la Babcock B300, Seminario Babcock Tehuacán, Pue, 1999 85-89
9. Summers, J.D. la importancia del peso corporal y la edad de la madurez sexual, influenciada por programas de alimentación y manejo adecuado de la producción de una ponedora redituable. Curso de actualización en el manejo de aves de postura, ANECA, Tepatitlán, Jal. 1994 30-44.

EFECTO DE LA TEMPERATURA DE CRIANZA SOBRE EL EMPLUME DE POLLOS DE ENGORDA MACHOS Y HEMBRAS

THE EFFECT OF BROODING TEMPERATURE ON FEATHER DEVELOPMENT IN MALE AND FEMALE BROILERS

José Arce Menocal¹, Carlos López Coello², Eduardo Gutiérrez Valdespinos³, Ernesto Avila González⁴

¹INIFAP Campo Morelia, Ecuador 120, Morelia, Mich, México arce@unimedia.net.mx. ²DPA:A, FMVZ, UNAM. México 04510 D.F. México. ³UMSNH, Morelia, Mich. México. ⁴CEIEPA, FMVZ, UNAM, México 04510 D.F.

SUMMARY

Length of the 3rd. primary feather was evaluated as a variable in response to sex and environmental temperature, at 1, 3, 5, 7, 14, 21, and 28 days of age. Feather length growth up to 7 days was significantly ($P<0.01$) higher in the females. This situation prevailed ($P<0.05$) up to day 21. No difference ($p>0.05$) was observed between both sexes on day 28. As far as the effect of the first-week temperature is concerned, feather length was greater under the most adverse conditions, but starting on day 14 longer feathers were observed with the best environment.

RESUMEN

Se evaluó el largo de la tercera pluma primaria como variable de respuesta a sexo y temperatura ambiental al día 1, 3, 5, 7, 14, 21 y 28 de edad, encontrando hasta los 7 días un crecimiento mayor ($p<0.01$) en hembras, continuando ($p<0.05$), hasta el día 21, sin diferencias ($p>0.05$) entre sexos al día 28. Para el efecto de temperatura durante la primera semana, la longitud fue mayor en condiciones ambientales mas adversas, obteniendo desde el día 14 plumas mas largas en el mejor ambiente.

INTRODUCCIÓN

El lento desarrollo del emplume en los pollos de engorda, particularmente en los machos de las líneas autosexables se han presentado con bastante frecuencia en las parvadas comerciales, ocasionando severas perdidas económicas principalmente por el daño que ocurre en la calidad del producto terminado. Las plumas tienen funciones importantes (mantenimiento de la temperatura corporal y la protección de la piel entre otras), tradicionalmente poca atención se le ha dado a este tejido, quizá debido a que el emplume no se mide en los términos clásicos del desarrollo del ave, como lo demuestra la escasa información publicada.

Entre los aspectos que han sido transformados, y que están involucrados en la conformación, cantidad, patrón y crecimiento del emplume se encuentran el desarrollo de las líneas autosexables, la rápida velocidad de crecimiento corporal, la existencia de una mayor superficie debido al incremento del desarrollo muscular y una eficiente conversión alimenticia.

Los genetistas han podido incluir en las líneas autosexables un gen ligado al sexo (K) el cual determina un emplume lento en los machos de la progenie; por ser las hembras portadoras del gen recesivo, se facilita de una manera rápida y precisa la

identificación del sexo al nacimiento mediante la observación, distribución y forma de las plumas remigeas. También se ha logrado una rápida velocidad de crecimiento corporal aunado al incremento de la superficie por el desarrollo de las masas musculares, sin que el periodo de formación de la pluma se haya acelerado para cubrir esa mayor área; por lo que hoy en día, los pollos tienen en proporción al peso corporal menor peso de plumas, lo que da como consecuencia un “faltante de plumas”.

Sin lugar a dudas la alta densidad de población, el limitado espacio de comedero y bebedero/ave, el estado de la cama y las condiciones ambientales que incluyen temperatura, humedad, ventilación e intensidad de la luz influyen sobre la calidad y cantidad de las plumas. Se ha mencionado que la crianza a temperatura elevada predispone los problemas de lento emplume, para conocer este efecto se realizó un estudio en pollos de engorda durante 28 días, manteniéndolos bajo condiciones ambientales arriba de los 30 °C, la ganancia de peso y mortalidad se vieron afectados, pero no fue posible reproducir alguna alteración en el emplume (López Coello, datos no publicados), la investigación de Coper y Washburn (1998), demostró que el porcentaje del peso de la pluma : peso corporal en pollos de engorda machos de 51 días de edad cuando fueron evaluados bajo condiciones de estados de tensión por alta temperatura (32 °C versus 21°C), resultó significativamente mayor al mantener a las aves a 21 °C (6.22%) en comparación con la zona de calor (5.03%), sin estar correlacionados con los parámetros productivos. Yalcin et al., (1997a), evaluaron el emplume en 3 líneas genéticas de pollo de engorda (dos de lento y una de rápido emplume) en Turquía durante el verano (28 °C) y otoño (18 °C), no existiendo diferencias a las 4, 5 y 6 semanas de edad al clasificar el dorso y muslos como completamente cubierto o pobre emplume. Los machos de lento emplume presentaron un menor score de emplume a las 4 5 y 6 semanas de edad en las dos estaciones. Todas las aves tuvieron el plumaje completo a las 7 semanas de edad; donde determinaron el porcentaje relativo a peso corporal (verano 5.11, 5.06 y 5.07%, otoño 5.05, 4.28, 4.72%), siendo mayor en hembras (5.36 y 4.92%) que en machos (4.80 y 4.45%) en las dos estaciones. El emplume no estuvo asociado con la estación del año o peso corporal; este autor (1997b) menciona que las gallinas de cuello desnudo tienen un peso de la pluma cerca de 20% inferior (4.36%) que las aves de emplume normal (5.57%) , independientemente del clima, sexo o edad. Petras y colaboradores en 1989 criaron pollos de engorda durante los primeros 21 días de edad a temperaturas bajas (27.9 °C y 19.7 °C con humedad relativa de 61.7 a 79.5% , obteniendo un peso corporal promedio a las 8 semanas de 1757 y 1686 g, sin existir diferencias en el

peso y largo de las plumas. Sharma et al., (1995) determinaron en pollos de 3 estirpes comerciales la cantidad de plumas en 2 diferentes épocas del año caliente / húmeda y

fría / seca) a las 6, 8 y 10 semanas de edad, encontrando diferencias significativas entre las tres estirpes solamente en la estación fría / seca a las 8 semanas de edad. Herremans et al., (1989) demostraron que la producción de calor corporal se incrementa cuando la temperatura ambiental es baja, o al existir un mal emplume.

Para conocer el efecto de diferentes temperaturas de crianza sobre la velocidad de emplume se realizó un estudio con 3000 pollitos sexados (1500 hembras y 1500 machos) distribuidos mediante un diseño completamente al azar, con un arreglo factorial 2 x 3 con 5 réplicas de 100 aves cada uno. Siendo los factores el sexo (hembra y macho), y tres diferentes manejos de calor artificial en los primeros 28 días de edad de acuerdo al esquema siguiente por semana (1, 2, 3 y 4), considerando la temperatura °C promedio, mínima, máxima y rango de temperatura): T1.- 22.1, 18.7, 18.3, 19.4 (promedio), 13.8, 6.95, 6.05, 9.80 (mínima), 36.1, 35.1, 34.4, 32.1 (máxima), 22.2, 28.2, 28.3, 22.3 (rango) . T2.- (22.6, 19.9, 19.0, 20.3 (promedio), 15.0, 7.92, 7.12, 10.4 (mínima), 37.5, 36.3, 35.1,32.9 (máxima), 22.4, 28.4, 28.0,22.4 (rango) T3.- 23.5, 21.5, 21.8, 2.8 (promedio), 15.4, 9.67, 13.0, 15.5 (mínima), 37.8, 33.8, 33.0, 31.9 (máxima), 22.4, 24.2, 19.9, 16.3 (rango). La caseta fue dividida totalmente en 3 secciones, con una cortina plástica de grueso calibre, en cada uno de los compartimentos se colocaron 3 termómetros electrónicos que registraron la temperatura cada hora. El alimento fue en forma de migaja, teniendo las aves libre acceso al agua y alimento

Al día de edad se seleccionaron e identificaron con bandas metálicas en el ala a 50 aves de cada sexo y se midió el largo de la tercera pluma primaria del ala derecha con un Vernier (expresando los valores registrados en cm. . Los datos se sometieron a un análisis de varianza de doble vía

Los resultados al primer día de edad mostraron significancia estadística (($p < 0.01$) entre sexos, siendo mayor en las hembras (1.17) , con respecto a los machos (0.71), en la segunda lectura que ocurrió al tercer día de edad, continuó la mayor longitud de la pluma ($p < 0.01$) en hembras (2.62) que en machos (1.78). La misma respuesta persistió al quinto día de edad ($p < 0.01$), observando valores de 3.56 para las hembras y de 2.08 en los machos). A la primera semana de edad el efecto de sexo continuó , obteniéndose valores de 4.07 y 2.58 respectivamente. (El diferencial en esta periodo es marcado entre sexos, lo que indica un patrón de emplume muy distinto entre ellos), al realizar la medición al día 14 se encontró un

diferencial menor ya que fue a una significancia de ($p < 0.05$), (hembras 6.68 y machos 5.32), A los 21 días la diferencia estadística también fue a favor de las hembras (8.47 contra 7.80); en la última lectura que se realizó al día 28 ya no se presentaron diferencias entre sexos, siendo los valores similares para hembras y machos (9.92 contra 9.86).

Con respecto a la temperatura ambiental, para los primeros 3 periodos de lectura (3, 5 y 7 días de edad), las aves del T1 obtuvieron estadísticamente mejor emplume (2.32^a, 3.14^a, 3.59^a), siendo altamente significativo ($p < 0.01$) con respecto a los animales del T2 (2.06^b, 2.52^c, 2.91^c) que estuvieron alojados con una temperatura media, mínima y máxima mayor, y solamente al día cinco con respecto al T3 (2.22^{ab}, 2.79^b, 3.48^a) donde se utilizaron las mejores temperaturas.

A los catorce días de edad, el T3 (6.24^a) mostró significancia ($p < 0.01$) con relación al T2 (5.63^b), pero no hacia T1 (6.13^{ab}), situación que continuó a los 21 días (T1 8.15^{ab}, T2 7.88^b, T3 8.39^a). Para la evaluación realizada a los 28 días de edad, la significancia se presentó entre T3 (10.27^a con respecto a T1 (9.69^b y T2 (9.71^b).

CONCLUSIONES

En la primera semana de edad (1, 3, 5 y 7 días de edad) el efecto de la velocidad de crecimiento de la tercera pluma primaria es más marcado entre sexos, siendo mayor en las hembras ($p < 0.01$), situación que disminuye con la edad entre los días 14 y 21 ($p < 0.05$), no mostrando significancia estadística a los 28 días de edad, sin embargo debido a la mayor velocidad de crecimiento de los machos, la cobertura es menor.

Con respecto a la temperatura ambiental durante la crianza, se obtuvo el mayor largo de la pluma en el tratamiento donde estas fueron más desfavorables (T1),

situación que no persistió a partir del día 14, donde la pluma resultó más larga en los pollos ubicados en el tratamiento con mejores condiciones ambientales (T3)

El largo de la pluma primaria como variable de respuesta hacia el emplume tiene la ventaja de ser un método rápido, preciso y económico; sin embargo, no refleja en su totalidad el patrón de emplume del animal y por sí solo no considera aspectos de calidad y cantidad de plumas.

REFERENCIAS

1. Coper, M.A., and Washburn K.W. The relationship of body temperature to weight gain, feed consumption, and feed utilization in broilers under heat stress. *Poultry Science*. 1998. 77:2, 237-242.
2. Herremans M., Decuyper E., and Siau O. Effects of feather wear and temperature on prediction of food intake and residual food consumption. *British Poultry Science*. 1989. 30:1, 15-22.
3. Pietras M., Herbut E., and Wezyk S. Effect of thermal conditions in cages on metabolic rate, feather growth and fattening performance of broiler chickens. *Zootechniczna*. 1989. 104:4, 51-63.
4. Sharma D., Tyagi P.K. and Shukla R.P. Carcass characteristics of broiler chicken as influenced by age, strain and season. *Indian Journal of Veterinary Research*. 1995. 4:1, 36-43.
5. Yalcin, S., Settar P., Ozkan S., and Cahaner A. Comparative evaluation of three commercial broiler stocks in hot versus temperate climates. *Poultry Science* 1997a. 76:7, 921-929.
6. Yalcin S., Testik A., Ozkan S., Settar P., Celen F., and Cahaner A. Performance of naked and normal broilers in hot, warm, and temperate climates. *Poultry Science*. 1997b, 76:7, 930-937.

DETECCIÓN DE LA MIOPATÍA PECTORAL PROFUNDA BAJO DOS SISTEMAS DE MANEJO DE CARGA Y EMBARQUE EN POLLO DE ENGORDA

DEEP PECTORAL MYOPATHY (DPM) IN BROILERS USING TWO CATCHING/SHIPPING SYSTEMS

Juan C. Valladares¹, Gerardo del Bosque¹, Benjamín Sánchez² y Armando Antillón³

¹Laboratorio de Control de Calidad y Patología Aviar, Productora de Alimentos Pecuarios de Nuevo León, S.A. de C.V. Juárez y Arista s/n, Salinas Victoria, N.L., México. CP 65500. juancv@papsa.mexis.com

²Elanco Animal Health, ³Nutrifarm, S.A. de C.V.

SUMMARY

The effect of two catching, loading, and shipping systems on the prevalence of DPM and other traumatic lesions detected in the processing plant, as well as in

fresh carcass retail shops was evaluated using two shipments of 4,800 broiler males weighing 3.4 kg as an average. A traditional, per-group, hand catching system was compared with an individual hand catching/rail

system. Lesion detection was made by gross observation in the processing line, and carcasses were observed again in 10 public fresh carcass retail shops. Results with the traditional loading system were: DPM, 10%; foot traumatic lesions (FTL), 5% and traumatic breast bursitis (TBB) 0.3%. Results with the rail-catching system were DPM <0.01%, FTL, 0.1%, and TBB, 0.3%.

RESUMEN

Se analizó el efecto de dos sistemas de manejo de captura, carga y embarque de pollo de engorda en la prevalencia de Miopatía Pectoral Profunda (MPP) y de otras lesiones traumáticas detectadas a nivel de Rastro y en expendios al público de pollo fresco en dos embarques de 4,800 pollos machos con un peso promedio de 3.4 kg. Se comparó un sistema de captura tradicional manual en grupo y un sistema de captura manual individual con rieles. La detección de lesiones se realizó por observación macroscópica en la línea de faenamiento y las canales fueron observadas posteriormente en 10 expendios públicos de pollo fresco recién procesado. Con el sistema de carga tradicional se estimó una prevalencia de MPP del 10%; de lesiones traumáticas en patas (LTP) del 5% y de bursitis traumática de la quilla (BTQ) en 0.3% mientras que en sistema de captura con rieles se estimó una prevalencia de MPP menor al 0.01%, de LTP del 0.1% y de BTQ del 0.3%.

La Miopatía Pectoral Profunda (MPP) también conocida como enfermedad del músculo de Oregon o enfermedad del músculo verde, es un padecimiento caracterizado por hemorragias, edema y necrosis del músculo pectoral profundo (*m supracoracoideus*)^{2,4,6} y fue originalmente descrita en pavos en 1968³. La MPP es la consecuencia de un movimiento súbito y brusco de aleteo que ocasiona tumefacción y aumento de tamaño del músculo supracoracoideos, el cual se aprisiona dentro de su fascia inelástica hasta generar isquemia y necrosis por falta de un riego sanguíneo suficiente^{3,4,6}; experimentalmente se ha demostrado que un aleteo violento de tan solo 30 segundos puede producir la MPP⁴. La MPP es más frecuente en aves de peso elevado y aparentemente es más frecuente en los machos en época de invierno, no está relacionada con aportes de ningún nutriente específico pero la adición de vitamina E y selenio (sobre todo en su forma orgánica) puede motivar un efecto protector leve; se puede presentar en cualquier estirpe pero las estirpes de rápido crecimiento son las más afectadas⁵. La necrosis resultante del músculo afectado puede al principio tener un aspecto hemorrágico en las primeras horas tras su generación, y evolucionar a un aspecto reseco y verdoso algunos días después de su desarrollo, pero es asintomática^{4,6}. El manejo brusco que motiva la presentación de la MPP y de otras lesiones traumáticas

observadas en el rastro, como las lesiones traumáticas en las patas (LTP), incluyendo las hemorragias en articulaciones de tarsos y muslos, el dislocamiento del fémur y la ruptura del tendón tarsal, así como la bursitis traumática de la quilla (BTQ) puede ser ocasionado en el momento en el que las aves son capturadas antes de ser cargadas, en el enjaulado, la carga, el transporte, la descarga o en el manejo inmediato previo al sacrificio; y en cada una de estas etapas se pueden generar lesiones que demeriten la calidad de las canales^{1,5}.

El objetivo del presente estudio fue analizar si el sistema de captura y carga de pollo de engorda previo al sacrificio modifica la incidencia de MPP, LTP y BTQ detectados a nivel de rastro o expendio de pollo fresco.

MATERIAL Y METODOS

Se analizaron dos embarques de pollos de engorda, machos, de 4,800 aves con un peso promedio de 3.4 kg., sin dietar, procedentes de la misma caseta de producción, con dos sistemas de atrapamiento y enjaulado de las aves antes de su transporte al rastro, denominados arbitrariamente como Sistema Convencional de Captura (SCC) y Sistema Nuevo de Captura (SNC).

En el SCC el camión se localizó afuera de la caseta y las jaulas vacías se subieron al camión acomodándolas por niveles. Dentro de la caseta los cargadores atraparon de forma manual 4 aves en cada mano, tomándolas de una pata. Los cargadores sacaron a las aves de la caseta caminando un trayecto de entre 20 y 30 m.; afuera de la caseta y en la orilla de la plataforma del camión, pasaron las 8 aves a un segundo cargador que las introdujo a las jaulas vacías. Conforme las jaulas de un nivel se fueron llenando, se colocó otro nivel de jaulas hasta completar 10 niveles.

En el SNC el camión se localizó afuera de la caseta y se le colocó una rampa hecha con dos tubos de PVC de 2 pulgadas, desde la plataforma hasta la entrada de la caseta. La caseta fue dividida en corrales de aprox. 6 metros cuadrados, utilizando jaulas vacías como barrera. Cada cargador capturó a las aves, una por una, tomándola con ambas manos sobre el dorso a la altura de las alas, introduciéndolas individualmente a las jaulas. Una vez cargadas, las jaulas fueron sacadas de la caseta con la ayuda de dos tubos de PVC de 2 pulgadas colocados en el piso a manera de rieles de ferrocarril, sobre los cuales se empujaron las jaulas llenas una detrás de otra hasta llegar a la puerta de la caseta, donde fueron también empujadas sobre la rampa hasta la plataforma del camión, una vez arriba las jaulas se apilaron en 10 niveles como en el Sistema Convencional.

El transporte ulterior, la descarga, el sacrificio y el procesamiento de las canales se realizó en forma

convencional y fue similar en ambas observaciones. El recorrido entre la granja y el sitio de sacrificio fue de aproximadamente 1,000 km. y el tiempo de traslado fue entre 15 y 17 horas. Brevemente el proceso de faenamiento consistió en la descarga de las jaulas en forma manual, posteriormente las aves fueron sacadas de las jaulas tomándolas de las patas y fueron colgadas de ambas patas en una línea metálica, posteriormente fueron desensibilizadas con un choque eléctrico con la cabeza sumergida en agua por 5 seg., sacrificadas por corte de la vena yugular y desangradas por gravedad; fueron sumergidas en un caldero con agua caliente durante 1-2 min. y fueron desplumadas con una máquina eléctrica para finalmente pasar a un desplumado final en forma manual.

La detección de lesiones externas se realizó por observación macroscópica en la línea de faenamiento. La detección de la MPP se realizó por palpación de la parte lateral anterior de la pechuga y en los casos sospechosos se incidiendo la masa muscular pectoral para observar el músculo supracoracoides. Debido a que los pollos procesados en el Rastro no se evisceran ni se cortan se procedió a dar seguimiento a los mismos en 10 expendios de pollo fresco diferentes, solicitando la evaluación de las pechugas por los expendedores y procediendo al corte de las mismas en casos sospechosos. Se colectaron selectivamente 5 muestras de pechugas afectadas con MPP para realizar estudios de histopatología y bacteriología de los músculos afectados.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Con el Sistema Convencional de Captura la carga de las 4,800 aves con una cuadrilla de 12 cargadores se realizó en dos horas. Se estimó una incidencia de Miopatía Pectoral Profunda del 10%; de Lesiones Traumáticas en Patas del 5% y de Bursitis Traumática de la Quilla en 0.3% mientras que en Sistema Nuevo de Captura la carga de las 4,800 aves se realizó con una cuadrilla de 14 personas en dos horas con treinta minutos. No se detectaron lesiones compatibles con MPP, se observó aproximadamente un 0.05%, de Lesiones Traumáticas en Patas y un 0.31% y de Bursitis Traumática de la Quilla.

Las lesiones detectadas en los casos de MPP incluyeron edema y hemorragias entre los músculos pectorales superficial y profundo, tumefacción del músculo supracoracoides con consistencia suave y friable, color blanquecino o amarillento y aspecto

similar a carne de pescado; similar a lo descrito previamente por otros autores^{2,4,6}; microscópicamente se observó necrosis coagulativa masiva con hialinización y pérdida de estrías, sin presencia de núcleos ni infiltrado inflamatorio; el estudio bacteriológico fue negativo al aislamiento de bacterias aerobias y anaerobias.

Las Lesiones Traumáticas de las Patas consistieron primordialmente en hemorragias en la cara interna del muslo, desarticulación de la articulación coxofemoral, con desprendimiento del cartilago articular y hemorragias periarticulares, ruptura parcial o completa del tendón gastrocnémio con hemorragias en la articulación tarsal y fractura de los tarsos. Las lesiones traumáticas de la Quilla consistieron en hemorragias subcutáneas severas a nivel pectoral.

La utilización del Sistema Nuevo de Captura aparente redujo la incidencia de MPP y de LTP detectadas a nivel de rastro, aunque la proporción de BTQ fue similar, la utilización de métodos de atrapamiento de las aves que eviten el movimiento brusco de estas antes de ser enjauladas puede incrementar la calidad de las canales y reducir el número de decomisos que se observan en el Rastro, como ha sido estudiado en Brasil, en Europa y en el sureste de Asia¹.

REFERENCIAS

1. Bakker, W. La carga de pollos y su transporte a la procesadora. *Tecnología Aviecuaria en Latinoamérica* 167: 16-22. 2001.
2. Bilgili, S., J. Hess, R. Lien and K. Downs. Deep Pectoral Myopathy in broiler chickens. Abstracts XXI World Poultry Congress, Montreal, Canada. 2000.
3. Dickinson, E., J. Stephens and D. Helfer. A degenerative myopathy in turkeys. *Proc. 17th Western Poultry Dis. Conf.*, Davis, CA. pp 17. 1968.
4. Jones, M. Miopatía degenerativa en músculo pectoral de pollo. *Síntesis Acícola*, pp 34-38, abril 1989.
5. Owens, C. Situación actual y tendencias globales en el procesamiento de aves. *Tecnología Aviecuaria en Latinoamérica* 158: 3-6. 2001.
6. Ridell, C. Developmental, Metabolic, and other noninfectious Disorders., in *Diseases of Poultry*, 10th ed. B. Calnek, H. Barnes, C. Beard, L. McDougald and Y. Saif eds. Iowa State Press, Ames, Iowa, pp. 923-924. 1997.

INTERACCIÓN GENOTIPO-AMBIENTE EN UNA LINEA DE AVES PRODUCTORA DE HUEVO COMERCIAL

GENOTYPE: ENVIRONMENT INTERACTION IN A COMMERCIAL LAYER STRAIN

¹MVZ. Juan Antonio Serratos Vidrio; ²Ph.D. Benito López Baños; ³Ph.D. Ariel Ortiz Muñiz

¹Hy Line de Mexico S.A. DE C.V; Avenida Porcicultores # 50 Tepatitlán Jal.
E – Mail: jserrato@vitep.com.mx

^{2,3} Facultad de Estudios Superiores Cuahutitlan; UNAM

SUMMARY

This paper evaluates the effects of the genotype:environment interaction (IGA) in light-weight laying hens from different breeder flocks of different ages and seasons, in several farms located in Mexico's Jalisco state highlands. The genetic level of the flocks included the year of production (1, 2, 3), season (spring-summer, PV; or fall-winter, OI), and breeder age (young, J; production peak, PP; or old, V) at the end of the laying cycle, as categorization variables.

RESUMEN

El presente trabajo evalúa los efectos de la interacción genotipo - ambiente (IGA) en parvadas de gallinas ligeras procedentes de diferentes lotes de reproductoras con distintas edades y épocas estacionales en varias granjas de la zona de los Altos de Jalisco, México. Se consideró el nivel genético de las parvadas como el año de producción (1,2,3), la época estacional Primavera – Verano (PV) y Otoño – Invierno (OI), la edad de las reproductoras Jóvenes (J) aves en el pico de producción y Viejas (V), al final del ciclo de producción como variables de clasificación.

PALABRAS CLAVES: interacción genotipo - ambiente, en una línea de ponedoras ligeras.

PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

Etapas de desarrollo:

En los resultados de los desarrollos (0-18 semanas) de las pollas blancas variedad W36 en la zona de los Altos de Jalisco, México se observa que un gran número de parvadas no alcanzan los parámetros productivos señalados óptimamente en la guía de manejo respectiva, viabilidad, peso corporal. (1,2)

Etapas de producción:

En los resultados de las primeras 10 semanas de producción (20-30 semanas) de las gallinas blancas variedad W36 en la zona de los Altos de Jalisco, México se observa que un gran número de parvadas no alcanzan los parámetros productivos señalados óptimamente en la guía de manejo respectiva, número

de huevos producidos, masa total, conversión, viabilidad, peso corporal. (4,5,6,7,8,10)

MATERIAL

El material utilizado en el presente trabajo es el comportamiento productivo de las parvadas observadas durante los años 1998,1999, y 2000, de gallinas blancas Hy Line Variedad W36 procedentes de diferentes lotes de reproductoras con distintas edades y épocas estacionales en varias granjas de la zona Alta Jalisciense.

METODO

Dentro de la metodología del presente estudio, se consideró el nivel genético de las parvadas como el año de producción (1998, 1999 y 2000), la época estacional en que nacieron las pollitas Primavera – Verano (PV) y Otoño – Invierno (OI), la edad de las reproductoras (Jóvenes (J) aves en el pico de producción y Viejas (V), al final del ciclo de producción) como variables de clasificación. Y como covariables: El peso corporal de las reproductoras, peso promedio del huevo que da origen al lote de pollitas comerciales y el peso promedio de las pollitas al nacimiento. Los porcentajes de mortalidad a las 18 semanas y el porcentaje de producción de las aves comerciales en las semanas 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, se utilizaron como variables respuesta, mismas que fueron transformadas a valores Arcosenos para su análisis estadístico (9) mediante el Modelo siguiente:

$$Y_{ijkl} = \mu + G_i + C_k + I_{ij} + I_{ik} + B_1 X_1 + B_2 X_2 + B_3 X_3 + E_l$$

Donde: Y_{ijkl} es % de mortalidad a las 18 semanas de las pollas comerciales o % de producción de las semanas 20 a 28.

μ es una media general

G_i es el nivel genético de las reproductoras.

E_j es época de nacimiento de las pollitas.

C_k es la clasificación de edad de las reproductoras.

I_{ij} es la interacción genotipo- época de nacimiento.

I_{ik} es la interacción genotipo- edad de las reproductoras.

X_1 , X_2 , X_3 son, Peso corporal y Peso del huevo de las reproductoras, Peso al nacimiento de la pollita comercial respectivamente mismas que se utilizan como covariables.

B_1 , B_2 y B_3 son parámetros de ajuste del modelo.

E_1 es, el error aleatorio.

También se estimó las medias de mínimos cuadrados y el error estándar de todas las variables respuesta, utilizando la orden GLM del programa SAS (Versión 6.12).

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

El cuadro 1 muestra las medias de mínimos cuadrados para los porcentajes de mortalidad a las 18 semanas y los porcentajes de producción de huevo de las semanas 20 a 28 para las gallinas blancas línea W 36, en el podemos notar que para porcentaje de mortalidad a las 18 semanas los efectos principales por grupo genético 1, 2 y 3 fue de 2.0, 2.8 y 1.6 respectivamente, mismos que denotan diferencias estadísticas significativas entre el nivel genético 2 y 3 ($p < 0.05$). Esto puede deberse a problemas de tipo patológico durante el año de desarrollo de las parvadas del nivel genético 2 que es el que presenta mayor mortalidad, mas que a una diferencia genética entre grupos. Los porcentajes de mortalidad estimados por época otoño - invierno y primavera - verano fueron de 2.5 y 1.8 respectivamente mismos que no denotan diferencia significativa ($p > 0.1$). Esto mismo se observa en los porcentajes de mortalidad para pollas provenientes de madres jóvenes o viejas, mismas que presentaron porcentajes de mortalidad de 3.2 y 1.1 respectivamente y sin diferencia significativa ($p > 0.1$).

En este mismo cuadro podemos observar los efectos principales para el inicio de la postura a las 20 semanas de edad expresado en porcentajes, donde podemos notar que los niveles genéticos 1 y 2 inician su postura con 2.2%, mientras que el nivel 3 inicia la postura con un 11.8% diferencia que resulta ser significativa ($p < 0.05$) misma que se mantiene hasta la semana 23 donde alcanza un porcentaje de 64.5, mientras que los grupos 1 y 2 llevan un 51.2 y 48.5 respectivamente. Sin embargo de la semana 24 a la 28 no se detectaron diferencias significativas entre los

niveles genéticos alcanzando en esta última semana 89.4, 90.5 y 89.5 % para los grupos genéticos 1, 2 y 3 respectivamente. Respecto al efecto principal de la época de inicio de la producción de las aves comerciales podemos notar en este mismo cuadro que el comportamiento de la producción es parecido al comportamiento de los grupos genéticos ya que las aves que inician postura en otoño - invierno tienen 1.6 mientras que las de primavera - verano tienen 9.1%

Diferencia significativa ($p < 0.05$). Y mantienen esta diferencia hasta la semana 23 donde las parvadas de OI alcanzan 43.9 y las de PV 65.6% . A partir de la semana 24 a la 28 no se detectan diferencias significativas ($p > 0.1$) alcanzando en esta última semana 89.0 y 90.6 % respectivamente. Sin embargo no se detectaron diferencias significativas entre aves provenientes de madres jóvenes y viejas, quienes inician la postura con 4.1 y 6.7 % y alcanzan a las 28 semanas 90.8 y 88.9 % respectivamente.

En el cuadro 2 se muestran los porcentajes de mortalidad expresados en medias de mínimos cuadrados que denotan los efectos de IGA entre nivel genético y época, en este podemos observar que de los 6 arreglos formados, el arreglo 2, 5 y 6 denotan diferencias significativamente menores a los arreglos 1, 3 y 4, con porcentajes de mortalidad de 1.2, 1.6 y 1.7 contra 2.8, 3 y 2.5 respectivamente, representado el arreglo 2, por el nivel genético 1 y época PV, el arreglo 5 por el nivel genético 3 y época OI, el arreglo 6 por el nivel genético 3 y época PV. El significado no solamente biológico sino también económico de la diferencia encontrada de un punto porcentual puede representar la rentabilidad de la empresa.

De lo anteriormente descrito podemos inferir que el arreglo formado entre el grupo genético 3 y la condición de viejas, tienden a romper postura con promedios más altos en las primeras 4 semanas de producción, pero que a partir de la quinta semana ya no se observan diferencias significativas entre estos 6 arreglos. Esto plantea la necesidad de evaluar como impacta los efectos de IGA en el ciclo completo de postura y masa de huevo, de tal manera que se puedan elegir aquellas parvadas que tengan un mejor comportamiento productivo en ambientes determinados.

Cuadro 1. Medias de mínimos cuadrados para porcentajes de mortalidad y producción de huevo para las semanas 20 a 28 en gallinas de postura Hy-Line.

	Nivel Genético			Epoca		Edad	
	1	2	3	OI	PV	Jóvenes	Viejas
Mort. 18 Semanas	2.0 ^a	2.8 ^{ab}	1.6 ^{ac}	2.5 ^a	1.8 ^a	3.2 ^a	1.1 ^a
Prod. 20 Semanas	2.2 ^a	2.2 ^a	11.8 ^b	1.6 ^a	9.1 ^b	4.1 ^a	6.7 ^a
Prod. 21 Semanas	9.4 ^a	9.9 ^a	26.8 ^b	6.2 ^a	24.5 ^b	9.4 ^a	21.3 ^a
Prod. 22 Semanas	26.3 ^a	25.9 ^a	46.4 ^b	19.3 ^a	46.5 ^b	8.0 ^a	57.8 ^a
Prod. 23 Semanas	51.2 ^a	48.5 ^a	64.5 ^b	43.9 ^a	65.6 ^b	1.0 ^a	100.0 ^a
Prod. 24 Semanas	71.8 ^a	67.8 ^a	78.8 ^a	67.5 ^a	78.1 ^a	20.6 ^a	100.0 ^a
Prod. 25 Semanas	80.7 ^a	80.0 ^a	79.0 ^a	75.7 ^a	84.1 ^a	57.7 ^a	100.0 ^a
Prod. 26 Semanas	86.4 ^a	86.7 ^a	85.1 ^a	82.6 ^a	89.5 ^a	61.7 ^a	100.0 ^a
Prod. 27 Semanas	88.8 ^a	90.4 ^a	89.7 ^a	87.7 ^a	91.6 ^a	63.6 ^a	100.0 ^a
Prod. 28 Semanas	89.4 ^a	90.5 ^a	89.5 ^a	89.0 ^a	90.6 ^a	90.8 ^a	88.9 ^a

Nota. Letras diferentes entre grupos de clasificación denotan diferencia significativa ($p < 0.05$)

Cuadro 2. Porcentaje de mortalidad a las 18 semanas expresada en medias de mínimos cuadrados que denota efectos de interacción genotipo- época en gallinas de postura Hy-Line.

Nivel Genético	Epoca		Edad	
	OI	PV	Jóvenes	Viejas
1	2.8 ^a	1.2 ^{bc}	3.0 ^a	1.0 ^a
2	3.0 ^a	2.5 ^a	3.9 ^a	1.7 ^a
3	1.6 ^{ac}	1.7 ^{bc}	2.7 ^a	0.6 ^a

Nota. Letras diferentes entre grupos de clasificación denotan diferencia significativa ($p < 0.05$)

CONCLUSIÓN

Se denotan los efectos de IGA entre nivel genético y época, para mortalidad a las 18 semanas de edad, así como, para el inicio de la postura. También se detecta efectos de IGA entre nivel genético y edad de las reproductoras en lo referente a porcentaje de postura de la semana 20 a 23 ($p < 0.05$).

REFERENCIAS

- Gutierrez Millán, L.E, et al. 1991 Interacción del genotipo-ambiente en las características productivas de tres líneas de pollo de engorda comercial. *Técnica Pecuaria en México*. 27: 3, 137-145.
- Hy Line, 1999. Guía de Manejo para Ponedoras Hy Line Variedad W36 Hy Line International Des Moines E.U.A.
- López B. B., 1999. Evaluación de la Producción Láctea de un Rebaño Caprino Considerando los Efectos de Interacción Genotipo Ambiente. Tesis Doctoral, FMVZ, Universidad de Colima.
- Ludrovsky, F., et al. 1986. Genotype and environment interaction in broiler production of

commercial and naked line. 7th European Poultry Conference, Paris, Volume 1, 196-199.

5. North, M. O., y D. D. Bell, 1993. Manual de Producción Avícola. Tercera Edición. Editorial El Manual Moderno. México.

6. Oakes, M.W. 1967. The effect of different levels of management on the assessment of differences between variety of chickens. *Anim. Prod.* 9: 121.

7. Quintana L., J. A., 1999. Avitécnia. Manejo de las aves domésticas más comunes.

8. Editorial Trillas. México. 384 p.

9. Rauen, H.W., et al. 1986. Significance of the genes for reduced feathering and naked neck (NA) in relation to the ability of laying hens to adapt to the stress of permanently high temperatures. *Archv fur Geflugelkunde*. 50(6): 235-245

10. SAS. 1993. SAS/SAT. Guide for personal Computers. Version 6.3. Edition SAS Institute, North Carolina, USA.

11. Sergeev, V.A. and Sobolev, E.A. 1989. Genotype-environment interaction for abdominal fat deposition in broilers. CAB: Animal Breeding Abstracts.

REDUCCIÓN DE LA INTOXICACIÓN ALIMENTARIA CON AFLATOXINA B₁ EN POLLO DE ENGORDA MEDIANTE N-ACETILCISTEÍNA

DECREASED DIETARY AFLATOXIN B₁ (AFB₁) TOXICITY USING N-ACETYL-CYSTEINE (NAC) IN BROILERS

A. G. Valdivia,¹ A. Martínez,¹ F. J. Damián,¹ T. Quezada,¹ R. Ortiz,¹ y J. L. Reyes²

¹ Centro de Ciencias Agropecuarias, A. P. No. 3, Jesús María, Aguascalientes, 20900, avaldiv@correo.uaa.mx; y ² Departamento de Fisiología y Biofísica, Centro de Investigación y Estudios Avanzados - Instituto Politécnico Nacional, A. P. No. 14-740, D. F. 07000, México.

SUMMARY

Four 30-broiler groups were used to evaluate the ability of NAC to reduce the toxicity effects of AFB₁ in the feed. Birds were divided into the following treatment groups: A) Control; B) Purified AFB₁ (3 mg/kg feed) for 21 days; C) NAC (800 mg/kg body weight daily); and D) AFB₁ + NAC at the same concentrations used in groups B and D. AFB₁ + NAC-treated animals showed to be partially protected against AFB₁ effects on performance, liver, and kidney damage, as well as against biochemical alterations.

RESUMEN

Con el propósito de evaluar la capacidad de la N-acetilcisteína (NAC) para disminuir los efectos de la intoxicación alimentaria por aflatoxina B₁ (AFB₁), se sometieron cuatro grupos de 30 pollos de engorda a los tratamientos dietéticos siguientes: A) control; B) AFB₁ purificada (3 mg/kg de alimento) durante 21 días; C) NAC (800 mg/kg peso corporal, diariamente); D) AFB₁ más NAC a las mismas dosis que los grupos B y C. Los animales tratados con AFB₁ más NAC mostraron estar protegidos parcialmente contra los efectos de la toxina sobre el rendimiento, daños hepáticos y renales así como con las alteraciones bioquímicas.

INTRODUCCIÓN

La N-acetilcisteína (NAC) es una variante acetilada del aminoácido L-cisteína que ha sido ampliamente prescrita en humanos y utilizada en otros mamíferos como un antídoto contra varios tóxicos así como también contra algunos agentes carcinogénicos, entre los que se incluye la aflatoxina B₁ (AFB₁). NAC es una fuente excelente de grupos sulfhidrilos, es capaz de estimular la síntesis de glutatión reducido (GSH), bloquear la activación de AFB₁, promover la detoxificación y actuar directamente como un atrapador de radicales libres^(3, 6).

La AFB₁ es la micotoxina natural más potente, es extremadamente tóxica y carcinogénica por lo que

representa un riesgo serio para la salud de las poblaciones humanas^(7, 13). Adicionalmente, la AFB₁ provoca severas alteraciones sanitarias y productivas en los pollos a partir de cantidades mínimas en el alimento (10 µg / kg)^(11, 12). Se ha demostrado que hasta un nivel variable, la AFB₁ se inactiva mediante su conjugación con GSH, un tripéptido hepático que actúa mediado por la actividad de un grupo de enzimas denominado glutatión S-transferasa (GST) y que finalmente se excreta como un complejo formado por NAC ligada a AFB₁^(1, 10, 18).

Por lo que pudiera suponerse que el nivel fisiológico de protección pudiera mejorarse aportando precursores de GSH, sobre todo en las aves que lo utilizan extensamente para la formación muscular y del plumaje. El propósito de este estudio fue evaluar la capacidad de NAC para disminuir los efectos de la intoxicación ocasionada por la ingestión de AFB₁ en pollos de engorda.

MATERIALES Y MÉTODOS

Con un diseño completamente al azar y utilizando los procedimientos descritos^(9, 17), se formaron cuatro grupos de 30 pollos cada uno, sexo macho, Hubbard, de un día de edad y se les suministraron, dentro de una dieta estándar sin contaminación aparente de micotoxinas, los tratamientos siguientes: A) grupo control; B) AFB₁ purificada (3 mg/kg de alimento) durante 21 d; C) NAC (800 mg/kg P. C., diariamente); D) AFB₁ más NAC a las mismas dosis que los grupos B y C.

Las aves fueron alojadas en jaulas y el peso corporal y la ingestión de alimento fue registrada diariamente. En el día 21 de edad, se obtuvieron muestras sanguíneas, hepáticas y renales y se estimaron actividades enzimáticas específicas de alanina aminotransferasa, aspartato aminotransferasa y GST; se calculó la concentración hepática de GSH y de proteínas totales en plasma e hígado y también se realizaron cortes histológicos de hígado y riñón con la tinción del ácido peryódico de Schiff.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

En nuestro estudio se observó el efecto negativo de la ingestión de AFB₁ sobre el rendimiento de los pollos y sobre la alteración de parámetros bioquímicos y presencia de alteraciones patológicas en hígado y riñón, por lo cual estos resultados coinciden con reportes previos^(2, 8, 15).

Los cambios inducidos por la AFB₁ fueron estadísticamente significativos al compararlos contra los pollos que consumieron la dieta control. Cuando los pollos consumieron una dieta contaminada con AFB₁ pero adicionada con NAC se apreciaron diferencias estadísticamente significativas contra el grupo que solamente consumió esta micotoxina, alcanzando a protegerse del efecto negativo en las proporciones siguientes: Peso corporal (57.8 %), ganancia diaria de peso corporal (49.1 %), índice de conversión alimenticia (21.4 %), concentración de proteínas totales en plasma e hígado (45.2, 66.7 %), actividad de alanina aminotransferasa en plasma (67.4 %), glutatión-S-transferasa hepática (18.8 %) y concentración de glutatión reducido en hígado (75.0 %).

Además, el grupo AFB₁ + NAC mostró menores cambios morfológicos en la decoloración hepática, textura friable, esteatosis microvesicular e inflamación de la membrana basal del glomérulo.

Los pollos que consumieron la dieta adicionada solamente con NAC no presentaron alteraciones del consumo de alimento, incremento de peso y conversión alimenticia, ni tampoco se alteraron los parámetros químicos sanguíneos y hepáticos ni tampoco indujo cambios morfológicos en hígado y riñón.

Este estudio se muestra que la administración de NAC en la dieta disminuye significativamente los efectos negativos provocados por el consumo de AFB₁ sobre la ganancia de peso corporal, conversión alimenticia, GSH hepático proteínas en plasma e hígado además de que disminuye la severidad de las lesiones histológicas inducidas por esta micotoxina.

Se puede considerar que NAC es inocuo para el consumidor final, ya que se metaboliza rápidamente en los pollos para formar cisteína y GSH y los residuos del compuesto íntegro desaparecen en cuestión de horas de los tejidos; en los humanos se utiliza en dosis diarias tan altas como 500 mg/kg de peso corporal^(5, 14).

Otros estudios^(2, 4, 16) han mostrado que otras sustancias como los aluminosilicatos y los aminoácidos azufrados de la dieta son, al igual que NAC, agentes quimioprotectores capaces de disminuir los efectos tóxicos de las micotoxinas, los cuales pudieran ser utilizados conjuntamente para evitar la absorción de las toxinas y elevar el nivel de resistencia de las aves, además de complementarse con el empleo de estrategias que eviten la contaminación de los

alimentos o que permitan su descontaminación o remediación.

REFERENCIAS

1. Adav, S. S., and S. P. Govindwar. Effects of aflatoxin B₁ on liver microsomal enzymes in different strains of chickens. *Comp. Biochem. Physiol.* 118C:185-189. 1997.
2. Bailey, R. H., L. F. Kubena, R. B. Harvey, S. A. Buckley, and G. E. Rottinghaus. Efficacy of various inorganic sorbents to reduce the toxicity of aflatoxin and T-2 toxin in broiler chickens. *Poult Sci.* 77:1623-1630. 1998.
3. Banner, W., M. Koch, S. B. Hopf, D. M. Capin, S. Chang, and T. G. Tong. Experimental chelation therapy in chromium, lead and boron intoxication with N-acetylcysteine and other compounds. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 83:142-147. 1986.
4. Beers, K. W., H. Nejad, and W. G. Bottje. Aflatoxin and glutathione in domestic fowl (*Gallus domesticus*) I. Glutathione elevation and attenuation by high dietary methionine. *Comp. Biochem. Physiol.* 101:239-44. 1992.
5. De Caro L., A. Ghizzi, R. Costa, A. Longo, G. P. Ventresca, and E. Lodola. Pharmacokinetics and bioavailability of oral acetylcysteine in healthy volunteers. *Arzneim-Forsch/Drug Res.* 39:382-386. 1989.
6. De Flora, S., C. Bennicelli, A. Camoirano, D. Serra, M. Romano, G. A. Rossi, A. Morelli, and A. De Flora. In vivo effects of N-acetylcysteine on glutathione metabolism and on the biotransformation of carcinogenic and/or mutagenic compounds. *Carcinogenesis*, 6:1735-45, 1985.
7. Eaton, D. L., and E. P. Gallagher. Mechanism of aflatoxin carcinogenesis. *Ann. Rev. Pharmacol. Toxicol.* 34:135-172. 1994.
8. Espada, Y, M. Domingo, J. Gómez, and M. A. Calvo. Pathological lesions following an experimental intoxication with aflatoxin B₁ in broiler chickens. *Res. Vet. Sci.* 53:275-279. 1992.
9. Federation of Animal Science Societies. Guideline for poultry husbandry. In: Guide for the care and use of agricultural animals in agricultural research and teaching. Savoy IL, USA. pp 55-66. 1999.
10. Gawai, K. R., J. K. Vodela, P. S. Dalvi, and R. R. Dalvi. Comparative assessment of the effect of aflatoxin B₁ on hepatic dysfunction in some mammalian and avian species. *Comp. Biochem. Physiol.* 101C:415-418. 1992.
11. Giambrone, J. J., U. L. Diener, N. D. Davis, V. S. Panangala, and F. J. Hoerr. Effects of purified aflatoxin on broiler chickens. *Poult Sci.* 64:852-858. 1985.

12. Hamilton, P. B. Determining safe levels of mycotoxins. *J. Food Prot.* 47:570-575, 1984.
13. International Agency for Research on Cancer, World Health Organization. Aflatoxins. In: Some Naturally Occurring Substances: Food Items and Constituents, Heterocyclic Aromatic Amines and Mycotoxins. IARC Monographs on the Evaluation of Carcinogenic Risk to Humans 56, Lyon, France, pp 245-395. 1993.
14. Kelly, G. S. Clinical applications of N-acetylcysteine. *Alternative Medicine Review* 3:114-127. 1998.
15. Mollenhauer, H. H., D. E. Corrier, W. E. Huff, L. F. Kubena, R. B. Harvey, and R. E. Droleskey. Ultrastructure of hepatic and renal lesions in chickens fed aflatoxin. *Am. J. Vet. Res.* 50:771-777. 1989.
16. Richardson, K. E., L. A. Nelson, and P. B. Hamilton. Interaction of dietary protein level on dose response relationships during aflatoxicosis in young chickens. *Poultry Sci.* 66:969-976. 1987.
17. Valdivia, A. G., A. Martínez, F. J. Damián, T. Quezada, R. Ortiz, C. Martínez, J. Llamas, M. L. Rodríguez, L. Yamamoto, F. Jaramillo, M. G. Loarca-Piña, and J. L. Reyes Efficacy of N-acetylcysteine to reduce the effects of aflatoxin B₁ intoxication in broiler chickens, *Poultry Sci.* 80:727-734. 2000.
18. Wang, S, W. G. Bottje, D. Cawthon, C. Evenson, K. Beers, and R. McNew. Hepatic export of glutathione and uptake of constituent amino acids, glutamate and cysteine, in broilers in vivo. *Poultry Sci.* 77:1556-1564. 1998.

EVALUACIÓN *IN VIVO* DE LA CAPACIDAD INHIBITORIA DE LAS MICOTOXICOSIS EN AVES ALIMENTADAS CON DIETAS CONTAMINADAS CON AFLATOXINAS, OCHRATOXINA A Y TOXINA T-2 CON LA ADICIÓN DE LEVADURAS *SACCHAROMYCES CEREVEISIAE* Y CON MANANGLUCANOLIGOSACARIDOS (SAFMANNAN^{MR})

***IN VITRO* EVALUATION OF THE MYCOTIXICOSIS INHIBITORY ACTIVITY OF THE ADDITION OF *SACCHAROMYCES CEREVEISIAE* YEAST AND MANNAN OLIGOSACCHARIDES (SAFMANNANTM) IN BIRDS FED AFLATOXIN-, OCHRATOXIN A-, AND T-2 TOXIN- CONTAMINATED FEEDS**

René Márquez Márquez.^{1*}, Enrique Vera Gutiérrez¹ y Dante González Salazar²

¹Laboratorio. de Micotoxinas y ²Laboratorio de Diagnostico del Cenid-Microbiología, INIFAP, SAGARPA. Carretera México-Toluca, Km. 15.5, Cuajimalpa, D.F. C.P. 05110

SUMMARY

Sixty chickens were divided into 4 15-bird groups. One treatment per group was given: Negative Controls, no mycotoxins; positive controls, a diet containing 282 µg/kg aflatoxin, 290 µg/kg ochratoxin A, and 6,300 µg/kg T-2 toxin; yeast group, 2 g/kg + mycotoxins, and; Safmannan group, 1 g/kg + mycotoxins. The experiment lasted for 4 weeks. Weight gains were: negative controls 592 g (100%), positive controls 314 g (57%); yeast group 533 g (90%), and; Safmannan group 599 g (101%). Severe liver, intestine, proventriculus, thymus, bursa, tongue, and oral mucosa lesions were observed in the positive controls. In the yeast and the Safmannan groups milder lesions were observed. Severe hipoplasia in the lymphoid organs and low Newcastle disease antibody titers were observed in the positive controls. This effect was lower in both the yeast and the Safmannan groups.

RESÚMEN

Se utilizaron 60 pollos en 4 tratamientos: Control, Testigo Positivo dieta con 282µg/Kg Aflatoxinas, 290 µg/Kg Ochratoxina-A y 6,300 µg/Kg T-2, Levaduras 2g/Kg + micotoxinas, Safmannan 1g/Kg + micotoxinas, 15 aves por tratamiento, durante 4 semanas. Las ganancias de peso fueron: 592g Control (100%), Testigo Positivo 314g (57%), con Levaduras 533g (90%) y con Safmannan 599g (101%). Hubo severas lesiones en hígado, intestinos, proventrículo, timo, bursa, lengua y mucosa oral en los Testigos positivos, con la adición de Levaduras o Safmannan el grado de lesiones disminuyó. Los órganos linfoides en el Testigo Positivo presentaron una severa hipoplasia, con bajos títulos de anticuerpos contra Newcastle. Este efecto fue menor en las aves de los tratamientos con Levaduras y Safmannan.

Se realizó un diseño factorial 4 X 5 X 3 donde los factores fueron: 4 Tratamientos, 5 aves por tratamiento y 3 repeticiones. Se utilizaron pollos de la estirpe Ross de un día de edad, se alojaron en una criadora Petersime con control eléctrico de temperatura y se alimentaron con una dieta comercial de iniciación y agua potable a libre acceso, durante una semana. Las aves se alimentaron durante 4 semanas con una dieta libre de micotoxinas para el Tratamiento 1, para el Tratamiento 2 con una dieta contaminada experimentalmente: 282µg/Kg Aflatoxinas, 290 µg/Kg Ocratoxina-A y 6,300 µg/Kg T-2, para el Tratamiento 3 se utilizó la mezcla de micotoxinas +l Levaduras 2g/Kg y para el Tratamiento 4 la mezcla de micotoxinas + Safmannan 1g/Kg . Se evaluó la ganancia de peso semanal, títulos de anticuerpos contra la Enfermedad del Newcastle (EN) y se realizó la necropsia de los animales para su estudio histopatológico.

Los efectos de la toxicidad acumulativa de las micotoxinas, se observó a partir de la 2ª semana de alimentación de las aves con la dietas contaminadas y sin la adición de levaduras o mananglucanos, a partir de ese período presentaron una ganancia de peso significativamente menor al resto de los tratamientos, aparecieron las primeras lesiones ulcerativas en paladar y la necrosis en la base de la lengua en la mayoría de las aves de dicho grupo. Los resultados de la ganancia de peso, indican que los niveles de contaminación de micotoxinas utilizados ocasionaron una disminución de más del 40% en los animales del tratamiento testigo positivo, mientras que al adicionar a las dietas contaminadas una dosis de 2g/Kg de Levaduras las aves obtuvieron una ganancia de peso final del 90.2% respecto la ganancia del control

negativo y del 101% con la adición de Safmannan, lo que representa un efecto importante de protección a la micotoxicosis. La necropsia de las aves reveló que a pesar de que el peso corporal de los animales con dietas conteniendo levaduras o glucanmananos era similar al grupo control negativo, se presentaron algunas lesiones ulcerosas en el paladar, zonas de necrosis en la lengua, úlceras en proventrículo, riñones congestionados e hígados grasos, lesiones que variaban ampliamente entre los grupos e incluso entre las aves del mismo grupo. El análisis microscópico de los tejidos confirmó que las lesiones más severas se obtuvieron en las aves que consumieron la dieta contaminada y sin secuestrante de micotoxinas, mientras que en el grupo control negativo prácticamente no se presentaron alteraciones histopatológicas, y en las aves del tratamiento con levaduras se observaron lesiones en diversos tejidos que se clasificaron como moderadas, es importante señalar que la magnitud de las lesiones disminuyeron considerablemente con la adición de mananglucanos a las dietas contaminadas. Los órganos linfoides que se analizaron microscópicamente (Timo y bursa de Fabricio) presentaron una severa depleción en las aves del tratamiento testigo positivo, aunado a que presentaron los títulos más bajos de anticuerpos contra la Enfermedad del Newcastle, lo que significa una inmunodepresión tanto celular como humoral. Este efecto se vio significativamente disminuido en las aves de los tratamientos adicionados con levaduras y mananglucanos, presentando el mejor efecto inhibitorio de la inmunosupresión por micotoxicosis en las aves que se les adicionó a la dieta 1.0 g/Kg de Mananglucanos (Safmannan).

Tratamientos	Semana 0		Semana 1		Semana 2		Semana 3		Ganancia Total
	X	± D.E.	X	± D.E.	X	± D.E.	X	± D.E.	
1 Control (-)	139.28 ^a	10.81	322.66 ^a	29.8	499.2 ^a	52.70	731.06 ^a	65.03	591.78 ^a
2 Testigo (+)	151.70 ^a	13.15	315.03 ^a	38.82	385.17 ^b	63.86	492.29 ^b	97.06	340.59 ^b
3 Levaduras	149.50 ^a	16.24	311.57 ^a	36.42	446.80 ^{a,c}	61.24	683.25 ^a	95.75	533.75 ^c
4 Safmannan	145.42 ^a	14.87	300.23 ^a	47.94	509.00 ^a	76.61	745.00 ^a	100.70	599.58 ^a

Líterales diferentes en las columnas indican significancia estadística entre los Tratamientos (p<0.05) ANDEVA.

REFERENCIAS

1. Brake J., P.B. Hamilton, and R.S. Kittrell. Effects of the Trichotheecene Mycotoxin Diacetoxyscirpenol on Feed Consumption, Body Weight, and Oral Lesions of Broiler Breeders. Poultry Science 79:856-863. 2000
2. Chorvatoricová D., Machova E., Sandula J., Kogan G. Protective effect of the Yeast glucomannan against cyclophosphamide-induced mutagenicity. Mut. Res. 444:117-122. 1999.

3. Ma. Y., Vemura K., Oka S., Kezutsumi Y., Kawasaki T. Antitumor activity of mannan-binding protein in vivo as related by a virus expression system: mannan-binding protein dependent cell-mediated cytotoxicity. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 96: 371-375. 1999
4. Osborne D., Huff W., Hamilton P., Burtmeister H. Comparison of ochratoxin aflatoxin and T-2 toxin for their effects on selected parameters related to digestion and evidence for specific

metabolism of carotenoides in chickens. *Poult. Sci.* 61:1646-1652. 1982

5. Stanley V., Ojo R., Woldesenbet S., Huitchinson D. The use of *Saccharomyces cerevisiae* to suppress the effects of aflatoxicosis in broiler chicks. *Poult. Sci.* 72:1867-1872. 1993

6. Wagnerova J., Liskova A., Navarova J., Kristofova A., Trnovec T., Ferencik M. The effect of two glucan carboxymethyl derivatives with various substitution degrees on cyclophosphamide immunosuppression in mice. *Immunopharmacol. Immunotoxicol.* 15:227-242. 1993.

EFFECTO DE OCHRATOXINA A, UREA Y AMPROLIO SOBRE LA PIGMENTACIÓN EN POLLO DE ENGORDA

EFFECT OF OCHRATOXIN A (OA), UREA, AND AMPROLIUM ON SKIN PIGMENTATION IN BROILERS

García MAR¹, Petrone GV², Juárez RM²

¹Ceiepa, FMVZ-UNAM; ²DPA:Aves, FMVZ-UNAM

SUMMARY

The effect of OA, urea, and amprolium on the absorption and deposition of synthetic carotenoid pigment in 4-7-week-old broilers was studied. Measurements were performed in plasma, intestine (3 portions), and feces. Skin pigmentation was also measured. Birds with OA showed pale skins, and reduced carotenoid plasma/intestine (all three sections) concentrations. No difference was observed in skin pigmentation of the birds treated with amprolium or urea when compared with the controls; even though carotenoid plasma level differences were observed. According with the results, the poor skin pigmentation of OA-treated birds does not seem to be related with pigment density in the intestine.

RESUMEN

Se estudió el efecto de ocratoxina A (OA), urea y amprolio sobre la absorción y deposición de pigmento carotenóide sintético en aves de 4 a 7 semanas. Las mediciones se hicieron en plasma, tres porciones de intestino y heces, además de la pigmentación cutánea. Con OA, las aves mostraron palidez en piel, y reducción de carotenoides en plasma e intestino en sus tres porciones. No se observó diferencia en la pigmentación cutánea de las aves tratadas con amprolio y urea respecto al testigo, aunque sí en los carotenoides plasmáticos respecto al testigo. Por los resultados, la mala pigmentación en las aves tratadas con OA no parece tener relación con la reducción de la densidad del contenido intestinal.

INTRODUCCIÓN

La pigmentación amarillo-naranja del pollo de engorda ha sido considerada como una característica comercial deseable, y es, de alguna manera, indicador del estado de salud en que el pollo fue criado, dado que

un pollo mal pigmentado en la mayoría de los casos tuvo algún padecimiento que alteró la absorción y deposición del pigmento. Entre los diversos factores que provocan mala pigmentación del pollo, se encuentra la ocratoxina A (OA), que produce disminución del crecimiento, inmunosupresión y una reducción en la concentración de pigmentos carotenoides en plasma. En algunas observaciones de campo se ha mencionado la posibilidad de una asociación entre mala pigmentación y exceso de humedad en las heces, como durante ocratoxicosis o por inclusión de urea en dietas como fuente de nitrógeno no proteico. Se ha informado que los anticoccidianos mejoran la pigmentación por un mecanismo indirecto. Sin embargo, observaciones de campo mencionan la posible asociación entre el uso de amprolio por tiempos prolongados y mala pigmentación, sin que se hayan corroborado éstas observaciones. Por éste motivo, el objetivo de éste trabajo fue el estudiar los efectos de OA y urea, conocidos por producir diuresis, y un anticoccidiano sobre la absorción y deposición del pigmento en pollos de engorda de 4 semanas.

MATERIAL Y MÉTODOS

Se utilizaron 76 aves Ross x Ross de 4 semanas de edad, alimentados con dietas a base sorgo-soya con 45 ppm de pigmento sintético (Lucantín amarillo). Las aves fueron aleatoriamente asignadas a cada uno de cuatro tratamientos: T1: testigo; T2 igual que T1 con 60 ppm de amprolio en el agua de bebida; T3: igual que T1 + 1.5 ppm de OA en el alimento; T4: igual que T1 + 5 % urea en el alimento. Cada tratamiento incluyó 3 réplicas de 6 pollos. La pigmentación cutánea fue medida a los 28, 38 y 48 días de edad en todas las aves, mediante el colorímetro de reflectancia MINOLTA (CIELab System). Se realizaron 3 muestreos de

acuerdo con el siguiente calendario: 29 días toma basal de 4 aves por tratamiento; 39 y 49 días: 7 aves por tratamiento. Las aves fueron alimentadas después de un ayuno de 12 h, las muestras de sangre e intestino se tomaron 90 minutos después de haber recibido alimento. En cada toma se midió pigmento plasmático y en tres diferentes secciones de intestino: hacia el final del asa duodenal, yeyuno anterior y posterior al divertículo de Meckel, además de heces. Estas mediciones se realizaron en un espectrofotómetro con longitud de onda de 480 nm. Mediante una curva patrón de carotenoides, los resultados fueron transformados a μg de carotenoides/g de muestra. Por otro lado, la humedad de las heces fue medida según la metodología descrita en el análisis proximal.

RESULTADOS

Se encontró una reducción significativa en los valores de amarillamiento en piel en las aves tratadas con OA, visible desde el día 38, y se mantuvo hasta el final del estudio ($1.49 \pm .28$). No se observó diferencia entre las aves tratadas con amprolio ($11.72 \pm .96$) y urea ($11.55 \pm .82$) respecto al testigo (13.88 ± 1.52) al final del estudio. En plasma se encontró diferencia estadística entre las aves tratadas con amprolio y urea ($.245 \pm .01$ y $.268 \pm .025$) y el testigo, en las aves tratadas con OA ($.0213 \pm .005$) respecto al resto de los grupos. En las aves tratadas con OA, se observó una menor concentración de carotenoides en los tres segmentos de intestino. En aves tratadas con urea, la concentración de carotenoides fue menor en duodeno a los 49 días, pero se mantuvo sin diferencias en los otros segmentos, tanto a los 39 como a los 49 días. No se encontró diferencia en las aves que recibieron amprolio respecto al testigo. En heces, no se observó una diferencia en el valor de carotenoides en alguno de los tratamientos a los 38 días, aunque si se observó diferencia a los 49 días, en que la menor concentración se encontró en las aves del grupo testigo. La humedad de las heces en los tratamientos 3 y 4 (81.18 ± 1.82 y $84.56 \pm .86$) fue significativamente mayor que en el grupo testigo (76.22 ± 1.83).

DISCUSIÓN

La reducción en los carotenoides en los tres niveles intestinales en aves alimentadas con OA muestra que éstos no fueron absorbidos, lo cual se corrobora cuando se observan los carotenoides del plasma. La mayor cantidad de carotenoides en éstas aves se encontró en las heces, y esto finalmente repercutió en la pigmentación cutánea. El efecto observado podría explicarse por una probable presentación de varios factores como: consumo de alimento reducido, incremento de líquidos en intestino por flujo de orina hacia el intestino en aves con diuresis, por lo cual observamos heces más húmedas, o

una disminución de la capacidad de los enterocitos de captar el pigmento para poder absorberlo posteriormente. La reducción de la densidad del contenido intestinal por incremento de líquidos en intestino es un factor que podría alterar la absorción del pigmento, como se ha discutido en otros informes, dado que el pigmento se absorbe por difusión pasiva. En aves alimentadas con urea se observó una reducción en los carotenoides del plasma a los 38 días, lo cual es consistente con el incremento en la humedad de las heces. Es conocido que la urea incrementa el consumo y excreción de agua, la cual es eliminada en la orina. Se ha mencionado que la orina tiene un flujo normal de la cloaca hacia el recto, los ciegos, e inclusive intestino delgado. Si esto ocurre, el contenido del intestino se hace menos denso, lo cual tendría un efecto sobre la absorción del pigmento. Este efecto probablemente afectó la absorción del pigmento, y en plasma se observó una reducción de la concentración de carotenoides en plasma. Sin embargo, no se afectó la pigmentación cutánea. Probablemente, la reducción en los carotenoides del plasma no fue lo suficientemente significativa para afectar negativamente la pigmentación en piel.

Aunque en el plasma de las aves tratadas con amprolio se observó disminuida la concentración de carotenoides a los 10 días del inicio de su uso (día 38), no se encontró que la pigmentación en piel fuera diferente respecto al testigo. Se ha mencionado que el amprolio, como lo hacen la mayoría de los coccidiostatos, mejora la pigmentación cutánea del pollo por una reducción en la población de coccidias intestinales. Sin embargo, no se observó tal efecto en éste estudio, en el que las aves estuvieron libres de coccidias.

Por lo tanto, de los factores aquí probados, sólo OA afectó significativamente la pigmentación. Urea afectó la concentración de carotenoides en plasma, pero a un nivel que no repercutió negativamente en la pigmentación de piel, mientras amprolio no afectó la pigmentación.

REFERENCIAS

1. Schaeffer JL, Tyczkowski JK, and Hamilton P. Alterations in carotenoid metabolism during ochratoxicosis in young broiler chickens. *Pou. Sci* 1987;66:318-324
2. Osborne DJ, Huff WE, Hamilton PB, and Burmeister HR. Comparison of ochratoxin, aflatoxin and T-2 toxin for their effects on selected parameters related to digestion and evidence for specific metabolism of carotenoids in chickens. *Pou. Sci.* 1982;61:1646-1652.
3. Petrone VM, Juárez RM, Tejeda R y García A. Hallazgos macroscópicos e histológicos gastrointestinales en pollos con mala pigmentación

intoxicados con ocratoxina A. Memorias del X aniversario de la Sociedad Mexicana de Patólogos veterinarios: 2001 junio 14-17; Puerto Vallarta (Jalisco) México. México (DF): Sociedad Mexicana de Patólogos Veterinarios, AC, 2001.

4. Tyczkowski JK and Hamilton P. Altered metabolism of carotenoids during pale bird syndrome in chickens infected with *Eimeria acervulina*. Pou. Sci 1991;70:2074-2081.

METODOLOGÍA PARA EVALUAR EXCRETAS DE POLLO

METHODOLOGY FOR FECAL EVALUATION

Carlos López Coello¹, José Arce Menocal² y Ernesto Avila González³

¹Departamento de Producción Animal:Aves, FMVZ, UNAM. México 04510, D.F. coelloca@servidor.unam.mx.

²INIFAP, Morelia, Michoacán, México, ³ FMVZ, UNAM.

SUMMARY

The evaluation of scouring conditions in broilers are typically done in a subjective manner. This limits result interpretation. Given the need for more reliable quantitative and qualitative information, an in-house sampling methodology was developed as a diagnostic tool. This methodology takes into account the different sampling points in different areas within the house, and the identification of feces types. Results are then interpreted.

RESUMEN

La evaluación de los cuadros diarreicos en pollos de engorda, generalmente se realizan de una manera subjetiva que limitan su interpretación, así como el transcurso de los mismos, ante la necesidad de contar con información cualitativa y cuantitativa mas confiable, se desarrollo una metodología de muestreo en la caseta como una herramienta de diagnóstico, considerando los puntos de muestreo en las diferentes zonas de la caseta, identificando el tipo de excretas y realizando una interpretación de los resultados obtenidos.

INTRODUCCIÓN

Hoy en día las afecciones del sistema digestivo son cada vez mas frecuentes a pesar de las avances en las técnicas analíticas para el control de calidad de las materias primas, la inclusión de sequestrantes de micotoxinas así como de los procesos de fabricación de alimentos balanceados con ingredientes de alta calidad y el mantenimiento de un tejido sano para la digestión y absorción, posiblemente en parte atribuidas a los sistemas intensos de producción, y a las regulaciones referentes a la restricción de la inclusión de promotores como promotores de crecimiento.

La recuperación de los nutrientes de la ingesta, representa uno de los principales objetivos del intestino, por ello es uno de los factores que se deben cuidar para alcanzar el máximo comportamiento

productivo en los pollos de engorda, consecuentemente un sistema digestivo sano desde un punto de vista anatómico y fisiológico es fundamental.

Los cuadros que se observan (infecciosos y no infecciosos) comúnmente bajo condiciones comerciales de producción generalmente tienen un origen multifactorial donde se encuentran involucrados todos los componentes de la producción animal (nutricional, sanitario y manejo), siendo menos frecuentes los de etiología simple. Los signos y lesiones macroscópicas y microscópicas que se describen, son poco específicos y en general difícil de diferenciar, ya que el ave responde en general de una manera similar ante esas circunstancias, debido a que se activan los mismos patrones fisiopatológicos; siendo necesario describir con mayor precisión las lesiones de acuerdo a tamaño, color, consistencia ya cantidad (Goodwin, 1998). Cualquier modificación de origen físico, químico, biológico o neuronal puede manifestarse como un problema entérico.

La diarrea en las aves es uno de los signos mas frecuentes de los trastornos entéricos, existiendo diversos procesos que la producen.

1. Hipermotilidad intestinal. Se refiere a un incremento en la intensidad, frecuencia y ciclo del peristaltismo, ocasionando una mayor velocidad de paso del alimento a través del intestino, puede ser generada por una inadecuada granulometría de los ingredientes, exceso del porcentaje de fibra cruda o desequilibrio de la flora intestinal, así como por las toxinas de bacterias como *E. coli*, *clostridium* u otros anaerobios. Los insecticidas y pesticidas también pueden favorecer este proceso.

2. Alteración en la permeabilidad de la pared intestinal. Los cuadros de enteritis cursan con un proceso inflamatorio en la mucosa intestinal, donde se modifica el tamaño de los poros intercelulares afectando la permeabilidad. Esto se produce en todos los casos de enteritis, ya que por definición siempre hay inflamación.

3. Hipersecreción. En los procesos donde se pierde el balance entre absorción y secreción de electrolitos, el resultado es la acumulación de agua en el lumen intestinal, y con ello la diarrea (pudiendo o no existir daño en la estructura de la mucosa). La hipersecreción participa en la patofisiología de varios procesos infecciosos debido a la estimulación de la secreción intestinal por la inflamación, irritación y respuesta inmunológica. Cuando hay producción de enterotoxinas, se puede presentar un cuadro de enteritis mucoides caracterizado por que aumenta la capacidad secretora del intestino. En la parte distal de las vellosidades se encuentran las células responsable de la absorción de los nutrientes, en cambio en las criptas estas mismas células en periodo juvenil son las responsables de la secreción, por lo que una pérdida de las células maduras se reflejará en menor absorción, estimulando la formación de nuevas células jóvenes secretoras, pudiendo ser una de las causas de diarrea.

4. Cuadro de "mala absorción". Debido a la enteritis, aumenta la descamación de enterocitos y hay deterioro de las vellosidades intestinales, produciendo una menor capacidad de absorción, pudiendo encontrar material no digerido en las excretas.

5. Aumento de la presión osmótica intraluminal. Debido a la retención del agua ingerida, además de los exudados y detritus del proceso inflamatorio, se acelera la velocidad del tránsito intestinal. Este proceso puede estar asociado con una fermentación y proliferación bacteriana, así como de nutrientes no digeridos, produciendo cambios en el pH y desequilibrio ácido-base.

6. Existen evidencias de la participación del sistema neuroendocrino/paraneural en la presencia de diarreas. Las secreciones gastrointestinales normalmente son estimuladas por las hormonas digestivas como la gastrina y la secretina, así como por la estimulación del nervio vago

Los cuadros de diarrea se pueden complicar con deshidratación, hipoglucemia, pérdidas de fluidos corporales, hipovolemia, hipertensión arterial, vasoconstricción periférica e isquemia, hiperpotasemia, alteración de la función cardíaca y en casos más avanzados acidosis metabólica (Martínez, 2001).

La anamnesis, y una mejor información referente a los signos clínicos y lesiones seguramente van a contribuir, no solamente para mejor diagnóstico sino también como pronóstico, teniendo el riesgo de confundir el cuadro clínico al no utilizar las técnicas de diagnóstico adecuadas, independientemente que los procesos pueden corregirse o complicarse cuando hay cambios en la dieta, población animal, manejo, clima etc. (López Coello, 2001)

La metodología de diagnóstico puede incluir técnicas sofisticadas, costosas y tardadas como es el caso de la determinación de la flora intestinal, que

incluye ensayos moleculares para la identificación de microorganismos que por cierto no han sido del todo conocidos, ya que con los estudios actuales se estima que solamente se ha podido determinar el 16% de las bacterias intestinales y que ejercen una gran participación para obtener el "confort intestinal".

Es curioso la poca atención que se le ha dado a la calidad de las excretas cuando se presenta un problema, generalmente se realiza una descripción muy subjetiva sin bases, y frecuentemente se cae en el error de un inadecuado abuso de los signos clínicos para integrar el diagnóstico, ya que solamente con la signología no es posible determinar la patogénesis de la alteración y mucho menos la etiología, complicando con ello la emisión del diagnóstico. Mediante los estudios histopatológicos tampoco es posible determinar todas las causas que afectan al sistema digestivo y menos aun microscópicamente (En la escala de diagnóstico es importante incluir los aspectos metabólicos y neuronales, para su integración).

Con la intención de contribuir para la definición e interpretación de la calidad de las excretas se diseñó una metodología de medición que incluye aspectos cualitativos y cuantitativos, Es importante considerar que los pollos de engorda realizan de 7 a 15 evacuaciones diarias y que las mismas provienen del sistema urinario, de los ciegos o del intestino y que de alguna manera pueden estar combinadas entre sí. En una caseta con 20,000 aves, se tendrían entre 140,000 a 280,000 evacuaciones por día, correspondiendo a un ciclo de 50 días a un total de 7 a 14 millones de excretas, siendo posible encontrar cualquier tipo entre todas ellas, independientemente de que por la misma densidad de las aves, solamente se van a poder identificar aquellas frescas.

Otro aspecto que es necesario establecer es el concepto de muestreo que se aplica constantemente en la avicultura, ya que generalmente se trabaja sobre la población como ocurre en las muestras de serología, análisis de alimento, peso corporal etc., pero por alguna razón que todavía no queda clara ante los problemas digestivos, da la impresión que se busca en la cama las excretas que se quieren identificar y esto sin lugar a dudas distorsiona la realidad de lo que acontece.

La metodología que se expone a continuación es muy sencilla y fácil de aplicar, se recomienda en un principio hacerla constantemente cada semana sobre todo para uniformar criterios e identificar las variables en los distintos puntos de la caseta como es la orientación de la caseta (entrada del sol), ubicación de bebederos principalmente, áreas de crianza (recepción de pollitos), material de cama, traspaso de cama etc. También se recomienda tener evaluaciones previas y posteriores ante un problema específico, ya que esto será de utilidad para conocer el proceso del mismo y emitir un pronóstico o bien la aplicación de medidas

para su control. Este concepto ya se esta aplicando en algunas empresas, dando resultados satisfactorios

1. Identificar dentro de la caseta 15 sitios de muestreo (5 en cada uno de los pasillos laterales y uno en la región central), por ejemplo si la caseta mide 120 metros de largo por 12 de ancho, el lugar de muestreo corresponderá a una distancia de 1 metro de cada pasillo hacia el interior de la caseta, teniendo una distancia lateral de 20 metros entre cada sitio; en el caso de los lugares centrales será en la parte central de la caseta (6 metros del pasillo).

2. Cada lugar de muestreo corresponderá a 1 m².

3. En el interior del área definida, se contara el total de excretas frescas, clasificándolas en 5 categorías.

4. Las categorías son: 1) Heces normales, 2) Heces acuosas, 3) Heces de color anormal (principalmente verdosas) 4) Heces con presencia de moco, 5) Heces con presencia de alimento sin digerir

5. En una matriz se coloca la información obtenida y se expresan los resultados como porcentaje.

6. La interpretación se realiza en base a los porcentajes obtenidos y en los antecedentes de las lecturas anteriores.

EJEMPLO DE EVALUACION EN PARAVADA DE 4 SEMANAS DE EDAD

VARIABLE	TOTAL		PASILLO ZONA ORIENTE					PASILLO ZONA CENTRAL					PASILLO ZONA PONIENTE										
	total	(%)	1	2	3	4	5	total	(%)	1	2	3	4	5	total	(%)	1	2	3	4	5	total	(%)
Normales	91	53.8	7	5	4	5	3	24	45.3	6	7	6	5	4	28	54.9	8	9	7	8	7	39	60.0
Acuosas	46	27.2	4	3	4	3	1	15	28.3	3	4	2	3	2	14	27.4	4	3	5	2	3	17	26.1
Verdosas	2	1.2	1	0	0	0	0	1	1.9	0	0	0	1	0	1	2.0	0	0	0	0	0	0	0.0
Moco	4	2.4	0	0	0	1	0	1	1.9	0	0	0	1	0	1	2.0	0	0	2	0	0	2	3.1
Alimento	26	15.4	3	2	4	2	1	12	22.6	2	2	0	2	1	7	13.7	2	0	2	3	0	7	10.8
Total	169		15	10	12	11	5	53		11	13	8	12	7	51		14	12	16	13	10	65	
(%)	100	100						100							100								100

Ejemplo de interpretación

1.- Debido a que el área de crianza estaba en el punto 1 había mayor numero de aves y por ello hay un mayor numero de excretas en los puntos 1 Y 2.

2.- En el pasillo oriente entraba la luz solar en la mañana y las aves se ubicaban en esa zona, provocando mayor densidad de población y excretas, promoviendo la humedad en la cama.

3.- La definición del cuadro clínico se centraliza a heces acuosas (27,2%) con presencia de alimento sin digerir (15.4%) con poca presencia de moco (2.4%).

REFERENCIAS

1. Goodwin, M.A. Patofisiología dl aparato digestivo de las aves :una revisión. Memorias Curso de enfermedades digestivas de las aves. ANECA, México, D.F. pp 23-37. 1998.

2. Martínez R.A.S. Enfermedades entéricas de las aves. Memorias Ciclo de conferencias SIPESA-TROUW. Guadalajara, México, 2001.

3. López C.C., Arce M.J., Avila G.E. Factores involucrados en la nutrición y alimentación de pollos de engorda que afectan la integridad del intestino. Memorias 10. encuentro Alpharma de enteropatias em frangos de corte, Campiñas, Brasil pp31-47. 2001.

Cuadro 1.

Tratamientos	Duodeno*	Yeyuno anterior a Meckel*	Yeyuno posterior a Meckel*	Heces*	Plasma**	Humedad en heces	Amarillamiento en piel
39 días							
Testigo	69 ± 28.6a	67.9 ± 26.8a	80.56 ± 24.7ab	96.43 ± 44.9a	0.36 ± .033a	76.23 ± 1.83a	9.89 ± .88a
Amprolio	55.62 ± 15.2a	54.2 ± 11.8a	47.3 ± 8.3bc	279.18 ± 20.7a	0.24 ± .017b	78.07 ± .94ab	9.5 ± .65a
Ocratoxina A	8.32 ± .7b	7 ± 1.7b	10.53 ± 2.1c	67.17 ± 15.2a	0.021 ± .005c	81.18 ± 1.82b	2.21 ± .33b
Urea	45.46 ± 10.3ab	57.41 ± 20.6a	84.8 ± 26.5a	277.4 ± 15a	0.267 ± .025b	84.57 ± .86c	8.79 ± .79a
49 días							
Testigo	82.32 ± 7.13a	80.37 ± 13.04ab	134.34 ± 32.6a	75.877 ± 12.5b	0.27 ± 0.04a	71.25 ± 2.22a	12.45 ± 1.53a

Amprolio	83.46 ± 21.18ab	114.957 ± 15.6a	106 ± 25.16a	231.94 ± 46.26a	0.24 ± .02a	65.64 ± 2.35a	11.72 ± .96a
Ocratoxina A	14.39 ± 6.89c	9.74 ± 2.5c	7.47 ± 2b	213 ± 30.06ab	0.02 ± .01b	77.03 ± 1.75b	1.54 ± .27b
Urea	46.266 ± 11.4b	74.290 ± 12.8b	80.185 ± 20.02a	189.44 ± 70.36b	0.18 ± 0.03a	79.58 ± 2.25b	10.36 ± .75a

Valores con distinta literal indican diferencia significativa (p<0.05)

Media ± Error Estándar de la Media

*Valores en µg de carotenoides/g muestra

**Valores de absorbancia

EVALUACIÓN DE LA CALIDAD DE ABSORBENTES AMONIACOS

QUALITY EVALUATION OF AMMONIA ABSORBENTS

Irlanda García, Lourdes Guevara y Javier Lara.

NUTEK S.A. DE C.V. 7 norte 416. Tehuacán, Pue. 75700 México. E-mail: jlara@grupoidisa.com

SUMMARY

Ammonia production causes health/environmental problems. Thus, the use of ammonia absorbents is desirable. This paper presents one method to measure the ammonia-absorption ability of different materials. The method consists of passing a nitrogen stream in a vessel containing both an ammonium hydroxide solution and the test material. Ammonia drawn by nitrogen is quantified using an assessment. Mineral- and plant-origin materials were evaluated. Results ranged from 3% to 90% retention rates.

RESUMEN

La emisión de amoníaco es un problema con repercusiones a la salud y al medio ambiente, por lo que el uso de absorbentes de amoníaco es deseable. En este trabajo se presenta un método para medir la capacidad de absorción de amoníaco de diferentes materiales. El método consiste en hacer pasar una corriente de nitrógeno en un recipiente que contiene una solución de hidróxido de amonio y el material a evaluar. El amoníaco arrastrado por el nitrógeno se cuantifica por una valoración. Se evaluaron materiales de origen mineral y vegetal con resultados que variaron del 3% al 90% de retención.

INTRODUCCIÓN

En el ámbito mundial, la emisión de amoníaco (NH₃) por las explotaciones pecuarias constituye un problema importante tanto para la salud, animal y humana, como para el medio ambiente. En el caso particular de México, el problema de salud es frecuentemente considerado de bajo impacto pues normalmente las casetas son ventiladas, por lo que el

aspecto ecológico retoma un primer plano. A esto se debe que el uso de aditivos que evitan la volatilización del amoníaco no es común, sin embargo en algunas empresas, concientes de la importancia del aspecto ecológico y de proporcionar un mejor confort a los animales y a los trabajadores, se empiezan a usar estos aditivos. Además se ha demostrado que al controlar la emisión del amoníaco se mejora la productividad.

En las explotaciones pecuarias el amoníaco se forma principalmente por la descomposición del ácido úrico o de la urea y su emisión al medio ambiente depende de muchos factores relacionados tanto con las instalaciones como con la nutrición animal (1), pero de una manera general depende de las condiciones del estiércol.

La emisión de amoníaco puede ser controlada mediante tres clases de materiales, el primero es a través de materiales que tienen la capacidad de combinarse con el amonio o el amoníaco, el segundo es a través de materiales que disminuyen el pH del desecho y el tercero a través de materiales que actúan microbiológicamente ya sea inhibiendo la función de la enzima ureasa o el crecimiento de ciertos microorganismos que favorecen la descomposición del ácido úrico. Entre los materiales que han sido empleados para el control de la emisión del amoníaco se pueden mencionar a las zeolitas, los fosfatos, el ácido fosfórico, el sulfato ferroso, los extractos de yuca, algunos ácidos orgánicos y paraformaldehído (2).

En la literatura se han reportado algunos estudios para evaluar la capacidad de absorción de amoníaco. Éstos se han realizado ya sea mediante pruebas de fermentación de semanas de duración (2), o mediante evaluaciones donde se mide la disminución del amonio libre en solución (3,4). En el primer caso la duración de la prueba impide su uso para control de calidad y en el

segundo no se tiene una medida directa de la disminución de la volatilización del amoníaco. Por consiguiente, se requiere un método rápido y que mida directamente la volatilización del amoníaco.

En este trabajo se propone un método rápido para medir directamente la volatilización del amoníaco y se evaluaron varios aditivos químicos que pueden ser utilizados para el control de la emisión del amoníaco. No se consideran materiales del tipo microbiológico.

MATERIAL Y MÉTODO

Se seleccionaron varios materiales que son o que pueden ser utilizados para el control de la emisión de amoníaco. Estos materiales se pueden clasificar en dos grupos, los que funcionan a través de una reducción del pH y los que se combinan con el amonio. Del primer grupo se utilizaron: Cloruro Férrico hexahidratado, Sulfato Ferroso monohidratado, Ortofosfato de Calcio al 18% de Fósforo y Ácido Fosfórico. Del segundo grupo se usaron 2 zeolitas de origen natural en polvo fino identificadas como ZM y ZC, 1 zeolita granulada del mismo origen que la ZM, 1 aluminosilicato, 1 bentonita sódica, 1 extracto de Yuca en forma líquida y sólida. En este caso se incluyó un aluminosilicato porque este material es usado con frecuencia en los alimentos como adsorbente de micotoxinas y no se ha hecho énfasis en su propiedad de absorción de amoníaco. También se incluyó una bentonita sódica pues este material al igual que las zeolitas (5) tienen una alta afinidad por el amonio.

El método consiste en colocar en un matraz 1 g o 1 mL del material a evaluar y adicionar 10 mL de una solución valorada de Hidróxido de Amonio al 0.5 N. El matraz se cierra con un tapón de hule el cual tiene dos perforaciones, una para la entrada de una corriente de Nitrógeno y la otra para la salida de este gas que arrastra el amoníaco que se volatiliza de la solución. Se utiliza Nitrógeno pues el aire además del dióxido de carbono puede contener trazas de amoníaco que haría necesario lavarlos para eliminar estas interferencias complicando el método. El flujo de Nitrógeno se fija a 100 mL/min y se hace circular por 30 minutos. La salida está conectada a un matraz que contiene una solución valorada de Ácido Clorhídrico donde se retiene el amoníaco que se arrastró con el nitrógeno. Este ácido se valora y mediante un cálculo estequiométrico se obtiene la cantidad de amoníaco que se volatiliza. Antes de evaluar los materiales se realiza una prueba blanco que permite calcular cuanto amoníaco se volatiliza sin la presencia de ningún aditivo. El resultado se reporta como porcentaje del amoníaco que se retiene con respecto al amoníaco que se volatiliza sin el uso del aditivo. Cada material fue analizado por duplicado y en el caso de los materiales que tienden a aglomerarse se tuvo el cuidado de dispersarlos bien. Otra variable también controlada fue

la temperatura, la cual se mantuvo a 24 ± 1 °C mediante la inmersión del matraz en un baño de agua.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

La evaluación de 6 repeticiones del blanco dio un promedio de 0.978 milimoles de amoníaco (16.6 mg) volatilizados que corresponden a 0% de retención. El coeficiente de variación fue de 5.6%. Los resultados de la reducción de la volatilización del amoníaco por los materiales utilizados se presentan de manera resumida en el cuadro 1. En este cuadro se observa que los valores de reducción de emisión del amoníaco dependen del tipo de material utilizado y del principio de funcionamiento. Así se observa que los que retienen el mayor porcentaje de amoníaco son aquellos que funcionan sobre el principio de la disminución del pH, como son el ácido fosfórico, el cloruro férrico, el sulfato ferroso y en menor grado el ortofosfato. Estos resultados coinciden con los reportados en la literatura (2) donde se llega a la conclusión que la reducción del amoníaco es mejor cuando se utiliza ácido fosfórico y sulfatos de hierro y de aluminio, que cuando se utiliza un silicato recubierto con ácido. En ese mismo estudio se favorece el uso del cloruro férrico al del sulfato ferroso por la toxicidad que puede ocasionar un exceso del hierro biodisponible del sulfato y se cuestiona el uso de los materiales que contienen Fósforo por su efecto de eutroficación de las aguas. Esto resulta muy interesante considerando que en la actualidad se pueden usar algunos ácidos orgánicos, como el adípico (6) u otros, en los alimentos que tienden a acidificar los desechos lo que puede disminuir la emisión de amoníaco. Además estos ácidos orgánicos pueden tener una influencia favorable en el tracto intestinal.

Respecto a las zeolitas se observa de los resultados de la zeolita ZM que el tamaño de partícula no tuvo una influencia muy grande en el resultado. Sin embargo el origen de la zeolita puede ser importante, pues se observa una diferencia de más del 10% de la reducción usando la zeolita ZM con respecto a la zeolita ZC. En el caso del extracto de Yuca se tiene prácticamente el mismo valor de reducción en sólido que en líquido. Es importante remarcar que este extracto de yuca no tuvo la reducción de amoníaco que era esperada, pues la cantidad adicionada en el experimento representó el 10% del volumen de la solución de amonio con valores de retención solamente del orden del 22%. Esto implica un nivel alto de inclusión como adsorbente de amoníaco, lo cual ya ha sido reportado en la literatura (4). Probablemente el funcionamiento de los extractos de yuca sea más por principio microbiológico que por absorción.

La reducción de amoníaco obtenida con el aluminosilicato resulta de interés, pues se tiene un porcentaje del orden del 17% y al ser este material empleado con frecuencia en los alimentos para

controlar la micotoxicosis se tiene un beneficio adicional, pues puede contribuir a reducir la emisión de amoníaco. Por otra parte, en este estudio la bentonita sódica utilizada tuvo un bajo nivel de reducción, lo cual aunado a su carácter sódico que puede contribuir a aumentar la salinidad de los desechos, la hace un material con pocas posibilidades de uso. Es claro que no todas las bentonitas van a tener el mismo comportamiento.

CONCLUSIÓN

El método presentado permite evaluar de manera rápida la capacidad de absorción de amoníaco de varios materiales. Este método no tiene validez para los materiales que actúan microbiológicamente. La rapidez del método permite que pueda ser utilizado para el control de calidad de los absorbentes de amoníaco. En cuanto a la evaluación se llega a la conclusión que los materiales que tienden a reducir el pH de los desechos retienen mayor cantidad de amoníaco que aquellos que se combinan con el amoníaco. Finalmente la decisión de usar o no un absorbente de amoníaco y que tipo va a depender del aspecto económico ya que el problema del amoníaco debe estudiarse desde varios aspectos, que incluyen las instalaciones, la nutrición y el manejo de los desechos.

Cuadro 1. Reducción de la volatilización de amoníaco por diversos aditivos. El valor representa la media de dos evaluaciones.

MATERIAL	REDUCCIÓN DE VOLATILIZACIÓN DE AMONIACO (%)
ÁCIDO FOSFÓRICO	90.7
CLORURO FÉRRICO H	82.0
SULFATO FERROSO	70.6
ORTOFOSFATO	63.6
E. YUCA POLVO	24.4
E. YUCA LÍQUIDO	22.9
ALUMINOSILICATO	17.3
ZEOLITA ZM POLVO	14.7
ZEOLITA ZM GRANO	14.0
BENTONITA SODICA	7.0
ZEOLITA ZC	3.5

REFERENCIAS

1. Canh, T.T., A.J.A. Aarnink, M.W.A. Verstegen y J.W. Schrama. Influence of dietary factors on the pH and ammonia emission of slurry from growing-finishing pigs. *J. Anim. Sci.* 76, 1123-1130, 1998.
2. Moore, P.A., T.C. Daniel, D.R. Edwards y D.M. Miller. Evaluation of chemical amendments to reduce ammonia volatilization from poultry litter. *Poultry Sci.* 75, 315-320, 1996.
3. Headon, D.R., K. Buggle, A. Nelson y G. Killeen. Glycofractions of the yucca plant and their role in ammonia control. P 95-108. En T.P. Lyons (ed), *Biotechnology in the feed industry*. Alltech, Inc. Nicholasville, Ky. 1991.
4. Wallace, R.J., L. Arthaud y C.J. Newbold. Influence of yucca shidigera extract on ruminal ammonia concentration and ruminal microorganism. *Appl. Environ. Microbiol.* 60, 1762-1767. 1994.
5. Theophilou, N. Clinoptilolite may help reduce ammonia. *Feed Mix* 8, 14-16, 2000.
6. Van Kempen, T.A.T.G. Dietary adipic acid reduces ammonia emission from swine excreta. *J. Anim. Sci.* 79, 2412-2417, 2001.

EFICACIA DEL 3-ACETIL 4''-ISOVALERIL TARTRATO DE TILOSINA EN EL TRATAMIENTO DE LA ENFERMEDAD RESPIRATORIA CRÓNICA (*MYCOPLASMA ALLISEPTICUM*)

EFFICACY OF 3-ACETYL, 4''-ISOVALERYL TYLOSINE TARTRATE (AIV) IN THE TREATMENT OF CHRONIC RESPIRATORY DISEASE (*MYCOPLASMA GALLISEPTICUM*)

Cerdá, Raúl ^{1,2}; Piscopo, Miguel ²; Unzaga, Florencia ²; Marino, Fernando ²; Petruccelli, Miguel ²

¹ECO Animal Health, UK. ²Facultad de Ciencias Veterinarias, Universidad Nacional de La Plata. CC 296 (B1900 AVW) La Plata, República Argentina.

SUMMARY

The purpose of this research was to evaluate the therapeutic efficacy of AIV alone or in combination with bromexine (BRO), in an experimental model to reproduce chronic respiratory disease (CRD) caused by *M. gallisepticum*. Four 2-day-old 15-chick groups were inoculated with *M. gallisepticum* K781 strain given by spray. Significant differences were found regarding lesion scores and weight gains between the controls and the AIV- and AIV+BRO-treated groups. A marked delay in seroconversion was also observed in these groups.

RESUMEN

El objetivo del estudio fue evaluar la eficacia terapéutica del 3-acetil 4''-isovaleril tartrato de tilosina (AIV), solo y asociado a bromexina (BRO) en un modelo de reproducción experimental de la enfermedad respiratoria crónica (ERC) por *Mycoplasma gallisepticum*. Se inocularon 4 grupos de 15 pollos de 2 días de vida con la cepa de *M. gallisepticum* K781 mediante aerosol. Se observaron diferencias significativas en cuanto a lesiones y ganancia de peso entre los grupos medicados con AIV y AIV asociado a BRO con el grupo control como así también un marcado retraso en la seroconversión en dichos grupos.

INTRODUCCIÓN

La infección por *M. gallisepticum* y la signología clínico-patológica por ella producida, conocida como ERC, se caracteriza en pollos parrilleros, por estertores respiratorios, tos y secreciones nasales. Estos signos, en ciertos casos, se ven exacerbados por la presencia de otros agentes, como bacterias (*Escherichia coli*) y virus (Bronquitis infecciosa). La relevancia de esta signología clínica se desprende de las cuantiosas pérdidas económicas que ocasionan en la industria avícola, debido básicamente al aumento del índice de conversión alimenticia y a la depreciación del valor de

la canal, y sobre todo, al costo de los medicamentos para paliar los efectos antes mencionados. Esta enfermedad obliga a establecer programas de control y prevención temprana. Para implementar estos programas se hace necesario comprender la aparición secuencial de estos signos clínicos que afectan el normal comportamiento del ave.

Los mucolíticos, como la BRO, son una de las armas terapéuticas con que cuenta la industria avícola para paliar o reducir las pérdidas económicas producidas por los cuadros mencionados, mediante su acción fluidificante del mucus traqueobronquial (Takeda, 1983) (Sumano, 1995). El uso de antibióticos es otro de los elementos que la industria posee para combatir la ERC. Dentro de éstos se encuentra el AIV derivado de la tilosina de reciente uso en el mercado (Skelly, 1986). Por otra parte se ha reportado un aumento de la eficacia terapéutica en afecciones respiratorias mediante la asociación de estas dos clases de drogas (Sumano, 1995).

El objetivo del presente estudio fue evaluar la eficacia del AIV y la BRO, individualmente y asociados, en un modelo experimental de ERC por *M. gallisepticum*, en base al análisis de las lesiones respiratorias macroscópicas, ganancia de peso y seroconversión.

MATERIALES Y MÉTODOS

Para este estudio se utilizaron 65 pollitos reproductores de engorda de un día de vida, provenientes de una granja comercial libre de micoplasmas y salmonellas. Los mismos fueron divididos en cuatro grupos: A) grupo control inoculado con *M. gallisepticum* (20 animales), B) grupo inoculado con *M. gallisepticum* y medicado con mucolítico (15 animales), C) grupo inoculado con *M. gallisepticum* y medicado con antibiótico (15 animales) y D) grupo inoculado con *M. gallisepticum* y medicado con mucolítico y antibiótico (15 animales).

Los animales de los cuatro grupos fueron inoculados con una cepa patógena de *M. gallisepticum* (ver inóculo) el segundo día de vida. Previamente se tomaron muestras de sangre de 10 animales para confirmar serología negativa a *M. gallisepticum* y *Mycoplasma sinoviae*.

Cuando se comenzaron a observar los primeros signos clínicos respiratorios (6 días posinoculación), se comenzaron los tratamientos en el agua de bebida y durante 5 días. El grupo B comenzó a recibir BRO a las dosis indicadas por el fabricante, 0,8 mg / kg peso vivo. El grupo C comenzó a recibir AIV a la dosis de 20 mg /kg peso vivo. Así mismo el grupo D recibió la combinación de las dos drogas arriba mencionadas.

Inóculo. Para el desarrollo de la infección experimental se empleó una cepa de referencia de *M. gallisepticum* (K-781). Dicha cepa fue adaptada al medio de cultivo líquido de Frey con 12% de suero porcino (Frey, 1968) mediante la realización de pasajes de 0,2 ml de cultivo inoculado en 2 ml de medio fresco, hasta la obtención de crecimiento en fase logarítmica (crecimiento en 24 hs por cambio de color del indicador de pH del púrpura al amarillo-naranja). En ese momento se obtuvo un inóculo con una concentración de 10^{10} UFC/ml. La descarga del inóculo en los pollitos se realizó vía aerosol mediante el empleo de un nebulizador de medicina humana. La copita plástica se cargó con 5 ml del cultivo y se colocó en forma vertical dentro de una caja de cartón conteniendo los animales a inocular (10 por vez). El tiempo de exposición fue de aproximadamente 3 minutos a fin de asegurarse una correcta descarga.

Muestreo. Se sacrificaron 5 animales por lote a los 5, 10 y 15 días post tratamiento (PT). Los animales fueron pesados, sangrados y sacrificados a los efectos de realizar los distintos estudios. Los estudios serológicos se llevaron a cabo mediante la prueba de aglutinación rápida en placa (ARP) con antígeno de Intervet. (Intervet International B.V. Boxmeer-Holland).

Análisis estadístico. Para el análisis estadístico de la ganancia de peso se aplicó el análisis de varianza (prueba de Fisher) con un nivel de significancia de 0.05.

RESULTADOS

Los resultados de ganancia de peso, lesiones en sacos aéreos y serología se detallan en la tabla adjunta. En el grupo control murieron 3 animales entre los 2 y 3 días PT con severas lesiones en los sacos aéreos.

DISCUSIÓN

A diferencia de la mayoría de los estudios de eficacia en los que la medicación se inicia antes o conjuntamente con la inoculación experimental, en el presente ensayo se buscó determinar la eficacia

terapéutica del AIV solo y asociado a BRO luego que se presentaran los signos clínicos de la enfermedad. Teniendo en cuenta que una vez establecida la enfermedad la efectividad de los tratamientos en la ERC es muy baja, consideramos de sumo valor los resultados obtenidos en el presente estudio en donde se pueden observar diferencias significativas ($P < 0.0001$) en la ganancia de peso entre los grupos tratados con AIV y los restantes como así también un menor número de animales con lesiones en los grupos tratados. Si bien no se observaron diferencias significativas entre los grupos C y D a diferencia de los trabajos de otros investigadores (Sumano, 1995), probablemente por el escaso número de muestras, si pueden observarse diferencias entre el grupo B y el grupo control en la ganancia de peso y lesiones respiratorias como así también en la mortalidad, lo cual habla de una cierta actividad del mucolítico en las aves tratadas. Pero tal vez el punto de mayor interés sea el referente a la seroconversión en donde se puede observar un importante retraso en la misma en cada muestreo, llegando inclusive a más de 25 días post inoculación en un animal del grupo D, cuando normalmente la positividad es detectada antes de los 10 días post infección mediante la prueba de ARP (Opitz, 1983), como ocurrió en los grupos A y B.

A partir del presente estudio podemos concluir que el AIV presenta una alta efectividad en el tratamiento de la ERC por *M. gallisepticum* confirmando los resultados obtenidos por Skelly y colaboradores (1986). No obstante es necesario realizar un estudio más amplio a fin de conocer fehacientemente la interacción entre el AIV y la BRO frente a esta enfermedad.

REFERENCIAS

1. Frey, M., R. Hanson and D. Anderson. A medium for the isolation of avian Mycoplasmas. Am. J. Vet. Res. 29: 2164-2171. 1968.
2. Nunoya, T., M. Tajima, T. Yagihashi and S. Sannai. Evaluation of Respiratory Lesions in Chickens Induced by *Mycoplasma gallisepticum*. Jpn. J. Vet. Sci. 49: 621-629. 1987.
3. Opitz, H., J. Duplessis and M. Cyr. Indirect micro enzyme-linked immunosorbent assay for the detection of antibodies to *Mycoplasma synoviae* and *Mycoplasma gallisepticum*. Avian Dis 27, 3 : 773-786. 1983.
4. Skelly, B., D. Andersen, M. Pruss, and R. Pellegrino. Prophylactic efficacy of 3-Acetyl-4'-Isovaleryl Tylosin in a *Mycoplasma gallisepticum*-Induced Airsacculitis Infection. Avian Dis 3: 505-509. 1986.
5. Sumano, H., I. Gracia, A. Capistran, A. Meade, G. Rivero and L. Ruiz-Ramirez. Use of ambroxol and bromhexine as mucolytics for enhanced

diffusion of furaltadone into tracheobronchial secretions in broilers. *British Poultry Science*. 36: 503-507. 1995.

6. Takeda, H, M. Misawa, and S. Yanaura. A Role of Lysosomal Enzymes in the Mechanism of Mucolytic action of Bromhexine. *Japan. J. Pharmacol.* 33: 455-461. 1983.

Cuadro 1: Lesiones, seroconversión y ganancia de peso de los distintos grupos a distintos intervalos de tiempo.

Tratamientos	5 días PT		10 días PT		15 días PT		Peso promedio a los 28 días (g.)
	Lesiones	ARP	Lesiones	ARP	Lesiones	ARP	
A) Control	5/5	2/5	5/5	5/5	5/5	5/5	1.010 ^c
B) BRO	4/5	2/5	4/5	5/5	5/5	5/5	1.089 ^a
C) AIV	1/5	0/5	1/5	1/5	2/5	5/5	1.187 ^b
D) AIV+BRO	0/5	0/5	3/5	1/5	3/5	4/5	1.207 ^b

Medias de pesos con letras distintas son significativamente diferentes ($P < 0.05$)

DETERMINACIÓN DE LA SENSIBILIDAD A ANTIBIÓTICOS DE DIFERENTES CEPAS DE *ESCHERICHIA COLI*

DETERMINATION OF ANTIBIOTIC SENSITIVITY OF DIFFERENT *ESCHERICHIA COLI* STRAINS

Rosario CC¹, Téllez Isaías¹, Eslava CC².

¹Departamento de Producción Animal: Aves, Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia, UNAM. Circuito Exterior 04510, Ciudad Universitaria, México, D.F. ²Departamento de Salud Pública, Facultad de Medicina, UNAM. rosario@servidor.unam.mx Tel (52) 55 56 22 58 67 Fax (52) 55 56 22 58 68

SUMMARY

Seventy-six *E. coli* strains were isolated from fertile eggs and chicks with yolk sac infection. These strains were subjected to antimicrobial sensitivity tests. All strains were found to be sensitive to antibiotics like Amikacin, aztreonam, cefoxime, ceftizoxime and imipenem. Nevertheless, nearly 50% of the strains were found to be resistant to ampicillin, sulfa/trimethoprim, and ciprofloxacin. Minimum inhibitory concentrations of both gentamicin and kanamycin showed very low levels of resistance.

RESUMEN

Se aislaron 76 cepas de *Escherichia coli* a partir de muestras de huevo fértil y aves con infección del saco vitelino. Las cepas obtenidas fueron sometidas a pruebas de sensibilidad a antimicrobianos. Se encontró que todas las cepas fueron sensibles a antibióticos como amikacina, aztreonam, cefoxime, ceftizoxime e imipenem, sin embargo en el caso de ampicilina, sulfa/trimetoprim y ciprofloxacina se encontró que casi el 50% de las cepas eran resistentes a dichos antibióticos. En el caso de la gentamicina y la kanamicina hubo un grado muy bajo de resistencia en la prueba de concentración mínima inhibitoria.

INTRODUCCIÓN

A diferencia de otras bacterias que sólo pueden producir un tipo de enfermedad, *E. coli* es capaz de ocasionar una gran variedad de padecimientos. En las aves se le ha relacionado con infecciones respiratorias, dermatitis, infección del saco vitelino y onfalitis (4).

En años recientes, con el objeto de prevenir las enfermedades aviares, se ha optado por la administración de niveles subterapéuticos de agentes antimicrobianos a las aves en el alimento y el agua (2). En el año de 1995 y 1996 se aprobaron la sarafloxacin y la enrofloxacin para uso en animales en los Estados Unidos, para su uso en el control de la mortalidad y la morbilidad ocasionada por *E. coli* (7). A pesar del optimismo inicial, la resistencia a las fluoroquinolonas entre las bacterias se ha incrementado significativamente desde su introducción (1).

De igual manera la introducción de cefalosporinas de amplio espectro, tales como cefotaxime, ceftriaxona y ceftazidime se ha visto acompañada de la aparición de cepas multiresistentes (5).

MATERIAL Y MÉTODOS

Cepas Bacterianas. Las cepas que se utilizarán en el presente estudio fueron aisladas a partir de granja

de reproductoras, incubadora y pollo de engorda, e identificadas como *E. coli*. Para realizar la caracterización, las cepas de *E. coli* se sembraron previamente en placas de agar sangre y agar MacConkey con lactosa, con el fin de establecer la pureza de las mismas, después de lo cual, se incubaron a 37° C por 24 horas.

Perfil de sensibilidad a antimicrobianos. Las 76 cepas aisladas se sometieron a una prueba de determinación de la sensibilidad microbiana utilizando el sistema VITEK para bacilos gram-negativos aerobios y/o anaeróbicos facultativos de crecimiento rápido. En ella se evalúa la sensibilidad hacia: amikacina, ampicilina, aztreonam, cefazolina, cefotaxima, ceftazidima, ciprofloxacina, gentamicina, imipenem, nitrofurantoina, piperaciclina, ticarcilina/ácido clavulánico, tobramicina, trimetoprim/sulfametoxazol. El sistema se basa en la técnica estándar de microdilución para CMI. Para su realización se siguieron las indicaciones del fabricante.

Determinación de la concentración mínima inhibitoria (CMI) en *Escherichia coli*. En la prueba de Concentración Mínima Inhibitoria (CMI) realizada a las cepas en estudio se utilizaron sales puras de tres antibióticos: Gentamicina, Kanamicina y Tetraciclina.

Se utilizó la técnica en placa, para lo cual se prepararon placas de agar Mueller Hinton con diferentes concentraciones de los antibióticos utilizados. En el caso de la gentamicina la concentración más elevada fue de 100 g/ml a partir de la cual se realizaron diluciones décuples seriadas hasta una concentración de 1.6 g/ml. En el caso de los otros dos antibióticos la concentración máxima utilizada fue de 50 g/ml y la mínima de 1.6 g/ml.

Las cepas de *E. coli* fueron sembradas en caldo nutritivo e incubadas 18 horas a 37° C. Los inóculos se ajustaron a una concentración de 0.5 con el nefelómetro de McFarland, posteriormente se sembraron 20 cepas por placa en las diferentes diluciones del antibiótico. Las placas se incubaron 24 horas a 37° C después de lo cual se procedió al análisis de los resultados obtenidos.

RESULTADOS

Perfil de sensibilidad a antimicrobianos

Los resultados de la prueba de sensibilidad a antibióticos, se muestran en el Cuadro 1. En el caso de algunos antibióticos todas las cepas resultaron sensibles, como en el caso de la amikacina, aztreonam e imipenem. Aunque en algunos antibióticos como ceftazidim y gentamicina se encontraron algunas cepas resistentes, la mayoría eran sensibles. Sin embargo, en el caso de algunos antibióticos como la ampicilina, la combinación sulfá trimetoprim, hubo un porcentaje elevado de resistencia. En el caso de la ciprofloxacina también se encontró que las cepas en estudio

presentaron un elevado porcentaje de resistencia (47%). En el caso de la gentamicina se encontraron 4 cepas resistentes.

Se encontraron 11 cepas resistentes a ampicilina, ciprofloxacina, piperacilina y sulfá/trimetoprim, los cuales fueron los antibióticos microbianos que presentaron el mayor porcentaje de resistencia.

Determinación de la concentración mínima inhibitoria (CMI) en *Escherichia coli*

Además de la gentamicina, se incluyeron en el ensayo de CMI kanamicina y tetraciclina, ya que estos son dos de los antibióticos más usados en la avicultura.

Los resultados de la sensibilidad a la gentamicina coinciden en la prueba automatizada de VITEK y en la prueba de CMI a excepción de una cepa que fue resistente en el VITEK y sensible en la prueba de CMI.

En el caso de la kanamicina un gran porcentaje (73.6%) de las cepas fue sensible a bajas concentraciones del antibiótico a pesar de que se utiliza comúnmente en la avicultura. Sin embargo, en el caso de la tetraciclina 67 cepas (88.1%) fueron resistentes a concentraciones mayores a 50 g/ml.

DISCUSIÓN

Probablemente la alta incidencia de cepas resistentes a ciprofloxacina es causada por una resistencia cruzada entre las fluoroquinolonas, ya que a pesar de que no se use directamente este antimicrobiano en aves, la enrofloxacin es parcialmente metabolizada en hígado a ciprofloxacina (Intorre, 1997). El hallazgo de cepas resistentes a fluoroquinolonas en granjas donde no se usaba tales quimioterapéuticos ya había sido reportada previamente, sin embargo, se trataba de quinolonas de uso veterinario que posiblemente fueron llevadas de una granja a otra por un inadecuado programa de bioseguridad (3).

Se ha observado que el uso indiscriminado de agentes antimicrobianos en la medicina, ha acelerado la diseminación de elementos genéticos que codifican para resistencia.

En el caso de *Salmonella typhimurium*, se consideraba que el principal reservorio de cepas multiresistentes eran los bovinos, sin embargo a partir de 1993 esta cepa ha sido ampliamente aislada de aves, y esto se ha relacionado con un incremento en la aparición de cepas resistentes a ciprofloxacina en humanos (6).

Es importante considerar estos resultados, ya que la resistencia en animales puede tener un gran impacto en salud pública, debido a que se ha sugerido que existe una relación entre el uso de antimicrobianos en la avicultura y la aparición de patógenos con una sensibilidad disminuida o completa resistencia a ciertos agentes utilizados para el tratamiento de infecciones en humanos.

REFERENCIAS

1. Everett, M.J., Fang, J.Y., Ricci, V., Piddock, L.J.V. Contributions of individual mechanism to fluoroquinolones resistance in 36 *Escherichia coli* strains isolated from humans and animals. *Antimicrob Agents Chemother* 40:2380-2386. 1996
 2. Geornaras, I., Hastings, J.W., Holy, A.V. Genotypic analysis of *Escherichia coli* strains from poultry carcasses and their susceptibilities to antimicrobial agents. *Appl Environ Microbiol* 67:1940-1944. 2001.
 3. Hofacre, C.L., Cotret, A.R.D., Maurer, J.J., Garrity, A., Thayer, S.G. Presence of fluoroquinolone-resistant coliforms in poultry litter. *Avian Dis* 44:963-967. 2000.
 4. Mosqueda, T.A. y Lucio, M.B. Enfermedades comunes de las aves domésticas. México: Universidad Nacional Autónoma de México, 1985.
 5. Shen, D., Biedenbach, D.J., Winokur, P.L., Pfaller, M.A., Jones, R.N. Phenotypic and genotypic characterization of Chinese strains of *Escherichia coli* producing extended-spectrum lactamase. *Diagn Microbiol Infect Dis* 34:159-164. 1999.
 6. Threlfall, E.J., Cheasty, T., Graham, A., Rowe, B. High-level resistance to ciprofloxacin in *Escherichia coli*. *Lancet* 349:403. 1997.
- White, D.G., Piddock, L.J., Maurer, J.J., Zhao, S., Ricci, V., Thayer, S.G. Characterization of fluoroquinolone resistance among veterinary isolates of avian *Escherichia coli*. *Antimicrob Agents Chemother* 44:2897-2899. 2000.

Cuadro 1. Sensibilidad a diferentes antibióticos de 76 cepas de *E. coli* aisladas a partir de huevo fértil y aves con infección del saco vitelino utilizando el sistema VITEK.

ANTIBIOTICO	PATRON DE SENSIBILIDAD (no. de cepas)		
	Sensible	Intermedio	Resistente
AMIKACINA	76		
AMPICILINA	27		49
AZTREONAM	76		
CEFAZOLIN	64	1	11
CEFOTAXIME	76		
CEFOXITIN	74	1	1
CEFTAZIDIME	69	2	5
CEFTIZOXIME	76		
CIPROFLOXACINA	40		36
GENTAMICINA	71	1	4
IMIPENEM	76		
NITROFURANTOINA	66	2	8
PIPERACILINA	33	13	30
TICARCILLIN/CA	52	24	
TOBRAMICINA	75	1	
TRIMETOPRIM/SULFA	21		55

EVALUACION COMPARATIVA INVITRO DE DOS ANTIMICROBIANOS A BASE DE FOSFOMICINA UTILIZANDO LA TECNICA DE MIC CONTRA DIVERSAS ESPECIES BACTERIANAS

IN VITRO COMPARISON OF TWO FOSFOMYCIN-BASED ANTIMICROBIALS USING THE MINIMUM INHIBITORY CONCENTRATION (MIC) TECHNIQUE AGAINST DIFFERENT BACTERIAL SPECIES

Lopez,F., Morales,C., Sosa,A.

SUMMARY

The effects of pathogenic bacteria like *Escherichia coli*, *Haemophilus paragallinarum*, or *Pasteurella haemolytica*, in association with *Mycoplasma* spp. render birds susceptible of developing the symptoms typical of complicated, chronic respiratory complex. Therefore we have been looking for new antibiotic combinations that are more effective against these new challenges faced by the poultry industry. The purpose of this study was to evaluate the *in vitro* antimicrobial activity of two commercial products, one prepared with fosfomicin, and the other with fosfomicin plus trimethoprim. Bacteria evaluated were: *Salmonella gallinarum*, *S. typhimurium*, *S. pullorum*, *S. enteritidis*, *Pasteurella haemolytica*, *Pasteurella multocida*, *Pseudomonas aeruginosa*, *E. coli*, and *Staphylococcus aureus*.

RESUMEN

Los efectos de patógenos bacterianos como *Escherichia coli*, *Hemophilus paragallinarum*, *Pasteurella hemolitica*, asociados con Mycoplasmas hacen a las aves susceptibles de adquirir los síntomas de la enfermedad del complejo respiratorio crónico complicado; es por ello que nos hemos dado a la tarea de generar nuevas combinaciones de antibióticos capaces de ser más efectivos contra estos nuevos retos de la avicultura. El objetivo del presente es evaluar la actividad microbiana invitro de dos productos comerciales, uno a base de fosfomicina y otro compuesto de fosfomicina más trimetoprim.

Las bacterias evaluadas fueron: *Salmonella gallinarum*, *Salmonella tifimurium*, *Salmonella pullorum*, *Salmonella enteritidis*, *Pasteurella hemolytica*, *Pasteurella multocida*, *Pseudomona aureoginosa*, *E. coli*, y *Staphilococcus aureus*.

INTRODUCCIÓN

En los últimos años se han encontrado en el campo un alto porcentaje de cepas bacterianas resistentes contra una amplia gama de antibióticos, causando problemas relacionados con la efectividad de

los tratamientos para solucionar problemas infecciosos de las aves.

El uso de antibióticos para el control de enfermedades en la avicultura moderna es una actividad común en las granjas. Tan común que las bacterias que anteriormente eran eficazmente controladas se han vuelto altamente resistentes a estos. Por esta razón los laboratorios dedican esfuerzos y recursos a la generación de nuevas alternativas para el control de las patologías bacterianas aviares. Al escasear las moléculas nuevas otra alternativa de los laboratorios ha sido el buscar combinaciones sinérgicas altamente eficaces; es por ello que en este trabajo hemos realizado un estudio comparativo para revisar la eficacia invitro de la fosfomicina en contra de una combinación de fosfomicina mas trimetoprim con la finalidad de desafiar ambos antibióticos en contra de las principales bacterias patógenas de las aves.

MATERIAL Y MÉTODOS

Se realizó la evaluación en la sección de bacteriología del laboratorio de diagnostico de Investigación Aplicada S.A. de C.V. ubicado en la ciudad de Tehuacán Puebla, utilizando diferentes medios de cultivo para las diferentes especies bacterianas (1), micro placas de 96 pocillos, pipetas, puntas, cultivos estandarizados de las siguientes especies bacterianas: *Salmonella tiphimurium*, *Salmonella enteritidis*, *Salmonella pullorum*, *Salmonella gallinarum*, *Pasteurella haemolytica*, *Pasteurella multocida*, *Pseudomona aureoginosa*, *E. coli*, y *Staphilococcus aureus*. Dos antibióticos comerciales (uno a base de fosfomicina al 10% y otro a base de fosfomicina al 10% mas trimetoprim al 2.5%).

Para la evaluación se utilizo la técnica de Mínima Concentración Inhibitoria (MIC), iniciando con la concentración de ambos productos comerciales (10 mg en 100 ml de fosfomicina en uno y en el otro 10 mg en 100 ml de fosfomicina mas 2.5 mg en 100 ml de trimetoprim) y a partir de estas se fueron haciendo diluciones dobles hasta determinar la concentración mínima inhibitoria, según refiere el método de Kir Wawer modificado.

RESULTADOS

Los valores de MIC después de las evaluaciones en cada una de las especies bacterianas referidas resultaron menores para la combinación de fosfomicina - trimetoprim que para la fosfomicina sola según se refiere en la tabla y gráfica 1.

CONCLUSIONES Y DISCUSIÓN

Los valores de MIC resultaron menores para la combinación de fosfomicina más trimetoprim que para la fosfomicina sola en la mayoría de las bacterias utilizadas.

La combinación de fosfomicina mas trimetoprim resultado mejor que la fosfomicina sola para inhibir el crecimiento de las bacterias invitro.

La Fosfomicina es un antibiótico aislado a partir de cepas de *Streptomyces sp*, cuyo mecanismo de acción actúa mediante el bloqueo de la transferasa que incorpora el fosfoenol piruvato del péptido nucleótido muramyl. Inhibe la formación de pared bacteriana en su primera etapa, por lo tanto tiene acción bactericida. Si sumamos este efecto al del trimetoprim el cual radica en la acción sobre dos pasos de la vía enzimática para la síntesis del ácido tetrahidrofólico, ya que es un potente inhibidor de la enzima dihidrofolato reductasa y que posee gran actividad y eficacia terapéutica en las primeras etapas de la infección bacteriana aguda ya que en esta etapa se reúnen las siguientes características: bacterias con alto nivel metabólico, huésped con sistema retículo endotelial capaz de fagocitar los agentes patógenos, velocidad para evitar que el proceso

inflamatorio produzca barreras que impidan la difusión de los medicamentos, y que el trimetoprim, eficaz aun en infecciones crónicas; entonces podemos observar un efecto aditivo en ambos antibióticos que potencialisa la efectividad en contra de estos patógenos.

REFERENCIAS

1. Campbell, T.W.; Coles, EH. Patología Clínica en Aves. In: Diagnóstico y Patología Veterinaria, 4th ed. México, Editorial Interamericana, 1989, pp 285-308.
2. Colusi, A. Resultados sobre el uso de la fosfomicina en terapéutica aviaria en in vivo e in vitro. 10 Congreso Latinoamericano de Avicultura 1987.
3. Colusi, A.D.; Colusi, M. Respuesta experimental in vivo de la fosfomicina frente a *Salmonella gallinarum*. CAPIA Informa 2000, 189: 3-7.
4. Coneman, W. Elmer. Diagnostico Microbiologico, Allen D. Stephen, Dowell B.R., Sommers M. Prueba de suceptibilidad a los antimicrobianos, Capitulo II Editorial Panamericana. Paginas 393 a la 396, año 1989.
5. Fernández, A.; Lara, C; Puyuelo, R.; Ramos, J.J.; Lose, A.; Marca, M.C.; Verde, M.T. Efficacy of phosphomycin in the control of *Escherichia coli* infection of broiler chickens. Res. Vet. Sci. 1998; 65: 201-204.
6. Merchant, I.; Packer, A. Veterinary Bacteriology and Virology. Ed. The Iowa State University Press. 7ed. 1967.

RESULTADOS DE MINIMA CONCENTRACION INHIBITORIA Y BACTERICIDA				
Fosfomicina + Trimetoprim y Fosfomicina Sola				
	MIC			
	Fosfomicina +Trimetoprim		Fosfomicina	
	mcg/ml	Log.	mcg/ml	Log.
CEPA				
Salmonella typhimurium	0.0000762	1.3	0.00244	1.11
Salmonella enteritidis*	0.00244	1.1	0.00976	1.04
Salmonella gallinarum*	0.0000762	1.3	0.00488	1.08
Salmonella pullorum**	0.00488	1.1	0.00488	1.08
Pasteurella haemolytica	0.00122	1.2	0.00488	1.08
Pasteurella multocida	0.00488	1.1	0.6103	0.7
Pasteurella multocida	0.00122	1.2	0.6103	0.7
Pseudomona aureoginosa	1.25	0.6	1.25	0.6
Escherichia coli O35	0.625	0.7	1.25	0.6
Staphylococcus aureus***	1.25	0.6	5	0.3
*INDRE				
**IPN				
***ATCC 29737				
MIC = Concentración Mínima Inhibitoria				(Tabla 1)

THE USE OF FEED ADDITIVES IN BROILER CHICKENS IN THE USA

USO DE ADITIVOS ALIMENTICIOS EN POLLO DE ENGORDA EN EE.UU.

H. D. Chapman

Department of Poultry Science, University of Arkansas, Fayetteville, AR 72701

RESUMEN

Entre 1995 y 2000 el uso de antibióticos en los alimentos avícolas disminuyó progresivamente. La bacitracina fue el más frecuente en las raciones de iniciación y crecimiento mientras que la virginiamicina lo fue en las dietas de retiro. En la mayoría de las unidades de producción se usaron dos antibióticos diferentes por parvada, principalmente bacitracina seguida de virginiamicina o bambermicinas, aunque en algunos casos se usó un solo antibiótico. La inclusión de roxarsona no cambió en el período estudiado pero el uso de la combinación ionóforo-roxarsona-antibiótico disminuyó y, al mismo tiempo, se incrementó el uso de una combinación ionóforo-roxarsona.

INTRODUCTION

In recent years there have been major changes in the use of feed additives for growth promotion and disease control in broilers in the USA but these changes have not been documented in the scientific literature. Quantitative documentation of many aspects of poultry production has provided the poultry industry with comprehensive, accurate, and frequent data that can be utilized to compare performance of individual broiler production units and thereby improve profitability of poultry production (AGRI STATS, Inc. 5001 U.S. Highway 30 West, Suite A, Fort Wayne, IN 46818). The database developed by AGRI STATS provides monthly information on the usage of feed additives in broiler feeds by more than 95% of broiler production units (poultry plants) throughout the U.S.A. Furthermore, information is provided on indices of performance such as calorie conversion, % mortality, and the number of days taken to grow a flock to 2.27 Kg. This database has been used to examine overall trends in the use of feed additives (anticoccidial drugs and growth promoters) during the last 5-6 years (Chapman, 2001; Chapman and Johnson, In Press). The anticoccidial drugs studied include the ionophores (ionophorous antibiotics - lasalocid, monensin, narasin, salinomycin, and semduramicin) and the synthetic drugs (?chemicals? - halofuginone, nicarbazin, robenidine, and zoalene). Growth promoters include the arsenical drug roxarsona, and the antibiotics bacitracin, bambermycins, lincomycin, tylosin, and

virginiamycin. In this report quantitative trends in the use of growth promoters during the years 1995-2000 are presented. Types of programs employed are correlated with performance of the birds.

METHODS

The methods used to analyze the data have been described (Chapman, 2001; Chapman and Johnson, In Press).

RESULTS

Trends in drug use. There was a progressive decrease in the overall use of antibiotics (ANT) from 1995 to 2000 in starter, grower and withdrawal rations. For example, 95% and 98% of production units used an ANT in the starter and grower feeds in 1995 but by 2000 this had decreased to 65% and 67% respectively. Overall ANT use was similar at different times of year. In 1995 roxarsona (ROX) was used by 70% and 74% of production units in the starter and grower feeds but this did not change thereafter. There were differences in the usage of individual antibiotics. Thus bacitracin was most frequently used in the starter and grower feed whereas virginiamycin was used most often in the withdrawal ration. Bambermycins and lincomycin were mainly used in grower feeds and tylosin was occasionally used in withdrawal rations. Most production units (69%) used two different ANT (mainly bacitracin followed by virginiamycin or bambermycins) during a single flock but 22% used just one ANT and 8% three ANT. (For example bacitracin in the starter, bambermycins in the grower and virginiamycin in the withdrawal ration). Twenty one different permutations of ANT were reported during this period!

Combinations of different types of drugs, for example an ionophore (ION) for coccidiosis control plus ROX and an ANT in different feeds was also reported. There was a decrease in the use of an ION+ROX+ANT combination in the starter and grower feeds (from 44% to 32% and 70% to 47% respectively, but an ION plus ROX combination showed an increase in use. Use of synthetic drugs in combination with ROX+ANT also decreased. Most production units used bacitracin at 55 ppm in the starter

and grower feeds but there was an increase in the percentage of units using a lower concentration (27.5 ppm) in the grower during the period of the study. ROX was mainly used at 50 ppm but some units employed lower concentrations.

Performance. There were no significant differences in calorie conversion whether an ION+ROX+ANT, ION+ ROX or ION+ANT was used but the number of days to rear birds to 2.27 Kg was significantly greater for those units using just ION+ROX. However, units that employed an ION+ROX had a significantly lower mortality.

Costs of medication. There was a decline in the cost of providing an ION+ROX+ANT during the period of investigation.

DISCUSSION

The results indicate the extent to which antibiotics and roxarsone are still used to promote the growth of broilers in the USA. The most popular programs involve the use of bacitracin in the starter and grower, and virginiamycin in the withdrawal. These drugs are often used in combination with roxarsone and an anticoccidial (ionophore) drug. Nevertheless, a significant decrease in the use of antibiotics has occurred in broiler feeds (particularly in the withdrawal

feed) in recent years. It is possible that producers consider these drugs not as effective as in the past but a principal explanation is that producers desire to save money by reducing the costs of medication. The cost of medication has actually decreased but this has not prevented a reduction in antibiotic usage. It is interesting to speculate whether the decline in drug usage has resulted in impaired performance of broiler flocks. Differences in performance were evident in this study. Production units that did not use an ANT took longer to rear birds to a specific weight and units that did not use ROX had a higher mortality.

ACKNOWLEDGMENTS

I thank M. Donohue and Agri Stats for kindly giving permission to utilize the AGRI STATS database.

REFERENCES

1. Chapman, H.D. Use of anticoccidial drugs in broiler chickens in the USA: analysis for the years 1995 to 1999. *Poultry Science* 80:572-580, 2001.
2. Chapman, H.D. and Z.B. Johnson. Use of antibiotics and roxarsone in broiler chickens in the USA: analysis for the years 1995-2000. *Poultry Science* (In Press).

INCIDENCE OF PATHOLOGICAL CONDITIONS IN CLINICALLY NORMAL BROILERS FROM DIFFERENT REGIONS OF THE USA

Hector M. Cervantes

Phibro Animal Health, 1031 Westchester Court, Watkinsville, GA 30677-2171

Data collected during a 13-month period from routine broiler chicken health surveys from 3 geographical regions of the United States was averaged by region and the incidence of pathological conditions compared to determine if significant differences existed between regions. Region 1 averages included 3 companies from the southeastern United States, region 2 averages included 3 companies from the northeastern United States and region 3 included 2 companies from the western United States. Abnormal conditions or subclinical diseases normally recorded during our broiler chicken health surveys included the following:

1. Undersized birds, if a bird size is 75% or less than that of its group.
2. Bursa score, the bursa of Fabricius of each bird is exposed and measured with a Bursameter. The scores can range from 1-8 depending on the size of the bursa, the larger the bursa, the higher the score.

3. Active IBD, if the bursa of Fabricius of a bird is firm and/or turgid and covered with a transparent golden yellow gelatinous exudate.

4. Foot pad lesions (pododermatitis), if a bird has one or more lesion(s) that has/have ulcerated through the keratinized skin on one or both feet.

5. Oral lesions, typical lesions ranging from erosions to necrotizing ulcers are found at the base of the tongue, the roof of the mouth or the cranial esophagus. Scoring is based on the number and depth of the lesions. Erosions of the epithelium are recorded as mild lesions. Erosions and shallow ulcers are recorded as moderate lesions. Deep ulcerations filled with necrotic debris in the mouth or in the esophagus extending through the mucosa, muscle layer and serosa creating a perforation are recorded as severe lesions.

6. Tracheitis, this condition is graded according to its severity and recorded as mild, moderate or severe. A trachea having one or more of the following changes, serosal or mucosal hyperemia, a few mucosal petechia, or clear non-occlusive intraluminal mucous

accumulation, would be recorded as mild tracheitis. A trachea having numerous petechiae, echymotic hemorrhages, purulent intraluminal mucous, and irregular to slight flattening of cartilaginous rings would be recorded as moderate tracheitis. A trachea with hemorrhagic intraluminal mucous, diphtheritic membranes, a caseous mucous plug, and severe or total collapse of tracheal ring would be recorded as severe tracheitis.

7. Dehydration, when the subcutaneous tissue and musculature of the breast and thighs have a darker, red to purple color, appears drier and the skin is less pliable and separates from the musculature with greater difficulty than normal. Internally the organs and vessels are darker in color and urates are seen in the ureters, kidneys, and often in other organs and joints. The eyes are often recessed deeper into the orbit and the oral mucous is very sticky.

8. Inflammatory Process (IP), there are different stages and severity of this condition but any of the following would be recorded as IP; subcutaneous edema with golden to serosanguinous fluid which progresses to form dry plastic-like yellow plaques under the skin located over the hips or under the sides or ventral abdomen.

9. Tibial Dyschondroplasia (TD), an excessive or irregular shaped cartilaginous core that is observed by slicing off the medial surface of the proximal metaphysis and epiphysis of the tibia tarsus bone.

10. Ricketts, if a bird has a wider growth plate when the proximal end of its tibia is examined. No attempt is made to grade the severity of this abnormality.

11. Synovitis, if when the capsule of the tibia tarsus and metatarsus or the femoral-tibia tarsus joint is incised exposing the intra-articular joint space and an excessive amount of synovial fluid that is serosanguinous or purulent is found.

12. Femoral head necrosis (FHN), if when disarticulating a bird's hip the proximal end of the femur breaks off. If the cap of the femoral head separates during the disarticulation of the hip and stays with the acetabulum, this is not recorded as an abnormality.

13. Sudsy airsacs, if a small amount of tiny bubbles are present on the air sacs of a bird.

14. Airsacculitis, this condition is graded according to its severity and recorded as mild, moderate or severe. If a bird has slight cloudiness and vascularization of its air sacs and the presence of small amounts of fluid or yellowish exudate on its airsacs, it would be recorded as a mild airsacculitis. If a bird's airsacs are thickened and larger amounts of fluid or yellowish exudate are on them, it would be recorded as moderate airsacculitis. If a bird's airsacs are very thickened and contain even larger accumulations of

exudate, and/or if large accumulations of caseous material are found in its body cavity, it would be recorded as severe airsacculitis.

15. Colisepticemia, if the examination of the internal organs of a bird reveals the presence of a diffuse fibrino-purulent exudate around the heart (pericarditis), and/or the liver (perihepatitis), and/or polyserositis.

16. Ascitis, if the examination of the internal cavity of a bird reveals the presence of excessive amounts of a serogelatinous or serosanguinous fluid and/or hepatomegaly and cardiomegaly.

17. Retained yolk sac, when the yolk sac remains attached to the jejunum in birds 7 days old or older.

18. Proventriculitis, if the size of the proventriculus is at least one half the size of the gizzard and when examination of its internal surface reveals a loss of the normal architecture of the secretory duct papillae with or without hemorrhaging and thickening or thinning of the cross-section of the proventricular wall. No attempt is made to differentiate between proventriculitis and proventriculosis or any other proventriculopathy.

19. Litter eater, when a bird's gizzard is incised and 50% or more of its contents consist of litter.

20. Gizzard erosion, if an ulcer is found on the lining of the ventriculus. A mild score is given if one or more erosions are seen in the kaolin layer of the ventriculus giving the lining a rough appearance. A moderate score is given if the ulceration goes through the kaolin layer and exposes the underlying muscle. A severe score is given if the ulcer extends through the kaolin layer and erodes into the underlying muscle.

21. Coccidiosis, when a bird's intestinal tract is examined externally and internally for the presence of gross coccidial lesions and one or more lesions of one or more species of *Eimeria* parasites are found, the lesions are recorded individually and the bird is counted as positive for coccidiosis. Typical gross coccidial lesions consist of uneven villus thickening or atrophy with white/tan spots or streaks in the duodenum, petechia, villus atrophy, thinning of the intestine, uneven mucosal surface in the jejunum or a range of changes in the ceca consisting of slight mucosal thickening, hyperemia and thin watery contents to severe thickening and contraction with frank hemorrhage and bloody caseous cores.

22. Enteritis, when the internal contents of a bird's intestinal tract are examined and evidence of enteritis is found, regardless of the type. This condition is graded according to its severity as mild, moderate or severe.

23. Intestinal debris, when the internal contents of a bird's intestinal tract are examined and large amounts of a dry orangey mucous is found.

24. Worms, when the internal contents of a bird's intestinal tract are examined and tapeworms or round worms are encountered, the type of worm found is recorded individually and the bird is counted as positive for worms.

25. Feed passage, when excessive amounts of feed particles are found at the distal end of a bird's

ileum, this finding is recorded under this category. No attempt is made to categorize this finding as malabsorption and/or maldigestion.

26. Others, this category is used to include conditions not previously described but that may be prevalent at a particular location.

Table 1. The table shown below summarizes our necropsy findings by region:

Pathological condition(s)	Region 1	Region 2	Region 3
Average bird age (days)	30.30	33.96	28.57
Undersized	2.50	1.67	1.11
Active IBD	0.25	0	0
Foot pad lesions	38.38	34.55	6.31
Oral lesions	36	8.15	9.13
Tracheitis	6.51	2.95	2.17
Dehydrated	0	0	0
IP	0.48	0.52	0
TD	6.01	3.23	3.85
Rickets	0	0	0
Synovitis	0.55	0	0.85
FHN	0.42	0	0.85
Sudsy air sacs	2.88	4.51	3.80
Airsacculitis	7.19	12.32	1.55
Colisepticemia	0.55	1.18	1.30
Ascitis	1.88	1.57	1.96
Retained yolk sac	12.55	11.83	11.66
Proventriculitis	5.52	9.70	3.83
Litter eater	1.80	1.55	2.43
Gizzard erosion	11.54	20.81	10.96
Coccidiosis	30.05	25.44	21.29
Enteritis	18.87	27.41	18.42
Intestinal debris	4.74	6.25	12.56
Roundworms	0	0	0
Tapeworms	3.43	0	0
Feed passage	4.93	2.51	9.15
Bursa scores	4.06	4.15	4.44

Significant observations made from the data collected and reported here, can be summarized as follows:

1. The incidence of undersized, active IBD, synovitis, femoral head necrosis, sudsy air sacs, colisepticemia, ascitis, retained yolk sacs, litter eaters, and bursa scores, was approximately within 1% from each other for all regions.

2. No birds with signs of dehydration, rickets or roundworms were found from any region.

3. The incidence of footpad lesions (pododermatitis) was noticeably higher in birds from the southeastern and northeastern regions. No particular reason for this difference is apparent.

4. The incidence of oral lesions was similar in birds from the northeastern and western regions but

much higher in birds from the southeastern region. Source of cereal grains used in feed formulation, cereal and feed storage conditions and differences in geographical environmental conditions may be at least partly responsible for the variation found between regions.

5. The incidence of tracheitis was similar in birds from the northeastern and western regions but more than double in birds from the southeastern region. No particular difference for this difference was apparent.

6. The incidence of TD was similar in birds from the northeastern and western regions but nearly twice as high in birds from the southeastern region. No particular difference for this difference was apparent.

7. The incidence of airsacculitis was highest in birds from the northeastern region, intermediate in

birds from the southeastern region and lowest in birds from the western region.

8. The incidence of proventriculitis was highest in birds from the northeastern region, intermediate in birds from the southeastern region and lowest in birds from the western region.

9. The incidence of gizzard erosions was similar in birds from the southeastern and western region and nearly twice as high in birds from the northeastern region.

10. The incidence of coccidiosis was highest in birds from the southeastern region, intermediate in birds from the northeastern region and lowest in birds from the western region.

11. The incidence of enteritis was similar in birds from the southeastern and western regions and higher in birds from the northeastern region.

12. The Incidence of intestinal debris was highest in birds from the western region, intermediate in birds from the northeastern region and lowest in birds from the southeastern region.

13. Tapeworms were found only in birds from the southeastern region.

14. The western region had the highest incidence of birds with signs suggestive of maldigestion and/or malabsorption, the incidence in birds from the southeastern region was intermediate and in birds from the northeastern region was lowest.

ACKNOWLEDGEMENTS

The author wishes to recognize the assistance of Dr. Brett Hopkins with the description of the necropsy lesions.

DIAGNOSTIC PATHOLOGY AND ULTRASTRUCTURE OF AVIAN DISEASES

Ferenc Ratz¹, Ma. Teresa Casaubon², Tamas Fehervari², José A. Quintana²

¹Department of Histopathology and Electronmicroscopy, Central Veterinary Institute. 1149 Budapest XIV Tábornok u. 2 Hungary

²Department of Animal Production: Poultry, Faculty of Veterinary Medicine and Zootechnique, National Autonomous University of Mexico, Av Universidad 3000 Mexico City, Mexico 04510

SUMMARY

The use of electron microscope in diagnostic pathology is discussed. The negative staining method versus positive block method are compared and the advantage of the use of light microscopic examination guided electron microscopic survey is also demonstrated in case of some important virus diseases as reticuloendotheliosis, EDS76, infectious laryngotracheitis, inclusion body hepatitis.

The electron microscope (EM) was invented by the German researchers E. Ruska and M. Knoll in 1931 but its use in biological research began only twenty years later. However, further ten years were needed to lay down the ultra structure of the animal and plant tissues and cells. The knowledge of normal ultra structure opened the gate for the study of pathological changes occurred inside the cell giving opportunity for the interpretation of infection procedure in molecular level.

The EM can be used not only in research but as a tool for diagnostic purpose. In this case efficacy and promptness are very important factors to provide diagnosis as soon as possible. These properties however are not always typical for the electron microscopic study because the preparation, selection of right part of the sample usually requires a quite long period. To reduce the preparation time and to get

higher efficacy samples have to be fixed with a reagent suitable for both, light and electron microscopic study and lesions should be selected first in histological slides ("selection") and evaluate through light microscope ("guidance"). The method is known as light microscopic (LM) examination guided electron microscopic survey. It makes possible that only those parts of the damaged tissue section or cell will be submitted for EM study where previous LM examination suggests the presence of ultra structural lesion or viruses, bacteria. In technical term, electrically slightly frozen then cut, stained and evaluated tissue sample is laid down again on the original sample where the histological cut came from and for electron microscopic study only the desired part is selected under stereo microscope.

Tissue samples can be studied in ultra thin slides called positive staining (block) method or in suspension called negative staining method. The last one gives the possibility to analyze the form, morphology and structure of bacteria, viruses or fungi. Cells of tissue culture and bacteria obtained from cultures can be excellently studied by the sedimentative centrifugation followed by fixation and embedding in agar because the jellified agar allows handling samples like any conventional histological preparation.

In a diagnostic work, the EM is used mainly for two purposes:

1. Demonstration of presence or absence of infectious agent,
2. Determination of the structure and analysis of inclusion bodies (IB).

The first purpose can be reached by using either negative staining or block methods. Both of them requires a relatively high (minimum 10^6) virus concentration in the sample. Since in case of natural infections, high virus concentration cannot be often found in the organs the method should be more efficient if it is combined with virus isolation either in chicken embryo or in cell culture where virus concentration often exceeds 10^6 .

Negative staining method is the most common to detect any avian virus. In case of negative staining, virus or other microorganism, mainly originated from culture samples, is sedimentated by centrifugation and

the sediment (pellet) is used for EM analysis. The immune electron microscopic preparation is also a useful method when pellet is mixed with specific hyperimmune serum then analyzed by EM. This method is often used to detect adeno viruses, e.g. EDS'76 virus. The block method requires cells from organ tissue or from cell culture and cell degeneration, virus replication can be found in infected cells. The block method is used to detect retroviruses, amongst others REV.

The study of inclusion bodies by EM is a very important method for determining if IB is related to virus infection or not. In this case only one or two cells are investigated therefore the use of LM examination guided EM survey is recommended. This method is applied in case of infectious laryngotracheitis, inclusion body hepatitis and avian pox infection.

ANALISIS DE LA SITUACIÓN DE LA AVICULTURA MEXICANA Y NORTEAMERICANA PRODUCTORA DE CARNE DE AVE EN EL PERIODO 1990-1999

ANALYSIS OF THE MEXICAN AND THE US BROILER INDUSTRIES: 1990-1999

Trueta S.R, Alonso P.F. Y García B.G.

Departamento de Administración y Economía. Facultad de medicina Veterinaria y Zootecnia. Universidad Nacional Autónoma de México. Ciudad Universitaria, Coyoacán. C.P. 04510, México, D.F. Teléfono 56-22-59-05. Fax 56-22-59-05.

SUMMARY

This paper analyses some discrepancies between the Mexican and the US poultry industries between 1990 and 1999. In 1998 broiler meat production in the US was equivalent to 7.93 times that of Mexico. In 1990 per-kilo production cost for Mexican integrations was 27% higher than that in the US. US *per-capita* consumption was 2.01 times that of Mexico. It is concluded that the decision of entering NAFTA in the poultry sector was wrong, and nothing has been done to alleviate the problems caused by these disparities.

RESUMEN

El trabajo analizó algunas asimetrías entre la avicultura mexicana y norteamericana en 1990 y 1999. En 1998 la producción de carne de pollo en EUA fue 7.93 veces mayor a la mexicana. En 1990 el costo de producción de un Kg de carne de pollo para avicultores integrados nacionales fue 27% superior a los estadounidenses. El consumo de carne de pollo per cápita en EUA fue 2.01 veces más que en México. Se concluye que la decisión de entrar al TLCAN en

avicultura fue inadecuada y no se ha hecho nada por paliar los problemas por asimetrías.

INTRODUCCIÓN

La desregulación y privatización, la competencia internacional y la apertura comercial, han sido algunos factores significativos de la política económica mexicana que han obligado a la reestructuración del aparato productivo nacional, incluyendo al avícola. En cuanto a la política agropecuaria nacional se han hecho importantes esfuerzos para dejar de apoyar a los consumidores vía precios de mercado, eliminando precios oficiales tope de la mayoría de bienes de la canasta básica, incluyendo al huevo; y por el lado del productor, eliminando subsidios a insumos estratégicos como el sorgo.

Por otro lado, el comercio avícola mundial ha sufrido modificaciones sustanciales tanto en su competitividad como en sus valores agregados que han impactado en los procesos productivos de las economías agrícolas, donde las relaciones del sector pecuario con el sector industrial y de servicios son cada

vez más intensas a través de integraciones horizontales y verticales, colocando a nivel de anaquel productos avícolas con alto valor agregado. Este alto valor agregado exige, entre otros aspectos, alta calidad higiénica, siendo esto un reto para países emergentes como México que se resolverá estableciendo normas sanitarias.

La avicultura nacional productora de carne de pollo es la actividad del subsector pecuario que presenta una mayor expansión productiva, ya que de 1990 a 1999 la Tasa Media de Crecimiento Anual fue de 9.7%. Los ciclos cortos de producción, el aprovechamiento de la infraestructura productiva avícola ociosa, la conformación de grandes consorcios avícolas en donde no tenían presencia y un aumento de demanda por carnes blancas, fueron algunos de los factores que permitieron esa T.M.C.A tan alta.

La avicultura estadounidense, la más poderosa del mundo, productora de carne de pollo; produjo en 1998 la cantidad de 12.7 millones de ton., es decir, el 28% de la producción mundial. Asimismo, y a raíz de la firma del Tratado de Libre comercio de América del Norte (T.L.C.A.N.) con Estados Unidos de América (E.U.A.), la avicultura mexicana (permeada de capital foráneo) enfrenta retos muy fuertes en el ámbito de comercio internacional con los Estados Unidos de América, entre algunos de estos retos están: la diferencia a favor de los estadounidenses en la provisión y calidad de los recursos naturales, humanos, de capital y financieros; mayores rendimientos de granos forrajeros que los obtenidos en México con índices pluviométricos menores y los cuantiosos apoyos directos e indirectos que reciben los avicultores estadounidenses que les permiten vender más barato.

Asimismo, y en el marco internacional, el gobierno norteamericano considera que las negociaciones en el comercio internacional agropecuario son más importantes al interior de la Organización Mundial de Comercio (O.M.C.) que en el T.L.C.A.N. Además, la política de comercio exterior de E.U.A. funciona subordinada a la política agropecuaria interna y esta última a partir de políticas de largo plazo. Por otro lado, la producción de carne de pollo en U.S.A y en México, se llevan a cabo en condiciones técnicas, económicas, sociales, políticas y jurídicas diferentes; configurando fuertes asimetrías entre ambas.

Ante este panorama general, se analizan algunos aspectos productivos-económicos de la aviculturas mexicana y norteamericana productoras de carne de ave en el periodo 1990-1999.

MATERIAL Y MÉTODOS

Se obtuvo información de fuentes secundarias, libros, revistas, y anuarios estadísticos. Parte de la información se procesó mediante la fórmula:

Donde T.M.C.A es la Tasa Media de Crecimiento Anual, V.F es el valor final, V.I. el valor inicial y n el número de años en estudio.

$$T.M.C.A = \sqrt[n]{\frac{VF}{VI}} - 1 * 100 \quad \text{ó} \quad T.M.C.A = \left[\frac{VF}{VI} \right]^{1/n} - 1 * 100$$

DESARROLLO

En 1993 la producción mundial de carne de pollo fue de 28.4 millones de ton., en ese mismo año los Estados Unidos de América produjeron 9.9 millones de ton., es decir, el 34.85% del total mundial; mientras que México produjo en ese año 1.04 millones de ton., el 3.66% de la oferta mundial. Visto desde otra perspectiva, la producción de carne de pollo de México fue del 10.10% con respecto a la producción de los Estados Unidos.

En 1993 la producción de carne de pollo de Estados Unidos fue de 9.52 veces superior a la producción nacional.

Para 1998 la producción mundial de carne de ave se ubicó en 37.7 millones de ton., en ese mismo año, Estados Unidos produjo 12.7 millones de ton. de la oferta mundial de carne (un tercio de las existencias mundiales), para ese año, México produjo 1.6 millones de ton., aportando el 4.24% de las disponibilidades mundiales. En ese año (1998) la producción estadounidense fue 7.93 veces mayor a la mexicana, acortándose la diferencia con respecto a 1993.

De 1988 a 1998 la T.M.C.A de la producción de carne de ave en los Estados Unidos fue del 3.27%, en México, en ese mismo periodo fue de 7.07%, esto explica la reducción en el número de veces superior en el volumen de producción de carne de pollo de Estados Unidos en relación con México. Además, la difícil situación vivida por México durante la década de los 80's y 90's determinaron que los consumidores modificaran en cierta medida su consumo a favor de carne de pollo sacrificando sobre todo, el consumo de carne de cerdo y res.

En 1999 el 93.4% de las empresas avícolas norteamericanas contaban con plantas de procesamiento adicional (tercera fase de producción que aporta un mayor valor agregado) en tanto que en México solo tres empresas contaban con ese proceso representando un porcentaje muy bajo.

Esta diferencia no es evidencia de una menor competitividad de los productores nacionales, son de un patrón de demanda radicalmente diferente; mientras en Estados Unidos la demanda de productos con procesamiento adicional ("nuggets", budines de pollo, pechuga rellenas de jamón y queso, alimentos preparados, etc.) ha crecido vertiginosamente; en México, aunque en los últimos años se ha

incrementado notablemente el consumo de estos productos avícolas con un importante valor agregado, el 60% de la producción de pollo se comercializó en la presentación de procesado en mercado público (42% presentación pollo vivo y 18% presentación mercado público) y solamente el 9% presentación supermercado.

La capacidad total de sacrificio de pollo en México en 1998 fue de 881.1 millones de aves; en Estados Unidos la capacidad total comparable fue de 8,641.6 millones de pollos, es decir, 9.8 veces la nacional.

En el periodo de 1990-1999 el uso de la capacidad instalada en México fue de 91.5% en promedio. En Estados Unidos este indicador se situó en 1999 en 96%. Este comportamiento se explicó fundamentalmente por el aumento de la demanda en esta actividad tanto en México como en Estados Unidos.

En 1990 la capacidad instalada (productiva) ociosa de Estados Unidos representó más de la mitad de la capacidad total instalada en México.

En 1990 el costo de producción de un kg. de carne de pollo en México, para productores que fabrican su alimento, fue 27% superior al correspondiente a los Estados Unidos. Para el caso de productores nacionales con compra de alimento balanceado en el mercado, el diferencial fue del 37%. El diferencial fundamental se debe a los costos de alimentación.

El consumo de carne de pollo por habitante en los Estados Unidos en 1990 fue 2.5 veces superior al de México en 1990 el consumo en Estados Unidos fue de 30 kg. por persona, en México de 12 kg. por habitante. En 1998 la diferencia disminuyó a 2.01 veces el Consumo Nacional Aparente de carne de ave en Estados Unidos fue de 38.1 kg. por persona, en México de 18.92 kg. en ambos países se registró una tendencia creciente en el periodo de 1990-1998 ya que la T.M.C.A en Estados Unidos fue (3.03%) y en México de (5.85%) de ahí se explica que el número de veces se haya reducido de 2.5 a 2.01. El dinamismo en el consumo de carne de pollo tanto en Estados Unidos como en México se explica por el cambio en las preferencias de los consumidores, los cuales, vienen sustituyendo carne roja por blanca. Además por el incremento en la participación de carne de pollo en los mercados de alimentos preparados "fast food" y por la disminución en el precio relativo del pollo, como resultado de un incremento en la eficiencia productiva del sector y por la crisis económica.

En cuanto al índice de conversión, se observó que en México se requirió en 1999 de 2.2 kg. de alimento

para producir 1 kg. de carne de ave, esto en las empresas integradas, mientras que en Estados Unidos se requirieron solamente de 2.0 kg., es decir, se utilizó en México un 1.0% más de alimento y un 20% más para los productores no integrados. Otro indicador técnico relativo a productividad es el número de ciclos productivos por año. Mientras que en México la producción de pollo tuvo como promedio en 1998 5 ciclos, en Estados Unidos el número de ciclos por año fue de 6.4 .

CONCLUSIONES

Ante las fuertes asimetrías entre las dos aviculturas con grandes ventajas comparativas estadounidenses es necesario que la avicultura nacional se esfuerce para elevar su nivel de productividad, hacer mucho más eficientes sus canales de distribución, cumplir con estándares ambientales, mejorar la organización interna de la actividad, lo que exigirá de fuertes inversiones, que hasta ahora se han frenado por escasos y selectivos recursos financieros y además a un alto costo y un amplio margen de intermediación financiera. Por otra parte, el Estado mexicano debe adoptar una política que impulse la competitividad avícola. Así mismo, manejarse con una visión en cadena, donde las interrelaciones entre sector primario, secundario y terciario no solamente se den entre los grandes consorcios avícolas, además con la organización de pequeños y medianos avicultores.

La decisión de entrar a avicultura al T.L.C.A.N. fue inadecuada y no se ha hecho nada para paliar los problemas que representan las asimetrías.

REFERENCIAS

1. Alonso, P.F. La avicultura en México 1975-1998. Centro Mexicano de Estudios Sociales –Debate-Propuesta A.C. 2000.
2. Estudio de la Posición del Sector Avícola para la Negociación del Acuerdo de Libre Comercio México – Estados Unidos. Grupo de Economistas y Asociados. Unión Nacional de Avicultores. 1991.
3. Situación Actual y Perspectivas de la Producción de Carnes en México 1990 –2000. Centro de Estadística Agropecuaria. Secretaría de Agricultura, Ganadería, Desarrollo Rural, Pesca y Alimentación. 2001.
4. Situación Actual y Perspectivas de la Producción de Pollo En México 2000. Centro de Estadística Agropecuaria. Secretaría de Agricultura, Ganadería, Desarrollo Rural, Pesca y Alimentación. 2001.

EL COMPORTAMIENTO DE LAS IMPORTACIONES DE CARNE DE POLLO EN EL PERIODO 1994-1999 EN EL MARCO DEL TLCAN

BROILER MEAT IMPORTS WITHIN THE NORTH AMERICAN FREE TRADE AGREEMENT (NAFTA): 1994-1999

Alonso, P.F.; García, B.G.

Departamento de Administración y Economía. Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia. Universidad Nacional Autónoma de México. Ciudad Universitaria, Coyoacán. C.P. 04510, México, D.F. Tel. 56 22 59 36.
Fax 56 22 59 37

SUMMARY

This paper analyses the behavior of broiler meat imports to Mexico during the 1994-1999 period, within the NAFTA framework. Results indicate that grandparent stock imports showed a yearly mean growth rate (*TMCA*) of 3.5%. Broilers grew 9.52%. Meat imports grew at a 10.79% *TMCA*. From 1994 to 1999 broiler/turkey meat paste imports grew at a 17.12% *TMCA*. Salty meat and cuts grew 5.82% during the period. It is discussed that high paste import rates have affected the Mexican swine industry.

RESUMEN

El trabajo estudió el comportamiento de las importaciones de carne de ave en México durante 1994-1999 en el marco del TLCAN. Los resultados indican que durante el periodo las importaciones para aves progenitoras fueron a una *TMCA* del 3.5%; en aves de abasto 9.52%. Las importaciones de carne crecieron a una *TMCA* del 10.79%. De 1994 a 1999 las importaciones de pasta de carne de pollo y pavo crecieron a una *TMCA* del 17.12%. Los trozos y carne salados crecieron en el periodo en 5.82%. Se discute que las altas importaciones de pastas han afectado a la porcicultura nacional.

INTRODUCCIÓN

De 1994 a 1999, la avicultura productora de carne fue la actividad de la ganadería que expendió en mayor medida su oferta. Los ciclos cortos de producción, el aprovechamiento de la infraestructura productiva ociosa y la conformación de grandes consorcios avícolas que se expandieron hacia entidades en donde no tenían presencia, han sido algunos de los factores que permitieron que la producción de carne de pollo creciera en un 53.77% en el periodo antes referido, pasando de 1.1 millones de ton a 1.7 millones de ton, expresando una Tasa Media de Crecimiento Anual (*TMCA*) de 8.98%. Este fuerte crecimiento productivo se canalizó prácticamente hacia el mercado interno.

A raíz de la firma del Tratado de Libre Comercio de América del Norte (TLCAN) con Estados Unidos de América (EUA), la avicultura nacional, permeada de capital foráneo, enfrenta retos fuertes como establecer una relación comercial diferente con el país (EUA) más poderoso en avicultura de carne siendo que su productividad es más alta que la productividad avícola mexicana. Asimismo la avicultura norteamericana presenta otras ventajas como son: diferencial a favor de ellos en provisión y calidad de recursos naturales, humanos y de capital, índices pluviométricos que en amplias regiones estadounidenses son del 100%, apoyos directos e indirectos que reciben los avicultores estadounidenses, así como integraciones verticales y horizontales hacia las cadenas de abastecimiento de insumos y en la comercialización con alto valor agregado de la mercancía a nivel de detalle.

La desaparición de cuotas y aranceles en enero de 2003, además de fortalecer la ya ancestral balanza comercial deficitaria avícola, es probable que acelere las acumulaciones y concentraciones de capital en la rama avícola reproduciéndolo y ampliándolo.

Ante este planteamiento se estudiara el comportamiento de las importaciones de carne de ave hechas por México en el periodo 1994 – 1999 en el marco del TLCAN.

MATERIAL Y METODOS

Se obtuvo información de fuentes secundarias de libros, revistas y anuarios estadísticos. Parte de la información obtenida se procesó mediante la fórmula:

Donde *TMCA* es la Tasa Media de Crecimiento Anual, *VF* es el Valor Final, *VI* el Valor Inicial y *n* número de años de estudio.

DESARROLLO

Las compras de aves en el mercado internacional durante 1999, y con respecto a 1998, mostraron una baja importante, es así que con referencia a aves para abasto directo o previa engorda, las importaciones bajaron de 6.7 a 2.4 millones de aves, es decir una

disminución del 64.17%. Con referencia a las importaciones de pie de cría (progenitoras), el volumen se desplomó de las 778 mil cabezas en 1998 a 555 mil cabezas en 1999 en sí una baja del 29%. Estas disminuciones en las importaciones se explica por una contracción del mercado nacional, al haberse eliminado o disminuido el efecto negativo de algunas enfermedades, como la Leucosis aviar, que afecta la productividad interna y obviamente la producción interna.

Cabe mencionar que la participación de las aves importadas para abasto en razón a la producción nacional de carne de pollo es muy pequeña representando menos del 1%, equivaliendo a 11,700 y 4,000 ton de carne en canal, respectivamente para 1998 y 1999.

Si se hace un análisis del periodo (1994 – 1999) la TMCA para aves progenitoras fue del 3.55% pasando de 466 mil a 555 mil, en lo referente a aves para abasto la TMCA en el periodo fue de 9.52%, ya que en 1994 se importaron 1.5 millones de aves, para 1999 las compras al exterior fueron 2.4 millones.

Por otro lado, las importaciones de carne (que incluyen canales y trozos de ave, ya sean refrigeradas, congeladas, salados o en salmuera y las pastas de pavo y pollo) crecen en el periodo (1994 – 1999) a una TMCA del 10.79%, pasando de 119 mil ton a 199 mil ton. En 1999 las 199 mil ton importadas se distribuyeron en 48.5% en canales y trozos de ave, ya sean refrigerados, congelados o en salmuera y el 51.5% por pastas de carne de pollo y pavo. Al interior del 48.5%, se observa que únicamente el 1.4% correspondió a aves enteras o canales y el 47.1% a trozos, contemplando en este porcentaje las importaciones de carne salada o en salmuera.

Estudiando la información por componentes de 1994 a 1999 se aprecia que la TMCA de pastas fue 17.12%, ya que se pasó de 47 mil ton importadas en 1994 a 103 mil ton en 1999. Mientras que la de trozos y carne salados o en salmuera fue de 5.82%, en 1994 las importaciones fueron 73 mil ton en 1999 de 97 mil ton.

Se observa que las pastas de ave presentan el mayor dinamismo, obedeciendo a la necesidad de adquisición de productos particulares para la industria empacadora, cuya producción al interior del país es

baja. Por otro lado la autorización del incremento de las cuotas de estas pastas se viene dando con el fin de atender la demanda de la planta elaboradora de embutidos y carnes frías.

DISCUSION

Aun cuando la avicultura nacional productora de carne de pollo es la actividad del subsector pecuario que más ha crecido, que su oferta de 1.7 millones de ton en 1999 se colocaron en el mercado interno y que las importaciones totales representaron en 1999 el 11.50% de la oferta nacional, no deja de preocupar la dinámica de importaciones de canales y trozos de ave que han crecido a una TMCA del 10.79% en el periodo de estudio, por eso la importancia de una política prudente en la asignación de cupos para importación.

A la fecha las importaciones de pie de cría presentan un tamaño suficiente para abastecer el proceso de engorda.

En el 2000 el total de importaciones ascendió a 210 mil ton, 3% superior a lo reportado en 1999, con lo que su participación en el componente del Consumo Nacional Aparente fue del 10%.

Con respecto a la Balanza Comercial avícola para el 2000 se presenta altamente deficitaria en 206, 000 ton. El hecho que haya importado (210 000 ton) mucho más que lo que se exportó (4,000 ton) implica que se dejan de crear empleos directos e indirectos, así como efectos multiplicadores al interior de la actividad avícola y de la rama porcina ya que las importaciones de pastas han afectado a esa rama.

REFERENCIAS

1. Alonso, P.F. La avicultura en México 1975 – 1998. Centro Mexicano de Estudios Sociales – Reflexión – Debate – Propuesta A.C. 2000.
2. Situación Actual y Perspectivas de la Producción de Carnes en México 1990 – 2000. Centro de Estadística Agropecuaria. Secretaría de Agricultura, Ganadería, Desarrollo Rural, Pesca y Alimentación. 2001.
3. Situación Actual y Perspectivas de la Producción de Pollo en México 2000. Centro de Estadística Agropecuaria. Secretaría de Agricultura, Ganadería, Desarrollo Rural, Pesca y Alimentación. 2001.

NEW TECHNOLOGY FOR THE POULTRY INDUSTRY - THE ESSENTIAL COMPONENTS OF SCIENCE AND ECONOMICS

NUEVA TECNOLOGÍA PARA LA INDUSTRIA AVÍCOLA – LOS COMPONENTES ESENCIALES DE LA CIENCIA Y LA ECONOMÍA

Donald Bell

Cooperative Extension, University of California, Highlander Hall, Riverside, CA 92521

RESUMEN

La industria avícola ha sido punta de lanza en avances tecnológicos desde que, en sus albores, se adoptaron los principios científicos del cruzamiento (genética), el establecimiento de las especificaciones bien definidas de las necesidades alimenticias (nutrición), y el uso de computadoras desde un principio para formular raciones de alta eficiencia y elevado valor nutricional, además de facilitar la selección de las estirpes de aves capaces de alcanzar niveles increíblemente altos de eficiencia para transformar los ingredientes del alimento en productos para el consumidor, tanto huevo como carne, a razón de menos de 2 Kg de alimento por 1 Kg de producto. Detrás de estos resultados están los esfuerzos de cientos de científicos que han dedicado su vida a comprender y mejorar la industria avícola mundial. Gracias a sus esfuerzos, las aves y sus productos son siempre altamente preferidos por los consumidores en todos los países.

ABSTRACT

The poultry industry has been at the forefront of technological advancements since the early adoption of scientific breeding principles (genetics), the establishment of highly defined nutritional requirement specifications (nutrition), and the early use of computers to formulate highly efficient and nutritious feeds and to facilitate the selection of strains of chickens capable of unbelievably high conversion of feedstuffs to consumer products - both eggs and meat at less than 2 pounds of feed per 1 pound of product. Behind these results are the efforts of hundreds of scientists who have dedicated their lives to the understanding and betterment of the poultry industry of the world. Through their efforts, poultry and poultry products are consumed at all-time high levels by consumers in all countries.

INTRODUCTION

Just what is science? Traditionally, science was thought to include physics, chemistry and biology. Through the years, additional disciplines were added until today, we include subjects such as computer

science, social science, engineering science and yes, even poultry science among a long list of others. Of the many definitions found in different dictionaries and encyclopedias, the one that attracted me most was: “**The search for knowledge and understanding**”.

As you can see, the emphasis is on the process and not necessarily the discipline.

Associated with the word science, is the concept “**Scientific method**”. This is an equally important subject to the discussion to follow. Webster defines it as “the principles and procedures for the systematic pursuit of knowledge involving: the recognition and formulation of a problem, the collection of data through observation and experiment, and the formulation and testing of hypotheses”.

The discussion that follows will emphasize 1) the need and the search for knowledge, 2) the research community, 3) research methods, 4) sources of information, 5) information transfer, 6) adoption by the ultimate user, 7) evaluation of its worth, and 8) scientific tools for the future.

THE NEED AND THE SEARCH FOR KNOWLEDGE

New technology must result in higher flock performance, greater efficiencies in converting feed to eggs and meat, better working conditions for employees, improvements in the health and well-being of flocks, higher quality and safe egg and meat products, fewer environmental problems for neighbors and finally, a reasonable economic return for the farmer’s efforts. These are the measures that must be applied to the results of making change.

Significance of New Technology. “Significance” of this new technology implies:

1. Scientific significance - are the observed results simply a chance happening and can they be repeated?
2. Social significance - how is society affected by the adoption of the new practice?
3. Economic significance - have all economic consequences been properly considered and is the net effect still favorable?

THE RESEARCH COMMUNITY

Traditionally, research has been the responsibility of the educational and research universities in our society. In recent years, though, commercial industry and even farmers have discovered a role for themselves in pursuing new basic and applied knowledge. Many agricultural companies have multi-million dollar research programs with large staffs and excellent facilities.

In general, university research is more of a basic nature with emphasis on the fundamental processes. Through their Extension Services, applied, problem-solving research is emphasized.

Industrial research is usually product-oriented and is commonly protected by patents and copyrights. The emphasis is on the production of unique salable products.

At the production and/or processing sites, new ideas and products must be evaluated using acceptable scientific procedures. A casual observation that something works better than something else is not sufficient evidence to adopt the concept. True research requires repeated examination of relationships under random and controlled conditions, hopefully comparable to the conditions under which it will be applied.

The researcher or developer should always be concerned with the possibility of interacting factors which may change the outcome of the research. Will the concept succeed with different strains and breeds? Will it work as effectively under high and low temperature conditions? Will it have a comparable advantage when applied to different nutritional programs?

The scientist or developer must examine all relevant performance traits in determining the merits of a new concept. It's not enough to measure rates of egg production, egg size, mortality and feed consumption if eggshell quality is significantly affected by the treatment. Total mortality may not measure the net effects of mortality if different "patterns" of mortality exist.

And, finally, improvements in performance traits may not result in improvement in economic results. Nutritionists would not be needed if maximum performance was the goal. Once a good ration was developed, it should last for all times. The nutritionist's role, though, is to develop the most economic feeding program under varying conditions and to do this, some elements of performance may have to be sacrificed, ingredients may have to be altered, and new values used.

Egg production rates could be improved easily by increasing cages space allowances but this may result in less total farm profits. Single cycle egg production is associated with higher egg production rates and

improved feed efficiency, but replacement costs are higher. Increasing the "bottom line" must be the objective of adopting new technology.

RESEARCH METHODS

All scientists (researchers) approach problems and the development of solutions in a similar manner. It is through this methodology that new knowledge and solutions for problems are obtained. Listed below are some of the problem-solving techniques used by the scientific community.

Hypothesis: a tentative idea as to how facts are interpreted and explained

Experiment: a research tool used to discover something unknown or to test a principle or hypothesis

Randomization: treatments are given an equal (unbiased) chance to be in a given house (row, deck, location)

Replication: a treatment is repeated two or more times to provide a measure of variation.

Variation: differences in results due to either a treatment difference or natural differences between apparently similar individuals (flocks, houses, etc.). Normal variation within an "untreated" population must be measured in order to understand the differences observed in the treated population. When graphed, most biological data fit a mathematically defined curve called the normal frequency (distribution) curve.

Analysis of Variation: a test comparing the variability within samples (replicates) of a common treatment versus the variability of replicates between treatments.

Probability: a comparison of the observed frequency with the amount expected purely by chance. In flipping a coin there would be a probability of 0.50 (half the times) that heads would come up. In scientific research, a probability of 0.05 would indicate that results of the nature observed would be expected by chance (not due to treatment) five times out of one-hundred. In other words, there would be a strong indication that the results were the result of the treatment studied (feed, strain of birds, or other variable).

Correlation: is defined as the degree of relationship between two or more items. For example how is the price of eggs affected by the volume of production. A related term is the R^2 of a regression line "fit". A perfect fit is 1.0, a good fit might be .85, or a poor fit might be only .35. It is a measure of the degree of variability which can be attributed to the item being studied.

Regression (linear, curvilinear): an additional unit of input will yield an increasing (positive) or decreasing (negative) production of output in a proportional manner (linear) or changing manner

(various curvilinear shapes). An example would be an increase in body weight gain as temperature decreases within a mid-range of normal temperatures - this would be a linear curve. If extremely cold and hot temperatures were included, body weight gain would eventually drop at both extremes and the resulting regression curve would be curvilinear or U-shaped.

Repeatability: a measure of the likelihood that results will come out in the same direction and/or magnitude when a “test” is repeated.

Interaction: results are not of the same magnitude or direction when two or more factors are involved at a time. For example, Strain A reacts positively to fewer birds per cage while Strain B reacts negatively.

Surveys - yield frequencies of individual measurements within a population, various averages can be calculated. Large data bases from commercial farms can be assembled and relationships between factors can be determined. This is a very effective substitute for smaller highly controlled experiments on university farms.

Separation of Means (averages): statistical procedures which separate individual statistically significant different results within a ranked set of results.

Comparison: in the simplest form, this is how farmers usually “test” methods and products. Regardless of the size of the house or flock, two houses or flocks will differ by chance and no real reliable determination of treatment differences can be assumed.

Comparison results, though, can be strengthened by the use of repetition. Repeatable results in the same direction can be used to evaluate treatments.

Laboratory Research: carefully controlled experiments where all variables other than the one being tested are held alike as possible. Laboratory experiments usually involve smaller groups with replication of treatments and controls, but sophisticated measurements of physiological change, micro-nutrients concentrations, and bird behavior. The birds and/or environment may be instrumented for continuous recording of temperatures, relative humidity, gases and light patterns. Ingredients and finished diets may be exhaustively tested along with feed consumption levels to determine the precise intake level of all nutrients. Video cameras may be employed to record the effects of a treatment on bird reactions.

Publication of Research Results: a key element of any research is to publish the results in a “refereed” publication reviewed by one or more scientists within the same discipline field. This procedure results in a critical review of experimental design, procedures and results. It also assures that the experiment was conducted within the context of other similar studies.

SOURCES OF INFORMATION

Basic flock management programs should be patterned after the recommendations of the poultry breeder wherever possible. These guidelines are tailored to the unique requirements of the strain involved and have been developed after years of research and experience. In some cases, though, local conditions (disease, economics, environment) may justify departing from the breeder’s recommendations. This should only be done after consulting with other reputable advisors.

Each breeder has developed performance standards for their birds which provides the user with a very useful comparison tool. Flock performance which differs from these standards should be studied for possible correction. Performance standards for feed consumption and egg size are usually not too useful since few breeders attempt to make adjustments for seasonal effects, thus making comparisons difficult..

Other sources of information include books, magazines, university publications, professional journals and newsletters. Hundreds of such publications exist and are available in a wide assortment of different languages.

Electronic communications and information retrieval in today’s poultry industry. E-Mail is a concept that none of us could have imagined just a few years ago. Who would have thought we could sit in our offices and have instantaneous communications back and forth with someone on the other side of the globe at essentially no cost? That’s what e-mail has given us.

Web-sites, on the other hand, have given us access to thousands of information sources directly applicable to our specialized interests. A feature on the Internet is the “bookmark” which allows on to select favorite sites with hundreds of sites with usable information on poultry. Each of these sites, in turn, have multiple “links” with other sites which multiply your connections to additional sources of poultry information.

Sites are available from all major universities, private companies, government, trade associations, and professional societies - to name just a few. The University of California Cooperative Extension site’s address is:

animalscience.ucdavis.edu/extension/avian
(Reference #1: Bell, 2000)

INFORMATION TRANSFER

The transfer of knowledge is defined as “the conveyance of information or goods from individuals, companies, or nations that have possession of such knowledge to other parties who may benefit from receiving it”. This may be as simple as exchanging ideas between neighbors to ones that require complex

international agreements. It involves many cultural and economic considerations which may facilitate or impede the transfer.

Today, ideas are more available than at any time in the past. We live in a global business where producers and suppliers have almost instantaneous access to what people are doing elsewhere. At no time in the past has there been so many management options to consider - multiple products and solutions for every problem. The key word is "problem" - does a problem actually exist?

Before transfer is accomplished, the recipient must decide whether or not he is in the market for new technology. This can only be assessed by knowing where the company is today. If the communicator's concepts are said to be superior to those in use, the customer must be very critical in accepting them at "face value". Results with referrals of successful commercial applications should be required.

The rate of transfer is governed by the nature of the advantages associated with the idea or product. Users have their own pace for accepting new concepts. Automatic feeders have been in existence for 50 or more years, but recent surveys in the US have shown that 16% of egg production farms still prefer to use hand feeding systems. Belt egg collection systems have also been in use for 50 years, but approximately 1/3 of all eggs are still gathered by hand. (Reference #2: Anonymous, 2000).

Technological "break-throughs" are not common but, when they solve widely recognized problems at relatively low cost, changes are fast and as a result, we have temporary disruption in our industries. An example of this is when a vaccine became available for Marek's Disease. Producers had to make immediate adjustments in flock size in order to compensate for the lower mortality rates; otherwise, chronic over-production would have resulted.

Other examples of sudden change include: shifting to brown-egg layers almost over-night in parts of the world, changing egg size definitions and number of size classes, and the mandating of egg handling procedures beyond the capacity of our refrigeration systems.

The industry is faced with another sudden change when laws requiring modified, or the elimination of cage systems, are activated. With increasing space allowances and changing specifications, all of a sudden extremely efficient systems will no longer be allowed to operate. Even though enormous welfare and economic advantages can be demonstrated scientifically, public perceptions will be allowed to dictate management systems which have been proven over decades of use.

Impediments to the transfer of technology include:

1. Man's normal reluctance to change.
2. Certain technology has no place in some regions of the world. It's just not an economic practice under different conditions of prices and costs.
3. Nation's often protect their own industries by not allowing the import of technology. For example, the latest breeding stock from overseas is not allowed in.
4. Private or national funds are simply not available

(Reference #3: Filmer and Anderson, 1984)

The most important technology is almost always available except for the constraints listed above. Public research is readily available through membership in professional genetic, nutrition, health, engineering and food processing societies. A relatively small investment can gain a company almost instantaneous access to every public institution's research papers. Private information or products are generally available through purchase except for companies that develop their own procedures and technologies and use these to establish an advantage over their competitors.

The application of new technology involves three or more parties:

1. The researcher or individual who develops and tests a concept
2. The communicator who recognizes the merits of the concept and can effectively describe its potential.
3. The ultimate user who must verify its use within his company.

The **developer** of a new idea or product must have a "track record" of successful experiences if potential users are going to listen. This applies both to professional researchers and to private enterprises. The developer must have a thorough understanding of all factors which may affect the idea. This requires:

1. A knowledge of proper evaluation procedures
2. An awareness of interacting inputs which may affect its successful implementation.
3. A thoroughness of investigation
4. A concern for economics.

An understanding of the factors surrounding a "new concept" requires a total familiarity with how things were done in the past and the various options available in the present. This includes the options in use today in different regions of the world. Recommendation can and should draw from an international pool of experiences.

The second participant in the transfer of knowledge is the **communicator**. This includes: 1). the friend in another region who's also in the poultry business, 2). the sales person who communicates his observations collected during the past week of farm visits, 3). the poultry magazine editor who is always looking for new concepts, 4). The University Extension

poultry specialist who's charged with reviewing what's new and promising for the poultry industry.

Communicators are most effective when they operate on a one-to-one basis with people who they've had successful relationships with in the past. This relationship allows for a clear understanding of the needs of the poultry producer by the communicator through past contacts. Needs can be directed to mutually recognized problem areas.

The transfer of knowledge is very successfully accomplished by the popular poultry press. Producers rely on trusted editors to sort out the "wheat from the chaff" of new technology. Readers must also look for recognizable authors for the various articles. Some journals leave the listing of authorship to the end of the article, as if an after-thought; authorship should be listed at the front so that readers will know the source.

A third major way of transferring knowledge is through meetings, workshops, and seminars. Even though notable speakers may be on the program, the audience must take extreme care with the information if they plan to apply it under local conditions without careful study. Just because its interesting, doesn't mean it has a local application.

Today's communication techniques are so rapid and all-encompassing that users may find themselves "listening" to persons with a platform (Internet) but with no credentials (experience). The Internet has opened the door for the rapid transfer of both scientifically evaluated and anecdotal experiences.

The user must be cautioned to apply the same rules to this source of information as to the other sources previously discussed (Reference #4: Bell, 1988, Reference #5: Broekhuizen, 1988)

The third and final participant in the transfer of knowledge is the **ultimate user** who must make the decision that the information is worthy of use and has an economic potential. This individual must have an accurate awareness of his/her present position relative to the new concept and a willingness to accept the proposal that improvement may be possible.

Some producers are completely closed to new ideas - what's apparently worked well for years, does not need changing. Others are willing to try new ideas on a small scale with careful evaluation. And then, some want to try every idea that comes along resulting in a high degree of failure. Obviously, the intermediate approach is best.

ADOPTION BY THE ULTIMATE USER

Adding new technology to an established business requires a number of basic steps:

1. Introduction of the concept
2. Gather information and analysis
3. Small scale adoption
4. Large scale adoption

5. Continuous evaluation and comparison

What steps should be taken to implement a new program?

1. Develop program guidelines
2. Prepare a detailed written description
3. Monitor its applications (quality control)
4. Measure and evaluate results

How can you evaluate products or ideas?

1. Repeated comparison
2. Well designed tests in your own test house
3. Sponsorship of research
4. Use of knowledgeable consultants

Division managers must document, monitor and defend practices to higher levels of management.

Application of New Technology. Once an idea or product is applied, the user must continually monitor its application. Are results consistent? Does the user apply the concept exactly as the developer recommends? Does the product continue to improve over time e.g., strains of chickens? Are other options continuously considered?

Technology is not a static issue. If this were so, egg production standards would not have increased by 2 eggs per hen per year. Mortality rates would still be in excess of 1% per month compared to less than one-half of that today. It would still take 8 weeks to grow a 4 pound broiler.

EVALUATION OF ITS WORTH

The performance of laying flocks is commonly evaluated by a variety of measurements. These usually include hen-day egg production, hen-housed egg numbers and mortality. More careful evaluators include egg weight, feed consumption and various measures of egg quality.

Emphasis on only one or a few measurements can often lead to the incorrect evaluation of a strain, a program or a product being tested. Oftentimes, one positive trait is partially or totally offset by an accompanying negative trait. For example, high peaks of egg production may be associated with lower egg production rates further on in the egg production cycle. Large eggs may be associated with an excessively high feed consumption level. High mortality totals may have a more or less significant impact because of when the birds die.

Similar examples can be illustrated for the selection of programs. High house temperatures result in extremely good feed efficiencies, but may adversely affect average egg values because of lower egg weights. Crowding may reduce egg numbers and increase mortality on a percentage basis, but economic returns may be enhanced. Flock recycling may reduce egg production rates and house utilization, but overall returns for the facility may be higher. The issue is "are

you placing the proper emphasis on various performance traits or are you emphasizing traits which only “appear” to be beneficial?

Traditional approaches for analyzing flock performance, one trait at a time, must make way for more complex techniques which bring the economics of the issue into proper focus. Researchers as well as egg producers must evaluate multiple traits and this can be done only with representative economic values. Over-emphasis on one performance trait over others can and does often lead to erroneous conclusions regarding strain selection, recommendations followed, and products purchased. Today’s low margin industry can not live with errors of interpretation of this type.

Important relationships relative to products and management practices should be re-examined from time to time under new price and cost combinations to be sure that good technology is not lost to the industry because “at one time it was not a sound economic practice.” Likewise, the economic circumstances in one region or in one country may not justify the use of technology that is widely accepted in other regions or countries. Sound economic analyses are required to make sure that our use of technology is justified.

Technology which may have been discarded for economic reasons sometime in the past, should be re-evaluated for their current economic justification when prices and costs have changed. Costs of labor and equipment alternatives need to be re-evaluated as costs change. Replacement programs should be re-visited as replacement and feed costs increase and as egg prices change. Cage densities may have to be adjusted as buyers become more involved with the management of the flocks from which they purchase eggs.

SCIENTIFIC TOOLS FOR THE FUTURE

Dr. W.B. Roush, Department of Poultry Science at Pennsylvania State University, has recently reviewed a number of existing decision-making systems which are currently being used or will be so in the near future by forward-thinking businessmen. Those in limited current use include: statistical analysis (see above), linear and non-linear programming, integer programming, multiple objective (goal) programming, decision analysis, waiting line (queuing) models, dynamic programming, and the Markov analysis. In the not-too-distant future, neural network computing, genetic algorithms, fuzzy set theory and expert systems will be in common use. Roush concludes by saying “Operations research is a fundamental discipline encompassing familiar (e.g., linear programming) and new technologies (e.g., neural networks and genetic algorithms) for defining management decisions. (Reference #6, Roush, 2001).

ISSUES WHICH AFFECT RESEARCH DIRECTIONS

New ideas and products are commonly issue-driven, especially when systems are mandated by regulations. For example, today we see a series of issues that face all poultry producers and “new” answers are actively being sought:

1. Environmental - waste handling, equipment, odor.
2. Welfare - space allowances, changing cage designs, beak trimming, molting.
3. Food Safety - elimination of problem sources, processing.
4. Cost and efficiency competitiveness.
5. Government intervention.

New legislation regarding cage space and the eventual abolishment of traditional cages has driven manufacturers to a frenzy of new designs which they hope will satisfy the legislators. If past history is any guide, new regulations could easily be adopted to make the new designs unacceptable in the future. Concepts which address current concerns may prove unsatisfactory later on. Meanwhile, the industry must go on and hopefully not get mired down with regulations which are not science- based.

Food safety is the latest issue to call for mandated procedures in the poultry industry. Even though most quality assurance programs are voluntary, new legislation has dictated handling procedures for eggs to control their temperature at the processing plant, during transportation and at the retail store. Other legislation requires code dating, nutrition and safety warnings on egg cartons. More and more practices are being spelled out by the regulators in our society some good and others not well thought-out.

SUMMARY

Science provides the basis for everything we do. A major problem is the frequent escalation of requirements beyond that which is built upon scientific research. A significant element in our society believes that “If a little is good, more must be better”. If resources are to be utilized efficiently, it’s imperative that standards of management be established and adhered to and that ranges of acceptability be allowed. Such standards must allow for different geographically-related systems, different types of birds, different management styles and different economic factors.

Management methods should not be dictated by anyone other than the owner of the operation - not the government nor special interest groups. The manager of owner is responsible for the selection of sound management programs. The procedures discussed in this paper can help the manager with the selection of such programs.

REFERENCES

1. Bell, D.D., 2000. Electronic Communication and Information Retrieval in Today's Poultry Industry, California Poultry Letter, Jan-Feb.
2. Anonymous, 2000. Part II: Reference of 1999 Table Egg Layer Management in the U.S., USDA Animal and Plant Health Inspection Service.
3. Filmer, W.W., and A. Andersen, 1984. The Legislation Affecting the Economic Results of Broiler and Egg Laying Farms. Pages 79-83 in: Proceedings of the World's Poultry Congress, Helsinki, Finland.
4. Bell, D.D., 1988, Information Gathering and Use. Pages 142-145 in: Proceedings of the World's Poultry Congress, Nagoya, Japan.
5. Broekuizen, H.B., 1988. Poultry Education and Extension in the Netherlands. Pages 151-155 in: Proceedings of the World's Poultry Congress, Nagoya, Japan.
6. Roush, W., 2001. An Operations Research Approach to Leveraging New Technology Opportunities. J. Appl. Poult. Res. 10:293-302.

CINÉTICA DE LA ABSORCIÓN, TRANSPORTE Y DEPOSICIÓN DE PIGMENTO CAROTENOIDE EN POLLO DE ENGORDA

KINETICS OF CAROTENOIND PIGMENT ABSORPTION, TRANSPORTATION, AND DEPOSITION IN BROILERS

Aceves AMG¹, García MAR¹, Juárez RM², Petrone VM², Fuente MB¹.

¹CEIEPA, FMVZ-UNAM; ²DPA: Aves, FMVZ-UNAM

SUMMARY

Carotenoid pigment was measured in plasma, duodenum, jejunum, and feces of 21-to-49 day-old broilers fed 80 ppm natural pigment, in order to determine the absorption site and fate of such pigment. The highest pigment concentration was found in the jejunum, just next to Meckel's diverticulum. Carotenoid plasma concentration was increased from 0.36 g/ml (3rd week) to 23.07 g/ml (5th week, 200 min.). A large amount of pigment was excreted in the feces, particularly at 40 minutes (1393.06 g/g) at week 3. These results are useful in understanding the absorption kinetics of carotenoid pigments.

RESUMEN

Para determinar el sitio de absorción y destino del pigmento carotenoide, éste se midió en plasma, duodeno, yeyuno y heces en aves de 21 a 49 días alimentadas con 80 ppm de pigmento natural. La mayor concentración se encontró en el yeyuno anterior al divertículo de Meckel. La concentración de carotenoides plasmáticos se incrementó de 0.36 g/ml (3ª semana) hasta 23.07 g/ml (5ª semana, 200 min.). Una alta cantidad de pigmento fue eliminada por las heces, especialmente a los 40 minutos (1393.06 g/g) en la 3ª semana. En intestino se observó la mayor concentración de carotenoides en yeyuno anterior al divertículo de Meckel. Estos resultados son de utilidad para entender la cinética de absorción del pigmento carotenoide.

INTRODUCCIÓN

La pigmentación del pollo de engorda reviste especial importancia para el consumidor en el momento de la compra. El color amarillo naranja de la piel del pollo se ha convertido en un indicador de calidad y en ciertos casos, del estado de salud del pollo. Para conseguir ésta coloración, se recurre al uso de pigmentos naturales o sintéticos, adicionados a diferentes concentraciones. El pigmento natural amarillo, por ejemplo, se utiliza de 60 a 80 ppm en el alimento. La eficiencia en la utilización del pigmento depende de varios procesos fisiológicos de absorción, transporte y deposición que no han sido estudiados completamente, y por lo tanto, la información acerca de la metodología de evaluación es limitada. La única técnica objetiva es la colorimetría de reflectancia, con que se mide la pigmentación en piel. Sin embargo, no se ha desarrollado una metodología de acuerdo con la cinética del pigmento para medirlo antes de que ocurra la deposición en piel. La medición en plasma es útil para detectar problemas de mala absorción del pigmento por alteración en intestino y poder corregirlos antes de que se presente mala pigmentación cutánea. Tampoco se ha evaluado como ocurre la absorción del pigmento a lo largo del intestino y de acuerdo con el tiempo en que ocurre la digestión del alimento, lo cual sería de utilidad para entender cómo se afecta la pigmentación en presencia de diferentes especies de coccidia que afectan regiones específicas del tracto intestinal. Con éstos antecedentes, la finalidad de éste trabajo fue evaluar la absorción entérica, transporte

plasmático y la absorción cutánea del pigmento de flor de compasúchitl.

MATERIAL Y MÉTODOS

Se utilizaron 234 aves de 21 días, criadas en batería, alimentadas con dietas a base sorgo-soya sin coccidiostato, con 80 ppm de pigmento natural. Las aves fueron pesadas semanalmente. La medición del pigmento cutáneo se realizó mediante el colorímetro de reflectancia MINOLTA (CIELab System) a los días 20, 27, 34, 41 y 48, en la zona apterílica costal derecha, en 40 aves por toma. Previo a la toma de muestras, los días 21, 28, 35, 42 y 49, las aves fueron alimentadas a libre acceso después de 14 h de ayuno, para garantizar que las aves consumieran alimento. A partir de ocho aves por cada intervalo de tiempo: 0, 40, 80, 120, 160 y 200 min., se tomaron 2 ml de sangre con EDTA, 3 cm de intestino en tres diferentes porciones: hacia el final del asa duodenal, yeyuno anterior y posterior al divertículo de Meckel, y heces. Las muestras de intestino y heces fueron pesadas y refrigeradas. De cada muestra de intestino y heces, se extrajo el pigmento carotenoides con 20 ml de solución de hexano:etanol:acetona:tolueno (10:6:6:7) durante toda la noche, en refrigeración y oscuridad. De las muestras de sangre se obtuvieron 0.5 ml de plasma, que se mezclaron con 4.5 ml de acetona para la extracción de los carotenoides. En ambos casos, se leyó la absorbancia de las muestras en un espectrofotómetro ajustado a 478 nm de longitud de onda. Los valores fueron convertidos a g de carotenoides/g de muestra para intestinos y heces, y en g de carotenoides /ml en plasma, mediante una curva patrón de carotenoides.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Los resultados se presentan en el cuadro 1. En plasma, a los 21 días, la mayor concentración de pigmento se alcanzó a los 200 min., y mostró una tendencia ascendente. A los 28 días, la concentración de carotenoides se incrementó hasta 20.7 g/ml, y 23.07 g/ml en el día 35 a los 200 minutos. A partir de éste punto, la concentración de pigmentos carotenoides mostró una tendencia descendente. A los 42 días se encontró entre 20 y 22 g/ml, manteniéndose constante en todos los intervalos de tiempo. Para los 49 días se

mantuvo entre 17 y 20 g/g. En intestino, la concentración de carotenoides en duodeno a los 21 días fue de 50.37 g/g a los 40 min., mostrando una tendencia ascendente conforme transcurrió el tiempo después del suministro del alimento. En heces se encontró la mayor concentración de carotenoides a los 40 min (1393 g/g) la cual fue disminuyendo hacia los 200 min.(207.54 g/g). Se observó una mayor concentración en yeyuno anterior a Meckel a los 40 y 80 min. (87.72 g/g), la cual fue disminuyendo hacia los 200 min, mientras que en yeyuno posterior a Meckel la tendencia fue a la inversa.

Estos resultados indican que la máxima concentración en duodeno después de ingerir alimento se alcanza a los 160 min. La mayor concentración de carotenoides en intestino se encuentra en yeyuno anterior al divertículo de Meckel. La mayor eliminación del pigmento en heces se observó a los 40 min. (1393.06 g/ml). En aves que consumen alimento con pigmento en forma continua, la concentración de carotenoides en plasma permanece constante sin importar el tiempo transcurrido desde que el ave inició su consumo de alimento.

REFERENCIAS

1. Fernández S. Pigmentación en avicultura. Memorias del 1er. Diplomado en Producción Avícola; 2000 febrero-marzo; México (DF): Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia, UNAM, 2000:94-96.
2. Herrick GM. Repletion and depletion of pigmentation in broiler skin and shank. *Poult Sc* 1971;1467-1475.
3. Janky DM. The use of the Minolta Reflectance Chromameter II TM for pigmentation evaluation of broiler shanks. *Pou Sci* 1986;65:491-496.
4. North MO. Comercial chicken production manual. 3a ed., The Avi Publishing Company Inc., WestPort Connecticut, USA, 1984.
5. Vicente SJ. Aspectos básicos sobre la pigmentación en la Industria Avícola. Memorias del 1er. Diplomado en Producción Avícola; 2000 febrero-marzo; México (DF): Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia, UNAM, 2000:94-96.

Cuadro 1. Valores de amarillamiento en piel y carotenoides en intestino, heces y plasma
Media \pm Error estándar de la media.

Edad	Amarillamiento en piel	EVALUACIÓN DE CAROTENOIDES EN INTESTINO (μg carotenoides/g muestra) Y PLASMA ($\mu\text{g}/\text{ml}$)					
		Minutos	Duodeno	Yeyuno anterior a Meckel	Yeyuno posterior a Meckel	Heces	Plasma
3 ^a semana	2.46 \pm .21	40	50.37 \pm 5.68	87.82 \pm 7.85	77.04 \pm 10.25	1393.06 \pm 525.275	0.36 \pm .13
		80	62.28 \pm 10.39	103.25 \pm 15.48	89.25 \pm 8.643	2354.67 \pm 1430.79	0.35 \pm .13
		120	93.68 \pm 7.9	137.76 \pm 8.09	122.81 \pm 15.99	693.56 \pm 203.99	0.67 \pm .13
		160	199.41 \pm 97.7	122.62 \pm 16.82	148.28 \pm 24.33	476.83 \pm 171.26	0.89 \pm .11
		200	103.38 \pm 10.82	131.33 \pm 17.21	566.64 \pm 450.93	207.54 \pm 50.72	0.91 \pm .17
4 ^a semana	10.22 \pm .31	40	58.15 \pm 8.12	111.36 \pm 20.61	114.81 \pm 16.51	202.07 \pm 34.27	13.31 \pm .91
		80	65.99 \pm 13.20	110.49 \pm 7.25	111.04 \pm 15.48	439.18 \pm 116.65	13.93 \pm .9
		120	77.93 \pm 13.73	130.36 \pm 16.01	140.31 \pm 21.5	129.53 \pm 17.82	13.42 \pm .84
		160	110.66 \pm 34.98	177.17 \pm 35.08	216.68 \pm 22.84	191.47 \pm 49.73	12.62 \pm 1.36
		200	92.88 \pm 28.13	121.51 \pm 12.63	172.70 \pm 21.44	133.37 \pm 22.85	14.72 \pm 1.09
5 ^a semana	13.4 \pm .36	40	114.36 \pm 9.57	301.70 \pm 55.46	234.87 \pm 32.47	425.94 \pm 179.04	21.30 \pm 1.5
		80	166.99 \pm 29.58	338.27 \pm 43.79	294.55 \pm 87.43	535.92 \pm 132.45	20.03 \pm 1.95
		120	145.12 \pm 15.19	296.26 \pm 21.26	258.82 \pm 42.10	253.71 \pm 64.66	20.31 \pm 1.51
		160	162.67 \pm 15.14	333.21 \pm 58.58	211.78 \pm 48.29	109.65 \pm 29.11	21.31 \pm 1.53
		200	152.71 \pm 15.9	346.99 \pm 48.94	188.45 \pm 27.99	118.13 \pm 26.76	23.07 \pm .65
6 ^a semana	15.59 \pm .66	40	157.08 \pm 20.44	343.92 \pm 44.1	502.07 \pm 60.35	1462.52 \pm 838.78	22.29 \pm 1.52
		80	135.03 \pm 25.11	281.63 \pm 49.71	404.89 \pm 41.16	482.92 \pm 54.25	21.47 \pm 1.04
		120	156.34 \pm 10.82	312.20 \pm 30.17	477.59 \pm 55.36	213.45 \pm 44.16	20.62 \pm 1.13
		160	202.03 \pm 28.4	354.53 \pm 31.45	735.31 \pm 97.6	275.49 \pm 93.91	20.14 \pm 1.49
		200	149.53 \pm 13.53	228.22 \pm 20.56	425.11 \pm 28.9	400.04 \pm 99.98	22.73 \pm 0.78
7 ^a semana	20.44 \pm .54	40	120.42 \pm 12.53	282.63 \pm 42.81	335.81 \pm 71.79	375.52 \pm 46.48	17.95 \pm .84
		80	132.89 \pm 13.65	328.99 \pm 51.15	379.81 \pm 70.78	419.69 \pm 59.22	20.17 \pm 1.26
		120	162.80 \pm 19.11	321.49 \pm 49.92	315.79 \pm 56.16	380.32 \pm 61.04	19.13 \pm 1.48
		160	190.60 \pm 20.13	403.45 \pm 36.8	499.08 \pm 71.63	628.68 \pm 128.78	18.44 \pm 1.31
		200	163.04 \pm 11.46	269.58 \pm 27.6	388.05 \pm 84.49	240.69 \pm 48.05	19.31 \pm 1.28

MECANISMOS DE PATOGENICIDAD DE *ESCHERICHIA COLI* AVIAR COMO LÍNEA DE INVESTIGACIÓN: ADHERENCIA A PROTEÍNAS DE LA MATRIZ EXTRACELULAR

PATHOGENICITY MECHANISMS OF AVIAN *ESCHERICHIA COLI* AS A RESEARCH LINE: ADHESION TO EXTRACELLULAR MATRIX PROTEINS

Sánchez Villanueva C, Almanza Márquez Y, Ramírez-Santoyo RM.

Departamento de Enfermedades Infecciosas. Unidad de Biología Experimental. Universidad Autónoma de Zacatecas. Calzada de la Revolución Mexicana s/n. Col Tierra y Libertad. Guadalupe Zac. Apartado Postal 12 Tel y Fax (492) 921-13-26. E- mail: rmrs20@hotmail.com. y colv21@hotmail.com

SUMMARY

Colibacillosis is a major cause of economic losses for the poultry industry. It is caused by pathogenic *E. coli* strains that carry diverse virulence factors, some of which possibly allow the bacterium to adhere to host tissues. This research analyzed the adhesion ability of pathogenic avian *E. coli* to extracellular matrix components: type IV collagen, and fibronectin. Results showed more adherence to type IV collagen but not so to fibronectin when pathogenic *E. coli* strains were compared with strains of the normal flora.

RESUMEN

La colibacilosis aviar es una de las principales causas de pérdidas económicas en la industria avícola, y es producida por cepas patógenas de *E. coli* que portan diversos factores de virulencia, algunos de los cuales posiblemente le permiten adherirse a los tejidos del huésped. En este trabajo se analizó la capacidad de adherencia de *E. coli* patógena aviar al colágeno tipo IV y a la fibronectina, ambos componentes de la matriz extracelular. Los resultados mostraron más adherencia al colágeno tipo IV pero no a la fibronectina cuando se compararon cepas de *E. coli* patógena y cepas de flora normal.

La colibacilosis aviar es un problema de salud animal y económico que afecta principalmente a la industria del pollo de engorda. Es causada por cepas patógenas de *Escherichia coli* (APEC). Entre los síndromes que produce destacan la enfermedad respiratoria y la septicemia (1,2)

A partir de la década pasada se empezó a analizar la capacidad de adherencia de los patógenos bacterianos a la matriz extracelular. Con la finalidad de elucidar sí la capacidad de adherencia de las cepas patógenas al colágeno tipo IV y/o a la fibronectina celular son un posible mecanismo de patogenicidad, se realizó el presente trabajo.

MATERIAL Y MÉTODOS

Se utilizaron cuatro cepas de APEC aisladas de casos clínicos de septicemia aviar que fueron ColV positivos, para los estudios comparativos se utilizaron cuatro cepas de *E. coli* aisladas de aves clínicamente sanas que mostraron ser fimbria tipo 1 negativas y ColV negativas.

Ensayos de adherencia a proteínas de matriz extracelular inmovilizadas: Se realizaron en cajas de cultivo de 24 pozos que contenían cubreobjetos a los cuales previamente se agregó colágeno tipo IV (Sigma) a una concentración de 8g/cm², así mismo otros cubreobjetos fueron preparados con 3 pmol de fibronectina celular (Sigma). Se colocaron inóculos de 10⁷ UFC/ml de cada una de las cepas de *E. coli* y se incubaron 90 minutos a 37°C, 5% de CO₂ y 85% de humedad. Los cubreobjetos se lavaron, se tñieron con Giemsa y se observaron al microscopio contando diez campos visuales. Cada ensayo se repitió dos veces. Los resultados fueron sometidos a un ANDEVA.

RESULTADOS

Se encontró una mayor capacidad de adherencia al colágeno tipo IV en las cepas APEC en comparación con las cepas indígenas de *E. coli* (p<0.05); en contraste no se encontraron diferencias significativas en la adherencia a la fibronectina celular al comparar los dos grupos de bacterias.

DISCUSIÓN

Los resultados sugieren que la adherencia al colágeno tipo IV puede ser un mecanismo de patogenicidad de las cepas APEC.

REFERENCIAS

1. Blanco, M., Blanco, J. E., Mora, A., Blanco, J. *Escherichia coli* septicémicos aviaries: serotipos, factores de virulencia, resistencia a antibióticos y desarrollo de vacunas. Med. Vet. 13: 525-535. 1996

EFEECTO DE LA EDAD EN LA MINERALIZACIÓN DEL CASCARÓN DE HUEVOS DE GALLINAS CRIOLLAS GEN CUELLO DESNUDO (NA) HETEROCIGOTAS (NANA) Y SU COMPARACIÓN CON LA ESTIRPE COMERCIAL BABCOCK B-380, DURANTE EL PRIMER CICLO DE POSTURA

EFFECT OF AGE ON EGG SHELL MINERALIZATION OF NATIVE, NAKED NECK (Na GENE), HETEROCYGOUS (Nana), AND BABCOCK B-380 HEN EGGS DURING THE FIRST LAYING CYCLE

Alvarez, RMT.^{1,3}, Solorio G. F.,² Tato P.⁴, Téllez G.³

¹ Laboratorio de Parasitología, Facultad de Biología, Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo, Michoacán (UMSNH), ² Instituto de Investigaciones Metalúrgicas. UMSNH. Morelia Michoacán ³ Departamento de Producción Animal: Aves, Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia, Universidad Nacional Autónoma de México, México D.F., ⁴ Departamento de Microbiología y Parasitología, Facultad de Medicina, Universidad Nacional, Autónoma de México, México, D.F.

SUMMARY

The eggshell contents of several chemical elements was determined during the first laying cycle. Samples were subjected to X-ray microanalysis. Results showed that during production peak, elements (C, O, N, Mg, Mn, Al, P, S, Ca, K, etc.) remain constant. As hen age progresses chemical levels decline, and calcium carbonate crystal cementing protein levels decrease, thus a more evident eggshell demineralization and pore size increase occur. The comparison showed that native hens experience a smaller decrease ($P < 0.05$) in the amounts of chemical elements.

RESÚMEN

Se determinó la presencia de elementos químicos constituyentes del cascarón, durante el primer ciclo de postura. Las muestras se sometían a microanálisis de rayos X. Los resultados mostraron que durante el pico de postura se mantienen constante los elementos químicos, (Carbono, Oxígeno, Nitrógeno, Magnesio, Manganeso Aluminio, Fósforo, Azufre, Calcio, Potasio etc. conforme avanza la edad, disminuye estos. Al reducir las concentraciones, disminuyen las proteínas cementantes de cristales de carbonato de Calcio, observándose mayor desmineralización del cascarón y abertura de poros. La comparación mostró que las gallinas criollas disminuye menos las cantidad de elementos químicos $P < 0.05$.

El objetivo de este trabajo fue, determinar la variación en la distribución de la cutícula, en las diferentes zonas, del cascarón de huevos de gallinas criollas gen cuello desnudo (Na) heterocigotas (Nana) comparadas con la gallinas comerciales B-380. La metodología consistió en cortar 5 pedazos de 3x3 mm de cascarón con un microdisco de diamante, en zonas polares, ecuatoriales medio-ecuatorial-polar, se metalizaron (S150A sputter coater) con cobre, las muestras de cascarón cada 8 semana, a partir del la semana 4° de postura, en un microscopio electrónico de barrido (Jeol JSM.6400), a una aceleración de electrones de 10,000 voltios se localizaba la región más representativa y se tomaba fotografía a 700X, 1500X y 4000X de magnificencias. Los resultados mostraron que existe diferencias de distribución de la cutícula en las diferentes zonas del cascarón, y además varía entre las gallinas criollas y las gallinas B-380. Conforme avanza la edad, disminuye su cantidad y distribución, también existió un diferencia entre las dos gallinas. Conclusiones: La distribución de la cutícula no es homogénea en todo el cascarón, varía su concentración dependiendo de la zona. Así como también se observó en las fotografías, que le afecta considerablemente la edad de la gallina conforme avanza el ciclo productivo, aunque las dos gallinas se ve afectada en su cutícula por la edad, sin embargo las gallinas criollas mantienen las zonas ecuatorial muy protegidas en todo el ciclo, comparadas con las B-380.

A MODEL FOR THE HORIZONTAL TRANSFER OF *CAMPYLOBACTER JEJUNI* IN POULTRY

UN MODELO PARA LA TRANSFERENCIA HORIZONTAL DE *CAMPYLOBACTER JEJUNI* EN AVES

K. Amoako, S. Gomis, A. Potter, and B. Allan

Veterinary Infectious Disease Organization, 120 Veterinary Road, Saskatoon, Saskatchewan, Canada S7N 5E3.

RESUMEN

El propósito de este trabajo fue desarrollar un modelo para la colonización del pollo con *C. jejuni*. Desarrollamos un modelo para la transferencia horizontal de la bacteria en un grupo de aves. Se obtuvieron improntas cloacales de aves individuales y se cultivaron en agar de Karmali, medio sumamente selectivo para este género bacteriano. Al tercer día el 40% de las aves mostraba ya colonización y esto fue válido también para el 85% de las aves al quinto día. El séptimo día todas las aves del grupo eran positivas a *C. jejuni*. Los pollos desafiados inicialmente continuaron colonizados a todo lo largo del experimento.

The purpose of this work was to develop a model for the colonization of chickens by *Campylobacter jejuni*. Day-old chicks are not normally colonized by *C. jejuni*. Around two weeks of age colonization of birds is first detected. By the time of slaughter, however, between 30 and 100% of flocks will be colonized. It is assumed that a few birds are colonized. The bacteria are shed in the feces and spread to other birds. We have developed a model for the horizontal transfer of *C. jejuni* within a group of birds. At day of age 20 percent of the birds were challenged with 10^8 CFU's of *C. jejuni* NCTC11186. This is the strain of *C. jejuni* that has been sequenced. The bacteria were

grown for 18 hours under reduced oxygen conditions on Mueller-Hinton agar. For use in the challenge the bacterial cells were resuspended in normal saline and diluted to the appropriate concentration. Cloacal swabs were obtained from individual birds and cultured on Karmali agar, a medium that is very selective for *Campylobacter*, to monitor the spread of colonization. By day three 40% of the birds were colonized and by day five 85% of the birds were colonized. On day 7 all birds in the group were positive for *C. jejuni*. The birds that were initially challenged remained colonized throughout the experiment.

We have also shown that it is possible to colonize older birds by horizontal transfer. Broilers that were four weeks old were tested to confirm that they were not shedding *C. jejuni*. Forty broilers were housed together and 25 % of the birds were given an oral challenge of 5×10^6 colony forming units of *C. jejuni*. The bacteria were grown as previously described. By day five 75% of the birds, including all those challenged had positive cloacal swabs for *C. jejuni* and by day seven all birds were shedding *C. jejuni*.

These models mimic the situation that occurs when a flock is initially colonized. It will be useful in the study of the effect of vaccination on the colonization of poultry by *C. jejuni*.

CARACTERIZACIÓN HISTOPATOLOGICA EN ENCÉFALOS DE POLLOS LIBRES DE PATÓGENOS ESPECÍFICOS EXPERIMENTALMENTE INFECTADOS CON EL VIRUS DE LA ENFERMEDAD DE NEWCASTLE CEPA CHIMALHUACÁN

BRAIN HISTOPATHOLOGICAL CHARACTERIZATION OF SPECIFIC PATHOGEN FREE (SPF) CHICKENS EXPERIMENTALLY INFECTED WITH NEWCASTLE DISEASE VIRUS, CHIMALHUACÁN STRAIN

MVZ Adriana Barri¹, MVZ MC Nestor Ledesma¹, MVZ PhD. Guillermo Téllez Isaías¹, MVZ PhD. David Caldwell².

¹Universidad Nacional Autónoma de México, Departamento de Producción Animal:Aves
²Texas A&M University, Poultry Science Department

SUMMARY

Lesions found in the central nervous system of 36 SPF chickens were histopathologically characterized. Birds were inoculated with Newcastle disease virus, Chimalhuacán strain. Five cross sections per brain were obtained. The following lesions were found: gliosis, 97%; focal necrosis, 69%; demyelination, 58%; peripheral chromatolysis, 55.5%; and vascular degeneration, 53%. The most affected regions of the brain were as follows: Telencephalon and cranial/caudal diencephalon: the neostriatum and the hiperestriatum. Mesencephalon: the optic chiasma. Cerebellum: the pyramidal cells. These results differ from those published by other authors regarding different newcastle disease virus strains. Further studies comparing different strains are required.

RESUMEN

Fueron caracterizadas histopatologicamente las lesiones en sistema nervioso central de 36 pollos SPF inoculados con la cepa Chimalhuacan del virus de ENC, se estudiaron 5 cortes coronales por cada encefalo, encontrandose como lesiones mas frecuentes: gliosis 97%, necrosis focal 69%, desmielinización 58%, cromatolisis periferica 55.5% y degeneracion fibrinoide 53%. Los sitios mas afectados fueron en telencefalo, diencefalo rostral y caudal, el neostriato e hiperestriato, en mesencefalo el quiasma optico y en cerebelo las celulas piramidales. Estos resultados difieren con lo reportado para otras cepas del virus de ENC. Se requieren mas estudios para comparar las lesiones producidas por otras cepas.

ABSTRACT

A histopathological characterization of lesions found in the central nervous system of 36 SPF chickens was made. The birds were inoculated with the Newcastle disease virus Chimalhuacan strain. Five

transversal cuts per brain were made, finding as frequent lesions: gliosis 97%, focal necrosis 69%, demyelination 58%, peripheral chromatolysis 55.5%, and vascular degeneration 53%. The most affected regions of the telencephalon, rostral and caudal diencephalon were the neostriatum and hiperestriatum, of the mesencephalon the optic chiasm, and of the cerebellum the pyramidal cells. These results differ from other reports made for other NDV strains. Further studies making comparisons among different strains are required.

INTRODUCCIÓN

El encéfalo de un ave esta dividido en 5 divisiones para su mejor estudio; el telencéfalo, diencefalo, mesencéfalo, metencéfalo y mielencéfalo. De cada subdivisión existen subregiones, y cada una de estas divisiones y subdivisiones constituye un elemento de suma importancia para el buen funcionamiento del encefalo y por ende del ave. Las lesiones provocadas por el virus de la enfermedad de Newcastle (V-ENC) en el sistema nervioso central (SNC) de pollos infectados con cepas velogénicas (V V-ENC), no han sido debidamente caracterizadas. Aunque en distintos países se han descrito las lesiones provocadas por algunas cepas mesogénicas, mesogénicas neuroadaptadas, velogénicas viscerotrópicas y velogénicas neurotrópicas, no existen estudios en nuestro país sobre las lesiones producidas por la cepa Chimalhuacan V V-ENC en el encéfalo de las aves. Además, la mayoría de los informes únicamente describen encefalitis no supurativa sin especificar el sitio anatómico de la lesión, su distribución ni su grado, por lo que podrían existir diferencias con respecto a las cepas de las cuales sí existen informes, así como existen diferencias en los signos clínicos observados. Al tener identificadas las lesiones y la ubicación neuroanatómica de aquellas provocadas por el V V-

ENC, se puede tener un diagnóstico más certero. El propósito de este estudio fue identificar y caracterizar las lesiones en SNC en aves libres de patógenos específicos (LPE) que fueron inoculadas experimentalmente con la cepa Chimalhuacan V V-ENC. Se utilizaron 54 aves las cuales fueron separadas en dos grupos. Grupo 1) 36 aves fueron inoculadas I.M. con 0.2 ml de 10^6 DIE₅₀ de V V-ENC. Grupo 2) 18 aves inoculadas I.M. con PBS estéril y fueron utilizadas como grupo testigo negativo. A las 24, 36 y 48 horas posinoculación (PI) fueron sacrificados 2 pollos del grupo infectado y uno del testigo negativo con el fin de obtener el encefalo de estas, posteriormente se obtuvieron de la misma forma las muestras a intervalos 4 horas entre cada muestreo. Cada encéfalo se fijó en formalina al 10% amortiguada a un pH de 7 para su posterior proceso por la técnica de inclusión en parafina y tinción H y E. Se hicieron 5 cortes por encéfalo (telencéfalo, diencéfalo rostral, diencéfalo caudal, mesencéfalo y cerebelo) y se registraron las lesiones y la frecuencia en cada región anatómica. No hubo mortalidad ni signología observada en el grupo 2, mientras que en el grupo 1, inoculado con la V V-ENC, se encontraron signos respiratorios (estornudos, secreción nasal), digestivos (diarrea color verde esmeralda), y nerviosos (incoordinación, tortícolis, tics, temblor) a partir de la hora 36 PI. La mortalidad empezó a las 72 horas PI. Cerca del 80% de las aves presentaron signos nerviosos. Se observó que la mayoría de las aves que mostraron signos clínicos nerviosos, presentaron lesiones a la histología, aunque en algunos casos se pudieron observar lesiones sin que los animales presentaran la signología nerviosa correspondiente.

Las regiones que presentaron cambios histológicos de manera más importante y constante fueron: telencéfalo (neostriato e hiperestriato particularmente); mesencéfalo (sobre todo en la subregión del quiasma óptico); y en el cerebelo (particularmente en la capa de células piramidales). En la evaluación de estas regiones, las lesiones histológicas consistieron en: 97% focos de gliosis, 89% focos de necrosis; 69% focos de desmielinización leves, 58% cromatolisis periférica; 55.5% degeneración fibrinoide de vasos sanguíneos, 53% edema perivascular, 53% neuronofagia, 33% infiltración linfocítica perivascular (manguito perivascular) leve, 28% hemorragias y 19% meningitis no supurativa leve. Estos resultados, difieren con lo descrito en cepas mesogénicas y lentogénicas en donde se ha observado encefalitis difusa no supurativa caracterizada por infiltración linfocítica perivascular, malacia, vasculitis proliferativa y desmielinización. Se requieren más estudios en donde sean comparados los sitios de lesión de otras cepas velogénicas viscerotrópicas y neurotrópicas de la enfermedad de Newcastle para poder saber si existen diferencias entre las diferentes cepas. Es de suma importancia realizar, para cualquier estudio histopatológico (sin importar la enfermedad que se este diagnosticando) de encefalo, los 5 cortes usados en este estudio, con el fin de abarcar la mayor area posible del encefalo y evitar omitir areas que presenten lesiones importantes que nos puedan dar indicio de la presencia del virus.

(El artículo completo será publicado en el *Avian Pathology*).

DEMONSTRATION OF AVIAN PNEUMOVIRUS INFECTION IN CHICKENS IN RUSSIA

DEMOSTRACIÓN DE LA INFECCIÓN DE POLLOS CON EL NEUMOVIRUS AVIAR (APV) EN RUSIA

Y.A. Bochkov, E.V. Ovchinnikova, A.V. Borisov, V.N. Irza, V.V. Borisov, G.V. Batchenko, T.B. Manin, L.O. Scherbakova, V.V. Drygin

All-Russian Research Institute for Animal Health, 600901, Vladimir, Russia

RESUMEN

La infección causada por el neumovirus aviar (APVI) antes conocida como rinotraqueítis infecciosa del pavo (TRT) es causada por un APV que pertenece al género *Metapneumovirus*, familia *Paramyxoviridae*. La información serológica obtenida con un kit de ELISA comercial detectó anticuerpos contra el APV aproximadamente en el 50% de las muestras de suero

obtenidas de pollos de 150 días de edad o más, en granjas en Rusia y países CIS en el 2001. Los resultados de los estudios moleculares, biológicos y serológicos sugirieron la presencia de una infección por APV en pollos, en los países citados.

Avian pneumovirus infection (APVI), earlier known as infectious turkey rhinotracheitis (TRT), is

caused by an avian pneumovirus (APV), which belongs to genus Metapneumovirus, family Paramyxoviridae. The disease is an upper respiratory infection of turkeys and in chickens the role of APV as a primary pathogen is less clearly defined, but it is commonly associated with swollen head syndrome in breeder chickens. For the first time TRT was described in turkeys in Southern Africa in the late 1970s and then in France, UK and other countries. According to the serological data using commercial ELISA kit (Biochek, USA) antibodies to APV were detected in approximately 50 % of the serum samples obtained from chickens at the age of 150 days and elder from poultry farms of Russia and CIS-countries in 2001 that specifies a wide prevalence of the disease. By the use of RT-PCR with primers

designed by Cavanagh et al. [1999], which flanks a part of G gene of APV, 49 samples of pathological material (lungs, tracheas and guts) were tested. The primers allow to differentiate 2 pneumovirus genotypes - A and ?. In four samples APV genome of genotype A was identified. In three samples genome of IBV field isolates together with a pneumovirus was detected. A pneumovirus of genotype B was not identified. Rather low percentage of positive samples can possibly be caused by circulation of pneumoviruses of other genotypes, which could not be detected by the given primers. Thus, the results of molecular-biological and serological studies suggested the presence of a pneumovirus infection in chickens on territory of Russia and countries of CIS.

STUDIES ON PREDOMINANT DISEASES IN POULTRY BACKYARD FLOCKS IN MOROCCO (KHENIFRA REGION)

ESTUDIOS SOBRE LAS ENFERMEDADES PREDOMINANTES EN LAS PARVADAS DE TRASPATIO EN MARRUECOS (REGIÓN DE KENIFRA)

K. Bouzoubaa, B. Atifi and M. El Houadfi

Institut Agronomique et Vétérinaire Hassan II, Département de Pathologie Aviaire
BP 6202 Rabat-Instituts Morocco

RESUMEN

El objetivo de estos estudios fue determinar las enfermedades predominantes en la avicultura de traspatio de tres pequeños poblados de la provincia de Kenifra, encontrando que éstas son de origen infeccioso y parasitario. Esta última categoría fue masiva y, además, se encontró seroprevalencia variable respecto a enfermedad de Newcastle, infección de la bolsa de Fabricio, bronquitis infecciosa, *Mycoplasma gallisepticum* y *M. synoviae*. El 5.6% de las improntas cloacales permitió el crecimiento de *Salmonella enteritidis*.

ABSTRACT

The main objective of these studies is to determine predominant diseases of backyard poultry in three villages located in the rural district of 'Lehri', in the province of Kenifra. An inquiry on medical aspect was carried out. Predominant diseases were determined on the basis of observations of sick poultry, necropsy examinations, and mainly laboratory analyses. One hundred eighty blood samples were collected at different intervals : D₁, D₁₅ and D₄₅. Different serological tests were carried out in order to detect antibodies against the following diseases : newcastle

disease by IH and ELISA, infectious bursal disease and infectious Bronchitis by ELISA, *Mycoplasma gallisepticum* and *Mycoplasma synoviae* by plate agglutination test. One hundred eighty cloacal swab samples were used for the isolation and identification of Salmonella. These studies showed that predominant diseases of backyard poultry in the area are of infectious and parasitic origin. The examinations and observations of the sick animals revealed a predominance of diseases with respiratory signs. In the post mortem examinations, internal and external parasites were identified; a massive parasitic infestation of chickens in the area of study was shown.

Using some serological tests, a high prevalence of all the diseases investigated in the three villages was found. Seroprevalence between 10% and 70% was found for the Newcastle diseases by IH test. The ELISA revealed a seropositivity of 80% for Newcastle disease, Infectious Bursal Disease, and Infectious Bronchitis. The plate agglutination showed a seropositivity between 27% to 37% for *Mycoplasma gallisepticum*, and a seropositivity between 3% to 17% for *Mycoplasma synoviae*. Bacteriological examination showed 5.6% of all 180 cloacal swab samples were contaminated by *Salmonella enteritidis*.

SITUACIÓN Y OPORTUNIDAD DE LA PRODUCCIÓN DE HUEVO ORGANICO EN UN SISTEMA RURAL DE LA SIERRA NORTE DE PUEBLA

STATUS AND OPPORTUNITIES OF ORGANIC EGG PRODUCTION IN A RURAL SYSTEM IN THE NORTHERN SIERRA OF PUEBLA

¹María Cano-Basave, ¹Carlos López-Díaz y ²Marco Antonio Juárez-Estrada.

¹Departamento de Economía y Administración. ²Departamento de Producción Animal: Aves. Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia, Universidad Nacional Autónoma de México. Avenida Universidad 3000. Ciudad Universitaria 04510 México, D.F.

SUMMARY

This study determined the feasibility of production and commercialization of organic eggs in a common-land community, in the Mexican state of Puebla. A survey was performed among the urban population to determine the acceptability of this type of products. Under the social/economic conditions observed in Ixtacamaxtitlán, it was determined that the production of organic eggs is feasible using semi-heavy and native hens. Probing showed that the product can be well accepted among the urban population, since consumers appreciate organic eggs, and typify them as “ranch eggs”. This type of eggs was preferred over regular farm eggs.

RESUMEN

El presente estudio determinó factibilidad de producción y comercialización de huevo orgánico en una comunidad ejidal de Puebla. Se efectuó un sondeo urbano para determinar la aceptación de este tipo de productos. Bajo las condiciones sociales y económicas observadas en la comunidad de Ixtacamaxtitlán se determinó que es factible la producción de huevo orgánico mediante la explotación de gallinas semiligeras y criollas. El sondeo efectuado en un medio urbano fue aceptable, ya que el consumidor aprecia el consumo de huevo “orgánico” tipificado como “huevo rancho” y lo prefiere al consumo de huevo de granja.

INTRODUCCIÓN

La industria del huevo para plato cubre aparentemente toda la gama de necesidades y requerimientos del consumidor en cuanto a precio y calidad¹. Sin embargo, actualmente existe un interés creciente por el consumo de productos de origen netamente orgánicos o bien enriquecidos con aceites insaturados (Omega 3 y Omega 6). Como ya se sabe, la producción conocida como “orgánica” viene a satisfacer la necesidad de la población de mejorar su calidad de vida y prolongar en tiempo la esperanza de la misma, al consumir alimentos más sanos producidos

a partir del cuidado de los recursos naturales y de la menor utilización de sustancias potencialmente nocivas (antibióticos, sudanes, conservadores, etc.)². Los alimentos que proporcionan los sistemas productivos “orgánicos” son inocuos para la salud humana, ya que no contienen residuos químicos potencialmente peligrosos ni contaminan el medio ambiente². Además, mediante el sistema extensivo de producción se puede lograr una producción autosostenible que puede llegar a satisfacer la demanda de alimentos de la población, manejar los recursos naturales y humanos, al igual que los financieros y físicos, para aumentar la riqueza y bienestar a largo plazo que no impliquen un crecimiento real del costo social.^{2,3} En el presente trabajo se estudio la factibilidad de producción y consumo del “huevo de rancho” (caracterizado como “orgánico” debido a la falta de legislación al respecto en nuestro país) producido en la comunidad de Ixtacamaxtitlán en la sierra norte de Puebla.

MATERIAL Y MÉTODOS

Se estudió la situación de la explotación aviar en 22 familias de la comunidad del ejido Almeya en el municipio de Ixtacamaxtitlán en la sierra Norte del Estado de Puebla. Utilizándose cuestionarios abiertos y cerrados para la obtención de información técnica, sanitaria y socioeconómica a partir de las 22 familias censadas. Para la recopilación de la información a nivel de preferencia de consumo se aplicaron 100 cuestionarios cerrados en el consumidor urbano de estrato medio de la ciudad de México, Distrito Federal. La información fue capturada en computadora y procesada a través de los paquetes computacionales SPSS y la hoja de cálculo Excel (Microsoft Office 2000 ®). Los resultados se expresan en porcentajes.

RESULTADOS

El censo avícola de las 22 familias reporto un total de 466 aves, de las cuales 18.66% eran pollitos, 14.8% pollonas de reemplazo, 4.29% eran gallos y

10.51% pollos para consumo, otras aves observadas fueron 9.87% de guajolotes y 0.21% de patos. De las gallinas en postura se observó que 30.90% del total de las gallinas estaban en postura, 10.72% en descanso y el resto eran aves no productoras. Durante las dos semanas en las cuales se verificó la tasa de ovoposición la mayor cantidad de huevos registrados fue en la familia 20 con 10.18% de la producción total que fue de 737 huevos y en la familia 2 con 9.50%. La mayoría de las familias reportaron cada una aproximadamente un 4% de la producción total y son pocas las que tuvieron un porcentaje menor al 1 por ciento, como la familia identificada con la clave 15 que registro únicamente 0.81% de la producción total. En las gallinas de la familia 9 no se registró ovoposición durante toda la duración del estudio. El tipo de explotación es extensivo, las aves pastorean libremente durante el día y en la noche son encerradas en un gallinero. En el gallinero se les proporciona únicamente maíz que es cultivado en la misma comunidad, además de desperdicios de cocina y masa, el alimento comercial sólo se utiliza para complementar la dieta de los pollitos en el 42.8% de los casos. En la comunidad la mayoría de los habitantes no utiliza medicina preventiva ni profilaxis para tratar a sus gallinas debido a falta de información ya que desconocen el manejo que se les da en una granja comercial. La comercialización en la comunidad se efectúa para usarlo como huevo fértil y reproducir a sus gallinas así como para consumo pagando a un peso (Moneda Nacional, mes de julio del 2001) la pieza de huevo. De los cuestionarios aplicados a las familias de clase media de la ciudad de México para conocer la preferencia que existe por este tipo de huevo se encontró que el 74% de los consumidores conoce al huevo "orgánico" (definido específicamente así de acuerdo a las características de producción y composición referidas para las producciones avícolas de este tipo en Europa) como huevo de rancho, el 18% como huevo de gallinero, el 5% como huevo de traspatio y el 3% como otro tipo de huevo. Ninguno de los consumidores se refirió a él como huevo "orgánico". El 85% de los consumidores ha probado el huevo de rancho alguna vez en su vida, de ellos el 20% lo ha probado una o dos veces por mes, el 2% lo ha consumido 3 a 6 veces por año, el 28% una o dos veces por año y finalmente el 34% menos de una vez por año. El 80% de los consumidores considera que el huevo de rancho tiene un sabor diferente al huevo que normalmente se vende en tiendas de autoservicio. La mayor parte de los consumidores (62%) cree que el huevo de rancho es mas saludable que el huevo de granja, 7% considera que es menos saludable y 31% cree que es igual de saludable que el huevo de granja. Con respecto al colesterol, el 23% de los consumidores cree que tiene mas colesterol que el huevo de granja,

23% cree que tiene menor cantidad y 54% considera que el huevo tiene la misma cantidad de colesterol que el huevo de granja. El 70.4% de los consumidores cree que el huevo de rancho es mas sabroso que el huevo de granja, el 25.5% piensa que es igual de sabroso y únicamente el 4% considera que es menos sabroso en comparación con el huevo de granja. De acuerdo al valor nutritivo el 59% de los consumidores considera que el huevo de rancho es mas nutritivo que el huevo de granja, 7% cree que es menos nutritivo y 34% considera que es igual de nutritivo que el huevo de granja.

DISCUSIÓN

Bajo las condiciones sociales y económicas observadas en la comunidad de Ixtacamaxtitlán se determinó que es factible la producción de huevo orgánico mediante la explotación de gallinas semiligeras y criollas. Siempre y cuando se establezcan las condiciones de medicina preventiva, prácticas de manejo, crianza y alimentación adecuadas con la finalidad de eficientizar la producción. Se requiere el estudio de un modelo para determinar un proceso de comercialización más eficiente de los huevos producidos en este tipo de explotaciones de acuerdo a los lineamientos de producción y comercialización estudiados por Lampkin y Padel³, Mendoza y Ramírez⁴, y Gómez *et al* ⁵. Se requiere el estudio de un modelo económico-social para eficientizar el establecimiento y funcionalidad de un criadero de gallinas ecológicas bajo el esquema de producción comunal mexicano, de acuerdo a las sugerencias establecidas para regiones de recursos económicos escasos conforme al marco socioeconómico de desarrollo sustentable estudiado por Lampkin y Padel³. En el país no existe aún legislación respecto a las prácticas de producción, comercialización y sanidad del "huevo orgánico", por lo cual se requiere estudiar la formulación de una propuesta de ley de este tipo. En el presente estudio se observó ampliamente que el consumidor aprecia y prefiere el consumo de huevo "orgánico" tipificado como "huevo rancho". Además se constató que existe una inquietud creciente por el consumo de productos avícolas clasificados como "orgánicos".

REFERENCIAS

1. Situación actual y perspectivas de huevo para plato en México 1990-2000. SAGARPA-CEA. México, D.F. 2001.
2. Torres, T.F., y Tráfaga, D.Y. La agricultura Orgánica. Instituto de Investigaciones Económicas-UNAM. México D.F. 1997.

3. Lampkin, N.H. and Padel, S. The economics of organic farming: an international perspective. Cab. International. United Kingdom. 1994.

4. Mendoza Z. J. A., Ramírez F. L. El potencial económico de los Productos Agropecuarios

Comercialmente No Tradicionales. Memoria de la Primera Exposición Nacional. 1997.

5. Gómez C. A., Gómez T. L., Schwentesius R. R., Rendón M. R. Perspectivas de la Agricultura Orgánica de México. Ponencia. PIAI-CIESTAAM. 2001.

NEUROPATHOLOGY ASSOCIATED WITH *HAEMOPROTEUS LOPHORTYX* IN BOBWHITE QUAIL

NEUROPATOLOGÍA ASOCIADA CON LA INFECCIÓN POR *HAEMOPROTEUS LOPHORTYX* EN CODORNICES BOBWHITE

Carol Cardona¹, Arthur Bickford²

¹Veterinary Medicine Extension, Surge III, Rm. 1383, University of California, Davis, Davis, CA 95616

²California Animal Health and Food Safety Laboratory, Turlock, PO Box 1522 Turlock, CA 95381

RESUMEN

Las parvadas de codornices Bobwhite con frecuencia experimentan durante el verano índices de mortalidad que llegan al 20 ó 30%, debidas a *Haemoproteus lophortyx* en California. Las aves infectadas se rehusan a moverse, presentan plumaje erizado, esplenomegalia y emaciación. Aproximadamente el 10% de los animales infectados también presenta signos neurológicos como incapacidad para caminar o ponerse de pie, aun cuando todas las aves (excepto las moribundas) pueden volar. Muestran también sacudimientos de la cabeza, temblor y pataleo. Los cortes seriados de encéfalo de aves afectadas mostraron numerosas áreas de encefalomalacia, infiltración linfocitaria perivascular y estrechamiento de la luz de los vasos sanguíneos. Nuestra propuesta es que *H. lophortyx* penetra en las células endoteliales del cerebro y produce oclusión del flujo sanguíneo y encefalomalacia en las áreas irrigadas por los vasos afectados.

Commercial bobwhite quail flocks repeatedly experience summertime mortality reaching 20-30% (normal mortality is 2-6%) due to *Haemoproteus lophortyx* in California. In addition to the devastating economic losses to commercial quail producers, this parasite has hindered efforts to raise native California and other Western species of quail for release into the wild (1,3). We have studied *H. lophortyx* on one commercial bobwhite quail operation in Oroville, CA extensively (2). Mortality increases in May and drops precipitously once cold weather begins (November). Infected birds are reluctant to move, have ruffled feathers, and exhibit splenomegaly, emaciation and muscle wasting, with obvious hemorrhagic streaks in

skeletal muscle. Muscle forms of the parasite are consistent with schizonts of *H. lophortyx*, and gametocytes in the red blood cells are diagnostic for *H. lophortyx*.

An estimated 10% of infected bobwhite quail also exhibit the clinical signs of neurologic disease. These signs include imbalance manifest by an inability to walk or stand although all but moribund birds can fly. Head shaking, tremors, and paddling have all been observed. In order to explore the cause of these disease symptoms, we collected the brains of quail with one or more clinical signs of neurologic disease. Serial sections were stained with hematoxylin and eosin and examined histologically. Numerous areas of encephalomalacia were observed, as were perivascular cuffs with narrowed vessel lumens. We propose that *H. lophortyx* enters endothelial cells in the brain resulting blood flow occlusion and consequent foci of encephalomalacia in areas supplied by affected vessels.

REFERENCES

1. Campbell, H., and L. Lee. Studies on quail malaria in New Mexico and notes on other aspects of quail populations. New Mexico Dept. Game and Fish. Restor. Proj. W-41-R. 1953.

2. Cardona, C.J., A. Ihejirika, and L. McClellan. *Haemoproteus lophortyx* infection in bobwhite quail, Avian Dis. In press.

3. O'Roke, E. C. The morphology, transmission and life-history of *Haemoproteus lophortyx* O'Roke, a blood parasite of the California valley quail. Univ. California Pub. Zool., University of California Press, Berkeley, CA. 36:1-50. 1930.

AMPLIFICATION OF THE IL-2 GENE OF TOTAL CHICKEN SPLEEN CELLS IN A *SALMONELLA GALLINARUM* INFECTION

AMPLIFICATION OF THE IL-2 GENE OF TOTAL CHICKEN SPLEEN CELLS IN A *SALMONELLA GALLINARUM* INFECTION

Castellanos L¹, Ledesma N¹, Ortega D¹, Téllez G¹, Caldwell D²

¹ D.P.A.:AVES F.M.V.Z. U.N.A.M., ² Departments of Veterinary Pathobiology and Poultry Science Texas A&M University

SUMMARY

One of the most important cytokines in a *Salmonella* infection is IL-2. The amplification of this gene was attempted in neonatal chickens challenged with *Salmonella gallinarum*. IL-2 mRNA amplification was not observed using reverse transcriptase-polymerase chain reaction (RT-PCR). Nevertheless, the amplification of the gene by internal PCR was observed starting on day 1. IL-2 mRNA amplification obtained from B300 bird spleen cells is 95.7% homologous to the sequence published in 1999. No evidence was found of IL-2 as being the main cytokine in the immune response to *S. gallinarum* in neonatal chickens.

INTRODUCCION

La IL-2 es una de las moléculas centrales de la respuesta inmune celular y es una de las citocinas que se expresan por una infección de *Salmonella*.^{1,2} Se han realizado estudios para buscar diferencias moleculares en la IL-2 de diferentes líneas de pollo para encontrar alguna relación entre la susceptibilidad de estas líneas para algunas enfermedades.³ En el presente trabajo se estableció la técnica para amplificar el gen de la IL-2 para determinar su expresión en aves neonatas ante un desafío por *Salmonella*.

DESARROLLO

Se estableció la técnica de RT-PCR y de PCR interna para la amplificación del RNAm de IL-2 a partir de esplenocitos totales estimulados con Concanavalina A. Se verificó la amplificación obtenida por medio de cortes con enzimas de restricción, así como por secuenciación. Una vez obtenida la amplificación se evaluó la expresión de dicho gen a partir de esplenocitos totales de aves ligeras B-300 ALPES de 1 día de edad desafiados con 1X10⁸ UFC de *Salmonella gallinarum*. La evaluación de la expresión de dicho gen se llevó a cabo los días 1,2,3,4, 5, 6,7 y 10 postdesafío.

RESULTADOS

Se observaron lesiones y signos causados por la *Salmonella gallinarum* durante el desarrollo de la

enfermedad. A partir del séptimo día postinfección dichas lesiones disminuyeron considerablemente observándose mejoría evidente de las aves enfermas, mientras las aves del grupo control no presentaron ningún signo o lesión. Se logró el reaislamiento de *Salmonella* a partir de bazo. No se observó la amplificación del RNAm de IL-2 tanto en animales desafiados como en no desafiados, por lo tanto se hizo PCR interna y se observó amplificación de IL-2 desde el primer día postinoculación tanto en animales desafiados como en animales control.

DISCUSION

Garrity P⁴ menciona que para realizarse la transcripción de la IL-2 se debe de llevar acabo la activación de todo un complejo de proteínas, las cuales no se ha demostrado estén presentes en el pollo neonato. Los resultados del presente estudio muestran que el RNAm se encuentra presente desde el primer día de edad del pollo, pero no en cantidades suficientes para ser detectadas por RT-PCR, y que tiene un comportamiento similar en aves con y sin desafío por *Salmonella* lo que sugiere que la IL-2 no es la citocina principal en la resistencia a infecciones por *Salmonella*. Por otra parte, es importante considerar que Shaw J et al.⁵ demuestran que la vida media del RNAm de IL-2 es de 1 a 2 horas y que declina de 4 a 6 horas después. Se requieren mas estudios en los que se determinen los papeles que desempeñan otras citocinas ante infecciones por *Salmonella*.

REFERENCIAS

1. Sirard, J.C., Niedergang, F., Kraehenbuhl, J.P. Live attenuated *Salmonella*: a paradigm of mucosal vaccines. Immunol. Reviews 171:5-26. 1999.
2. Finlay, B.B., Brumell, J.H. *Salmonella* interactions with host cells: in vitro to in vivo. Phibs. Trans. R. Soc. Lond. B. Biol. Sci. 355:623-631. 2000.
3. Kaiser, P., Mariani, P. Promoter sequence, exon:intron structure, and synteny of genetic location show that a chicken cytokine with T-cell proliferative activity is IL2 and not IL15. Immunogenetics 49:26-35. 1999.

4. Garrity, P., Chen, D., Rothenberg E., Wold, B. Interlukin-2 transcription is regulated in vivo at level of coordinated binding of both constitutive and regulated factors. *Mol. Cell. Biol.* 14:2159-2169. 19994.

5. Shaw, J., Meerovitch, K., Bleackley, C., Paetkau, V. Mechanisms regulating the level of IL-2mRNA in T lymphocytes. *J.Immunol*140:2243-2248.1988.

APLICACIÓN DE UNA CUTÍCULA ARTIFICIAL EN HUEVOS INCUBADOS DE AVESTRUZ

APPLICATION OF AN ARTIFICIAL CUTICLE TO OSTRICH HATCHING EGGS

Marco A. Juárez-Estrada^A, Raúl Cervantes-Sánchez^A, José A. Quintana-López^A, Ernesto Ávila-González^A

^A Departamento de Producción Animal: Aves, Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia, Universidad Nacional Autónoma de México. Avenida Universidad 3000. Ciudad Universitaria 04510 México, D.F.
E-mail: britoco@servidor.unam.mx

SUMMARY

The effect of an artificial cuticle on moisture loss and hatchability was determined using 11 eggs from 6 African Black female ostriches, from August to November, 2000. The artificial cuticle was prepared using chicken egg albumin. The cuticle was analyzed by blocking the genetics of each female over moisture loss from each egg. Differences were observed between all 6 females. Treatment with the cuticle (moisture loss: 20.8%) was different to the treatment with no cuticle (average: 22.4%). The artificial cuticle helps decreasing moisture loss without affecting embryo livability.

RESUMEN

Se determinó el efecto de una cutícula artificial sobre pérdida de humedad e incubabilidad de 112 huevos de seis hembras *African black* de agosto a noviembre del 2000. La cutícula artificial se elaboró con ovoalbúmina de gallina. La cutícula se analizó bloqueando la genética de cada hembra sobre la pérdida de humedad de cada huevo. Se observaron diferencias entre las seis hembras. El tratamiento con la cutícula (pérdida de humedad: 20.8%) fue diferente al tratamiento sin ella (promedio: 22.4%). La cutícula artificial ayuda a disminuir la pérdida de humedad sin afectar la viabilidad del embrión.

INTRODUCCIÓN

En la actualidad se requiere aumentar la eficiencia en la producción de avestruces por lo cual la incubación artificial ayuda a eficientizarla, sin embargo; se debe monitorear cuidadosamente durante la incubación la pérdida de humedad de cada huevo. Se sabe que una gran cantidad de huevos de hembras jóvenes, viejas y algunos muy porosos tienen una

excesiva pérdida de humedad durante la incubación. Esta exagerada pérdida de humedad compromete la viabilidad del embrión, ésta pérdida es regulada por el intercambio gaseoso del embrión vivo, la cantidad y tamaño de los poros que tiene el cascarón, además de la humedad de la incubadora, por lo cual ésta última es la única que técnicamente es posible modificar. Se dice que para obtener una adecuada tasa de natalidad se requiere que el huevo pierda aproximadamente el 15% de su peso en forma de vapor de agua. Uno de los elementos presentes en el cascarón del huevo es la cutícula, la cual proporciona una barrera que evita el paso de agentes patógenos hacia el interior del huevo, amortigua la diferencia de temperaturas entre el interior y el exterior del huevo, regula el intercambio gaseoso al principio de la incubación e impide una excesiva pérdida de humedad.

Se ha observado que en algunas explotaciones de avestruces a gran altitud sobre el nivel del mar se presenta un alto porcentaje de mortalidad embrionaria tardía principalmente en huevos picados no nacidos posiblemente debida a la exagerada pérdida de humedad, se decidió determinar por lo tanto el efecto que tiene sobre la pérdida de humedad e incubabilidad la aplicación de una cutícula artificial sobre huevos de avestruz aptos para incubar.

MATERIAL Y MÉTODOS

Huevos para incubación.- Se utilizaron los huevos provenientes de seis hembras de avestruz *African black* (identificadas como 1, 5, 7, 21, 79 y 93) las cuales estuvieron en parejas con machos de la misma raza de febrero a noviembre del 2000. Para este estudio se utilizaron 112 huevos ovopositados de julio a octubre del año 2000.

Recolección de los huevos y desinfección.- Los huevos se recolectaron a partir del nido con guantes de hule, se procedió a limpiarlos de polvo con una franela limpia, posteriormente se asperjaron con una solución desinfectante con base a ácidos orgánicos. La cutícula artificial se elaboró a partir de un compuesto de ovoalbúmina de gallina contenida en un buffer estándar. Ésta se aplicó con un atomizador de gota mediana a una distancia de 15 cm de 56 huevos puestos en serie por cada una de las hembras evaluadas, dando el tratamiento de cutícula a un huevo sí y a los 56 siguientes únicamente se les desinfectó de manera rutinaria. Los huevos se almacenaron en el cuarto frío por un periodo de tres a cinco días a una temperatura de 18°C con una humedad relativa de 70-80%, después se les proporcionó una etapa de precalentamiento durante seis horas a una temperatura de 20 a 22°C y posteriormente se metieron a la incubadora

Incubación de los huevos.- Los huevos se incubaron durante treinta y nueve días en una máquina incubadora IAMEX tipo gabinete para noventa huevos de avestruz, a una temperatura de 97.5°F y 30% de humedad relativa. Para la eclosión se mantuvieron tres días más en una nacedora IAMEX tipo gabinete a una temperatura de 96°F y 50% de humedad relativa.

Metodología de estudio.- La metodología consistió en registrar el peso de cada huevo al momento de ingresar al cuarto frío y al momento de su traslado a la nacedora (treinta y nueve días de desarrollo embrionario, el porcentaje de pérdida de humedad se obtuvo de restar del peso inicial de entrada al cuarto frío el peso a los treinta y nueve días de incubación. La fertilidad de los huevos se determinó con base en un ovoscopiado realizado a los quince y veintiún días de incubación. La incubabilidad se obtuvo tomando en cuenta los avestripollos nacidos a partir del 100% del total de huevos diagnosticados como fértiles.

Análisis estadístico.- Para determinar el efecto del tratamiento de la cutícula sobre la pérdida de humedad se realizó un análisis de varianza a través de un modelo lineal generalizado empleando bloques incompletos, se bloqueó el efecto que tiene el aspecto genético de cada hembra sobre la pérdida de humedad de cada huevo ovopositado por la misma hembra.

RESULTADOS

Se observó que existen grandes diferencias entre las seis hembras evaluadas ya que los huevos de algunas pierden más humedad que los de otras, por ejemplo se observó que la hembra 1 perdió en promedio 18.25% de humedad mientras que la hembra 79 perdió hasta 27.24% de humedad. Los huevos de la hembra 1, 5, 7, 21, 79 y 93 con cutícula artificial perdieron 18.13%, 19.54%, 20.95%, 19.29%, 26.22% y 20.65% de humedad respectivamente. Mientras que sin

cutícula artificial los huevos de la hembra 1, 5, 7, 21, 79 y 93 perdieron 18.38%, 22.25%, 23.49%, 20.95%, 28.27% y 21.54% de humedad respectivamente. Al evaluar el modelo con bloqueo del factor genético se determinó que el tratamiento con la cutícula (promedio: 20.8%) fue diferente ($P < 0.0001$) al tratamiento sin ella (promedio: 22.4%). El porcentaje de incubabilidad de los huevos tratados con cutícula fue de 50.0% y el de los no tratados fue de 35.7%.

DISCUSIÓN

El utilizar algún tipo de sustancia no apta para reemplazar la cutícula natural con la finalidad de disminuir la pérdida de humedad a niveles que se pueden considerar normales (15%), a la altura sobre el nivel del mar que se está incubando en este tipo de explotación, probablemente pondría en riesgo la viabilidad del embrión, debido a que al taponar todos los poros y no permitir un adecuado intercambio de oxígeno el embrión muere disminuyendo por lo tanto la tasa de incubabilidad. A pesar de lo reportado por Christensen *et al* (1996)¹ quien indica que la estructura del poro del avestruz es de mayor complejidad que la del huevo de la gallina doméstica, la cutícula se puede ver afectada por diversos factores de manejo como son cuando la cutícula natural es removida debido a que el huevo fue puesto en la tierra o el piso y tuvo que limpiarse con una lija, un trapo, o bien tuvo que ser lavado, asperjado con líquido desinfectante o haber sido fumigado con exceso de formaldehído y permanganato de potasio. El empleo de la cutícula probada en este trabajo puede llegar a ser muy útil para rescatar embriones valiosos provenientes de huevos ovopositados por hembras viejas o embriones provenientes de huevos ovopositados que pierden demasiada humedad la cual probablemente es debida a un gran tamaño del poro o a bien a un adelgazamiento del cascarón. Se observó que en algunas hembras (Hembra 5) la cutícula artificial ayuda a disminuir más eficientemente la pérdida de humedad de los huevos que lo observado en otras hembras (Hembra 1), lo cual indica que existen condiciones particulares de la estructura del cascarón descritas ya por Christensen *et al* (1996)¹ de cada una de las hembras estudiadas aquí, que se encuentran afectadas en mayor grado por la utilización de la cutícula artificial influyendo directamente con el grado de intercambio gaseoso y por lo tanto con la pérdida de vapor de agua.

El utilizar una cutícula artificial disminuye la pérdida de humedad durante la incubación, por lo cual se observa que la utilización de una cutícula de este tipo ayuda a disminuir una exagerada pérdida de humedad, sin embargo, se deben considerar algunos factores como el reportado por Enguilo (1994)² donde al utilizar una cutícula artificial elaborada con ovoalbúmina de gallina doméstica asperjada sobre

huevos de reproductoras pesadas viejas, observó al igual que en el presente estudio, que se aumentaba significativamente la incubabilidad y disminuía la pérdida de humedad durante la incubación, sin embargo, reportó además un menor peso en los pollitos nacidos, lo cual posiblemente podría repercutir directamente sobre la calidad de los mismos. Esta última característica no se evaluó en el presente estudio. Se requieren más investigaciones acerca de la óptima composición de esta cutícula en la incubación de huevos de avestruz y otras especies aviares que presenten problemas de incubación por exagerada

pérdida de humedad o bien pérdida de la cutícula natural.

REFERENCIAS

1. Christensen, V.L. Davis, G.S., and Lucre L.A. Eggshell conductance and other functional qualities of ostrich eggs. *Poultry Sci.* 75: 1404-1410. 1996.
2. Enguilo, M. B. L. Efecto de la aplicación de una cutícula artificial a base de albúmina, sobre el cascarón en la incubabilidad de huevos de gallinas de 58 semanas de edad. tesina de licenciatura. Universidad Nacional Autónoma de México, México. 1994.

DETERMINACIÓN DEL PESO ÓPTIMO DE INCUBACIÓN EN HUEVOS DE AVESTRUZ

DETERMINATION OF OPTIMUM EGG WEIGHT IN OSTRICH HATCHING EGGS

Marco A. Juárez-Estrada¹; Raúl Cervantes-Sánchez¹; José A. Quintana-López¹; Ernesto Ávila-González¹

¹Departamento de Producción Animal: Aves, Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia, Universidad Nacional Autónoma de México. Avenida Universidad 3000. Ciudad Universitaria 04510 México, D.F.
E-mail: britoco@servidor.unam.mx

SUMMARY

The optimum weight of eggs yielding a successful hatch, and that of non hatched eggs were determined. The average weight of hatched eggs prior to incubation was 1.53 Kg, and 1.54 Kg for the eggs of the first and second cycles, respectively. Non-hatched egg weights were 1.59 Kg, and 1.64 Kg for the first and second cycles, respectively. On day 39 hatched egg weights were 1.26 Kg, and 1.25 Kg for the first and second cycles, respectively. The weights of non-hatched eggs were 1.24 Kg, and 1.28 Kg for the first and second cycles, respectively. Moisture loss rates of hatched eggs were 17.33%, and 18.21%, for the first and second cycles, respectively. Moisture loss rates of non-hatched eggs were 22.08%, and 21.9%, for the first and second cycles, respectively.

RESUMEN

Se determinó peso óptimo de huevos que eclosionaron exitosamente y los que no. El promedio de huevos nacidos antes de incubar del primer ciclo fue 1.53 Kg, del segundo 1.54 Kg. Los no nacidos del primer ciclo fue 1.59 Kg, del segundo 1.64 Kg. Al día 39 los huevos eclosionados del primer ciclo fue 1.26 Kg, del segundo 1.25 Kg, Los no eclosionados del primer ciclo fue 1.24 Kg, del segundo 1.28 Kg. La pérdida de humedad de los nacidos en el primer ciclo

fue 17.33%, del segundo 18.21%. Los no nacidos del primer ciclo fue 22.08%, del segundo 21.9%.

INTRODUCCIÓN

Actualmente la selección genética efectuada en las avestruces, principalmente en la única raza existente (*African black*) se ha concentrado más en la calidad de los productos, como las plumas o bien en la cantidad de huevos, que en la calidad de la reproducción. La prácticamente nula selección genética efectuada en la crianza del avestruz no ha permitido obtener aún huevos uniformes a partir de las aves reproductoras. Este proceso se vislumbra a plazo muy largo, principalmente por el tiempo y dinero requerido.¹ Por lo tanto y con base a la ausencia de selección genética, los parámetros de incubación deben ser válidos para una amplia banda media, no obstante debe buscarse la máxima uniformidad en los huevos puestos y seleccionados para la incubación. Se ha observado que la mayor parte de los huevos incubados en una explotación ubicada en el altiplano mexicano pierden más humedad de la requerida mostrando ser uno de los principales problemas que afectan la incubabilidad y factibilidad económica de la explotación.² En el presente estudio se evalúa el peso óptimo de incubación de huevos eclosionados favorablemente durante dos ciclos de producción. Los hallazgos de este análisis son discutidos con relación a

las implicaciones requeridas para mejorar la incubabilidad de los huevos de avestruz.

MATERIAL Y MÉTODOS

Sitio del estudio.- El presente estudio se realizó en el criadero de avestruces de la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia de la Universidad Nacional Autónoma de México ubicado en Zapotitlán, Tláhuac, México, D.F ubicado a una altitud de 2,250 m. s. n. m.

Huevos para incubación.- Se utilizaron 535 huevos incubados provenientes de 11 hembras de avestruz *African black* durante el ciclo de reproducción de 1999 y 486 huevos incubados provenientes de 9 hembras durante el ciclo de reproducción del 2000. Las hembras estuvieron en parejas con machos de la misma raza de febrero a noviembre de cada ciclo de producción.

Incubación de los huevos.- Los huevos del primer ciclo (1999) se incubaron durante treinta y nueve días en una máquina incubadora Jamesway tipo AVN®. Las del segundo ciclo (2000) en una incubadora IAMEX tipo gabinete para noventa huevos de avestruz, a una temperatura de 97.5°F y 30% de humedad relativa. Para la eclosión de los avestripollos durante los dos ciclos se mantuvieron tres días más en una nacedora IAMEX tipo gabinete a una temperatura de 96°F y 40-50% de humedad relativa.

Metodología de estudio.- La metodología consistió en registrar el peso de cada huevo al momento de ingresar al cuarto frío y al momento de su traslado a la nacedora (a los treinta y nueve días), obteniendo el porcentaje de pérdida de humedad restando la diferencia existente entre el peso a los treinta y nueve días de incubación del peso inicial de entrada al cuarto frío. La fertilidad de los huevos se determinó con base en un ovoscopiado realizado a los quince y veintiún días de incubación. La nacencia se obtuvo tomando en cuenta a los avestripollos nacidos a partir del 100% del total de huevos determinados como fértiles.

Análisis estadístico.- Se consideraron descriptivamente los promedios de peso de los huevos eclosionados durante el primer y segundo ciclo antes de incubar y al momento de la transferencia. Además de los promedios de peso de los huevos no eclosionados durante el primer y segundo ciclo antes de incubar y al momento de la transferencia. Se determinó el porcentaje de pérdida de humedad de los huevos eclosionados en el primer y segundo ciclo. A su vez se determinó el porcentaje de pérdida de humedad de los huevos no eclosionados del primer y segundo ciclo de producción.

RESULTADOS

El promedio de peso de los huevos nacidos antes de incubar (Cuarto Frío) durante el primer ciclo (1999)

fue de 1.53 Kg y al día 39 de incubación momento de la transferencia fue de 1.26 Kg. En los huevos no nacidos el promedio antes de incubar fue de 1.59 Kg y al día 39 de 1.24 Kg. El promedio de peso de los huevos nacidos antes de incubar durante el segundo ciclo (2000) fue de 1.54 Kg y al día 39 de incubación fue de 1.25 Kg. En los huevos no nacidos el promedio antes de incubar fue de 1.64 Kg y al día 39 de 1.28 Kg. El porcentaje de pérdida de humedad en los 56 huevos eclosionados del ciclo 1999 fue de 17.33%, mientras que de los 79 huevos fértiles no eclosionados la pérdida de humedad fue de 22.08%. El porcentaje de pérdida de humedad en los 52 huevos eclosionados del ciclo 2000 fue de 18.21%, mientras que de los 141 huevos fértiles no eclosionados la pérdida de humedad fue de 21.9%.

DISCUSIÓN

Lo que se observa es que el peso promedio de los huevos eclosionados durante los dos ciclos antes de incubar (1.535 Kg.) tiende a ser más bajo que el promedio de los huevos no eclosionados (1.615 Kg). Lo cual indica de acuerdo a diferentes autores^{1,2,3,4,5} que los huevos demasiado grandes presentan problemas de incubabilidad. El peso promedio ideal (1.40 Kg) propuesto por diferentes autores^{2,3,4,5} sugiere que es necesario contar con hembras que ovopositen huevos con esta característica. El peso promedio al momento de la transferencia (39 días) de los huevos eclosionados favorablemente durante los dos ciclos (1.255 Kg) es semejante al promedio de los huevos no eclosionados durante los dos ciclos evaluados (1.260 Kg) lo cual indica que existe una mayor pérdida de peso durante el proceso de incubación de los huevos no eclosionados, posiblemente esta causa es la más importante y que hace que estos huevos no logren eclosionar. Factiblemente la causa es que ya no pueden aprovechar la energía del saco vitelino, y por lo tanto no pueden romper la cámara anterior y mucho menos romper el cascarón al momento de la eclosión, por lo cual muchos de estos embriones están muriendo posiblemente de asfixia. Algunos autores^{3,4} sugieren como pertinente una pérdida de peso del huevo durante la incubación del 15 % por lo cual indican como ideal al día 39 un peso promedio de 1.19 Kg. Deeming *et al*³ trabajando con un lote de 96 huevos fértiles encontraron que el peso antes de la incubación de 82 huevos eclosionados fue de 1.456 Kg y de 14 huevos no eclosionados fue de 1.424 Kg. No existe una diferencia significativa entre estos pesos que justifique el que exista un factor que explique el porque no eclosionaron esos 14 huevos. Al contrario de lo observado en la presente investigación donde el promedio de los huevos no eclosionados (1.615 Kg) fue mucho mayor al promedio de los huevos que si lo hicieron. (1.535 Kg). Los huevos estudiados por

Deeming *et al*³ provenían de un criadero comercial en Namibia lo cual sugiere que posiblemente las hembras que ovopositaron esos huevos presentaban mayor homogeneidad entre ellas, o bien los huevos provenían de tan sólo 3 o 4 hembras. El porcentaje promedio de pérdida de peso (12.39%) en los huevos eclosionados estudiados por Deeming *et al*³ fue menor al observado en los huevos no eclosionados (14.85%). Lo cual aunque fue menor a los promedios de pérdida de peso de los huevos analizados en el presente estudio muestran claramente que los huevos no eclosionados pierden mucha más humedad que los no eclosionados. Además Deeming *et al*³ indica que la pérdida de peso de los huevos incubados en su estudio fue menor a la requerida (15%). Una falla para perder suficiente peso durante la incubación puede conducir a una retención de agua por el embrión de avestripollo lo cual puede reducir a su vez la incubabilidad. Una baja pérdida de vapor de agua durante la incubación puede indicar también que existe una baja permeabilidad en la conductancia de vapor de agua y gases a través del cascarón. Si la permeabilidad del cascarón es muy baja, los problemas de abastecimiento de oxígeno y remoción de bióxido de carbono pueden complicar la sobrevivencia de los embriones que presentan un desarrollo avanzado. Lo cual posiblemente explica en cierto grado lo que sucedió con los huevos incubados por Deeming *et al*³, pero no explica lo sucedido con los huevos analizados en el presente estudio. Sin embargo, algunos investigadores^{1,2,3,4,5} mencionan que muchos de los huevos que mueren antes de eclosionar tienen grandes pérdidas de humedad a pesar de haber sido incubados con humedades relativas altas. Indicando que esta situación posiblemente se deba a una alta porosidad del cascarón. Factiblemente ésta es la causa de que todos los huevos analizados en el presente estudio, aún los eclosionados pierdan un porcentaje de humedad superior (promedio de los dos ciclos: 17.77%) al recomendado (15%). Esto

posiblemente explica la alta mortalidad observada durante el primer mes de vida, como consecuencia de la obtención de avestripollos (Clasificados como de segunda calidad) afectados por este exceso de pérdida de humedad durante el proceso de incubación. Algunos autores^{2,3,5} han sugerido que muchos huevos se salvarían de esta exagerada pérdida de humedad si la porosidad del cascarón se pudiera reducir artificialmente taponeando los poros temporalmente o bien sellando una parte de ellos. Otro factor importante que posiblemente incide sobre este aumento de pérdida de humedad ya mencionado por Juárez *et al*² es la altura del sitio de incubación. Lo que se concluye en el presente estudio es que los huevos analizados presentan una alteración en la conductancia de vapor de agua a través del cascarón que esta relacionada directamente con la porosidad del mismo.

REFERENCIAS

1. Stewart, J.S. Manejo del huevo de avestruz y de la incubación. *American Ostrich* 11: 22. 1995.
2. Juárez, E.M.A. Alfaro, C.J.C. Esquivel, P.J., y Ávila G. E. Determinación de la pérdida de humedad en huevos fértiles de avestruz "African Black" incubados en el Distrito Federal durante el periodo de reproducción de 1999. Memorias de la XXV Convención anual ANECA. Cancún, Quintana Roo, México. pp. 138-142. 2000.
3. Deeming, D.C. Ayres, L., and Ayres, F.J. Observations on the commercial production of ostrich (*Struthio camelus*) in the United Kingdom: incubation. *Vet. Rec.* 132: 602-607. 1993.
4. Christensen, V.L. Davis, G.S., and Lucore, L.A. Eggshell conductance and other functional qualities of ostrich eggs. *Poult. Sci.* 75: 1404-1410. 1996.
5. Gonzalez, A. Satterlee, D.G. Moharer, F., and Cadd, G.G. Factors affecting ostrich egg hatchability. *Poult. Sci.* 78: 1257-1262. 1999.

HALLAZGOS MACROSCÓPICOS Y MICROSCÓPICOS EN AVES CON PROBLEMAS DE DESPIGMENTACION TRABAJO EXPERIMENTAL

GROSS AND MICROSCOPIC FINDINGS IN POULTRY WITH POOR PIGMENTATION - EXPERIMENTAL WORK

Chapa B., J., Rodríguez G., E.

Investigación Aplicada S.A. de C.V. Tehuacán, Puebla, México.

SUMMARY

The purpose of this experiment was to reproduce –under controlled conditions– the clinical picture

observed in broilers, and to demonstrate the possible causes for the poor skin pigmentation of these birds, including the influence of the feed. Dietary carotene

and xanthophyll levels could have been the most important cause. Other findings like poor gizzard muscle development, and proventriculus lesions could also have exerted an influence. The cause of these lesions was not clear. Test feed texture/composition could also have had a major influence.

RESUMEN

El objetivo del trabajo fue reproducir en condiciones controladas el cuadro clínico observado en pollos de engorde y demostrar las posibles causas de la mala pigmentación de estas aves, incluyendo la influencia del alimento. El contenido de carotenos y xantofilas en el alimento pudo ser la causa más importante y, otros hallazgos como el pobre desarrollo muscular de la molleja y lesiones en el proventrículo pudieron influir en la presentación del problema. No se demostró la causa de estas lesiones; la composición y textura del alimento de prueba pudieron influir de manera importante.

INTRODUCCION

La pigmentación de la piel de las aves y de la yema del huevo es una característica que influye en la demanda de estos productos por parte del consumidor. Los problemas de mala pigmentación en las aves pueden tener diversas causas entre las que se incluyen la composición del alimento, deficiencias nutricionales, parasitosis y lesiones en el tracto digestivo por infecciones virales o bacterianas. Estas causas pueden ocurrir en forma independiente o en combinación con otras y tener un efecto negativo en el grado de pigmentación deseado. Con la finalidad de reproducir el cuadro clínico observado en varias granjas de pollo de engorde y tratar de demostrar las posibles causas de la mala pigmentación en las aves, incluyendo la influencia del alimento, se realizó un trabajo experimental en condiciones controladas.

MATERIALES Y METODOS

Aves. Se utilizaron 40 pollos de engorde de 1 día de edad que fueron separados en 4 grupos de 10 aves cada uno y alojados en unidades de aislamiento.

Alimento. Dos grupos de aves (grupos 3 y 4) se alimentaron a libre acceso con el mismo tipo de alimento (alimento de prueba) que había sido suministrado a las aves en las granjas. A los otros dos grupos de aves (grupos 1 y 2) se les suministró un alimento comercial para pollo de engorde elaborado en otra planta de alimentos.

Diseño experimental. Un macerado de intestinos obtenidos de aves representativas del problema en las granjas, fue preparado previamente en una proporción de 1:10 en solución salina fisiológica, filtrado y mezclado en el agua de bebida de los grupos 2 y 4 de aves al día de edad; a las aves de los grupos 1 y 3 no se

les proporcionó este macerado. Las aves se pesaron semanalmente hasta la sexta semana de edad y, al término de la prueba, se realizó la necropsia y se obtuvieron órganos que se fijaron en una solución de formol neutro al 10 %, se procesaron y tiñeron con hematoxilina y eosina por métodos convencionales para el examen histopatológico (4). Muestras de alimento fueron enviadas para el análisis químico proximal, la determinación de carotenos y xantofilas al laboratorio de química la empresa NUTEK S.A. en Tehuacán, Puebla.

RESULTADOS

Ganancia de peso. No se observaron diferencias significativas en el peso de las aves comparando los grupos por la prueba de comparación de medias ($P > 0.05$).

Análisis del alimento. Los resultados del análisis al alimento de prueba fueron los siguientes: grasa cruda (7 %), fibra cruda (3.3 %), proteína cruda (22.8 %), extracto libre de nitrógeno (52.3 %), carotenos (4 ppm) y xantofilas (11 ppm). Los resultados del análisis al alimento comercial: grasa cruda (5.6 %), fibra cruda (2.9 %), proteína cruda (21.9 %), extracto libre de nitrógeno (54.5 %), carotenos (7 ppm) y xantofilas (25 ppm). Esto demuestra importantes diferencias en la cantidad de carotenos y xantofilas, que fueron mayores en el alimento comercial. La cantidad de grasa, fibra y proteína, fueron ligeramente más altas en el alimento de prueba.

Necropsia. Una menor pigmentación de la piel y de la grasa corporal fue observada en las aves de los dos grupos 3 y 4 que consumieron el alimento de prueba en comparación con la pigmentación de las aves de los grupos 1 y 2 que consumieron el alimento comercial. Los proventrículos de las aves de los grupos 3 y 4 se observaron de mayor tamaño que los de las aves de los grupos 1 y 2. También, una marcada diferencia en el tamaño de las mollejas de las aves de los grupos 3 y 4, que se observaron notablemente pequeñas en comparación con las mollejas de las aves de los grupos 1 y 2.

Histopatología. Las lesiones microscópicas significativas fueron las siguientes:

Grupo 1. Moderada a notable infiltración linfocítica multifocal o difusa en la capa glandular del proventrículo.

Grupo 2. Moderada infiltración multifocal de linfocitos y presencia de folículos linfoides dispersos en la capa glandular del proventrículo; disminución de la población linfoide en la corteza del timo de dos aves; y lesiones de fase crónica de Infección de la Bolsa de Fabricio, caracterizadas por la disminución de la población linfoide y regeneración de folículos en las muestras de cuatro aves, y atrofia de los folículos en una muestra.

Grupo 3. Moderada a marcada infiltración multifocal de linfocitos, fibrosis y necrosis de células glandulares del proventrículo.

Grupo 4. Discreta infiltración linfocítica con presencia de folículos linfoides en la túnica glandular del proventrículo; disminución de la población linfocítica en la corteza del timo en tres muestras; y atrofia de folículos en una Bolsa de Fabricio.

DISCUSION

Las xantofilas son los compuestos responsables de la pigmentación de la piel más importantes en la alimentación de las aves (1); es fácil, por lo tanto, concluir que la deficiente pigmentación en dos grupos de aves se debió a la menor concentración de carotenos y xantofilas en el alimento, comparada con la concentración de estos compuestos en el alimento comercial y es muy probable que esta haya sido la causa más importante del problema en las granjas.

El hallazgo más notable en la necropsia fue el pobre desarrollo de la musculatura de la molleja y el mayor tamaño del proventrículo en las aves de prueba. Se ha reportado que el pobre desarrollo de la musculatura de la molleja es por lo general el resultado de una dieta finamente molida carente en fibra, y la dilatación del proventrículo es secundaria (5). Las propiedades de la textura del alimento como el contenido de fibra y el tamaño e integridad de las partículas son importantes para una apropiada musculatura y motilidad de la molleja (2). Los hallazgos en la necropsia difieren de lo anterior ya que el alimento de prueba tenía un mayor contenido de fibra que el alimento comercial, pero concuerdan en el aspecto de la textura, ya que el alimento de prueba era en forma de harina y el comercial en forma granular. De acuerdo a las lesiones microscópicas, no se pudo asociar el grado de lesión al hecho de que hayan

consumido el macerado de intestinos de aves afectadas en la granja, sin embargo un hallazgo interesante fueron las lesiones similares y menos severas en las aves que consumieron el macerado de intestino (grupos 2 y 4) que en las aves que no lo consumieron (grupos 1 y 3), independientemente del tipo de alimento. Solo en el grupo de aves que consumieron el alimento de prueba las lesiones fueron más severas y contribuyeron posiblemente al problema de despigmentación, ya que las lesiones en proventrículo pueden ser la causa del paso de alimento no digerido y las consecuencias como la mala absorción de nutrientes, pobre conversión, palidez, etc. (3)

REFERENCIAS

1. Castañeda, S., Hirschler, E., Sams, A.: Evaluación del color de la piel en pollo de engorda utilizando pigmentos naturales y sintéticos en la dieta. Memorias de la XXVI Convección de ANECA. Ed. Asociación Nacional de Especialistas en Ciencias Avícolas, Acapulco. Guerrero. México (2001).
2. Ferket, P.: La nutrición de pavos y reproductoras comerciales. Memorias de la XVI Congreso latinoamericano de avicultura. Ed. Asociación Peruana de Avicultura, Lima, Perú (1999).
3. Goodwin, M., Hafner, S., Bounous, D., Latimer, K., Player, C., Niagro, F., Campagnoli, R., Brown, J.: Viral proventriculitis in chickens. Memorias de la XXI Convección de ANECA. Ed. Asociación Nacional de Especialistas en Ciencias Avícolas, Cancún, Q. Roo, México (1996).
4. Luna, L.G.: Manual of histological staining methods of the armed forced institute of pathology, 3rd ed. Blackiston Div., Mcgraw-Hill, New York, 1968.
5. Ridell, C. The influence of fiber in the diet on the dilatation (hypertrophy) of the proventriculus in chickens. Avian Dis. 20: 442-445. 1976.

NEISSERIA SP. - A NOVEL BACTERIUM OF POULTRY

R.P. Chin

California Animal Health & Food Safety Laboratory System, Fresno
2789 S. Orange Ave., Fresno, CA 93725, rpchin@ucdavis.edu

RESUMEN

Una bacteria no identificada anteriormente, perteneciente a la familia Neisseriaceae, se aisló de pollos y pavos con enfermedad respiratoria. Setenta y seis cepas de esta bacteria han sido aislados durante los últimos 5 años. La secuencia del 16S rRNA ha demostrado que esta bacteria es una nueva especie dentro del género *Neisseria*.

In October 1995, an unidentified bacterium was submitted to the California Animal Health and Food Safety (CAHFS) Laboratory System, Fresno lab, for identification. After extensive testing, this isolate was only identified as a nonfermentative, gram-negative (NFGN), rod-shaped bacterium. Four months later, this same bacterium was isolated in pure cultures from the lungs of turkeys with severe pneumonia. Since then, 38 cases were identified from which 76 strains of the NFGN was isolated from the respiratory system of

turkeys and chickens with respiratory disease. Cases were submitted from various parts of the country.

Most cases reported a history of respiratory distress and/or increased flock mortality. Lesions seen in infected birds included tracheitis and pneumonia, which correlate with the sites of isolation. Sixty-one percent of the isolations were made from the trachea and 25% from the lung. Occasional isolations were also made from the infraorbital sinuses, heart sac and air sacs. Age of infected birds ranged from 35 to 315 days in turkeys, and 53 days to 3 years in chickens. Other bacteria, such as *Escherichia coli*, *Ornithobacterium rhinotracheale*, *Mycoplasma gallisepticum*, *M. synoviae*, *M. meleagridis*, *Bordetella avium* and *Pasteurella multocida* were also isolated from affected sites in 90% of the cases. In addition, Newcastle disease, pneumovirus infection and infectious laryngotracheitis were seen in some of the affected birds.

Preliminary assessment of phenotypic characteristics indicated this bacterium was different from common pathogenic or opportunistic bacteria isolated from the avian respiratory tract. The colonies appear small, grey, slightly raised with entire edges. All isolates were gram-negative, rod-shaped, positive for catalase and oxidases, and grew at 25C, 35C and 42C. The API 20NE system resulted in biocodes of 0000044 (95%) or 0000045 (5%). Fatty acid analysis demonstrated that the bacterium belonged to the family Neisseriaceae. Comparative 16S rRNA gene sequencing analysis demonstrated that the bacterium is a new species within the genus *Neisseria*. The significance of this organism in respiratory disease in birds is unknown, though a preliminary study found it to produce pneumonia in turkeys.

(A full-length article will be published in *Avian Diseases*).

DISK-DIFFUSION TESTING OF REFERENCE AND POULTRY VETERINARY BACTERIAL ISOLATES FOR SUSCEPTIBILITY TO AUREOMYCIN® (CHLORTETRACYCLINE)

PRUEBA DE DIFUSIÓN EN DISCO PARA DETERMINAR LA SUSCEPTIBILIDAD A LA AUREOMICINA® (CLORTETRACICLINA) DE AISLAMIENTOS BACTERIANOS DE REFERENCIA Y DE CASOS AVÍCOLAS

Steven R. Clark, James Skinner, Jeremy J. Mathers

Alpharma Inc., Animal Pharmaceuticals, P.O. Box 1399, Fort Lee, NJ 07024 USA

RESUMEN

Se realizó un estudio para evaluar la actividad antibacteriana *in vitro* de la clortetraciclina contra cepas de *Escherichia coli*, *Salmonella typhimurium* y *Pasteurella multocida*. Se probaron las siguientes cepas: *E. coli* ATCC (Colección Americana de Cultivos Tipo) 25922, *S. typhimurium* ATCC 14028 y *P. multocida* ATCC 12945. Para la evaluación se obtuvieron aislamientos de pavo y de pollo de *E. coli* (n = 21), *P. multocida* (n = 19) y *S. typhimurium* (n = 8) de seis laboratorios veterinarios de diagnóstico avícola. El procedimiento de análisis fue congruente con los lineamientos del NCCLS, realizando la incubación a 35°C en agar Mueller-Hinton. La susceptibilidad de los aislamientos se probó usando discos comerciales de aureomicina (A-30) y los resultados mostraron actividad antibacteriana contra *E. coli*, *S. typhimurium* y *P. multocida*.

SUMMARY

A study was conducted to assess the *in vitro* antimicrobial activity chlortetracycline against strains of *Escherichia coli*, *Salmonella typhimurium* and *Pasteurella multocida*. Isolates were tested for susceptibility using commercially prepared disks containing chlortetracycline (Aureomycin). *E. coli*, *S. typhimurium* and *P. multocida* were all inhibited by chlortetracycline.

MATERIALS AND METHODS

Strain *E. coli* ATCC 25922 were included for quality control, along with reference strain *S. typhimurium* ATCC 14028 and *P. multocida* ATCC 12945. Turkey and chicken isolates of *E. coli* (n=21), *P. multocida* (n=19) and *S. typhimurium* (n=8) were obtained from 6 poultry veterinary diagnostic laboratories and evaluated. The testing procedure was consistent with NCCLS guidelines, incubated at 35 degrees Celsius on Mueller-Hinton agar. Isolates were tested for susceptibility using commercially prepared

Aureomycin test disks (A-30) that are 6.4 mm filter paper disks impregnated with 30 mcg of chlortetracycline. Twenty selected strains were additionally tested with standard commercial tetracycline disks (Te-30).

RESULTS AND DISCUSSION

Against the tested reference strains, both Aureomycin chlortetracycline and tetracycline were antimicrobially active. Disk diffusion assays of ATCC strains indicate that chlortetracycline is antimicrobially active against *E. coli* with zone diameters of 18.0-19.3 mm, *S. typhimurium* (17.0-18.6 mm) and *P. multocida* (33.7-34.7 mm).

The listed interpretative tetracycline (Te-30) ranges for *Enterobacteriaceae* are ≤ 14 mm, resistant; 15-18 mm, intermediate; and ≥ 19 mm, susceptible. Using the Te-30 interpretive criteria as a general guideline for Aureomycin (A-30) disks, 6/21 (29%) *E. coli*, 17/19 (89%) *P. multocida*, and 1/8 (13%) *S. typhimurium* strains had a susceptible or intermediate response. Note that official AST breakpoints have not been established by NCCLS for Aureomycin chlortetracycline (A-30) disks and they are intended for

research purposes only; use the Te-30 interpretive criteria as a general guideline for A-30 disks.

Seven of the *S. typhimurium* isolates tested were non-susceptible to the A-30 disks. Five of eight isolates were from the same poultry company but different farms in one region. These isolates could be similar serotypes having similar tetracycline patterns, and may not be representative of overall *S. typhimurium* response.

The results from ATCC strains were used as a reference to compare the field isolates, reporting the number (%) of isolates with measured zone diameters equal to or larger than the respective ATCC strain. Of the *E. coli* and *P. multocida* field isolates tested, 19% and 16%, respectively, had zones larger than ATCC strains.

The chlortetracycline (A-30) results were similar (13 of 20; 65%) to tetracycline (Te-30) for most strains. Seven of 20 (35%) were not susceptible to either drug and 6 (30%) isolates had significantly smaller chlortetracycline zone diameters.

Within this trial, all of the microorganisms had adequate growth under the test conditions. The results show that Aureomycin had antibacterial activity against the tested poultry pathogens.

EFECTO DE LA VACUNA CONTRA COCCIDIOSIS AVIAR, NOBLIS COX ATM®, EN GRADO DE PIGMENTACION Y PARAMETROS PRODUCTIVOS EN POLLO DE ENGORDA

THE EFFECT OF NOBILIS COX ATM®, AVIAN COCCIDIOSIS VACCINE, ON SKIN PIGMENTATION AND PRODUCTIVE PARAMETERS IN BROILERS

¹Verónica Dávila-Ramírez, ¹Marco A. Juárez-Estrada, ²Guillermo González Herrera, ²Francisco Ríos ¹Gerardo Nava-Morales, ¹Ernesto Ávila-González

¹Departamento de Producción Animal: Aves, Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia, Universidad Nacional Autónoma de México. Avenida Universidad 3000. Ciudad Universitaria CP. 04510 México, D.F.

²Intervet México. Av. Paseo de los Frailes 22 Parque Industrial Santiago Tianguistenco CP. 52600 Edo. de México
E-mail: vdavilav@yahoo.com & britoco@servidor.unam.mx

SUMMARY

The purpose of this research was to evaluate the effect of the vaccine Nobilis Cox ATM®, by measuring pigmentation and major productive parameters in broilers challenged with pathogenic coccidia. Four groups were used: A) vaccinated-challenged, B) vaccinated-non challenged, C) challenged-non vaccinated, and D) non vaccinated-non challenged. Vaccine was applied at 5 days of age. Challenge was given at 28 days of age. At 35 days of age lesions were scored. The best final pigmentation was obtained in the vaccinated groups. Group B was the best group.

INTRODUCCIÓN

En México la marcada tendencia a preferir productos avícolas fuertemente pigmentados, es por una creencia común que las aves con una tonalidad amarilla o amarilla-naranja son las más sanas, mejor alimentadas y por lo tanto más nutritivas ¹. Existen varios factores que afectan la pigmentación en el pollo de engorda. Estos pueden ser raza, sexo, manejo, alimentación y principalmente enfermedades gastrointestinales. La coccidiosis es la enfermedad parasitaria más importante de la producción avícola. Los parásitos protozoarios del género *Eimeria* se multiplican en el tracto digestivo, ocasionando daño

tisular con interrupción del proceso digestivo (absorción de nutrientes) y aumento en la susceptibilidad a otros patógenos infecciosos². En la actualidad ante el problema de disminución de sensibilidad de las drogas anticoccidianas empleadas rutinariamente en el control de la coccidiosis, se está implementando la práctica de vacunar al pollo de engorda contra coccidiosis. La estrategia que se persigue es producir un brote controlado de la enfermedad con un inóculo coccidiano conocido con la finalidad de inducir inmunidad y proteger a las aves ante un brote clínico ocasionado por cepas de campo^{3,4}. En el presente estudio se evalúa el impacto que tiene una vacuna (Nobilis Cox ATM®) contra coccidia sobre el peso, lesiones intestinales, eliminación de oocistos, grado de pigmentación y conversión alimenticia después de un desafío efectuado con un aislado de cepas patógenas de campo.

MATERIAL Y MÉTODOS

Animales de experimentación.- Se utilizaron 480 pollos de engorda (Ross x Ross) sexados mitad hembras y mitad machos, de un día de edad. Alojados de forma mixta en una caseta de ambiente natural del CEIEPA de la U.N.A.M. Separando los corrales con rodets de lámina galvanizada para evitar contaminación cruzada, como material de cama se utilizó 50% de viruta y 50% de paja de avena. Al día 8 de edad se vacunaron contra Newcastle vía ocular (cepa B1 0.03 ml) y subcutánea (cepa La sota 0.5 ml).

Vacuna.- La vacuna Nobilis Cox ATM (Intervet International B.V. Booxmeer-Holanda) contiene cuatro cepas de oocistos vivos esporulados, estas cepas vacunales se reproducen aún en presencia de ciertos anticoccidianos del tipo ionóforo, su composición por cada 5 ml (agua de bebida) es de 500 ooquistes esporulados de *Eimeria acervulina*, 100 ooquistes esporulados de *Eimeria tenella*, 50 ooquistes esporulados de *Eimeria maxima cepa ACM* y 50 ooquistes esporulados de *Eimeria maxima cepa ACVM*. La vacunación se efectuó al día cinco de edad a través del agua de bebida a una dilución 1:100 de acuerdo a las recomendaciones del fabricante. Se constató que los pollitos consumieran aproximadamente los 5 ml recomendados por el fabricante, ya que habían sido previamente privados del agua de bebida por treinta minutos.

Inoculo de desafío.- Se utilizó un inoculo parasitario aislado y tipificado en el Departamento de Producción Animal: Aves por el MVZ Marco A. Juárez Estrada, el inoculo consistió en proporcionar directamente al día 28 de edad con una cánula plástica directamente al divertículo esofágico de cada ave desafiada 2.0×10^4 de *E. acervulina*; 1.0×10^3 de *E. máxima* y 1.0×10^4 de *E. tenella* oocistos esporulados por ave.

Diseño experimental.- Las aves fueron divididas en cuatro grupos mixtos de tratamiento cada uno con tres repeticiones de 40 aves distribuidas aleatoriamente. Grupo A: Vacunado y desafiado; B: Vacunado y no desafiado; C: Desafiado y no vacunado y D: No vacunado y no desafiado. Al día 28, los grupos A y C fueron desafiados. Se suministró agua y alimento *ad libitum*, con una dieta estándar con base a sorgo y pasta de soya. Se adicionó pigmento amarillo de origen vegetal en la etapa de finalización a una concentración de 80 ppm, sin adicionar ningún tipo de anticoccidiano en cualquiera de las dos etapas de alimentación.

Evaluación del experimento.- Con la finalidad de determinar las lesiones por coccidia de acuerdo a la escala de Johnson y Reid (1970)⁵ siete días postinoculación (pi) se sacrificaron 5 aves de cada repetición. Durante los 49 días de evaluación, se registraron de forma semanal el peso y la conversión alimenticia. El grado de pigmentación se tomó a nivel de la vena de la grasa en la piel de la pechuga izquierda a los 42 y 49 días de edad, utilizando un colorímetro de reflectancia Minolta CR-300 (Minolta Ltd. Japan), con el sistema CIELab de brillantez (L), intensidad de enrojecimiento (a), e intensidad de amarillamiento (b). Al día 49 se realizaron dos mediciones, la primera en la granja antes de salir a rastro y la segunda saliendo de la línea de procesamiento del rastro. Semanalmente se hicieron muestreos con 5 g de heces conservadas en dicromato de potasio al 2.5%. La cuantificación de oocistos se efectuó en el Departamento de Producción Animal: Aves de la U.N.A.M.

Análisis estadístico.- Los parámetros productivos y el número total de la excreción de oocistos se evaluaron a través de la prueba de análisis de varianza (ANDEVA). Conforme a un arreglo factorial 2x2, un factor fue vacunación y el otro fue desafío. El índice de lesiones se evaluó con la prueba no paramétrica de Kruskal-Wallis. Las diferencias se determinaron a un nivel de significancia de $P < 0.05$.

RESULTADOS

La vacuna Nobilis Cox ATM® no afectó el peso final de las aves, los pesos no variaron entre los grupos a los 35, 42 ó 49 días de edad. Al día 14 de edad el grupo A mostró una mayor eliminación de oocistos (142,080a, número total por gramo de heces) difiriendo ($P < 0.05$) respecto a los grupos B, C y D (43,947b, 1,636b, 569b.) Al día 21 de edad el grupo C eliminó la mayor cantidad de oocistos (21,973a) que fue diferente ($P < 0.05$) al grupo A (6,116b), el grupo B junto con el grupo D no difirieron respecto a ningún grupo. Al día 28 no hubo diferencias entre grupos (A: 2,560a; B: 2,631a; C: 924a; D: 640a). A los 35 días de edad el grupo D presentó la menor cantidad de oocistos y el grupo C la mayor cantidad. Se observó diferencia entre los grupos desafiados y sin desafiar, estos últimos

(B y D) mostraron la mejor conversión alimenticia (2.07b).

Las lesiones más severas por *E. avervulina* fueron en los grupos A y C (1.94 ± 0.48 y 2.42 ± 0.53). La variable desafío mostró tener efecto $P=0.009$. Observándose diferencia entre los grupos desafiados (2.18a) y sin desafiar (0.99b), donde los grupos menos lesionados fueron los no desafiados. En las lesiones inducidas por *E. maxima* el grupo C fue el más afectado (1.81 ± 0.312 .) Los grupos menos lesionados fueron los grupos B y D (0 ± 0 y 0.45 ± 0.793 .) Con valor intermedio se observó al grupo A (1.16 ± 1.011). Los promedios de los grupos desafiados (1.49a) mostraron diferencia ($P<0.05$) respecto a los grupos menos lesionados que fueron los no desafiados (0.22b). En la evaluación del índice de lesiones para *E. tenella*, ambas variables (vacuna y desafío) mostraron efecto $P<0.05$. Los grupos menos lesionados fueron los vacunados (0.22b) seguidos por los grupos no desafiados (0.27b).

Respecto a la pigmentación a los 42 días de edad, el factor vacuna presentó efecto positivo $P=0.0001$, donde los grupos con mayor amarillamiento fueron los vacunados (15.73a) respecto a los no vacunados (12.65b). En el grado de enrojecimiento el grupo A fue el de menor valor, obteniendo el mayor valor de enrojecimiento el grupo C y el grupo D. Sólo la vacunación presenta efecto sobre la pigmentación de rojos ($P<0.001$) donde los grupos vacunados presentan el menor valor (0.64b) y los no vacunados el mayor (1.03a). A los 49 días de edad en la medición efectuada en la granja, el efecto vacuna mostró aumento sobre el grado de pigmentación amarillo presentando el mayor valor los grupos vacunados (18.26a) respecto a los no vacunados (15.51b). El grupo B mostró el valor más alto y el D el menor valor. En la medición de enrojecimiento no existió interacción de la vacuna con el desafío, como tampoco efectos principales, el grupo de mayor valor fue el D y el menor el B. Saliendo de la línea de rastro a los 49 días de edad, se observó efecto de interacción en el grado de amarillamiento, donde el grupo mejor pigmentado fue el B ($41.46 \pm 4.961a$) que difirió ($P<0.05$) al resto de los grupos. El peor grupo fue el D ($33.96 \pm 4.343c$) que fue semejante al grupo C y difirió ($P<0.05$) con relación al grupo A. Observando que la vacuna tuvo efecto para obtener una mayor pigmentación, donde el mayor promedio lo presentan los grupos vacunados (39.6). La variable vacuna tuvo el mayor efecto ($P<0.0003$), mostrando en los promedios que los grupos vacunados obtuvieron el mayor valor de amarillamiento (39.6a) en comparación a los grupos no vacunados (34.87b). No se encontraron diferencias en el enrojecimiento.

DISCUSIÓN

Las aves vacunadas mostraron crecimiento compensatorio como lo han mencionado varios autores^{3,4} dando como resultado que no haya habido diferencia estadística en pesos al día 49 de edad. La mucosa intestinal del grupo B no sufrió daños severos facilitando una mejor absorción de los nutrientes^{6,7}. La vacunación aparentemente no tiene efecto sobre el peso final, sin embargo, ante un desafío de campo Schettters⁸ menciona que la vacuna Nobilis Cox ATM mejora la conversión alimenticia. En el presente estudio se observó que aunque la conversión alimenticia de los grupos vacunados no muestra diferencia estadística respecto a los no vacunados, si se observa una tendencia a ser menor. El factor que tuvo efecto sobre las lesiones causadas por *E. acervulina* y *E. maxima* fue el desafío, favoreciendo a los no desafiados, mostrando que la vacuna presentó un efecto protector de las mucosas intestinales en el grupo A respecto al grupo C que fue el más afectado por no contar con la vacuna. En los grupos no vacunados se observó la contaminación por cepas vacunales comenzando con el grupo C y D a los 14 días de edad, mostrando un pico a los 21 días y posteriormente declinando al día 28, lo cual indica que la cepa contaminante, posiblemente fue *E. acervulina* debido a la alta inmunidad generada en menos de tres semanas, mientras que los grupos vacunados mostraron una tasa de replicación homogénea y sostenida. Schettters⁸ y colaboradores observaron una reducción del 80% en la eliminación de oocistos a los 21 días de edad en los grupos vacunados reducción semejante (89%) a la obtenida en esta prueba. La pigmentación medida en la granja a los 42 días de edad, mostró que la vacuna no interfirió en la absorción de pigmentos, manteniendo una buena integridad física de la mucosa intestinal, para continuar con sus procesos de absorción normales, como lo menciona Cortés^{9,10}, mostrando por lo tanto un mayor valor de amarillamiento en la pigmentación. Esto debido al menor daño temprano de la mucosa intestinal proporcionado por una buena inmunidad temprana³. A los 49 días se observó que el amarillamiento no se vio afectado por las variables del experimento en ambas lecturas (granja y rastro). El mayor valor lo obtuvo el grupo vacunado y no desafiado al mostrar diferencias respecto al resto de los grupos, mostrando que los grupos vacunados fueron los mejor pigmentados en general, por lo que se puede deducir que la vacuna no interfiere negativamente en la pigmentación. Schettters⁸ menciona como una ventaja importante de la vacunación, el proveer mayor flexibilidad en el tiempo en el cual las aves podrían ser sacrificadas, dado que no existe necesidad de periodos de retiro de droga anticoccidiana. Además de que las vacunas no presentan resistencia por parte de las coccidias patógenas de campo como sucede con los productos

químico-sintéticos¹¹. Sin embargo lo que si se tiene que considerar son los estudios de protección cruzada contra diferentes aislamientos de *Eimeria* sp provenientes de diferentes regiones geográficas del país.

CONCLUSIONES

El uso de la vacuna Nobilis Cox ATM[®] es recomendable, ya que el grupo que fue vacunado y no desafiado resultó ser el grupo con menor índice de lesiones, el menor en conversión alimenticia y el mejor pigmentado además de no haberse visto alterado el peso final.

REFERENCIAS

1. Multon, J.L. Aditivos y auxiliares de fabricación en las industrias agroalimentarias, ed. España :Acribia,1988.
2. Calnek, B.W. Enfermedades de las aves. ed. México: Manual Moderno, 1995.
3. Juárez, E.M.A. Téllez, I.G. La inmunidad celular en la inmunoprofilaxis de la coccidiosis aviar. Memorias del curso de Inmunoparasitología y biología molecular. México, Distrito Federal. pp. 18-28. 2000.
4. Suls, L. The continuing battle against coccidiosis. World Poultry-Misset Coccidiosis Special Supplement. 4-8, 1999.

5. Johnson, J. Reid, W.M. Anticoccidial drugs: lesion scoring techniques in battery and floor-pen experiments with chickens. Experimental Parasitol. 28: 30-36. 1970.

6. Muñoz, B.L. Las coccidiosis de las porciones anterior y media del intestino delgado del pollo y sus efectos. Medicina Veterinaria.; 15: 212-217. 1998.

7. Chapman, H.D., and Cherry, T.E. Eye spray vaccination: infectivity and development of immunity to *Eimeria acervulina* and *Eimeria tenella*. Journal of Applied Poultry Research. 6: 274-278. 1997.

8. Schettters, P. M. Janssen, A. J. M., and Vermeulen, A. N. A new vaccination concept against coccidiosis in poultry. World Poultry-Misset Coccidiosis Special Supplement. 26-27. 1999.

9. Cortes, C.R., and Cabriales, J.J. Efecto de la coccidiosis subclínica en la absorción de xantófilas de marigold por el pollo de engorda. VII Jornadas Médico Avícolas 1998 marzo 81-84. ANECA.

10. Cortes, C.R. Efectos de la coccidiosis sobre la pigmentación del pollo de engorda: revisión bibliográfica. Memorias de la VII Jornadas Médico Avícolas. México, Distrito Federal. pp. 814-914. 1998.

11. Solis, J. Control de la coccidiosis aviar. Acontecer Avícola. 3: 45:50. 1995.

TRANSFER OF FOOD BORNE BACTERIAL PATHOGENS: INVESTIGATING POTENTIAL MODES OF INFECTION IN TURKEYS

TRANSFERENCIA DE BACTERIAS PATÓGENAS DE ORIGEN ALIMENTARIO: INVESTIGACIÓN DE LOS MODOS POTENCIALES DE INFECCIÓN EN PAVOS

D. J. Donoghue^A, N. A. Cox^B, C.R. Cisar^C, Y. K. Kirby^C, P. J. Blore^A, H. L. Nichols^A,
B. M. Hargis^A, and A. M. Donoghue^C

^A Poultry Science Department, University of Arkansas, Fayetteville, AR 72701; ^B Nelson A. Cox, Poultry Microbiological Safety Research Unit, ARS, USDA, Russell Research Center, Athens GA 30605; ^C Poultry Production and Product Safety Research Unit, ARS, USDA Fayetteville, AR 72701

RESUMEN

Campylobacter se puede transferir a las pavas adultas mediante la inseminación artificial. Debido a que el semen en las granjas meleagrícolas comerciales se mezcla y luego se utiliza para inseminar a múltiples pavas, es muy factible que el semen contaminado pueda diseminarse al *Campylobacter* en toda la parvada. Los objetivos de este trabajo fueron: 1) Evaluar el semen de pavo recolectado al azar en granjas comerciales y determinar cuáles bacterias estaban

presentes en él; y 2) Evaluar el efecto de los diluentes para semen disponibles comercialmente sobre el crecimiento bacteriano. Las bacterias identificadas en el semen del pavo fueron *Pseudomonas aeruginosa*, *Escherichia coli*, *E. hermannii*, *Staphylococcus lentus*, *S. sciuri* o *S. capitis*, *Salmonella* y *Campylobacter*. Los diluentes para semen que contienen antibióticos reducen sólo en forma limitada la carga bacteriana en el semen del pavo.

Vertical transmission of *Campylobacter* between broiler breeder flocks and commercial broiler flocks has recently been demonstrated by molecular characterization of clonal isolates (1). How *Campylobacter* is transferred between broiler breeder flocks and progeny is unknown due to the inability to culture *Campylobacter* from eggs or hatcheries. *Campylobacter* may be transferred to hens via artificial insemination. Because semen on commercial turkey farms is pooled and then used to inseminate multiple hens, contaminated semen could easily spread *Campylobacter* throughout entire flocks. Semen collection by nature of the tom's anatomy is predisposed to fecal contamination. Because vertical transmission has only recently been reported (1), the likelihood for *Campylobacter* transfer in semen has not been evaluated. The objectives of this study were to: 1) evaluate turkey semen collected randomly from commercial turkey farms and determine which bacteria were present in the semen; and 2) evaluate the effect of commercially available semen extenders on bacterial growth.

METHODS

Six turkey flocks were evaluated for the presence of bacteria over a 7 week period. Semen containing randomized pool of ejaculates from 10-30 toms/farm was evaluated for bacterial load. Bacterial load was assessed using standard bacteriological methods. Briefly, 100ul semen was added to 9.9ml of Butterfield's phosphate diluent, 10 fold serial dilutions were performed and then 100ul of each dilution was plated on tryptic soy agar plates. Additionally, 10ul of raw semen was plated on Campy-cefex plates (containing the following antibiotics: cefoperazone, 20mg/L; vancomycin, 20mg/L; trimethoprim 20mg/L; and natamycin 25 mg/L) and grown overnight at 42C in a microaerophilic environment. DNA was extracted from semen samples for use in PCR using two different techniques. The first method was a very crude prep consisting of 100ul of raw semen diluted in 400ul dH₂O, boiled for 10 min at 100C and then placed on ice. The second method followed the sample enrichment protocol described previously (2). PCR reactions were performed as described by Soumet *et al.*, (3) and Vanniasinkam *et al.*, (4) except the annealing temperature used was 63C. To determine bacterial counts after exposure to commercially available semen extenders containing antibiotics, 10 ul of bacteria isolated from semen (kept frozen after collection) was placed into 10 ml of TBS and grown overnight. Equal portions (0.25 ml) of bacterial culture and 4 different treatment groups, 3 replicates each, were combined and incubated for 15, 30, and 60 min at room temperature. The four semen extenders treatments were 1) without antibiotic; 2) with 200

ug/ml of gentamicin (Field Ready Turkey Extenders Green and Blue, respectively); 3) with 2.5 ug/ml gentamicin and 8.8 ug/ml tylosin (Ovodyl); and 4) with enrofloxacin (TSS Medium). All extenders were provided by IMV Inc., Minneapolis, MN.

RESULTS AND DISCUSSION

Pseudomonas aeruginosa, *Escherichia coli* and *hermannii*, *Staphylococcus lentus*, and either *sciuri* or *capitis*, *Salmonella* and *Campylobacter* were identified in turkey semen. One of the flocks tracked for seven weeks (August-September) consistently tested positive for *Campylobacter*, which has been further identified as *C. coli* using genus and species specific primers in PCR (2, 4). *Salmonella enteritidis* was also identified by PCR (using genus species specific primers, (3)) in two of the flocks tracked. All extenders containing antibiotics resulted in a log or greater reduction in bacterial count compared to the extender without antibiotics at the 15 min time point. At the 30 min time point only the treatment 2 extender caused a log reduction compared to control and no difference in bacterial counts was noted at the 60 min time point. Because turkey semen has not been considered a source for pathogenic bacteria, antibacterial diluents for these pathogens have not been developed or tested for efficacy against human food borne pathogens. It appears semen extenders containing antibiotics produce a limited reduction in bacterial load in turkey semen. We are currently evaluating the efficacy of antibiotic containing semen extenders against *Salmonella* and *Campylobacter*.

REFERENCES

1. Cox, N., N.J. Stern, K. Hiatt, and M. Berrang, 1999. Transmission of *Campylobacter jejuni* from breeders to commercial broiler chickens. Tenth Internat. Workshop on *Campylobacter*, *Heliobacter* and Related Organisms H.L.T. Mobley, I. Nachamkin, D. Mcgee, eds. Baltimore, MD. Pg 61.
2. Gonzalez, I., K. A. Grant, P. T. Richardson, S. F. Park and M. D. Collins. 1997. Specific identification of the enteropathogens *Campylobacter jejuni* and *Campylobacter coli* by using a PCR test based on the *ceuE* gene encoding a putative virulence determinant. J. Clinical Microbiology 35:759-763.
3. Soumet, C., G. Ermel, V. Rose, N. Rose, P. Drouin, G. Salvat, and P. Colin. 1999. Identification by a multiplex PCR-based assay of *Salmonella typhimurium* and *Salmonella enteritidis* strains from environmental swabs of poultry houses. Letters in Applied Microbiology 29: 1-6
4. Vanniasinkam, T., J. A. Lanser and M. D. Barton. 1999. PCR for the detection of *Campylobacter* spp . in clinical specimens. Letters in Applied Microbiology 28: 52-56.

EL VIRUS DE INFLUENZA AVIAR. ¿POTENCIAL PANDÉMICO? (REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA)

AVIAN INFLUENZA VIRUS: PANDEMIC POTENTIAL? (A BIBLIOGRAPHIC REVIEW)

Escorcia, M.

Departamento de Producción Animal Aves. magdaescorcia@yahoo.com

SUMMARY

Three papers are summarized demonstrating that direct bird-to-human avian influenza virus transmission hardly occurs in mother nature. Beare *et al.*, found that humans are refractory to the infection with avian viruses. Scholtissek, Banks, Claas, Kida and Ito, propose swine as the species where dual infections can occur (avian influenza, human influenza), thus allowing events of genetic re-arrangement, resulting in progeny capable of infecting humans. Castrucci and Claas identified influenza viruses with genetic re-arrangements from both poultry and humans (H3N2) in pigs.

RESUMEN

Se resumen tres trabajos del área de influenza aviar donde se demuestra que la transmisión directa del virus de ave a humano es difícil en la naturaleza.

Beare y col., encontraron que los humanos son refractarios a la infección con virus aviares.

Scholtissek, Banks, Claas, Kida e Ito, proponen a los cerdos como la especie animal donde se dan infecciones duales (influenza aviar, influenza humana) permitiendo eventos de rearrreglo genético dando progenie capaz de infectar a humanos.

Castrucci y Claas identificaron virus influenza con rearrreglos genéticos de aves y humanos (H3N2) en cerdos.

INTRODUCCIÓN

La transmisión directa de virus de influenza aviar (H5N1) a 18 humanos en Hong Kong en 1997 con 6 muertos estableció que estos virus pueden transmitirse aparentemente de forma directa al humano y causarles una infección letal.

Se ha propuesto un posible mecanismo:

- Los virus aviares pueden transmitirse sin rearrreglo genético pero deben primero adaptarse a las células humanas en otras especies animales.

REFERENCIAS

1. Beare, A. S., and R. G. Webster. 1991. Replication of avian influenza virus in humans. *Arch. Virol.* 119: 37-42.
2. Banks, J., Speidel, E., and Alexander, D. J. 1998. Characterisation of an avian influenza A virus isolated from a human – is an intermediate host necessary for the emergence of pandemic influenza viruses? *Arch. Virol.* 143: 781-787
3. Ito, T., Couceiro, N. S. S., Kelm, S., Baum, L. G., Krauss, S., Castrucci, M. R., Donatelli, I., Kida, H., Paulson, J. C., Webster, R. G. and Kawaoka, Y. 1998. Molecular basis for the generation in pigs of influenza A viruses with pandemic potential. *J Virol* 72: 7367-7373.
4. Shaw, M., Cooper, L., Xu, X., Thompson, W., Krauss, S., Guan, Y., Zhou, N., Klimow, A., Cox, N., Webster, R., Lim, W., Shortridge, K., Subbarao, K. 2002. Molecular changes associated with the transmission of avian influenza A H5N1 and H9N2 viruses to humans. *J Med Virol* 66: 107-114.

SEXADO DE AVESRUCES

SEX DETERMINATION IN OSTRICHES

Esquivel PJ¹, Sánchez RE¹, Jínez MT¹, Avila GE¹, Flores DJL²

¹Centro de Enseñanza, Investigación y Extensión en Producción Avícola de la FMVZ-UNAM

²Secretaría de Producción Animal de LA FMVZ-UNAM

SUMMARY

Sex determination is an important management procedure in the integration of breeder couples or trios, or for the sale of sexed individuals. This procedure can be performed either visually or by palpation. This research evaluated 30 ostriches, i.e.: 5 birds of each of the following ages: 4 days, 1 month, 4 months, 6 months, 8 months, and 14 months. Birds were identified in accordance with hatch consecutive numbers. From 0 to 4 months an error rate of 26.6% was made. From 6 to 14 months no errors were made. In conclusion, sexing errors can be made in ostriches younger than 4 months.

RESUMEN

El sexado es un manejo importante, para formar pares, tríos reproductores o bien para comercializarlos. Este se realiza mediante un examen visual o palpación: En este trabajo se evaluaron 30 avestruces: 5 pollos de cuatro días de edad, 5 de un mes, 5 de cuatro meses, 5 de seis meses, 5 de ocho meses y 5 de catorce meses. Se identificaron de acuerdo al número progresivo de nacimientos. Resultados fueron del 26.6% de error, de cero a cuatro meses, y de seis a catorce meses no existió error. Esto indica un porcentaje de error en animales menores a 4 meses.

INTRODUCCION

El sexado en avestruces antes de la pubertad representa un manejo importante para su comercialización, ya que existen compradores que se interesan en adquirir avestruces pequeños por ser estos de bajo costos interesándose más en adquirir hembras que en machos para formar pares o tríos reproductores o con la finalidad de llevarlo al mercado. El sexado se lleva a cabo mediante un examen visual o palpación: a

la cuarta semana de edad, se presiona la porción más baja de la pared de la cloaca dando un giro con un movimiento circular horizontal y ventral de esta manera se aprecia el clítoris o pene del ave. En animales de cuatro meses se introduce el dedo índice en el piso de la cloaca y haciendo tracción para exteriorizar el pene o clítoris. El pene es más largo, cónico, ligeramente curvado hacia el lado izquierdo. El clítoris es más pequeño y de un color ligeramente más pálido. En avestruces mayores de cinco meses se puede diferenciar el sexo observando el pene del macho que emerge con el paso de la orina o cuando defeca. En las aves adultas el color es la clave más visible a partir de los 14 meses de edad, ya que estas empiezan a cambiar de coloración de las plumas, en el caso del macho es de color negro y el de la hembra de color gris.

MATERIAL Y METODOS

El siguiente trabajo se realizó en el C.E.I.E.P.A. de la FMVZ. UNAM donde se utilizaron 30 avestruces con las siguientes edades, grupo 1 con, 5 pollos de cuatro días de edad. Grupo dos 5 pollos de un mes. Grupo tres 5 pollos de cuatro meses. Grupo cuatro 5 pollos de seis meses. Grupo cinco, 5 avestruces de ocho meses de edad y grupo seis con 5 avestruces de catorce meses de edad. Los animales se identificaron con aretes de acuerdo al número progresivo de nacimientos.

RESULTADOS

Los resultados obtenidos en los animales sexados fueron del 26.6% de error, los de cero a cuatro meses de edad y de seis a catorce meses no existió error al sexado. Estos resultados indican que hay un porcentaje de error en animales menores a 4 meses.

IDENTIFICACIÓN DE VIRUS DE LA ENFERMEDAD DE GUMBORO EN EL PERÚ POR ELISA DE CAPTURA DE ANTÍGENO

IDENTIFICATION OF INFECTIOUS BURSAL DISEASE VIRUS IN PERU USING ANTIGEN CAPTURE ELISA

Eliana Icochea^B, Mónica Alba^B, Rosa Gonzalez^B, Manuel Contreras^c, Elmer Dávila^c y Stephanie Mengel-Whereat^A

College of Veterinary Medicine, San Marcos University, Lima Perú^B Department of Animal and Food Sciences, University of Delaware, Delaware USA^A, Merial Laboratories^c

SUMMARY

The study was conducted to determine the presence of the variants strains of Infectious bursal disease virus (IBDV) in commercial poultry farms in Perú. Eighty-five bursas from fifteen broiler farms were evaluated by antigen-capture enzyme immunoassays (Ac-ELISA). The monoclonal antibody (Mab) B29 was used to detect IBDV where twenty samples were positives, seventeen suspicious and forty-eight negatives. The Mab AVS was used as a control. A panel of Mabs: B29, B69, R63, BK9, 67, 57 and 10 was used for antigenic characterization in order to identify variant strains among the positives and suspicious samples. Only 29 samples showed reaction, 14 of them (48%) were classical strains, 6 (21%) were Delaware strains and 9 (31%) were not identified.

RESUMEN

El presente estudio (SE) tuvo como finalidad identificar la presencia de cepas variantes de virus de la enfermedad infecciosa de la bursa (VEIB) en granjas comerciales en Perú. Un total de 85 bursas de fabricación procedentes de 15 granjas de pollos de carne fueron evaluadas por la Técnica de ELISA de Captura de Antígeno. El anticuerpo monoclonal (Mab) B29 fue usado para detectar presencia de virus de Gumboro obteniéndose 20 muestras positivas, 17 sospechosas y 48 negativas. El anticuerpo monoclonal para el virus de la Enfermedad de Newcastle (ENC), AVS fue usado como control negativo. Las muestras positivas y sospechosas fueron enfrentadas a un panel de anticuerpos monoclonales contra el VEIB: B29, B69, R63, BK9, 67, 57 y 10, para identificar cepas variantes. Solo 29 muestras mostraron reacción, 14 de ellas (48%) fueron calificadas como de tipo clásico, 6 (21%) como Delaware y 9 (31%) no pudieron ser identificadas.

La Infección bursal es una enfermedad altamente contagiosa de pollos jóvenes ocasionada por un virus de la familia Birnaviridae que se caracteriza por producir dos formas de infección, una forma subclínica en aves de 1 a 3 semanas y una forma

clínica en aves de 21 a 65 días de edad. La célula blanco es el linfocito B inmaduro, por tanto el virus produce lesiones en Bursa de Fabricio ocasionando inmunosupresión en aves jóvenes. El cuadro clínico se caracteriza por tener un corto periodo de incubación, 2 a 3 días, 100% de morbilidad, 20 a 30% de mortalidad, diarrea acuosa blanquecina, depresión y erizamiento de plumas. (1)

Existen dos serotipos de virus 1 y 2, el serotipo 1 aislado en pollos y pavos, es patógeno solo en pollos, dentro de este serotipo son reconocidos 6 subtipos antigénicos que incluyen cepas clásicas y cepas variantes. El serotipo 2 es un virus no patógeno aislado de pavos. (2)

Para la detección de anticuerpos específicos son usadas pruebas de Virus neutralización y ELISA y para la detección del virus, Inmunofluorescencia directa e inoculación en huevos embrionados de 11 días. Durante los últimos años con la necesidad de identificar la naturaleza patogénica o antigénica de nuevas cepas, las técnicas de ELISA de Captura de Antígeno (3) y RT/PCR vienen siendo empleadas (4,5). La técnica de ELISA de captura de antígeno aprovecha la tecnología de los Mabs y tiene la ventaja de detectar el virus directamente del tejido bursal. Con un panel de Mabs conocidos es posible identificar cepas virales, sin embargo esta técnica está limitada a los Mabs usados, Anticuerpos adicionales son necesarios para identificar nuevas cepas. (3,6).

Durante la última década han sido reportadas en muchos países variantes antigénicas del serotipo 1 (3, 5,7). En el Perú en zonas avícolas densamente pobladas se observan algunas veces cuadros compatibles con procesos inmunosupresivos sin embargo no existen estudios que indiquen si estos están o no relacionados a cepas variantes del virus.

El presente estudio tuvo como objetivo detectar si en las granjas comerciales del Perú además de las cepas clásicas están presentes también cepas variantes del virus de Gumboro

MATERIAL Y METODOS

Lugar de estudio. Laboratorio de Patología Aviar de la Facultad de Medicina Veterinaria de la Universidad Nacional Mayor de San Marcos, Lima-Perú.

Bursas de Fabricio. Fueron colectadas 85 bursas de Fabricio de pollos de carne entre 09 y 35 días de edad procedentes de 15 granjas ubicadas en una zona avícola densamente poblada. Las muestras procedían de aves que habían recibido una dos vacunaciones con vacunas conteniendo cepas intermedias, la última de ellas por lo menos 9 días antes de la fecha de muestreo.

ELISA de captura de antígeno. La prueba fue hecha siguiendo la técnica previamente descrita (3).

Placas de ELISA de 96 celdas (Costar Corp., Cambridge, MA) fueron cubiertas con una solución de 1 mg de Staph aureus proteína A / ml de agua destilada, luego diluidas 1/500 en buffer bicarbonato / carbonato y mantenidas a 4 ° C en cámara húmeda durante toda la noche. Fue removida la proteína A y añadidos los anticuerpos de captura (Mab) diluidos 1:100 en PBS-tween y 2% de nonfat dry milk (NFDM) luego incubados a 4 ° C toda la noche. La placa fue bloqueada con una solución de 2% de NFDM por 1 hora a temperatura de ambiente. Removida la leche y adicionadas las bursas homogenizadas en tres volúmenes de solución salina fosfatada (PBS) conteniendo 0.05% de una solución de Tween-20 e incubadas por 2 horas a 39 ° C. Las placas fueron lavadas tres veces con la solución buffer de lavado y luego añadidos anticuerpos secundarios policlonales de pollo contra VEIB diluidos 1:500 en buffer IBEIA y 0.5% de inmunoglobulina G humana (IgGH) e incubados por 1 hora a 39 ° C. Las placas fueron nuevamente lavadas tres veces y adicionado el conjugado (Goat anti-chicken peroxidasa) diluido en una solución buffer IBEIA mas IgGH (KPL), incubadas por 1 hora a 39 ° C y nuevamente lavadas. Fue añadido el substrato peroxidasa (ABTS- KPL #50-66-00) y cuando fue alcanzada una D.O. de 1,000, fue añadida una solución de dodecyl sulfato de sodio al 5% para paralizar la reacción. La lectura se hizo en un lector de ELISA usando un filtro de una longitud de onda de 405 nm.

Anticuerpos monoclonales: Un panel de 8 Mabs del virus de Infección bursal proporcionados por el Dr. John Rosenberger de la Universidad de Delaware, USA. fueron usados para la identificación viral: B29,

B69, R63, Bk9, 67, 57, 10, AVS; este último es un anticuerpo monoclonal del virus de la Enfermedad de newcastle (ENC) y fue usado como control negativo. Las cepas de campo fueron clasificadas de acuerdo a su reactividad frente a los anticuerpos monoclonales.

RESULTADOS

La evaluación de 85 Bursas de Fabricio de pollos de carne procedentes de 15 granjas avícolas, analizadas por la técnica de ELISA de captura de antígeno frente al Mab B29 que es usado para detectar presencia de virus de Gumboro dio como resultado 20 muestras positivas (24%), 17 sospechosas (20%) y 48 negativas (56%). Las muestras positivas y sospechosas enfrentadas a los anticuerpos monoclonales B69, R63, Bk9, 67, 57 y 10, para identificar cepas variantes mostraron reacción en 29 muestras, 14 de ellas (48%) fueron calificadas como de tipo clásico, 6 (21%) como Delaware y 9 (31%) no pudieron ser identificadas.

Los resultados de la prueba por granjas son mostrados en la tabla 1.

DISCUSION

Trabajos hechos por el Dr. Snyder y col, usando anticuerpos monoclonales permitieron detectar cambios progresivos de epitopes de neutralización viral en las cepas clásicas y es así como variantes Delaware del serotipo I del VEIB fueron identificadas desde mediados de la década de los 80 en áreas avícolas en Delmarva (1, 7). Posteriormente también han sido reportadas en Costa Rica, El Salvador, Guatemala, México, Puerto Rico, Venezuela (8) y últimamente en Brasil (9). El presente trabajo tuvo como objetivo determinar si en nuestro país además de las cepas clásicas están presentes cepas variantes del virus, con ese fin fueron examinadas bursas de Fabricio de pollos de carne procedentes de 15 granjas comerciales ubicadas en la costa norte de la capital habiéndose detectado presencia del VEIB clásico en 9 de las 15 y, variantes Delaware en solo dos de ellas. La prevención de la enfermedad se realiza mediante medidas de bioseguridad y la aplicación de vacunas. Para lograr una óptima protección mediante esto último es necesario que las cepas vacunales tengan similar composición antigénica con las cepas de campo, de ahí la importancia de determinar la naturaleza de los virus desafiantes presentes en las explotaciones avícolas (1).

Tabla 1. Resultados de la prueba de ELISA de captura de antígeno para detectar cepas variantes del virus de EIB en 15 granjas de pollos de carne.

Granja	Edad (Días)	Resultado	Tipo
1	30	+	Clásico
2	25	+	Delaware
3	14	-	-
4	09	-	-
5	15	-	-
6	26	-	-
7	18	-	-
8	35	-	-
9	25	+	Delaware
10	30	+	Clásico
11	30	+	Clásico
12	35	+	Clásico
13	31	+	Clásico
14	25	+	Clásico
15	23	+	Clásico

REFERENCIAS

1. Lukert, P.D., B. W. Calnek, H. John Barnes, C. W. Beard, L. R. McDougald, and Y. M. Saif, Infectious Bursal Disease. In: Diseases of poultry, 10th ed. Iowa State University Press, Ames, IA. pp 721-738. 1997.
2. Jackwood, D. J. , Saif, Y. M. And Moorhead, P. D., Immunogenicity of Infectious bursal disease virus serotypes I and II in chickens. Avian Dis. 29: 1184-1194. 1985.
3. Snyder, D. B., D. P. Lana, B. R. Cho, and W. W. Marquardt. Group and strain-specific neutralization sites of infectious bursal disease virus defined with monoclonal antibodies. Avian Dis. 32: 527-534. 1988.
4. Jackwood, D.J., and R., J. Jackwood. Infectious bursal disease viruses: Molecular differentiation of antigenic subtypes among serotype I and II in 75 Ohio chicken flocks. Avian Dis 38:531-537.1994
5. Sellers, H. S.;Villegas, P. N.,Seal, B. S. and Daral Jackwood. Antigenic and Molecular Characterization of three Infectious Bursal Disease Virus Field Isolates. Avian Dis. 43: 198-206. 1999.
6. Mengel, S. Department of Animal and Food Sciences, University of Delaware, Delaware USA. Comunicación personal. 2000.
7. Rosenberger, J. K., and S.S. Cloud. Isolation and characterization of variant infectious bursal disease viruses. J..Am. Vet. Med.Assoc. 189-357. 1986.
8. Fernandez, R., E. Montiel, C. Jaramillo, Y. Ramos, D. Jackwood, J. Quesada y N. Master. Caracterización de las Cepas del Virus de la Enfermedad de Gumboro en Aves de Engorde en Latinoamérica, utilizando la técnica de Reacción en Cadena de la Polimerasa. Memorias del XV Congreso Latinoamericano de Avicultura, Cancún, México. (del 23 al 26 de Setiembre), 119-121. 1997.
9. Ikuta, Nilo. Diagnostico Molecular do Virus da Doença de Gumboro. II Simposio da Doença de Gumboro. Campinas, SP. Brasil (del 21al 22 de noviembre del 2001). pp 93-101.

EFFECTO DE UNA VACUNA COMERCIAL DE COCCIDIA SOBRE EL TIPO DE ESPECIE PRESENTE DESPUÉS DE UN DESAFÍO PATÓGENO EN POLLOS DE ENGORDA

EFFECT OF A COCCIDIAL COMMERCIAL VACCINE ON THE *EIMERIA* SPECIES PRESENT AFTER A PATHOGENIC CHALLENGE IN BROILERS

Marco A. Juárez-Estrada, Ana. I. Fernández-Cortés, Gerardo M. Nava-Morales, Rubén Merino-Guzmán, Nestor Ledesma-Martínez, y Guillermo Téllez Isaías

Departamento de Producción Animal: Aves, Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia, Universidad Nacional Autónoma de México. Avenida Universidad 3000. Ciudad Universitaria 04510 México, D.F.
E-mail: britoco@servidor.unam.mx

SUMMARY

A coccidial vaccine was evaluated regarding both production parameters and the species of *Eimeria* present after challenge. Groups were: 1) non vaccinated; 2) non vaccinated/challenged (day 21); 3) vaccinated/challenged; and 4) vaccinated/non challenged. At day 28, groups 1, 2, 3, and 4 weighed 923.30 ± 126.24^a ; 775.05 ± 99.05^b ; 731.47 ± 120.58^b ; and 726.16 ± 130.67^b , respectively. At 7 days p.i. *E. acervulina* was found in 87%, 54%, and 21% in groups 1, 2, and 3, respectively. Groups 2 and 3 showed 22%, and 41% *E. maxima*, respectively. Groups 1, 2, and 3, showed 13%, 24%, and 28% *E. tenella*, respectively.

RESUMEN

Se evaluó una vacuna de coccidia sobre parámetros productivos y tipos de especies de coccidia presentes después de un desafío. Los grupos fueron 1) Sin vacuna; 2) Sin vacuna y desafío (día 21); 3) Vacunado y desafiado; 4) Vacunado sin desafío. Al día 28 los grupos 1, 2, 3, y 4 pesaron 923.30 ± 126.24^a ; 775.05 ± 99.05^b ; 731.47 ± 120.58^b y 726.16 ± 130.67^b . Siete días p.i., el grupo uno presentó 87% el dos 54% y el tres 21% de *E. acervulina*. El grupo dos 22%, el grupo tres 41% de *E. máxima*. El grupo uno 13%, el dos 24% y el tres 38% de *E. tenella*.

INTRODUCCIÓN

Para el control de la coccidiosis aviar se han empleado desde 1950 compuestos químicos y de fermentación biológica. Estos compuestos utilizados cuidadosamente en los programas anticoccidiales son eficientes para el control de la enfermedad. Sin embargo, el inevitable desarrollo de resistencia anticoccidiana por cepas de campo ha dado como resultado la formulación de otro tipo de estrategias para el control de la coccidiosis, las vacunas basadas en la utilización de oocistos vivos es una de ellas. La vacunación contra la coccidiosis no es un concepto nuevo, las vacunas se han utilizado en la industria

avícola desde la década de 1950. Las cinco vacunas más representativas en el sector comercial (marcas registradas como “Coccivac”, “Immucox”, “Nobilis-Cox”, “Livacox” y “Paracox”) incorporan en su composición algunas de las siete especies de *Eimeria* que más afectan a las aves. Cuando se aplican bajo buenas prácticas de crianza todas estas vacunas proporcionan inmunidad sólida contra la infección por coccidias. Sin embargo, a pesar de que otorgan una buena protección contra la enfermedad principalmente en pollonas de reemplazo y aves reproductoras, estas vacunas se han utilizado menos frecuentemente en el pollo de engorda. El principal motivo para este bajo empleo es que el rendimiento obtenido en el pollo de engorda registrado como ganancia de peso, eficiencia alimenticia y pigmentación, no siempre es igual al que se observa en los pollos medicados profilácticamente. Aunque algunos de los aspectos relacionados con una eficiente vacunación tienen que ver directamente con el tipo o sistema empleado para la vacunación, existen reportes de respuesta inmune pobre a *E. tenella*, además de variabilidad antigénica de las cepas de *E. máxima*, mostrando frecuentemente que la vacunación con oocistos vivos no siempre es efectiva en proteger contra cepas de campo de diferentes sitios geográficos. En el presente estudio se evalúa el impacto que tiene una vacuna contra la coccidiosis sobre el peso, calificación de lesiones, eliminación de oocistos y tipos de especies de coccidia presentes después de un desafío efectuado con un aislado de cepas patógenas de campo.

MATERIAL Y MÉTODOS

Animales de experimentación.- Todas las aves fueron criadas en piso en corrales de 100 x 120 cm en una unidad de aislamiento de la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia de la Universidad Nacional Autónoma de México. Consumieron una dieta estándar para pollo de engorda isoproteíca e isocalórica, con base sorgo-soya y sin ningún tipo de droga anticoccidiana.

Vacuna.- Se utilizó una vacuna comercial para pollo de engorda que contenía una dosis estándar para mil pollos con oocistos esporulados de *E. acervulina*, *E. máxima* y *E. tenella*. Se aplicó al día de edad por aspersión en una cabina especialmente diseñada de acuerdo a las recomendaciones del fabricante.

Inoculo de desafío.- Se utilizó un inoculo parasitario aislado y tipificado en el Departamento de Producción Animal: Aves por el MVZ Marco A. Juárez Estrada, el inoculo consistió en proporcionar directamente con una canula plástica directamente al divertículo esofágico 6.0×10^4 de *E. acervulina*; 5.0×10^3 de *E. máxima* y 4.0×10^4 de *E. tenella* oocistos esporulados por ave.

Diseño Experimental.- Cada grupo experimental consistió de veinte pollos de engorda (Ross x Ross) y se dividió en cuatro grupos experimentales. 1) Testigo negativo sin vacuna; 2) Testigo positivo sin vacuna y con desafío; 3) Vacunado y desafiado; 4) Vacunado sin desafío. Los grupos vacunados recibieron la vacuna por aspersión al día de edad como ya se ha descrito. Los grupos 2 y 3 fueron desafiados a los 21 días de edad, los grupos 1 y 4 solo recibieron solución tamponada por la misma vía y con el mismo manejo. Semanalmente las aves fueron pesadas y los oocistos en heces fueron cuantificados. Se verificó el porcentaje de incremento de peso del día 21 al día 28 de edad. Al día 28 de edad (7 días postinoculación (p.i.)) todas las aves de cada grupo se evaluaron para calificar lesiones de acuerdo a la escala establecida por Johnson y Reid (1970) y los oocistos recuperados p.i. fueron determinados cualitativamente de acuerdo a lo descrito por Long *et al* (1976).

Análisis estadístico.- Los efectos registrados en los parámetros por grupo fueron determinados por análisis de varianza de un solo factor. Las diferencias entre las medias de los grupos fueron determinadas a través de la comparación múltiple de medias de Tukey con una significancia para alfa preestablecida de acuerdo a Fisher de $P < 0.05$.

RESULTADOS

Al día 7 el grupo uno peso 133.10 ± 18.31^a , el grupo dos 125.70 ± 14.66^a , el grupo tres 127.10 ± 18.31^a y el cuatro 122.44 ± 20.0^a ; Al día 14 los grupos 1,2,3, y 4 pesaron 321.80 ± 54.59^a ; 313.40 ± 51.57^a ; 309.55 ± 53.10^a y 292.44 ± 42.70^a ; respectivamente. Al día 21 los grupos 1, 2, 3, y 4 pesaron 615.65 ± 100.10^a ; 622.00 ± 72.67^a ; 544.83 ± 105.88^b y 504.94 ± 88.49^a ; respectivamente. Al día 28 los grupos 1,2,3, y 4 pesaron 923.30 ± 126.24^a ; 775.05 ± 99.05^b ; 731.47 ± 120.58^b y 726.16 ± 130.67^b ; respectivamente. El porcentaje de incremento de peso del día 21 al día 28 en el grupo uno fue de 50.13%, en el grupo dos fue de 24.59%, en el grupo tres de 34.46% y en el grupo cuatro de 44.09%. La calificación de lesiones para *E.*

acervulina de los grupos 1, 2, 3 y 4 fue 0.87 ± 0.76^b , 2.35 ± 0.49^a , 0.94 ± 0.43^b y 0.27 ± 0.46^c respectivamente. Para *E. máxima* los grupos 1,2,3 y 4 presentaron 0.05 ± 0.22^c , 1.75 ± 0.64^a , 1.17 ± 0.73^b y 0.11 ± 0.32^c respectivamente. Para *E. tenella* los grupos 1,2,3 y 4 presentaron 0.05 ± 0.22^b , 0.25 ± 0.55^a , 0.70 ± 0.89^a y 0.11 ± 0.32^b respectivamente. El conteo de oocistos al día 7 de edad de los grupos 1,2,3 y 4 fue de 0 ± 0^b , 0 ± 0^b , 626.2 ± 750.5^a y 421.48 ± 512.45^a oocistos respectivamente. A los 14 días los grupos 1,2,3 y 4 excretaron 0 ± 0^c , 0 ± 0^c , $49,600.0 \pm 1,995.5^b$ y $260,000 \pm 31,450.84^a$ oocistos respectivamente. A los 21 días de edad los grupos 1,2,3 y 4 excretaron 0 ± 0^c , 0 ± 0^c , $1,598,666.6 \pm 837,835.5^a$ y $718,666.6 \pm 104,126.4^b$ oocistos respectivamente. A los 28 días de edad los grupos 1,2,3 y 4 excretaron $406,000.0 \pm 35,071.9^c$, $3,626,666.6 \pm 828,985.9^a$, $2,280,000.0 \pm 573,860.2^b$ y $62,666.6 \pm 10,927.4^c$ oocistos respectivamente. Al efectuar el análisis cualitativo de oocistos a los 21 días se determinó que el grupo uno presentó 0% de *Eimeria* sp.. El grupo dos 0% de *Eimeria* sp.. El grupo tres 80% de *E. acervulina*, 8% de *E. máxima* y 12% de *E. tenella*. El grupo cuatro 83% de *E. acervulina*, 2% de *E. máxima* y 15% de *E. tenella*. A los 28 días de edad 7 días p.i. se determinó que el grupo uno presentó 87% de *E. acervulina* y 13% de *E. tenella*. El grupo dos 54% de *E. acervulina*, 22% de *E. máxima* y 24% de *E. tenella*. El grupo tres 21% de *E. acervulina*, 41% de *E. máxima* y 38% de *E. tenella*. El grupo cuatro 84% de *E. acervulina*, 4% de *E. máxima* y 12% de *E. tenella*.

DISCUSIÓN

Lo que se determinó en el presente estudio es que la protección de la vacuna evaluada aquí contra *E. acervulina* fue eficiente al proteger al grupo vacunado y desafiado mostrando una afección del peso no significativa. El grupo control positivo mostró un mayor daño intestinal que el resto de los grupos, la recuperación de peso una semana después del desafío fue menor con relación al grupo 3. La ganancia en peso de los grupos 1 y 2 se redujo durante la fase aguda de la infección pero se incrementó durante la fase de recuperación de acuerdo a lo observado por Adams *et al* (1996). Siete días postinoculación las aves de los grupos vacunados desafiados y sin desafiar, no mostraron diferencias significativas de peso entre sí; pero en calificación de lesiones y eliminación de oocistos el grupo 2 fue diferente al grupo 1. Si bien la vacuna comercial protege contra un desafío de campo, esta protección no fue del 100% como se observa en el cuadro 1 donde el grupo vacunado y desafiado aunque muestra una menor reducción en la ganancia de peso respecto al grupo testigo positivo, esta ganancia de peso es menor al grupo vacunado no desafiado y al grupo testigo negativo que no recibió el desafío. El grupo vacunado y no desafiado muestra una menor

ganancia de peso en relación a la observada en el grupo testigo negativo (cuadro 1), posiblemente debido a que las especies vacunales se siguen replicando a esta edad y por lo tanto afectan la ganancia de peso, sin embargo, posteriormente este peso lo recuperan compensatoriamente dos semanas más tarde mostrando una menor conversión alimenticia de acuerdo a lo reportado por Dávila (2000). En el presente estudio la inmunidad humoral no tuvo un efecto importante en los grupos desafiados, aunque, Girard *et al* (1997) al utilizar un ensayo de cultivo *in vitro* de tejido intestinal durante 21 días después del desafío con *E. acervulina* y *E. tenella*, anticuerpos específicos de IgA e IgG se incrementaban únicamente después de la segunda semana postdesafío. Por lo cual posiblemente en este estudio no se determinó ninguna diferencia después de solo siete días postdesafío. Las investigaciones que muestran variabilidad antigénica por parte de *E. maxima* y pobre inmunidad por parte de *E. tenella* indican que la vacunación con una suspensión de oocistos vivos no puede llegar a ser tan eficiente en proteger contra desafíos de campo por cepas provenientes de diferentes localizaciones geográficas. Por lo cual las cepas de *Eimeria* sp presentes en las vacunas comerciales no siempre proporcionan suficiente inmunidad a los desafíos con cepas heterólogas de campo de estas mismas especies. Aunque la vacuna comercial utilizada en el presente estudio protege contra un desafío de campo, esta protección no fue del 100% ya que como ya se a descrito existe una mayor proporción de *E. maxima* en el grupo vacunado desafiado que en el grupo vacunado y no desafiado. La falta de protección cruzada entre cepas heterólogas de *E. maxima* se ha mencionado ya desde la publicación de Long en 1976; sin embargo no se había caracterizado adecuadamente esta falta de protección entre cepas de diferente origen geográfico hasta los recientes estudios hechos por Danforth (1998) quien ha mostrado que existe una enorme inmunovariación entre cinco cepas de *E. maxima* obtenidas de diferentes áreas en Norteamérica. Lo interesante es que en México se han introducido recientemente vacunas comerciales para pollo de engorda que contienen cepas vivas de *E. maxima* sin efectuar los estudios previos de inmunoprotección desafiando con cepas nativas. El presente estudio demuestra que la protección cruzada es importante a considerar en la protección conferida por una vacuna comercial y su probable éxito en proteger adecuadamente las parvadas de aves de diferentes localidades geográficas del país. A pesar de que *E.*

maxima se ha reportado como una especie muy inmunógena, en el presente estudio la vacuna de origen extranjero no protegió contra el aislado de origen mexicano, repercutiendo más esta falta de iprotección cruzada sobre los parámetros productivos que el efecto único de aplicar la vacuna sin desafiar. Ante el desafío contra *E. tenella* el grupo vacunado presentó una protección débil debido en parte a la mala generación de inmunidad de ésta especie en particular y posiblemente al igual que en el caso de *E. maxima* a la baja inmunidad cruzada de la vacuna con las cepas del aislado mexicano. Es importante considerar la caracterización molecular de las cepas nativas de *Eimeria* sp en México para comprender la relación que tienen en la protección conferida por cepas comerciales con la finalidad de determinar posibles variaciones antigénicas. Se requiere efectuar más investigación en el país respecto a la inmunidad cruzada contra *E. maxima* antes de utilizar vacunas de manera indiscriminada.

REFERENCIAS

1. Johnson, J., and Reid, W.M. Anticoccidial drugs: lesion scoring techniques in battery and floor-pen experiments with chickens. *Experimental Parasitol.* 28: 30-36. 1970.
2. Long, P.L. Millard, B.J. Joyner, L.P., and Norton, C.C. A guide to laboratory techniques used in the study and diagnosis of avian coccidiosis. *Folia Vet. Latina* 6: 200-217. 1976.
3. Adams, C. Vahl, H.A., and Veldman, A. Interaction between nutrition and *Eimeria acervulina* infection in broiler chickens: development of an experimental infection model. *British J. of Nutr.* 75: 867-873. 1996.
4. Dávila, R.V. Efecto de la vacuna Nobilis Cox ATM[®] contra la coccidiosis aviar sobre el grado de pigmentación y principales parámetros productivos en pollos de engorda. tesina de licenciatura. Universidad Nacional Autónoma de México, México. 2001.
5. Girard, F. Fort, G. Yvoré, P., and Quéré, P. Kinetics of specific immunoglobulin A, M and G production in the duodenal and caecal mucosa of chicken infected with *Eimeria acervulina* or *Eimeria tenella*. *Int. J. Parasitol.* 27:803-809. 1997.
6. Danforth, H.D. Use of live oocyst vaccines in the control of avian coccidiosis: experimental studies and field trials. *Int. J. Parasitol.* 28: 1099-1109. 1998.

COMPATIBILIDAD DE UN ADSORBENTE ORGANOALUMINOSILICATO DE MICOTOXINAS CON ADITIVOS QUIMICOS

COMPATIBILITY OF A MYCOTOXIN ADSORBING ORGANIC ALUMINUM SILICATE WITH CHEMICAL ADDITIVES

Fierro, J. A., y Medina, J. C.

Nutek, S.A. de C.V. 7 norte 416, Tehuacan, Puebla. México. nutek@grupoidisa.com.mx

SUMMARY

This paper describes the compatibility results of a organic mycotoxin adsorbant and chemical fungicidal and actericidal additives used in the manufacturing of balanced feeds(3). The inclusion of these additives is extremely important for the adequate protection against the contamination by different organisms during storage(2,5). In order to manage this problem, chemically-treated mycotoxin adsorbents have been developed for the control of non-polar mycotoxines like zearalenone. Even though, chemical reactions of aluminum silicates with fungicidal and bactericidal compounds have not been documented.

RESUMEN

El trabajo describe los resultados de compatibilidad de un adsorbente de micotoxinas, con tratamiento orgánico, contra aditivos químicos: fungicidas y bactericidas, que se utilizan en la elaboración de alimentos balanceados para animales (3). La inclusión de estos aditivos es de gran importancia para una adecuada protección contra la contaminación por diferentes microorganismos durante su almacenamiento (2,5). Para enfrentar este problema se han desarrollado adsorbentes de micotoxinas con tratamiento orgánico para el control de las micotoxinas no polares como la zearalenona, sin embargo, no se cuenta con la documentación de que los organoaluminosilicatos reaccionen químicamente con fungicidas y bactericidas.

Los problemas de contaminación con bacterias y hongos son de gran importancia para la industria pecuaria. Algunos hongos, además de disminuir la calidad nutritiva de los alimentos, pueden producir micotoxinas responsables de problemas en la industria pecuaria debido a que reducen los parámetros productivos. Algunas de ellas afectan el sistema inmune y en casos muy severos puede presentarse la muerte (2,3,4). El objetivo fue evaluar el efecto de cuatro aditivos químicos sobre un organoaluminosilicato comercial. Los aditivos a evaluar fueron los siguientes: Ácido propiónico

concentrado, diacetato de sodio Q.P., formaldehído en solución acuosa al 37 %, producto comercial patentado contra *Salmonella sp.* (formaldehído 30%-ácido propiónico 10%, etc.). El tiempo de contacto fue de 20 minutos, 7, 14, 21 y 28 días. Las mezclas se realizaron por duplicado con una semana de diferencia. Como medida de la compatibilidad se consideró la capacidad de adsorción de zearalenona por cromatografía de líquidos de alta resolución(1), dado que esta es una de las micotoxinas de menor polaridad. Los resultados obtenidos fueron los siguientes: el adsorbente presentó compatibilidad en todos los tratamientos durante el periodo de prueba, la adsorción fue del 100 % de zearalenona, solo en el día 14 se presentó una pequeña variación con tres de los aditivos ácido propiónico (98 %), formaldehído (97 %) y el producto comercial (98 %), la variación se puede atribuir a la naturaleza del producto. En conclusión, la inclusión de aditivos químicos en alimentos balanceados y materias primas tanto de origen vegetal como animal no presenta ningún problema con otros aditivos como el organoaluminosilicato, adsorbente de micotoxinas, estudiado.

REFERENCIAS

1. AOAC International. Official Methods of Analysis. 16th edition pag. 24. cp 49 International Arlington, Va. 1995.
2. Christensen, C. M., y D. B. Sauer. Storage of cereal grains and their products. Amer. Assoc. of Cereal Chemists, Inc. St. Paul, Minn. Pp 219 – 240. 1982.
3. Coelho, M. B. Molds, mycotoxins and preservatives in feed industry. Ed. BASF pag. 129. 1992.
4. Micotoxinas.Tercera conferencia internacional mixta FAO/OMS/PNUMA sobre micotoxinas. Túnez, Túnez. 1999.
5. Torres, V. R.. Agentes transmitidos por alimentos. Universidad de Guadalajara. Cap. 3 – 16. 1999.

EFFECTS OF THE VACCINATION AND NORMAL AVIAN GUT FLORA (NAGF) APPLICATION ON *SALMONELLA ENTERITIDIS/GALLINARUM* CONTROL IN COMMERCIAL LAYERS IN ITALY

EFFECTOS DE LA VACUNACIÓN Y DE LA APLICACIÓN DE FLORA INTESTINAL AVÍCOLA NORMAL (NAGF) SOBRE EL CONTROL DE *SALMONELLA ENTERITIDIS/S. GALLINARUM* EN PONEDORAS COMERCIALES, EN ITALIA

Grilli G.^A, Pisoni A.^A, Ricci A.^B, Meini A.^C, Stonfer M.^D, Tagliabue S.^E, Gallazzi D.^A

^ADipartimento di Patologia Animale, Igiene e Sanità Pubblica Veterinaria, Università degli Studi di Milano via Caloria 10, 20133 Milano – ITALY, ^BLab. di Referenza Nazionale per le Salmonellosi, IZS Legnaro, Padova – Italy, ^CIntervet Italia s.r.l., via Walter Tobagi 7, 20068 Peschiera Borromeo (MI) – ITALY, ^DBayer s.p.a. Sanità Animale, viale Certosa 126, 20156 Milano – ITALY, ^EIstituto Zooprofilattico Sperimentale, via Bianchi 9, 25124 Brescia – ITALY

RESUMEN

Desde 1997 existe en Italia un programa voluntario de control de *S. enteritidis* y *S. typhimurium* en ponedoras comerciales. Durante los últimos 3 años más de 50 millones de gallinas (60% de las parvadas italianas) se vacunaron contra *S. enteritidis* y/o *S. gallinarum*. El 30% de las gallinas recibió el NAGF ya sea en la incubadora o durante la primera semana de vida. La incidencia de tifoidea en las ponedoras y la presencia de *S. enteritidis* en el huevo han disminuido. Disertaremos sobre los resultados y los analizaremos.

SUMMARY

Salmonella enteritidis and *S. gallinarum* infections in Italy are not present in layer parents' flocks. In commercial layers fowl typhoid and *S. Enteritidis* infection sporadically occur because of the deficiency on biosecurity measures (mainly recycling eggs packages) and because of the warm climate in South Italy.

The introduction of *Salmonellae* in commercial layers flocks through feeds does not represent an important vector, as in chicken or turkey.

Since 1997 in Italy is effective a voluntary *S. enteritidis* and *S. typhimurium* control programme in commercial layers. During the last 3 years more than 50 million hens (60% of Italian flocks) were vaccinated against *S. enteritidis* (inactivated vaccine) and/or *S. gallinarum* (live vaccine). NAGF at the hatchery level or during the first week of age was applied to 30% of hens. Fowl typhoid in layers as well as the presence of *S. enteritidis* in eggs have decreased in the field, but the isolation of these organisms may occur again in live poultry/mammals or in avian meat products (Table 1). This situation is due to a reduced application of NAGF and of specific vaccines (only for economic reasons). At the same time there has been a decrease of salmonellosis with clinical signs by *S. enteritidis* and/or *S. gallinarum*. In order to control properly these infections, prophylactic programmes and specific vaccinations must be applied continuously for more years and biosecurity measures have be implemented.

Table 1. Isolation of *S. Enteritidis* and *S. Gallinarum* in animals and meat products from 1997 to 2000 in Italy.

Year	Chicken	Turkey	Other avian species	Bovine	Pork	Meat products Bovine/ Pork	Eggs	Feeds	Other	Total	
<i>S. Enteritidis</i>											
1997	128	2	4	11	2	4	40	28	-	40	259
1998	87	25	6	3	-	2	34	36	3	65	261
1999	78	10	8	-	2	7	24	25	1	40	195
2000	25	-	4	2	-	4	23	13	-	22	93
Total	318	37	22	16	4	17	121	102	4	167	808
<i>S. Gallinarum</i>											
1997	63	-	-	-	-	-	-	-	-	3	66
1998	12	-	1	-	-	-	-	2	-	-	15
1999	27	-	44	-	-	-	-	1	-	2	74
2000	10	-	3	-	-	-	-	-	-	1	14
Total	112	-	48	-	-	-	-	3	-	6	169

EVALUACIÓN DE LA CAPACIDAD DE SECUESTRO *IN VITRO* DE OCHRATOXINA A POR DIFERENTES SECUESTRANTES COMERCIALES UTILIZADOS EN MÉXICO

EVALUATION OF THE *IN VITRO* EFFECTIVENESS ON OCHRATOXIN A (OA) OF DIFFERENT MYCOTOXIN BINDERS USED IN MEXICO

García MAR¹, Rosiles MR², Bautista OJ².

¹ CEIEPA, Facultad de Medicina Veterinaria, UNAM.

² Laboratorio de Toxicología, Facultad de Medicina Veterinaria, UNA

SUMMARY

The sequestering ability on OA of 10 commercial mycotoxin binders used in Mexico was measured *in vitro*, using high performance liquid chromatography (HPLC) on unbound mycotoxin. Three different OA extraction methods were used. Similarly, OA-contaminated wheat was used as a mycotoxin source in one of the trials. Results showed wide variability depending on the extraction method. Only one product remained constant in its binding ability in all three trials. When OA-contaminated wheat was used as a source of OA, variability was even higher. These results demonstrate the little reliability of the *in-vitro* binding challenge test for the evaluation of mycotoxin binders.

RESUMEN

Se midió la capacidad de secuestro *in vitro* de ocratoxina A (OA) de 10 secuestrantes comerciales de micotoxinas utilizados en México, mediante cuantificación por cromatografía de líquidos de alta resolución (HPLC) de la micotoxina no secuestrada,

utilizando 3 diferentes métodos de extracción de OA. Asimismo, se utilizó trigo contaminado con OA como fuente de micotoxina en uno de los ensayos. Los resultados mostraron una amplia variabilidad según el método de extracción. Solo un producto se mantuvo constante en su capacidad de secuestro en los tres ensayos realizados. Cuando se utilizó trigo contaminado como fuente de OA, la variabilidad fue aún mayor. Estos resultados demuestran la poca confiabilidad del desafío de secuestro *in vitro* para la evaluación de un secuestrante de micotoxinas.

INTRODUCCIÓN

Las micotoxinas son metabolitos tóxicos de hongos que afectan el grano y otras materias primas. Una de las más importantes y tóxicas para aves jóvenes es la ocratoxina A (OA), que produce disminución de la ganancia de peso, inmunosupresión y mala pigmentación. Para combatir a las micotoxinas se ha recurrido al uso de secuestrantes, como los aluminosilicatos, consistentes básicamente en arcillas compuestas de aluminio y silicio combinados con otros

minerales en arreglos tridimensionales, que forman estructuras con amplia superficie de contacto y porosidad. Recientemente, nuevos productos a base de paredes celulares de levaduras han surgido en el mercado para tal fin. La eficacia de los secuestrantes se ha comprobado sólo para aflatoxinas en estudios *in vitro* e *in vivo*. Dada la presencia de otras micotoxinas, como OA, diversos productos han surgido en el mercado para su secuestro, y se hace necesario un control de calidad. La evaluación de secuestro *in vitro* busca simular las condiciones encontradas en el tracto digestivo del ave, tales como pH y el tiempo de contacto entre secuestrante y micotoxina. Sin embargo, tal evaluación no refleja el comportamiento del producto en condiciones de campo. No obstante, es el tipo de evaluación más frecuentemente utilizada por los fabricantes de secuestrantes, y en muchos casos, el único sistema de evaluación con que éstos productos cuentan antes de salir a la venta.

Dada ésta situación, el objetivo de la presente investigación fue medir la capacidad de secuestro *in vitro* de OA de 10 secuestrantes comerciales de micotoxinas, utilizando cromatografía de líquidos de alta resolución (HPLC) para cuantificar la micotoxina no secuestrada.

MATERIAL Y MÉTODOS

Se evaluaron 10 secuestrantes comerciales, a los cuales se les determinó el pH. Para el desafío de secuestro *in vitro* se colocaron 20 ml de solución de pepsina en ácido clorhídrico 0.075N en tubos de polipropileno, y se mezclaron 500 mg de secuestrante y por un lado, 250 mg de trigo molido contaminado con OA (ensayo I) y por otra parte 2 µg de estándar de OA (ensayos II, III y IV). Los tubos fueron colocados en baño María por 3 h a 37 C en oscuridad. De cada muestra se tomó una alícuota de donde la micotoxina libre (no secuestrada) fue extraída siguiendo 3 diferentes metodologías: Nesheim para HPLC (ensayo I y III), Stoloff (ensayo II), e igual que en ensayo I y III sin filtración de la muestra (Ensayo IV). Las muestras fueron inyectadas a un cromatógrafo de líquidos de alta resolución. Se calculó la curva de regresión lineal para los estándares de OA y las muestras problema. Para el cálculo del porcentaje de secuestro se cuantificó la micotoxina presente en el testigo negativo (tubo sin secuestrante) y se consideró ésta como el cien por ciento de la micotoxina (cero por ciento de secuestro). Los resultados de adsorción *in vitro* fueron analizados mediante la prueba de estadística no paramétrica de Friedman, considerando el ensayo de adsorción como bloque, con una significancia de $\alpha = 0.05$.

RESULTADOS

El porcentaje de adsorción de OA resultó muy variable según el método de extracción y el tipo de producto. Los porcentajes varían desde cero hasta 98.36 (Ver Cuadro) En el ensayo I, los resultados fueron también variables, dado que en algunos casos la concentración de OA no secuestrada fue mayor que en el testigo (Ver Cuadro). No es posible, por lo tanto, establecer alguna comparación entre las concentraciones obtenidas en los diferentes casos. El secuestrante que se mantiene constante en el secuestro de OA en los ensayos II a IV es el producto 5, siendo en promedio el de mayor porcentaje de secuestro *in vitro*.

DISCUSIÓN

No se encontró evidencia estadística de que la adsorción de OA por parte de alguno de los secuestrantes sea mejor. La diferencia fue numérica, y en la mayoría de los casos no coincide con lo mencionado para cada secuestrante por parte de sus fabricantes. Por otra parte, dada la variabilidad de los resultados obtenidos por diferentes métodos extracción de la muestra, la confiabilidad del ensayo *in vitro* como método de evaluación de un secuestrante es cuestionable, lo cual ha sido mencionado por varios autores respecto a las pruebas *in vitro*. Es importante considerar el uso de un testigo negativo, conteniendo la misma solución de contacto y micotoxina, pero sin secuestrante, que debe ser procesado y cuantificado como cualquiera de las muestras. De ésta manera, el valor de la toxina recuperada en éste testigo será considerada el cien por ciento de micotoxina de la cual partimos, y los cálculos para cada secuestrante deben ser realizados en base a dicho testigo. De no hacerlo así, la micotoxina perdida durante el proceso de extracción será considerada como secuestrada, lo cual nos arrojará un resultado falso.

El secuestrante que numéricamente presentó una mayor capacidad de secuestro *in vitro* de OA fue el identificado como producto 5, el cual es ampliamente recomendado por sus fabricantes para el secuestro de OA, situación que, al menos bajo condiciones *in vitro*, coincide con lo obtenido en éste estudio. El resto de los secuestrantes no presentaron una buena capacidad de secuestro de OA, lo cual coincide con los estudios realizados al respecto para otras micotoxinas. Dado que no existe una metodología bien establecida para la realización del ensayo de secuestro *in vitro*, existe cierta diversidad en los métodos desarrollados por cada laboratorio. Los resultados observados en este estudio cuando se confrontaron los secuestrantes con trigo contaminado con OA resultaron ampliamente variables, dado que la distribución de cualquier micotoxina no es homogénea en el grano, por lo que no es recomendable realizarlo de ésta manera, dado que

puede producir un resultado falso. El utilizar estándar de OA es un procedimiento que garantiza la cantidad de micotoxina con la que se confronta el secuestrante, lo cual resulta costoso y no es comparable con las condiciones presentes en el ave.

Finalmente, es importante considerar que la evaluación *in vitro* es un sistema de evaluación de secuestrantes que trata de simular las condiciones presentes en el organismo del ave, pero si un secuestrante presenta una buena adsorción *in vitro* no implica que sucederá lo mismo *in vivo*. Por ésta razón, la prueba biológica de éstos productos se hace necesaria para obtener un resultado más preciso y cercano a la realidad.

REFERENCIAS

1. Andrade OF. Efecto de los aluminosilicatos como secuestrantes de aflatoxina B₁, evaluado por conversión alimenticia y concentración de calcio, fósforo, magnesio, fierro, cobre y zinc en pollo de engorda (tesis de licenciatura). México (DF): FMVZ, UNAM, 1993.
2. Roland DA, Barnes DG and Laurent SM. Influence of sodium aluminosilicate, hydroxy-sodalite, carnegieite, aluminum sulfate and aluminum phosphate

on performance of comercial Leghorns. Poultry Science 1991;70:805-811.

3. Osuna O. Soluciones prácticas para disminuir el impacto de las micotoxinas en la avicultura. Memorias del XVI Congreso Centroamericano y del Caribe de Avicultura; 2000 Noviembre 15-17; Panamá (Panamá): Asociación Centroamericana de Avicultura, 2000:355-361.

4. Medina JC, Muñoz J, Lara J, Rivera L y Fierro JA. Criterios de control de calidad de aluminosilicatos comercializados como adsorbentes de micotoxinas. Memorias del XVI Congreso Latinoamericano de Avicultura; 1999 septiembre 21-24; Lima (Perú). Perú: Asociación Peruana de Avicultura, 1999: 391-393.

5. Lechuga GD, Rosiles MR, Horta RJM. Identificación fisicoquímica de algunos aluminosilicatos y de su actividad adsorbente sobre aflatoxina B₁ *in vitro*. Veterinaria México 1995;26:129-132.

6. Scheideler SE. Effects of various types of aluminosilicates and aflatoxin B₁ on aflatoxin toxicity, chick performance and mineral status. Poultry Science 1993;72:282-288.

Cuadro 1. Resultados de adsorción de ocratoxina A por diferentes secuestrantes bajo diferentes métodos de extracción de la micotoxina no secuestrada.

PRODUCTO	Ensayo I (ppm de OA)	Ensayo II % de secuestro	Ensayo III % de secuestro	Ensayo IV % de secuestro	Promedio
Control	56.44	0.00a	0.00a	0.00a	0.00
Producto 1	24.84	78.98a	66.57a	41.78a	48.53
Producto 2	41.74	0.00a	0.00a	0.93a	0.31
Producto 3	37.00	56.66a	0.00a	7.77a	21.48
Producto 4	56.14	30.36a	54.36a	10.07a	31.60
Producto 5	68.13	93.07a	98.36a	63.31a	84.91
Producto 6	24.87	95.55a	43.54a	0.00a	43.26a
Producto 7	26.34	80.05a	62.73a	43.18a	61.99a
Producto 8	64.54	66.50a	0.00a	27.21a	31.24a
Producto 9	57.17	63.43a	0.00a	19.31a	27.58a
Producto 10	71.12	45.10a	10.94a	11.92a	31.33a

Valores con diferente literal indican diferencia estadísticamente significativa (p<0.05)

EVALUACIÓN DE SECUESTRANTES DE MICOTOXINAS PARA REDUCIR LA TOXICIDAD EN DIETAS PARA POLLO DE ENGORDA CONTAMINADAS CON CULTIVOS DE *ASPERGILLUS OCHRACEUS* Y *FUSARIUM TRICINCTUM* PRODUCTORES DE OCHRATOXINA A Y TOXINA T-2

EVALUATION OF MYCOTOXIN BINDERS TO DECREASE TOXICITY IN BROILER DIETS CONTAMINATED WITH OCHRATOXIN A-/T-2 TOXIN-PRODUCING *ASPERGILLUS OCHRACEUS* AND *FUSARIUM TRICINCTUM* CULTURES

García MAR¹, Avila GE¹, Rosiles MR², Petrone GV³

¹CEIEPA, Facultad de Medicina Veterinaria, UNAM; ²Laboratorio de Toxicología, Facultad de Medicina Veterinaria, UNAM; ³Departamento de Producción Animal: Aves, Facultad de Medicina Veterinaria, UNAM.

SUMMARY

The effectiveness of 3 mycotoxin binders against the toxicity caused by ochratoxin A (OA) and T-2 toxin (T-2) was tested in broilers. Treatment groups included: negative control; diets with binder and no mycotoxin; OA positive control; T-2 positive control; OA + T-2 positive control; and their combinations with binders. Productive parameters, gross and microscopic lesions (liver, kidney, proventriculus, and bursa of Fabricius), and blood chemistry parameters were measured. Results showed that the effects of OA were not offset by any binder. T-2 effects were partially offset by two of the binders tested. Toxic effects were more severe when both mycotoxins were given in combination.

RESUMEN

Se probó la efectividad de 3 secuestrantes de micotoxinas contra la toxicidad de ocratoxina A (OA) y toxina T-2 (T-2) en pollo de engorda. Los tratamientos incluyeron: testigo negativo, dietas con secuestrante sin micotoxina, testigo positivo de OA, T-2 y ambas, y sus combinaciones con secuestrantes. Se evaluaron parámetros productivos, lesiones macro y microscópicas en hígado, riñón, proventrículo y bolsa de Fabricio; y diferentes parámetros de bioquímica sanguínea. Los resultados mostraron que los efectos de OA no fueron contrarrestados por algún secuestrante. Los efectos por T-2 fueron parcialmente contrarrestados por dos de los secuestrantes empleados. Los efectos tóxicos fueron más severos cuando se combinaron ambas micotoxinas.

INTRODUCCIÓN

Las micotoxinas son metabolitos tóxicos producto del desarrollo de hongos sobre el grano y otras materias primas. Su presencia produce efectos detrimentales en

los animales; en las aves se observa disminución de la ganancia de peso, inmunodepresión y mala pigmentación. Debido a esto, se ha recurrido al uso de los secuestrantes de micotoxinas, entre los que se encuentran los aluminosilicatos. Estos productos se adicionan en el alimento y secuestran las micotoxinas cuando se encuentran en el medio acuoso intestinal. Su efectividad ha sido comprobada para las aflatoxinas en experimentos *in vitro* e *in vivo*. Sin embargo, en los alimentos es posible encontrar otras micotoxinas de importancia clínica y económica e igualmente tóxicas para las aves, como la ocratoxina A (OA) y toxina T-2 (T-2), cuya toxicidad no ha podido ser reducida por algún secuestrante. La evaluación de un secuestrante debe incluir experimentos *in vitro* y pruebas *in vivo* con evaluación de lesiones macroscópicas e histológicas, además de bioquímica sanguínea, según la literatura. Las micotoxinas difícilmente se encuentran solas en un ingrediente, por lo que un secuestrante debería actuar contra varias micotoxinas así como contra los metabolitos fungales no identificados. Pocos estudios se han realizado utilizando cultivos de hongos toxigénicos, lo cual semeja más a la realidad observada en campo. Es importante, por lo tanto, la evaluación de un secuestrante bajo éstas condiciones, por lo cual, el objetivo de éste trabajo fue la evaluación de 3 secuestrantes de micotoxinas expendidos en México recomendados para el secuestro de OA y T-2, cuando éstas se encuentran solas y en combinación.

MATERIAL Y MÉTODOS

Se utilizaron cepas de *A. ochraceus* y *F. tricinctum*, para la producción de OA y T-2, respectivamente. El grano contaminado fue esterilizado, molido y deshidratado, y se adicionó a dietas a base sorgo-soya. OA y T-2 se cuantificaron en

el alimento, mediante HPLC y ELISA, respectivamente. Tres secuestrantes de micotoxinas fueron adicionados a las dietas en las concentraciones recomendadas por sus fabricantes. Los tratamientos fueron los siguientes:

T1: Testigo (aves alimentadas con dieta sin secuestrante ni micotoxina).

T2: Secuestrante A

T3: Secuestrante B

T4: 567 ppb de OA

T5: 927 ppb de T-2

T6: 567 ppb de OA mas 927 ppb de T-2

T7: Como T4 + Secuestrante A

T8: Como T4 + Secuestrante B

T9: Como T5 + Secuestrante A

T10: Como T5 + Secuestrante B

T11: Como T6 + Secuestrante A

T12: Como T6 + Secuestrante B

T13: Como T4 + Secuestrante C

T14: Como T5 + Secuestrante C

Se utilizaron aves Ross x Ross de 1 día de edad, alojadas en baterías de crianza. Las aves fueron distribuidas aleatoriamente a cada tratamiento con 4 réplicas de 6 aves, y fueron alimentadas durante 21 días de acuerdo al tratamiento. Semanalmente se llevó un registro de ganancia de peso, alimento consumido y mortalidad. A los 21 días de edad se seleccionaron aleatoriamente 5 aves por tratamiento, a partir de las cuales se realizaron las siguientes pruebas:

Bioquímica Sanguínea: En la sangre de cada ave, obtenida por punción cardíaca y tratada con heparina, se obtuvo el plasma y se midieron: proteínas plasmáticas totales (PT), albúmina (ALB), globulinas (GL), la enzima aspartato amino transferasa (AST) y ácido úrico (AU).

Patología Macroscópica: Se evaluaron lesiones macroscópicas en boca, lengua, esófago, hígado, riñón, bolsa de Fabricio (BF), proventrículo (PV) y molleja (MLL) en 5 aves por tratamiento. Cada ave fue pesada e identificada, y el hígado, riñón izquierdo y bolsa de Fabricio fueron pesados individualmente, para obtener los pesos relativos. Se midieron los diámetros de la molleja y el proventrículo por su eje mayor, además de la unión proventrículo-molleja. Para la evaluación histológica, se obtuvieron muestras de riñón, hígado, proventrículo, bolsa de Fabricio, de cada ave, y se fijaron con formalina al 10 %.

Histopatología: Todos los cortes fueron teñidos con hematoxilina-eosina. A partir de 5 riñones por tratamiento se obtuvo un porcentaje de células en necrosis y una relación ovillo/glomérulo.

En 5 proventrículos por tratamiento se seleccionaron 5 glándulas adyacentes a la capa muscular del órgano, con presencia de conducto. Se midió el diámetro transversal de la glándula, y el diámetro de su conducto, además del grosor del

epitelio de recubrimiento del conducto glandular. En hígado, se determinó un porcentaje de células tumefactas, células en necrosis y tejido de reparación, además del número de conductos biliares por espacio porta. En bolsa de Fabricio se determinó un porcentaje de tejido linfóide dañado.

Análisis Estadístico: La ganancia de peso y consumo de alimento se analizaron mediante una prueba multivariada denominada componentes principales. Los valores de bioquímica clínica se analizaron mediante análisis de varianza multivariado. Los resultados de histopatología se analizaron mediante la prueba de Kruskal-Wallis.

RESULTADOS

Se observó reducción significativa de la ganancia de peso y consumo de alimento en los tratamientos que incluyeron OA ($p < 0.05$) (Ver cuadro 1). Aves tratadas con OA y secuestrantes no fueron diferentes al testigo positivo de OA. Con T-2, se observó una reducción significativa del peso y consumo de alimento en las aves tratadas con T-2 + secuestrante A, que no fue distinta del testigo positivo de T-2. En las aves alimentadas con T-2 + Sec B y T-2 + Sec C, el peso corporal y consumo de alimento fueron significativamente distintos al grupo testigo, pero también diferentes al testigo positivo de T-2, por lo cual hubo una protección parcial. Cuando se combinaron ambas micotoxinas, hubo una reducción significativa en peso y consumo, y no se encontró diferencia entre los grupos tratados con ambas micotoxinas con y sin secuestrantes. También se observó una reducción significativa de los valores de PT, ALB y GL en las aves tratadas con OA y T-2, sin importar si fueron tratadas o no con secuestrantes. AU aumentó significativamente en las aves tratadas con OA, con y sin secuestrantes. No se observó tal efecto con T-2.

Se observó un aumento significativo en el PR de riñón en las aves tratadas con OA, pero no con T-2. BF se encontró significativamente afectada en aves tratadas con T-2 y OA, con o sin secuestrante. No se encontraron cambios en hígado ni en PV y MLL

En las aves que recibieron OA se encontraron lesiones microscópicas significativas en riñón (necrosis de células epiteliales tubulares) e hígado (tumefacción y necrosis de hepatocitos e hiperplasia de conductos biliares). En las aves tratadas con T-2 se observaron lesiones principalmente en hígado. Cabe señalar que en aves tratadas con 2 secuestrantes sin micotoxinas, se observaron lesiones significativas de daño hepático (hepatocitos con tumefacción).

DISCUSIÓN

Los resultados coinciden con otros trabajos en los que los efectos tóxicos de OA no fueron contrarrestados por secuestrantes. Algunos autores han mencionado que las evaluaciones *in vivo* deben realizarse con dosis elevadas de micotoxina, para determinar que un secuestrante es eficaz. Sin embargo, nosotros consideramos que dichas dosis no se presentan con frecuencia en condiciones naturales. En éste trabajo, utilizando una dosis de 567 ppb, que es la sexta parte de lo que se usó en otras investigaciones, y puede ocurrir en condiciones naturales, encontramos efectos significativos de OA. Existe una gran divergencia entre los estudios conducidos bajo ésta metodología y aquellos en que se empleó grano contaminado con el hongo productor de la micotoxina. Esta condición es lo más cercano a la realidad, dado que naturalmente una micotoxina no se presenta sola, como sucede cuando se utiliza la micotoxina pura en la mayoría de las investigaciones, sino que se presentan diversos metabolitos, la mayoría tóxicos y desconocidos, e inclusive no identificables en laboratorio, aún cuando la micotoxina principal sea la que se encuentre en mayor cantidad. La reducción en la concentración de PT, ALB y GL, así como el incremento en AU en plasma, corrobora que los secuestrantes no protegieron contra los efectos tóxicos de OA. Igualmente, las lesiones observadas en riñón e hígado confirman dicho resultado.

Con 927 ppb de T-2 observamos una reducción significativa de la ganancia de peso y del consumo de alimento, que fueron estadísticamente distintos del grupo testigo, pero también del grupo con sólo T-2 ($p=0.09$), lo cual implica que al menos dos de los productos evaluados tuvieron un efecto parcialmente protector. La presentación de úlceras se ha considerado característica de toxina T-2, sin embargo, con la dosis y el tiempo de exposición, las aves no desarrollaron úlceras. Su presentación puede ser, por lo tanto,

dependiente del tiempo de exposición y de la dosis en el alimento. Sin embargo, se ha mencionado que el principal efecto de T-2, la presentación de úlceras, ocurre por contacto. Cuando éstas se presentan en boca y lengua, se reduce el consumo de alimento y por ende, la ganancia de peso. Estos efectos son difíciles de contrarrestar por un secuestrante, dado que éstos pueden reducir los efectos sistémicos de las micotoxinas al interactuar con ellas a nivel intestinal cuando ambos se encuentran en solución. De ser así, resultaría ampliamente difícil contrarrestar los efectos ulcerativos de T-2, dado que antes de ser absorbida, actúa por contacto en cavidad oral. Aunque hubo cierta protección por los secuestrantes en contra de T-2, las lesiones microscópicas de hígado revelaron que la toxina fue parcialmente absorbida y tuvo efectos visibles en microscopía. Dichas lesiones son consistentes con la reducción en las concentraciones de PT, ALB y GL.

La combinación de ambas micotoxinas produjo mayor reducción de la ganancia de peso y del consumo de alimento. Ningún secuestrante fue capaz de contrarrestar el efecto de ambas micotoxinas, lo cual coincide con lo mencionado en informes previos. No observamos un efecto sinérgico de ambas micotoxinas, sino un efecto aditivo. Los efectos sobre PT, GL y ALB no fueron más marcados cuando ambas micotoxinas se combinaron, pero sí lo fueron las lesiones microscópicas, lo cual es consistente con el efecto aditivo observado sobre los parámetros productivos.

Por los resultados mostrados en éste estudio, hasta el momento ningún secuestrante es capaz de contrarrestar los efectos tóxicos de OA, mientras que la toxicidad de T-2 fue contrarrestada parcialmente por 2 secuestrantes, durante los 21 días que duró la prueba.

REFERENCIAS

Disponibile con el autor.

Cuadro 1. Peso ganado y consumo de alimento de las aves experimentales.

<i>Tratamiento</i>	Peso ganado	Consumo de alimento
<i>Testigo</i>	665 ± 4.7a	905 ± 18.79a
<i>Secuestrante A</i>	669.25 ± 10.2a	898.67 ± 22.11a
<i>Secuestrante B</i>	662.25 ± 18.81a	898 ± 9.97a
<i>OA</i>	509.38 ± 16.52d	745.63 ± 21.86d
<i>T-2</i>	567.33 ± 31.03c	768.91 ± 36.13c
<i>OA+T-2</i>	486.46 ± 25.91e	713.62 ± 24.87e
<i>OA+ secuestrante A</i>	530.75 ± 6.95d	779.35 ± 21.49d
<i>OA+ secuestrante B</i>	500.58 ± 15.02d	776.25 ± 21.7d
<i>T-2+ Sec A</i>	574.50 ± 27.19c	820.05 ± 31.31d
<i>T-2+ Sec B</i>	641.38 ± 18.53b	890.88 ± 34.29d
<i>OA + T-2+ Sec A</i>	507.92 ± 22.38e	683.75 ± 28.38e
<i>OA + T-2 + Sec B</i>	445 ± 17.6f	659.97 ± 29.76e
<i>OA + Sec C</i>	520 ± 20.43d	740 ± 31.62d
<i>T-2+Sec C</i>	636.25 ± 13.6b	870 ± 17.32b

Valores con diferente literal indican diferencia significativa (p<0.05)

- Media ± Error Estándar

NEW VARIETY OF *ORNITHOBACTERIUM RHINOTRACHEALE*

UNA NUEVA VARIEDAD DE *ORNITHOBACTERIUM RHINOTRACHEALE*

R. Günther¹, M. Ryll², H. M. Hafez³ und K.-H. Hinz²

¹ Veterinary Laboratory, Heidemark Mästerkreis GmbH, Industriestr. 12, 49681 Garrel, Germany

² Poultry Clinic, Tierärztlichen Hochschule Hannover, Bünteweg 17, 30 559 Hannover, Germany

³ Institute of Poultry Diseases, Free University Berlin, Koserstr. 21, 14195 Berlin, Germany

RESUMEN

Ornithobacterium rhynotracheale pertenece a la nueva especie *Ornithobacterium rhynotracheale* gen. nov., sp. nov., dentro de la superfamilia V del rARN. Se sabe que esta bacteria está difundida en todo el mundo y causa infecciones en el tracto respiratorio de pavos y pollos. Todos los aislamientos descritos mostraron una reacción positiva de citocromooxidasa. Describiremos el primer aislamiento y la identificación de una cepa de esta bacteria negativa a la citocromooxidasa, obtenido a partir de pavos. De acuerdo con la historia del caso parece que la cepa aislada es de alta virulencia.

CASE HISTORY

Sudden death occurred in a flock of 20.000 toms at 19 weeks of age. Mortality peaked after 5-6 days at 0.4% per day. Within two weeks till slaughter mortality reached 13%. The farm is geographically isolated and went into production with an "all in – all out" regimen the year before.

METHODS

Samples were incubated under microaerophilic conditions on defibrinated sheepblood-agar at 37°C, stained with GRAM's stain and identified by means of biochemical and cytochemical tests (Hinz, et al., 1994, Vandamme et al., 1994, van Empel und Hafez, 1999). Cytochromoxidase-activity was tested using chemicals by FLUKA (contains N,N,N',N'-Tetramethyl-1,4-Phenlendiamin-D-hydrochlorid) and SIGMA (contains N-N-Dimethyl-P-Phenylenediamine Monohydrid) following the method described by Mannheim et al. (1980). Additionally, the strains were assayed in the buffered single substrate-test („bss-test“, Hinz et al, 1998) as well as in the API Zym and API 20 NE system (Bio-Mérieux, Montalieu-Vercieu, France). Subsequently, the results were compared with those from the *O. rhynotracheale* type strain LMG 9086^T (Vandamme et al., 1994). Serotyping was performed with the agar-gel-immunodiffusion-assay (AGID) published by Hafez und Sting (1999).

RESULTS

Pure cultures could be isolated in four out of five lung samples. On sheepblood-agar the isolates grew as small, gray-shining colonies without haemolysis. The bacteria stained as GRAM –negative, pleomorphic rods. The cytochrome-oxidase reaction turned out to be negative in all four isolates. Antibigrams were identical. According to the additional biochemical and cytochemical investigations the isolate could be clearly identified as *O. rhinotracheale*. Serotyping revealed serotyp A.

REFERENCES

1. Hafez, H.M. und R. Sting. Investigations on different *Ornithobacterium rhinotracheale* "ORT" isolates. Avian Diseases 34: 1–7. 1999.
2. Hinz, K.-H., C. Blome, and M. Ryll. Acute exudative pneumonia and aerosacculitis associated with *Ornithobacterium rhinotracheale* gen. nov, sp. nov. in turkeys. The Veterinary Record 135: 233-234. 1994.

3. Hinz, K.-H., M. Ryll, and B. Köhler. Detection of acid production from carbohydrates by *Riemerella anatipestifer* and related organisms using the buffered single substrate test. Veterinary Microbiology 60: 277-284. 1998.

4. Mannheim, W., S. Pohl and R. Holländer. Die Systematik von *Actinobacillus*, *Haemophilus* und *Pasteurella*: Basenzusammensetzung der DNS, Atmungschinone und kulturell-biochemische Eigenschaften repräsentativer Sammlungsstämme. Zentralbl. Bakteriologie Parasitenk. Infektionskr. Hyg. Abt 1 Orig. Reihe A 246: 512-540. 1980.

5. Van Empel, P.C.M., H.M. Hafez. *Ornithobacterium rhinotracheale*: a review. Avian Pathology 28: 217-227. 1999.

6. Vandamme, P., P. Segers, M. Vancanneyt, K. van Hove, R. Muters, J. Hommez, F. Dewhirst, B. Paster, K. Kersters, E. Falsen, L.A. Devriese, M. Bisgaard, K.-H. Hinz, and W. Mannheim. *Ornithobacterium rhinotracheale* gen. nov, sp. nov. isolated from the avian respiratory tract. International Journal of Systematic Bacteriology 44: 24-37. 1994.

EVALUACIÓN DE UNA VACUNA DE *EIMERIA TENELLA*, *E. ACERVULINA* Y *E. MAXIMA* EN POLLO DE ENGORDA

EVALUATION OF AN *EIMERIA TENELLA*/*E. ACERVULINA*/*E. MAXIMA* VACCINE IN BROILERS

Hernández VX, Escamilla R, Petrone VM.

Depto. Producción Animal: Aves, FMVZ. UNAM.

SUMMARY

Given the growing incidence of resistance development among field coccidial strains, and the growing use of coccidial vaccines in broilers, and given field results –not always satisfactory– the protective efficacy of an *E. acervulina*/*E. maxima*/*E. tenella* vaccine administered to broilers by spray was evaluated.

RESÚMEN

Debido a que cada vez es mayor el desarrollo de resistencia de cepas de coccidias en campo y al creciente uso de diversos tipos de vacunas para el control de Coccidiosis en pollo de engorda, así como a los resultados no siempre satisfactorios en campo se evaluó la eficacia protectora de una vacuna contra *E. acervulina*, *E. maxima* y *E. tenella* que fue administrada a pollo de engorda por aspersión.

MATERIAL Y MÉTODOS

Aves. Se utilizaron pollitos de engorda de la estirpe Arbor Acres de un día de edad, provenientes de una incubadora comercial que fueron alojados hasta la sexta semana de vida en corrales en unidades de aislamiento del Departamento de Producción Animal: Aves (DPA: Aves) de la FMVZ de la UNAM

Alimento. Se administró agua y alimento *ad libitum*, manejando dos fases de alimentación: iniciador con 21% de PC., 3100 kcal de E.M. y 40 ppm de pigmento. El alimento finalizador se les proporcionó del día 22 de edad al final de la prueba, con 18% de PC., 3000 kcal de E.M. y 85 ppm de pigmento. Ambas fases fueron elaboradas sin coccidiostato y sin promotor de crecimiento. Únicamente las aves del grupo IV recibieron alimento con coccidiostato (60 ppm de salinomocina) durante toda la prueba.

Vacuna. La titulación de la vacuna se realizó con una cámara de Newbawer, y el diferencial por especie se llevó a cabo con la medición de 100 ooquistes esporulados. La vacuna contenía cepas de

campo no atenuadas, en los siguientes porcentajes: *E. acervulina* (27%), *E. maxima* (18%), *E. tenella* (58%). La dosis por pollo fue de 1,000 ooquistes esporulados.

Inoculo de desafío. Al día 21 de edad las aves fueron desafiadas en el alimento con un inoculo mixto que contiene 200,000 ooquistes, con *E. acervulina* (23%), *E. maxima* (27%) y *E. tenella* (12%).

Conteo de ooquistes en heces. Para evaluar el número de ooquistes eliminados en heces por grupo, así como el porcentaje por especie, se colectaron muestras de heces de las tres réplicas de cada grupo al día 7, 14, 21, 28, 35 y 42 de edad. El conteo de ooquistes / g de heces (opgh) se realizó en la cámara de McMaster, y se expresó como promedio de las tres réplicas.

Severidad de las lesiones. Al día 7 posdesafío (28 de edad) las aves sobrevivientes de dos réplicas de cada grupo fueron sacrificadas por dislocación cervical e inmediatamente después se les extrajo el intestino. Las lesiones sugestivas a coccidias fueron evaluadas de acuerdo a la escala de Johnson y Reid.

Evaluación de pigmento cutáneo. El pigmento se evaluó con el colorímetro de reflectancia Minolta CR-300 (Minolta, Co. Osaka, Japón).

a los 42 días de edad en la zona apterica pectoral lateral en 10 pollos de cada grupo.

Índice anticoccidial. Se realizó tomando en cuenta el porcentaje de viabilidad, ganancia relativa de peso corporal entre el día 21 y 28 de edad, índice de lesiones e índice de ooquistes al día 28 de edad, y se clasificó como bueno en valores de 180 a 200, moderado de 160 a 179, pobre menor a 160.

Análisis estadístico. Los pesos y la pigmentación cutánea fueron sometidos a una prueba estadística de análisis de varianza y las diferencias entre las medias de los pesos entre grupos fueron evaluadas con la prueba de comparación múltiple de medias de Tukey con una significancia de $P < 0.05$.

DISEÑO EXPERIMENTAL

Las aves fueron distribuidas en 6 grupos, cada uno con 3 replicas de 10 pollos. Se asignó un tratamiento por grupo: los grupos I y II recibieron la vacuna por aspersión al día de edad, y se revacunó al grupo II al día 10 de edad. El grupo III únicamente fue desafiado. Al grupo IV se le administró la vacuna al día tres de edad y recibió alimento con 60 partes por millón (ppm) de salinomicina durante todo el ciclo. El grupo V no fue vacunado ni infectado. Mientras que al grupo VI únicamente se administró la vacuna al día 21 de edad, a dosis de 20X.

RESULTADOS

El grupo V se mantuvo negativo a ooquistes en heces durante toda la prueba, así como los grupos III y VI hasta siete días después del desafío y de la

vacunación respectivamente. Las muestras de heces en los grupos vacunados al día de edad (grupos I y II) fueron positivas a ooquistes a partir del día 7 de edad y registraron un pico máximo al día 14 y 28 respectivamente. En el grupo que recibió la vacuna vía agua de bebida (grupo VII), se detectaron coccidias en heces a partir del día 7 de edad en cantidad menor a los grupos I y II, y el número máximo de ooquistes excretados por gramo de heces fue 64,328 opgh al día 21 de edad, menor a los tratamientos I y II. En relación al grupo III se observó un pico de eliminación de 478,780 opgh, 7 días posinfección; mientras que el grupo VI eliminó un máximo de 187,220 opgh 7 días posvacunación.

El índice total de lesiones a los 7 días posdesafío fue en los grupos vacunados desde 0 a 2.5, el grupo III que únicamente fue desafiado tuvo un índice de lesiones total de 5.16, mientras que en el grupo VI fue de 2.5. En el grupo V o testigo negativo no se observaron lesiones. La mortalidad atribuible a la vacunación o infección con coccidias, por la severidad de las lesiones halladas a la necropsia (*E. tenella* grado 4+) fue mayor en los grupos I, IV y III respectivamente.

Al día 1 y 14 de edad no se observó diferencia de peso entre grupos. A partir del día 28 de edad y más al final de la prueba se observó que el grupo III fue significativamente menor en comparación con el resto de los grupos, seguido por los grupos I, VI y IV. En cuanto a la ganancia relativa de peso entre el día 21 y 28 de edad, se observó que de los grupos vacunados, el IV mostró una mejor ganancia relativa durante este periodo, no así el grupo VI que fue el más bajo. Los pesos finales fueron de mayor a menor en los grupos II, V, IV, VI, III y I, y fue significativamente diferente en todos los grupos.

El índice anticoccidial tuvo una calificación de bueno además del grupo testigo (V), en el grupo IV; y pobre en el resto de los grupos.

CONCLUSIÓN

De acuerdo a los resultados obtenidos en el índice anticoccidial se concluye que la vacuna utilizada en este estudio protegió solo parcialmente contra el desafío a los grupos I y II, y protegió mejor a las aves del grupo IV que fueron vacunadas en agua al día 3 de edad y al que además se le suministró salinomicina en el alimento. La vacunación en agua es menos homogénea que por aspersión, por lo que se sugiere que estos resultados muestran que la administración de 60 ppm de salinomicina en la dieta durante todo el ciclo controló mejor la replicación de los ooquistes vacunales, así como de las coccidias de desafío, evitando lesiones en intestino. Sin embargo tiene la gran desventaja de incrementar los costos de producción al incluir un coccidiostato para controlar

efectos indeseables de la vacuna. La vacuna utilizada en este estudio no fue seleccionada con cepas de baja virulencia, hecho que se demuestra con los resultados del grupo IX, además una desventaja frecuente en este

tipo de vacunas es la falta de estandarización del porcentaje de ooquistes esporulados por especie, en particular esta vacuna contenía un alto porcentaje de *E. tenella*.

Cuadro 1. Efecto de la vacunación *Eimeria tenella*, *E. acervulina* y *E. maxima* en pollo de engorda sobre la mortalidad, peso, pigmento cutáneo e índice anticoccidial

Grupo	Edad en días						% mortalidad*	Í. L.	Peso final	Pigmento	I.A.
	7	14	21	28	35	42					
I	18350	109885	83709	32984	4800	562	12	2.25	1820 E	13.7 C	Pobre
II	12506	49824	76348	504464	10580	2768	0	2.5	1950 A	21.0 AB	Pobre
III	0	0	0	478780	16400	1334	5	5.6	1473 F	10.9 C	Pobre
IV	3841	6600	64328	2480	13369	353	6	0	1898 C	22.4 A	Moderado
V	0	0	0	0	0	0	0	0	1914 B	20.2 AB	Bueno
VI	0	0	0	187220	96000	2280	0	2.5	1853 D	15.9 BC	Pobre

I.L. = Índice de lesiones

I.A. = Índice anticoccidial

Literales diferentes dentro de una misma columna denotan diferencia significativa $P < 0.05$.

*= % de mortalidad atribuible a coccidiosis, promedio de las tres réplicas

REFERENCIAS

1. Chapman, H.D. (2000) Control of coccidiosis in broilers: Role of drug programs and vaccines in the development of immunity.

2. Chapman, H.D. (2000) Practical use of vaccines for the control of coccidiosis in the chicken. *World's Poultry Science Journal* 56: 7-20.

3. McDougald LR, Reid WM. Coccidiosis in: Calnek BW., Barnes HJ., Reid WM., Yoder H.W. *Diseases of poultry* 10th 1999.

CARACTERIZACIÓN MOLECULAR DEL VIRUS BRONQUITIS INFECCIOSA

MOLECULAR CHARACTERIZATION OF INFECTIOUS BRONCHITIS VIRUS

Huerta L. B. J^{1,2}, Merino R.¹, Ortiz N. M¹, Téllez I. G¹, Alonso M. R.².

¹Departamento de Producción Animal: Aves, de la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia de la UNAM. Av. Univ. 3000, C.P. 04510. México D.F. Teléfono y Fax: 56225867.

² Departamento de Genética y Bioestadística: Lab. de Genética molecular, de la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia de la UNAM. Av. Universidad 3000, C.P. 04510. México D.F. Teléfono: 56225902, Fax: 56 16 65 36. E-mail: belemhuerta@hotmail.com

SUMMARY

A study was performed on 23 virus isolates as an attempt to implement a more specific diagnosis, and to distinguish between infectious bronchitis virus strains isolated in Mexico. RNA was purified from allantoic fluid, then used in the synthesis of cDNA to amplify – using reverse transcriptase-polymerase chain reaction (RT-PCR)– the S1 glycoprotein gene. Amplified fragments were digested with 3 restriction enzymes. Digestion patterns corresponded to the following strains: 7 to Mass, 5 to BL-56, and 3 to UNAM97. In addition, 2 digestion patterns did not correspond to any of those previously reported in Mexico.

RESUMEN

Con la finalidad de implementar un diagnóstico más específico y distinguir las cepas de Bronquitis Infecciosa (BI) aisladas en México, se realizó un estudio con 23 muestras de aislamientos virales. El RNA se purificó a partir de líquido alantoideo y fue utilizado en la síntesis cDNA para amplificar, por medio de la técnica RT-PCR el gen de la glicoproteína S1. Los fragmentos amplificados fueron digeridos con tres enzimas de restricción. Los patrones de digestión correspondieron: 7 a la cepa Mass, 5 a BL-56, 3 a UNAM97 y se encontraron 2 patrones de digestión diferentes a los previamente reportados en México.

INTRODUCCION

La bronquitis infecciosa aviar (BIA) es una enfermedad respiratoria viral aguda, altamente contagiosa de los pollos. En México es una de las principales enfermedades respiratorias de gran importancia económica ya que causa disminución en la producción y calidad del huevo.

Esta enfermedad es producida por un virus de RNA que pertenece a la familia *Coronaviridae*, que incluye al género *Coronavirus*. El virus de bronquitis infecciosa aviar (vBI) está conformado principalmente por tres proteínas específicas: las glicoproteínas de espícula (S), la glicoproteína de membrana (M) y la proteína de la nucleocápside interna. La glicoproteína S esta compuesta por dos glicopolipeptidos S1 y S2. La glicoproteína S1, induce la inhibición de la hemoaglutinación y ha sido considerada para inducir inmunidad, por tal motivo la clasificación de las cepas de vBI se basa principalmente en las características de la proteína S1. Sin embargo, hay evidencias de que el vBI puede sufrir una recombinación durante infecciones mixtas originando variación entre las cepas.

Tradicionalmente, las cepas de vBI son identificadas por la prueba de VN (virus-seroneutralización) o por la prueba HI (inhibición de la hemoaglutinación). En años recientes con el advenimiento de las técnicas en Biología Molecular tales como RT-PCR (Transcriptasa Reversa -Reacción en Cadena de la Polimerasa), RFLP's (Polimorfismo en la Longitud de los Fragmentos de Restricción) y secuenciación del gen S1 es posible tener un diagnostico más específico para identificación de las cepas del vBI.

Por tal motivo se consideró importante implementar un diagnostico por medio de la técnica de RT-PCR para caracterizar molecularmente la frecuencia de las variantes del vBI en México.

MATERIAL Y MÉTODOS

Se utilizaron 23 muestras de vBI proporcionadas por el departamento de Aves de la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia de la UNAM. El RNA fue purificado a partir de liquido alantoideo. Posteriormente el RNA se utilizo para obtener el cDNA mediante la técnica de RT el cual sirvió como molde en la reacción de PCR para amplificar un fragmento de 1720 pb correspondiente al gen de la glicoproteína S1. Los fragmentos amplificados fueron digeridos con tres enzimas de restricción *Bst*YI, *Hae*III y *Xcm*I que permiten identificar las diferentes cepas de vBI. Los fragmentos digeridos fueron separados de acuerdo a su tamaño por electroforesis en geles de agarosa al 3%.

Los patrones de digestión obtenidos se compararon entre si para determinar a que patrón de

cepa corresponde con los previamente descritos en México (Mass, BL56 y UNAM 97).

RESULTADOS

En base a los patrones de digestión de las 23 muestra de vBI, se encontraron 15 cepas previamente reportadas en México las cuales correspondieron a: 7 cepas fueron clasificadas como Massachussets, 5 como BL-56 y 3 fueron UNAM97. Sin embargo, 8 cepas mostraron 2 nuevos patrones de restricción: 4 fueron clasificadas como UNAM2001-1 y otras 4 se clasificaron como UNAM2001-2. Estas últimas 8 cepas deben ser sometidas a un análisis de secuenciación para determinar si en realidad se trata de cepas nuevas cepas variantes del vBI.

DISCUSIÓN

En este estudio se encontró que el 65.22% de las muestra de vBI correspondieron a cepas previamente reportadas en México como Massachussets (30.43%), BL56 (21.74%) y UNAM97 (13.04%). Algo relevante de este análisis fue que el 34.78% de las cepas tuvieron patrones de digestión diferentes a los anteriores, estos patrones correspondieron a UNAM2001-1 (17.4%) y UNAM2001-2 (17.4%). Lo anterior podría estar indicando que otras variantes distintas a las que ya han sido reportadas en México podrían estar causando la enfermedad de BIA. Sin embargo para corroborar si realmente se trata de nuevas variantes de vBI es necesario realizar otros estudios, como secuenciación de nucleótidos que permiten caracterizar mas extensamente estas variantes.

Este trabajo es importante ya que proporciona información acerca de la variación genética y la prevalecía de las distintas cepas del vBI en México. El enfoque molecular permite conocer los orígenes de los brotes y rastrear los caminos de la infección o la aparición de nuevas cepas mutantes; además esta información puede ser usada para desarrollar nuevas vacunas y modificar los programas de vacunación en determinadas áreas geográficas y así proveer mayor protección contra la enfermedad de Bronquitis Infecciosa Aviar.

REFERENCIAS

1. Calnek, B. W. (1997). Enfermedades de las Aves. *ED. Manual moderno*
2. King, D. J., Hopkins, S. R. (1984). Rapid serotyping of infectious bronchitis virus isolates with the hemagglutination-inhibition test. *Avian Dis.* 28:727-733.
3. Koch, G., Hartog, A., Kant, A., Roozear, D. J.(1990). Antigenic domains on the peplomer protein of avian infectious bronchitis virus: Correlation with biological functions. *J. Gen Virol.* 71:1929-1935.

4. Kwon, H. M., Jackwood, M. W., Gelb, J. (1993). Differentiation of Infectious Bronchitis Virus Serotypes Using Polymerase Chain Reaction and Restriction Fragment Length Polymorphism Analysis. *Avian Diseases*.37:194-202.

5. Wang, L., Junker D., Collisson, E.W. (1993). Evidence of natural recombination within S1 gene of infectious bronchitis virus. *Virology*. 192:710-716.

THE INFLUENCE OF BEHAVIOR AND ENVIRONMENTAL ENRICHMENT ON RESISTANCE OF TURKEYS TO *ESCHERICHIA COLI* RESPIRATORY INFECTION

INFLUENCIA DEL COMPORTAMIENTO Y DEL ENRIQUECIMIENTO DEL AMBIENTE SOBRE LA RESISTENCIA DE LOS PAVOS A LA INFECCIÓN RESPIRATORIA POR *ESCHERICHIA COLI*

G.R. Huff, W.E. Huff, J.M. Balog, N.C. Rath, and A.M. Donoghue

USDA/ARS Poultry Production and Product Safety Research, University of Arkansas, Fayetteville, AR 72701

RESUMEN

El propósito de este trabajo fue determinar los efectos del enriquecimiento del medio ambiente al principio de la vida de las aves sobre su resistencia a las enfermedades relacionadas con el estrés, y desarrollar una manera conductual de predecir dicha resistencia. Se proporcionaron objetos novedosos a los pavos durante las primeras dos semanas de vida. Los que cruzaron un laberinto "T" en 20 segundos o menos se designaron como rápidos, mientras que los que tardaron más de 60 segundos se consideraron como lentos. Los resultados sugieren que las diferencias en la resistencia a las enfermedades relacionadas con el estrés se puede predecir usando la prueba del laberinto en "T" y que el enriquecimiento del ambiente durante las primeras dos semanas de vida puede ser nocivo para las aves que presentan una respuesta rápida.

We have developed a stress model of turkey osteomyelitis complex that has led us to hypothesize that a small proportion of male turkeys selected for fast growth is inherently susceptible to opportunistic bacterial infections leading to arthritis, synovitis, osteomyelitis, and soft tissue abscesses. Involvement of both the immune and hypothalamic-pituitary-adrenal (HPA) systems in the stress response has led us to question whether behavioral and psychological responses demonstrated in mammalian stress models are applicable to turkeys and whether behavioral traits may be useful for selecting turkeys better able to cope with the stressors of commercial production (1,2).

Chicks that traverse a T-maze to come into visual contact with other chicks very quickly have been shown to have higher body weights (6), and decreased adrenocortical responses to a stressor than do very slow

chicks (5). The T-maze test has been suggested as a simple, non-invasive selection criteria for commercial breeding programs (4). We have previously reported that the stress of handling turkeys once or twice daily for the first 10 days of life, while tending to increase body weight, can also cause lasting changes in the immune response and result in decreased resistance in our model (1,2). It has been reported that increases in body weight similar to those produced by handling chicks can be incurred by simply providing environmental stimulation for the first 10 days of life (3,7).

The purpose of this study is to attempt to modulate disease resistance in later life by providing environmental stimulation for the first two weeks after hatch and to determine whether the performance of 2-day-old pouts in a T-maze can predict later disease resistance.

METHODS

Three hundred male day-old commercial turkey poults were randomly assigned to 12 floor pens. Environmental enrichment was provided in 6 pens, for the first 14 d after hatch, by placing in the pens a variety of commercially available infant toys, colored plastic balls, bells, mirrors, and other objects with textured surfaces. At 2 days of age each poult was tested for the time it took to reinstate contact with hatch mates using procedures described by Marin *et al.* (6). Birds which completed the test within 20 seconds were designated Fast. Those which took longer than 60 seconds were Slow. At 5 weeks of age, half of the birds were given three intramuscular injections of 2 mg of dexamethasone (DEX)/kg body weight. On the day of the third DEX injection, all DEX-treated birds

were inoculated in the left cranial-thoracic air sac with approximately 10 cfu of a non-motile, lactose negative strain of *E. coli* serotype O2. Birds were necropsied 2 weeks later. Data from mortalities and necropsied birds were combined and analyzed using the GLM and least square means procedures of SAS.

RESULTS AND DISCUSSION

Birds provided with environmental enrichment had increased mean body weights ($P=0.02$) and incidence of mortality ($P=0.001$), and decreased total WBC counts ($P=0.0002$). Those birds designated as Fast had increased mean airsac scores ($P=0.015$). This was due mainly to increased airsacculitis in the challenged Fast birds assigned to enriched pens ($P=0.003$). Challenged Fast birds from enriched pens also had increased mortality ($P=0.002$) and decreased body weights ($P=0.001$) as compared to challenged Slow birds from enriched pens. In response to challenge, the Slow birds from non-enriched pens had increased total WBC counts ($P=0.03$) and heterophil/lymphocyte ratio ($P=0.03$) whereas there was no change in enriched Slow birds or Fast birds from either enriched or non-enriched pens. These data suggest that the rather moderate stressor of environmental enrichment can increase body weights as has been reported, however, a sub-population of enriched birds (Fast) may become more susceptible to stress-induced opportunistic respiratory infections perhaps due to an increased airsac inflammatory response.

ANALISIS DE LA RENTABILIDAD EN LA COMERCIALIZACION DE POLLO EN MÉXICO

A PROFITABILITY ANALYSIS OF BROILER TRADE IN MEXICO

Ingalls HFR, Ortiz, MA

¹ Comité Científico de ANECA, Dr. Ernesto Soto, Chairman, reunión ANECA, WPDC.
Anexo documento para memorias Congreso ANECA, WPDC.
Atentamente: MVZ Fernando Ingalls Herrera Depto. Ciencias Sociales FES-C, UNAM.
Tel: 56 23 18 32, e-mail: ingallsh@servidor.unam.mx

SUMMARY

This research compares the profitability experienced by traders in 3 different broiler meat selling points throughout Mexico during 2000. Data published by Mexico's Poultry Producers Union (UNA) regarding production costs and selling prices was used. Economic analysis was performed by applying the Ingalls-Ortiz profitability index (IOR). From the results obtained it was concluded that the profit margin is higher at retail shops ($57.06\% \pm 23.586$) than at other

selling points. Producer's margin is 27% lower than the most profitable selling point.

RESUMEN

La investigación compara la rentabilidad que tuvieron los comercializadores en tres diferentes puntos de venta de la carne de pollo a nivel nacional durante el año 2000. Utilizando los datos de la Unión Nacional de Avicultores (UNA), de los precios de producción y venta. Se realizó un análisis económico, mediante la

REFERENCES

1. Huff, G.R., W.E. Huff, J.M. Balog, and N.C. Rath. Effect of early handling of turkey poults on later responses
2. to a dexamethasone-*Escherichia coli* challenge. 1. Production values and physiological response. Poultry Sci. 80:1305-1313. 2001.
3. Huff, G.R., W.E. Huff, J.M. Balog, and N.C. Rath. Effect of early handling of turkey poults on later responses to a dexamethasone-*Escherichia coli* challenge. Resistance to air sacculitis and turkey osteomyelitis complex. Poultry Sci. 80:1314-1322. 2001.
4. Jones, R.B., S. Harvey, B.O. Hughes, and A. Chadwick. Growth and the plasma concentrations of growth hormone and prolactin in chicks: effects of Aenvironmental enrichment, sex and strain. Br. Poult. Sci. 21:457-462. 1980.
5. Marin, R.H. and R.B. Jones, 1999. Latency to traverse a T-maze at 2 days of age and later adrenocortical responses to an acute stressor in domestic chicks. Physiol. Behav. 66:809-813.
6. Marin, R.H., R. B. Jones, D.A. Garcia, and A. Acre, 1999. Early T-maze behavior and subsequent growth in commercial broiler flocks. Br. Poult. Sci. 40:434-438.
7. Nichol, C.J. Effects of environmental enrichment and gentle handling on behavior and fear response of transported broilers. Appl. Anim. Behav. Sci. 33:367-380. 1992.

aplicación del Índice Ingalls-Ortiz de Rentabilidad (IOR). Con los resultados obtenidos podemos concluir que el margen de rentabilidad, es mayor en la pollería (57.06%± 23.586) que en los otros puntos de venta, teniendo el productor un margen inferior en un 27% con respecto al punto de venta más rentable.

OBJETIVO

El objetivo de la investigación es demostrar y comparar la rentabilidad diferenciada promedio que obtuvieron los comercializadores finales, en tres diferentes puntos de venta de carne de pollo a nivel nacional durante el año 2000 en México

INTRODUCCIÓN

Tomando como referencia los reportes técnicos del tema de comercialización pecuaria, se conoce que el margen de rentabilidad de la etapa de comercialización al consumidor final, varía de acuerdo a la inversión, infraestructura y nicho de mercado. Más sin embargo, queda claro que el margen de rentabilidad es mayor en la etapa de comercialización, que en la etapa de producción

METODOLOGÍA

Utilizando como base de datos los informes de la Unión Nacional de Avicultores (UNA) referentes al año 2000, de los precios de venta y de

comercialización, se realizó un análisis económico, mediante la aplicación del Índice Ingalls-Ortiz de Rentabilidad (IOR), para obtener el margen de rentabilidad en tres puntos de venta final al consumidor de la carne de pollo y poder determinar su diferenciación.

RESULTADOS

Los resultados obtenidos son los siguientes: precio de venta Kg promedio en autoservicio \$18.59 ± 0.618, mercado público \$18.68 ± 0.681, pollería \$ 18.98± 0.738, precio en pie \$10.73 ± 2.46, precio procesado \$12.35 ±1.99. La rentabilidad en la comercialización de pollo en pie fue de: autoservicio 85.35% ±48.860, mercado público 82.67% ±41.624 y pollería 85.52% ±42.011. La rentabilidad en la comercialización del pollo procesado es de: autoservicio 54.76% ±29.158, mercado público 54.60% ±22.921 y pollería 57.06% ±23.586.

CONCLUSIONES

Con los resultados obtenidos podemos concluir que el margen de rentabilidad bruta es bastante bueno, en los diferentes puntos de venta siendo mayor en la pollería que en los otros estudiados, teniendo el productor un margen inferior, en promedio del 27%.

EVALUACIÓN DE UNA CUTÍCULA ARTIFICIAL SOBRE LA PÉRDIDA DE HUMEDAD E INCUBABILIDAD EN HUEVOS DE AVES LEGHORN DE SEGUNDO CICLO

EVALUATION OF AN ARTIFICIAL CUTICLE ON MOISTURE AND HATCHABILITY LOSS IN THE EGGS OF SECOND-CYCLE LEGHORN HENS

Marco A. Juárez-Estrada^A, Raúl Cervantes-Sánchez^A, José A. Quintana-López^A, Omar F. Prado-Rebolledo^B, Ernesto Ávila-González^A

^ADepartamento de Producción Animal: Aves, Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia, Universidad Nacional Autónoma de México. Avenida Universidad 3000. Ciudad Universitaria 04510 México, D.F. ^BFacultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia-Universidad de Colima. Autopista Colima- Manzanillo km 40 Crucero de Tecmán. Tecmán. Col. C.P. 28100, E-mail: britoco@servidor.unam.mx

SUMMARY

The effect of an artificial cuticle on hatchability was evaluated using a 2x2 factorial arrangement, including 344 eggs per group. Group A (clean eggs with cuticle), group B (clean eggs, no cuticle), group C (dirty eggs with cuticle), and group D (dirty eggs, no cuticle). At 21 days no factor interaction occurred. Only an effect ($P<0.05$) of the cuticle on moisture loss (with cuticle 18.46±3.72^b %; w/o cuticle 19.64±2.64^a

%) was observed. No factor interaction was found on hatchability, but the cleanness factor had a significant effect (clean 70.24±14.05^a; dirty 60.71±4.61^b), and so did the cuticle (with cuticle 70.68±10.21^a %; with no cuticle 60.27±8.45^b %).

RESUMEN

Se evaluó el efecto de una cutícula artificial sobre incubabilidad con un arreglo factorial 2x2, con 344

huevos por grupo. Grupo A (Huevo limpio con cutícula), Grupo B (Huevo limpio sin cutícula), Grupo C (Huevo sucio con cutícula) y Grupo D (Huevo sucio sin cutícula). A los 21 días no hubo interacción de factores, solo efecto ($P < 0.05$) de la cutícula en pérdida de humedad (con 18.46 ± 3.72^b %; sin 19.64 ± 2.64^a %). En incubabilidad no hubo interacción de factores pero si del factor limpio (limpio 70.24 ± 14.05^a ; no limpio 60.71 ± 4.61^b) y del factor cutícula (con 70.68 ± 10.21^a %; sin 60.27 ± 8.45^b %).

INTRODUCCIÓN

El hombre ha sustituido la incubación natural por métodos artificiales lo cual ha constituido un aspecto clave para el éxito actual de las explotaciones avícolas. Aparte de la fertilidad de una parvada la incubación depende directamente de la estructura del cascarón de los huevos, la cual puede verse afectada por la edad, tipo de alimentación, salud y estirpe del ave; sin descartar otros elementos que influyen directamente sobre la incubación, tales como la altura sobre el nivel del mar, disponibilidad de oxígeno, temperatura y humedad de la máquina incubadora. Una de las estructuras que evitan la fácil penetración de bacterias al interior del huevo es la cutícula, la cual se distribuye irregularmente sobre la superficie del cascarón y se encuentra adherida a la parte calcificada del mismo, se introduce en los poros y forma tapones que sellan temporalmente al huevo. La cutícula esta compuesta de 85% de proteína (3% proteínas hidrosolubles) y de 13 a 15% de lípidos y carbohidratos. Un factor que condiciona la pérdida de humedad en los huevos durante la incubación es la cutícula. La ausencia de ésta facilita la contaminación y altera el intercambio gaseoso, poniendo en riesgo la vida del embrión; lo cual debe considerarse en la incubación de huevos de segundo ciclo, ya que estos tienen en su estructura la misma cantidad de calcio y fósforo, sin embargo son de mayor tamaño y por consiguiente presentan un cascarón más delgado y con poros mas grandes, los cuales permiten una mayor pérdida de peso durante la incubación. Ante esta situación se decidió evaluar una cutícula artificial compuesta por ovoalbúmina aviar para determinar el porcentaje de pérdida de humedad e incubabilidad de huevos limpios y sucios de gallinas ligeras de segundo ciclo.

MATERIAL Y MÉTODOS

Lugar de experimentación.- El experimento se desarrolló en la planta incubadora del Centro de Enseñanza, Investigación y Extensión en Producción Avícola perteneciente a la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia de la Universidad Nacional Autónoma de México, ubicado en Salvador Díaz Mirón s/n, Col. Zapotitlán, Del. Tlahuac en México D.F., a una altitud de 2,250 m.s.n.m. Con condiciones de clima

templado húmedo, siendo enero su mes mas frío y mayo el mas caluroso, presentando una precipitación pluvial de 747 mm.

Huevos para incubación.- Los huevos incubados fueron de la estirpe Isa Babcock B-300, aves reproductoras que contaban con 9 semanas de producción de segundo ciclo con relación 1:9 macho:hembra, se recolectaron 732 huevos limpios de nido y 732 huevos sucios de piso, todos los huevos se recolectaron con guantes de hule.

Diseño experimental.- Los huevos antes de incubar se dividieron en cuatro grupos de 366 huevos cada uno de acuerdo a un arreglo factorial 2×2 donde el primer factor fue la presencia de cutícula artificial o no, y el segundo factor si el huevo era limpio y provenía de nido o no. A cada huevo se le asigno un número progresivo individual, el grupo A (Huevo limpio con cutícula) se le asperjó únicamente la cutícula, el grupo B (Huevo limpio sin cutícula) se le asperjó una solución desinfectante orgánica únicamente (Citrex 1.5%), el grupo C (Huevo sucio con cutícula) se limpio con un trapo estéril y Yodo al 2 % y posteriormente se asperjó con la cutícula artificial, el grupo D (Huevo sucio sin cutícula) fue limpiado de la misma manera y posteriormente se le asperjó únicamente una solución desinfectante comercial (Acidos orgánicos al 1.5%).

Cutícula artificial.- La cutícula artificial se elaboró a partir de un liofilizado de albúmina de huevo de gallina, que se hidrató antes de su utilización al 10% con solución tamponada amortiguadora (PBS) y un desinfectante orgánico (Concentrado de ácidos orgánicos al 1.5%).

Aplicación de la cutícula artificial.- Se aplicó por medio de un atomizador manual de gota mediana a una distancia respecto a los alveolos de 15 cm aproximadamente.

Metodología experimental.- Se pesaron individualmente, se les asperjó aleatoriamente con la cutícula artificial o bien solución desinfectante de acuerdo al diseño experimental planteado, se introdujeron al cuarto frío durante 3 días a una temperatura de 18 °C y una humedad relativa del 80%, después se precalentaron por un periodo de 6 horas a una temperatura de 22 °C y una humedad relativa del 60%. Posteriormente se incubaron. Al día 18 de incubación todos los huevos de cada tratamiento se pesaron y trasladaron a la nacedora.

Pesaje.- Para el pesado del huevo se utilizó una balanza electrónica (O-haus®) con rangos de un gramo.

Máquinas incubadoras y condiciones de incubación.- Para el proceso de incubación (18 días) se utilizó una máquina incubadora de una sola etapa (Jamesway tipo AVN), con una temperatura durante las 24 hrs. de 99.8 °F y una humedad relativa del 50%,

para la eclosión los últimos tres días de incubación se empleó una máquina nacedora de una sola etapa (Jamesway tipo AVN) con una temperatura de 99.2 °F y una humedad relativa del 60%.

Determinación de pérdida de humedad e incubabilidad.- El porcentaje de pérdida de humedad se obtuvo al restar del peso inicial del huevo incubado, el peso del mismo huevo obtenido al día 18 de incubación, fecha de su transferencia a la nacedora. El porcentaje de incubabilidad se obtuvo del total de huevos que eclosionaron a partir del total de huevos diagnosticados como fértiles al día 18 de incubación.

Evaluación experimental.- Se determinó una adecuada aleatorización de los huevos través de su peso el día de la recolección, se determinó el porcentaje de pérdida de humedad bajo las condiciones experimentales ya descritas, se determinó el porcentaje de incubabilidad en cada uno de los grupos evaluados.

Análisis estadístico: Para el análisis de los porcentajes obtenidos estos se transformaron obteniendo el arcoseno de la raíz cuadrada de la proporción. Para determinar probables diferencias de los datos se sometieron a un análisis factorial 2 X 2. Con interacción significativa las diferencias entre tratamientos fueron analizadas con la prueba de comparación múltiple de medias de Duncan fijándose un nivel mínimo para alfa de $P < 0.05$. Los análisis estadísticos se realizaron utilizando el paquete computacional *Statistic Analysis Sistem* (SAS Institute ®).

RESULTADOS

A los 18 días del experimento se observó que respecto al porcentaje de pérdida de humedad no hubo interacción entre los factores, únicamente hubo efecto ($P \leq 0.001$) de la cutícula sobre reducción del porcentaje de pérdida de humedad (con cutícula 18.46^b %; sin cutícula 19.64^a %). En el porcentaje de incubabilidad no se observó interacción de los factores pero hubo efecto ($P \leq 0.03$) del factor limpio, el cual aumentó la incubabilidad (limpio 70.24^a; no limpio 60.71^b) y del factor cutícula ($P \leq 0.01$) (con cutícula 70.68^a %; sin cutícula 60.27^b %). Los promedios de los grupos están reportados en la Tabla 1.

DISCUSIÓN

Desde 1983 Burton y Tullet, citados por Deeming *et al*¹ han mencionado que muchos huevos fértiles podrían salvarse si la porosidad del cascarón se reducirá artificialmente a través de la aplicación de un barniz especialmente diseñado para sellar parcialmente los poros, o bien tapando definitivamente una parte de la superficie del cascarón con la finalidad de reducir una excesiva pérdida de peso, la cual se ha observado está relacionada directamente con una baja de incubabilidad. Sin embargo, existe poca investigación

sobre la utilización de “Barnices especiales” que auxilien a reducir la pérdida de humedad sin comprometer el desarrollo del embrión. En el presente estudio la utilización de la cutícula artificial fue muy favorable en reducir la pérdida de humedad, independientemente si el huevo provenía de piso o de nido. Sin embargo, en cuanto a incubabilidad, aunque el promedio del factor cutícula fue mayor y diferente a la utilización única del desinfectante y no se observó interacción entre factores, el grupo de huevo sucio con cutícula no mostró una diferencia marcada respecto al grupo limpio sin cutícula, aunque si fue mayor al grupo sucio sin cutícula. Por lo cual bajo el contexto de este resultado se requiere investigar si bacteriológicamente existe alguna circunstancia que explique esta aparente diferencia. En un estudio efectuado por Enguilo² utilizando una cutícula artificial con base a ovoalbúmina obtuvo resultados favorables al disminuir la pérdida de peso los primeros 18 días de incubación de huevos provenientes de reproductoras pesadas, reportando una pérdida de humedad del 12.7% aparentemente diferente al grupo que no empleo la cutícula artificial donde solo se utilizó la fumigación con permanganato de potasio y gas formaldehído (14.1%). Las diferencias en pérdida de humedad respecto al presente trabajo que fueron más altas (promedio: 19.05%), posiblemente se deben a que Enguilo² incubó a baja altitud (Cuautla, Morelos, México), en cambio en la presente investigación esta incubación se efectuó a 2,250 m.s.n.m. En cuanto a incubabilidad Enguilo² observó que en el grupo con cutícula artificial nació el 69.5% del total de huevos diagnosticados como fértiles, en tanto que en el grupo sin cutícula se observó un 51.3% de incubabilidad. Estos porcentajes aunque bajos debido posiblemente a que se trataba de reproductoras pesadas de 53 semanas de edad, reflejan un marcado efecto de la cutícula sobre un aumento de los huevos eclosionados, semejante a lo observado en el presente estudio donde los huevos limpios con cutícula presentaron un 18.48% de pérdida de humedad en tanto que en el grupo sin cutícula fue de 19.5%. Aunque la utilización de cutícula es favorable en la reducción de la pérdida de humedad además de aumentar el porcentaje de incubabilidad, Enguilo² encontró que el peso de los embriones es menor con relación a la no utilización de cutícula, por lo cual esta circunstancia la atribuyo a una alteración en la conductividad del cascarón, ya que de acuerdo a Peebles³ al inicio de la incubación la tensión aumentada de CO₂ en el interior del huevo es necesaria para la estimulación del crecimiento pero después del día cuatro al establecerse el intercambio gaseoso de oxígeno y CO₂, la cutícula podría posiblemente afectarlo. Sin embargo se requieren más investigaciones para determinar el tiempo en que tarda en desaparecer una cutícula artificial de este tipo,

además de la dilución óptima a emplear, considerando además medir el grado de conductancia de vapor de agua del cascarón con cutícula y sin ella. Un punto importante más por investigar es el impacto microbiológico que tiene el empleo de una cutícula artificial sobre los embriones y la calidad bacteriológica de los pollitos eclosionados.

REFERENCIAS

1. Deeming, D.C. Ayres, L., and Ayres, F.J. Observations on the commercial production of ostrich

(*Struthio camelus*) in the United Kingdom: incubation. *Vet. Rec.* 132:602-607. 1993.

2. Enguilo, M.B.L. Efecto de la aplicación de una cutícula artificial a base de albúmina, sobre el cascarón en la incubabilidad de huevos de gallinas de 58 semanas de edad. tesina de licenciatura. Universidad Nacional Autónoma de México, México. 1994.

3. Peebles, E.D. Pansky, T. Doyle, S.M. Boyle, C.R. Smith, T.W. Latour, M.A., and Gerard, P.D. Effects of dietary fat and eggshell cuticle removal on egg water loss and embryo growth in broiler hatching eggs. *Poultry Scien.* 77: 1522-1530. 1998.

Tabla 1. Porcentaje de pérdida de humedad e incubabilidad durante la incubación de huevos con y sin cutícula artificial

Porcentaje de pérdida de humedad al día 18 de incubación			
Cutícula			
Limpio	(+)	(-)	Promedio
(+)	18.48 ± 4.80	19.51 ± 2.39	19.00 a*
(-)	18.45 ± 2.65	19.78 ± 2.89	19.11 a
Promedio	18.46 b	19.64 a	
Porcentaje de nacimientos al día 21 de incubación			
Cutícula			
Limpio	(+)	(-)	Promedio
(+)	75.30 ± 15.05	65.18 ± 13.06	70.24 a*
(-)	66.07 ± 5.37	55.36 ± 3.85	60.71 b
Promedio	70.68 a	60.27 b	

*Literales diferentes en el promedio de los factores son estadísticamente diferentes (P<0.05)

IMMUNE FUNCTION FOLLOWING VACCINATION WITH AN INACTIVATED AVIAN PNEUMOVIRUS VACCINE

LA FUNCIÓN INMUNE DESPUÉS DE LA APLICACIÓN DE UNA VACUNA INACTIVADA CONTRA EL NEUMOVIRUS AVIAR

Darrell R. Kapczynski and Terry M. Tumpey

Southeast Poultry Research Laboratory, A.R.S., U.S.D.A., 934 College Station Rd, Athens, Ga 30605

RESUMEN

El neumovirus aviar (APV) recientemente comenzó a producir una enfermedad en los pavos, que está causando severas pérdidas económicas a la industria meleagrícola. El principal objetivo de este estudio fue comparar los mecanismos de la inmunidad celular con linfocitos de pavo purificados, procedentes de aves vacunadas y testigos después de un desafío con el APV. Los resultados indican diferencias en las respuestas proliferativas entre los grupos vacunados y los no vacunados.

Avian pneumovirus (APV) is a recently emerged infectious disease of turkeys causing severe economic losses to the turkey industry. The disease results in poor feed conversion, increased condemnations, and mortality associated with secondary bacterial infections. Economic losses to APV are estimated at 15 million dollars annually by the turkey industry. APV infections of poultry were exotic to the U.S. until 1996, when a new subtype of APV, type C (APV/C), was identified as the etiology of the disease. Some delay in diagnosis occurred until the virus could be isolated, because diagnostic reagents to APV types A and B present in other countries were ineffective in

identifying birds infected with type C virus. The history of the disease in the U.S. contrasts that experienced in other countries where the disease has been a serious problem since the mid-1980s. In those countries, the disease spread rapidly throughout their turkey production industry and has affected chickens as well as turkeys.

Control of APV has been performed by vaccination with live-attenuated, cell-culture adapted APV strains. Currently, APV type A vaccines protect against challenge from both type A and B viruses from Europe. Research has also shown that live attenuated APV vaccines may cause disease in young poults, which is apparently due to virulent viral subpopulations contained in vaccine preparations. Vaccination of birds with the U.S. virus reduces signs of disease following challenge with the APV type A, but not from APV type B. Inactivated APV vaccines are commercially available. However, clinical trials examining mammalian pneumovirus inactivated vaccines (human respiratory syncytial virus (RSV) or bovine RSV) resulted in enhanced pulmonary disease following infection. Research generated in our laboratory corroborate these findings.

The main objective of this study was to compare cellular immune mechanisms of purified turkey lymphocytes from control and vaccinated birds following APV challenge. Peripheral blood

lymphocytes were isolated and tested for proliferative response to APV and Concanavalin A (ConA). The relative percent of CD4+ lymphocytes following virus challenge was measured by flow cytometry. Also, the effect of APV infection on humoral immunity was examined by comparing APV-specific serum antibodies following virus challenge.

The results indicate differences in proliferative responses between vaccinated and non-vaccinated groups. Birds not immunized prior to challenge, had higher stimulation indexes (SI) to both APV and ConA than immunized birds. Interestingly, the SI to APV and ConA decreased throughout the experiment in the non-vaccinated APV-challenged group, possibly indicating immunosuppression. Groups that were not challenged had higher SI to APV and ConA than immunized-challenged groups. No significant differences in CD4+ lymphocyte populations were observed between vaccinated and non-vaccinated APV-challenged groups following challenge. Finally, APV-specific antibodies increased in all challenged groups as determined by ELISA. However, only non-vaccinated groups had corresponding increases in virus-neutralizing antibodies. These results indicate vaccination with inactivated-APV does not induce protective immunity, and APV challenge may result in a suppressed response of lymphocytes to mitogen.

VACCINE POTENTIAL OF CORE LPS OF AVIAN *ESCHERICHIA COLI*

EL POTENCIAL DEL LIPOPOLISACÁRIDO (LPS) CENTRAL DE *ESCHERICHIA COLI* AVIAR COMO VACUNA

Margie D. Lee^A, John J. Maurer^B, Charles L. Hofacre^B

^ADepartment of Medical Microbiology and Parasitology, ^BDepartment of Avian Medicine, College of Veterinary Medicine, The University of Georgia, Athens, GA 30602-4875

RESUMEN

Las vacunas existentes contra *E. coli* en otras especies animales se han enfocado hacia las toxinas y los *pili* específicos de la enfermedad que se desea prevenir. No se ha logrado la caracterización de los aislamientos de origen aviar de acuerdo a un factor de virulencia, pues por lo general no son toxigénicos, son poco invasivos y se ha encontrado que no comparten adhesinas comunes. Sería deseable contar con un vacuna efectiva para el control de *E. coli* patógena en pollo de engorda. Nosotros empleamos un sistema de tipificación mediante reacción en cadena con polimerasa para clasificar los tipos de oligosacáridos (OS) centrales asociados con *E. coli* patógena de origen

aviar. Casi todos los aislamientos recolectados a partir de sitios que normalmente son estériles presentaron los OS centrales ya sea R-1 ó R-3. Nuestros hallazgos indican que la inmunidad contra los OS centrales R-1 y R-3 puede ser una manera efectiva de proteger a los pollos contra un gran número de enfermedades causadas por *E. coli*.

Avian *E. coli* infections have been fought with antibiotics primarily because development of a broadly protective vaccine has been difficult due to the variety of serotypes associated with poultry diseases. These isolates also do not have well characterized virulence factors that can be exploited in vaccine development.

Existing *E. coli* vaccines for other animals have focused on toxins and pili that are specific for the targeted disease. For example, bovine colibacillosis vaccines target the K99 pili which are found on pathogenic isolates (5). Poultry isolates have defied characterization by virulence factor because they are generally nontoxic, poorly invasive, and have not been found to have common adhesins (3). The infections are responsible for significant losses to the poultry industry because they cause disease in birds near market age and the isolates are usually resistant to many antibiotics (2,4). But due to the issues associated with antimicrobial usage in food animals, effective antibiotics may not be available for future use.

Antibiotic resistance is increasing worldwide causing a financial burden of \$30 billion yearly and posing a great threat to public health (7). The use of certain antibiotics to treat infections in animals has been linked to greater resistance to similar drugs used to fight human pathogens. For example, a study evaluating resistance to quinolones among *Campylobacter jejuni* isolates from Minnesota residents from 1992 through 1998 revealed a significant increase in resistance after 1995, the year in which fluoroquinolones became approved in the United States to treat poultry (6). The concern about animal use and increased resistance has resulted in FDA-initiated procedures to re-evaluate approval of fluoroquinolones for animal use. Unfortunately the fluoroquinolones are the only effective antibiotic for some *E. coli* infections in poultry (2).

An effective vaccine would be a useful tool for control of avian pathogenic *E. coli* in broilers. O-antigen is very immunogenic and can be a useful antigen if a specific serotype is commonly found associated with disease. These bacteria, however, produce hundreds of O-antigen serotypes, many of which can be found in avian isolates. However, *E. coli* possesses few core oligosaccharide (OS) structures (1). One study determined that most isolates pathogenic to humans only contained 2 different OS types (R-1 and R-3) and that these types were also common to canine blood or urinary tract isolates. We used the PCR typing system described by Amor et al. (1) to characterize the prevalence of core OS types associated with avian pathogenic *E. coli*. We found that nearly all

of the isolates collected from sites that are normally sterile (liver, lung, blood) possessed either R-1 or R-3 core OS. Isolates cultured from the trachea or skin, most likely commensals, were less likely to be of these core types suggesting that R-1 and R-3 core LPS may be associated with pathogenicity. This suggests that these two core OS types are prevalent in disease-causing avian *E. coli*. These findings indicate that immunity to R-1 and R-3 core OS may be an effective way to protect chickens from a great number of diseases caused by *E. coli*. A vaccine may be a good alternative to treating poultry infections for which the only current treatment is fluoroquinolones, antibiotics belonging to the same class as those needed to treat humans, which may soon be banned for animal use.

REFERENCES

1. Amor K., D. E. Heinrichs, E. Frirdich, K. Ziebell, R. P. Johnson, and C. Whitfield. Distribution of Core Oligosaccharide Types in Lipopolysaccharides from *Escherichia coli*. *Infect. Immun.* 3:1116-1124, 2000.
2. Bass L., C. A. Liebert, M. D. Lee, A. O. Summers, D. G. White, S. G. Thayer, and J. J. Maurer. Incidence and Characterization of Integrons, Genetic Elements Mediating Multiple-Drug Resistance, in Avian *Escherichia coli*. *Antimicrob. Agents Chemother.* 12: 2925-2929, 1999.
3. Dho-Moulin M., and J. M. Fairbrother. Avian pathogenic *Escherichia coli* (APEC). *Vet Res.* 30:299-316, 1999.
4. Gross W. B. Colibacillosis. In: *Diseases of Poultry*, 9th ed. B. W. Calnek ed. Iowa State University Press, Ames. pp. 138-144. 1995.
5. Nagy, B. Vaccination of cows with a K99 extract to protect newborn calves against experimental enterotoxic colibacillosis. *Infect. Immun.* 27:21-24, 1980.
6. Smith K. E., J. M. Besser, G.W. Hedberg, F. T. Leano, J. B. Bender, J.H. Wicklund, B.P. Johnson, K.A. Moore, M. T. Osterholm, and The Investigation Team. Quinolone-resistant *Campylobacter jejuni* Infections in Minnesota, 1992-1998. *N. E. J. M.*, 20: 1525-1531, 1999.
7. Spake A. Losing the Battle. *U.S. News and World Report*, 126(18): 52-60, 1999.

CAMBIOS HEMATOLOGICOS EN AVES INFECTADAS CON LA CEPA 73688 ALTAMENTE PATOGENA DEL VIRUS DE INFECCION DE BOLSA DE FABRICIO

HEMATOLOGICAL CHANGES IN BIRDS INFECTED WITH HIGHLY PATHOGENIC 73688 STRAIN, INFECTIOUS BURSAL DISEASE (IBF) VIRUS

Lima, M.A¹; Calderon, A.N²; Fehervari, B.T.², Fortoul VDG. T. ³

¹Departamento de Patología Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia, UNAM. Tel. 56 22 58 78. Email: melo@servidor.unam.mx, ²Departamento de Producción Animal: Aves, Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia, UNAM. Tel. 56 22 58 67. Email: nlca@servidor.unam.mx, ³Departamento de Microscopía Electrónica, Facultad de Medicina. UNAM

SUMMARY

IBF results in lymphoid atrophy and depletion in the bursa of Fabricius. The purpose of this experiment was to determine hematological changes in 2-week-old birds challenged with IBF virus, 73688 strain. In Group 1 samples, packed cell volume, hemoglobin, and red blood cells remained unchanged when compared with group 2, with the exception of 96-hour samples in group 1, where these parameters were decreased. Leukopenia was found 96 hours post-infection, and heteropenia was observed at 72, 84, and 96 hours.

INTRODUCCION

La Infección de la Bolsa de Fabricio (IBF) es una enfermedad de origen viral, de aves jóvenes de 3 a 6 semanas de edad, es altamente contagiosa y ocasiona atrofia de la Bolsa de Fabricio (BF). El agente etiológico es un Birnavirus, que bajo condiciones naturales se transmite por vía oral, posteriormente se replica en linfocitos y macrófagos del intestino y por vía sanguínea se dirige a la BF donde se replica; 16 horas postinfección (hpi) existe viremia con replicación secundaria en otros órganos como bazo, hígado, timo, riñón y tonsilas cecales. La mortalidad es variable, pero puede ser hasta un 50% en aves Leghorn. El período de incubación es de 2-3 días, animales en la fase aguda de la enfermedad presentan severa postración, anorexia, diarrea, depresión, plumas erizadas y sucias (1,2). Debido a la signología, los cambios importantes en un hemograma son eritrocitosis relativa que se asocia a pérdida de líquidos en la diarrea, leucopenia y leucocitosis por heterofilia dos días y 5 días pi, respectivamente. La linfopenia que se presenta puede estar relacionada al incrementado número de células que sufren apoptosis, específicamente linfocitos B. Los efectos de inmunodepresión parecen ser más evidentes si la exposición al virus es en 2 a 3 semanas de edad (2,3,4).

METODOLOGIA

Se utilizaron 29 aves Leghorn, libres de patógenos específicos (SPF) de 2 semanas de edad, las aves se dividieron en dos grupos; Grupo 1 formado por 21 aves, a las cuales se les administró una dosis de 0.2 ml de la cepa 73688 del virus de IBF, vía oral y Grupo 2 formado por 8 aves, como testigos, a las cuales se les administró 0.2 ml de solución salina vía oral. Las aves infectadas, así como las testigos se alojaron en diferentes unidades de aislamiento del Departamento de Producción Animal: Aves de la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia (FMVZ), bajo condiciones controladas, recibieron alimento comercial y agua de bebida a libre acceso. Posteriormente se hicieron 7 muestreos a las 24, 36, 48, 60, 72, 84 y 96 horas hpi, del grupo 1 y de cada uno se tomaron muestras de sangre de 3 aves. Los muestreos en el grupo 2 fueron únicamente a las 24, 60 y 96 horas y de cada grupo se tomaron muestras de sangre a 3, 2 y 3 aves, respectivamente. La cantidad de sangre de cada ave fue de 0.8 ml, vía intracardiaca, utilizando microtainer con EDTA, como anticoagulante para la evaluación del hemograma, el cual se realizó en el Departamento de Patología sección Hematología, de la FMVZ.

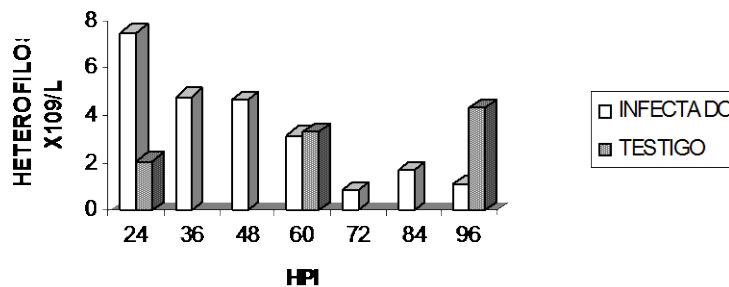
RESULTADOS

De los resultados obtenidos, en la línea roja durante los muestreos del grupo 1, se mantuvieron constantes el Hematocrito, Hemoglobina y Eritrocitos, con respecto al grupo 2, excepto en el muestreo de las 96 hrs del grupo 1, en el cual se observa una disminución del hematocrito en 17.7% y hemoglobina 27.9% con respecto al grupo testigo. En cuanto a los eritrocitos se presentó una disminución a las 84 y 96 hpi en 16.7% y 21.3%, respectivamente. En los valores de leucocitos, los cambios más importantes fueron a las 72 y 96 hpi en donde disminuyeron en un 45.8% en los dos muestreos. Los heterófilos, disminuyeron en un 71.9%, 47% y 65.7% en los muestreos de las 72, 84 y

96 hpi respectivamente (Gráfica 1). Los linfocitos y monocitos no presentaron cambios importantes en el grupo 1, mientras que en el grupo 2 se hace evidente

una ligera linfopenia, a las 24 hrs. Con respecto a los valores de eosinófilos, basófilos y proteínas plasmáticas, no mostraron cambios relevantes.

GRAFICA 1. PROMEDIO DE HETERÓFILOS DE AVES INFECTADAS CON LA CEPA 73688 DEL VIBF Y GRUPO TESTIGO



DISCUSION

Dentro de los hallazgos más importantes en el hemograma es eritrocitosis relativa asociada a hemoconcentración (3), sin embargo en este estudio los valores de hematocrito, hemoglobina y eritrocitos se encontraron sin cambios relevantes, debido posiblemente a que las aves no presentaron diarrea y por lo tanto no se suscitó pérdida de líquidos, que nos causara la presencia de esta eritrocitosis realtiva.

Cepas altamente patógenas inducen severa depleción de células hematopoyéticas en médula ósea, lo que hace suponer que las aves presentan cuadros de anemias, leucopenia y heteropenia (6), y como podemos observar existe una disminución de la línea roja en el grupo 1 a las 96 hpi, lo cual nos sugiere que el virus ha ocasionado lesiones a nivel de médula ósea, sin embargo estos cambios se van a correlacionar más adelante, con estudios histopatológicos.

En el leucograma, en este estudio los valores de leucocitos en el grupo 1 se encontraron solo cambios en las 72 y 96 hpi, con respecto al grupo testigo, a lo que se le denomina leucopenia, las cuales fueron ocasionadas por la heteropenia que se presentó a partir de las 72 hpi, lo cual es el resultado de una depleción de leucocitos circulantes y depleción o degeneración de la leucopoyesis, estas leucopenias son causadas primariamente por heteropenias y es consecuencia de infecciones virales, esto es debido a que el virus afecta líneas progenitoras en médula ósea, ocasionando su disminución. Por otro lado, la presencia de linfopenia en el muestreo de las 24 hrs del grupo 2 es básicamente asociada a la liberación de glucocorticosteroides endógenos que se liberan durante una respuesta inicial de estrés.

La lisis de linfocitos es causada por necrosis y apoptosis en aves jóvenes infectadas con el virus de IBF, esta apoptosis también se ha observado en linfocitos de sangre periférica *in vitro*, por lo tanto se puede suponer que las aves infectadas podrían presentar una linfopenia y esto es debido a que una de las causas importantes de linfopenia, se asocia a enfermedades virales severas, sin embargo en los resultados obtenidos en todos los muestreos del grupo 1 no se observaron cambios relevantes.

CONCLUSIONES

Es necesario realizar muestreos más prolongados para observar mejor el comportamiento celular tanto de línea roja y blanca, en esta enfermedad y así poder determinar si después de las 96 hpi se aprecia una anemia evidente o existe recuperación por parte del ave. Así mismo, determinar si las heteropenias observadas se vuelven más marcadas o las aves se recuperan.

Todos los hallazgos hematológicos se corroborarán con estudio histopatológico de médula ósea para determinar el daño ocasionado por el virus de IBF, en todos los muestreos.

RESUMEN

La Infección de la Bolsa de Fabricio (IBF), es una enfermedad que causa atrofia y depleción linfoide bolsa de Fabricio. El objetivo es determinar cambios hematológicos en aves, de 2 semanas de edad, desafiadas con la cepa 73688 del virus de IBF. Durante los muestreos del grupo 1 se mantuvieron constantes el Hematocrito, Hemoglobina y Eritrocitos, con respecto al grupo 2, excepto en el muestreo de las 96 hrs del grupo 1, en el cual se observa una disminución, con

respecto al grupo testigo. Se presentó leucopenia a las 96 hrs posinfección y heteropenia a las 72, 84 y 96 hrs respectivamente.

REFERENCIAS

1. Tsukamoto, K., Tanimura, N., Mase, M. and Imai, K. Comparison of virus replication efficiency in lymphoid tissues among three infectious bursal disease virus strains. 1995; 39:844-852.
2. Van den Berg, T.P. Agude infectious bursal disease in poultry: A review. 2000; 29:175-179.
3. Okoye, J.O.A. Infectious bursal disease of chickens. 1984; 54:425-436.
4. Sharma, J.M., Dohms, J.E. and Metz, A.L. Comparative Pathogenesis of serotype 1 and variant serotype 1 isolates of Infectious Bursal Disease virus and their effect on humoral and cellular immune competence of Specific-Pathogen-Free Chickens. Avian Diseases. 1989; 33:112-124.
5. Craig, W.H., Brewer, R.N. and Allen, E. Studies on infections bursal disease in chickens. 2. Scoring microscopic lesions in the bursa of fabricius, thymus, spleen, and kidney in gnotobiotic and battery reared white Leghorns experimentally infected with Infectious Bursal Disease Virus. Poultry Science. 1980; 59:1006-1017.
6. McFerran, J.B. and McNulty, M.S. Virus Infections of Birds. Elsevier Science Publishers B.V. Amsterdam 1993, (pp 213-228).
7. Campbell, T.W. Avian Hematology and Cytology. Second edition. Iowa State University Press/Ames. 1995.
8. Inoue, M., Fujita, A. and Maeda, K. Lysis of mielocitos in chickens infected with Infectious Bursal Disease Virus. Vet. Pathol. 1999; 36:146-151.
9. Feldman, B.F., Zinkl, J.G. and Jain, N.C. Schalm's. Veterinary Hematology. Fifth edition. Lippincott Williams and Wilkins.

APPLICATION OF THE PCR TO DETECT CHICKEN ANEMIA VIRUS GENOME

APLICACIÓN DE LA REACCIÓN EN CADENA CON POLIMERASA (PCR) PARA DETECTAR EL GENOMA DEL VIRUS DE LA ANEMIA DEL POLLO

V. A. Lobanov, V. V. Borisov, M. A. Volkova, G.V. Batchenko, V. V. Drygin

All-Russian Research Institute for Animal Health, Vladimir, Russia

RESUMEN

El diagnóstico de la infección con el virus de la anemia del pollo (CAV) se puede lograr mediante aislamiento viral o mediante la detección de anticuerpos específicos. El aislamiento del virus mediante las técnicas convencionales es un proceso bastante laborioso y tardado. Además, algunas cepas de este virus no se han logrado reproducir en células MSB-1 ni en otras líneas celulares linfoblastoides. Como una alternativa diagnóstica se desarrolló una prueba de reacción en cadena con polimerasa mediante "anidación" para detectar el genoma del virus de la anemia del pollo. Usando este sistema de análisis se detectó el genoma de dicho virus en el 54.2% de las pruebas. El análisis de la información reveló que el virus de la anemia del pollo con frecuencia está asociado con el síndrome de hidropericardio en Rusia. Estos hallazgos sugieren una amplia distribución del virus en las granjas rusas.

Diagnosis of chicken anemia virus (CAV) infection can be made by virus isolation or the detection of CAV specific antibodies. Isolation of CAV by conventional techniques is a cumbersome and time-

consuming process which impairs the rapid and reliable demonstration of virus in clinical samples. Further, some CAV strains have failed to replicate in MSB-1 or other lymphoblastoid cell lines.

As an alternative diagnostic approach a polymerase chain reaction ("nested"-PCR) has been developed for detection of CAV genome. Using the test system samples of pathologic material obtained during 1999-2001 years from 47 poultry farms in Russia, Ukraine, and Belarus have been investigated. As a result, CAV genome has been detected in 54.2% of tests. The data analysis revealed that CAV is often associated with hydropericardium syndrome outbreaks in Russia.

Del-Ros (USA) and Cuxhaven-1 (TAD, Germany) strain-specific fragments have been amplified. The amplified 1453 bp fragments of the strains and three field isolates detected have been cloned in pGEM-T plasmid vector. The cloned 1453 bp fragment contains the major part of VP1 gene, coding single structural protein 51,6 K, and also more than a half of the length of ORF for VP2 (24 K) and VP3 or apoptin (13,6 K). The 1453 bp sequences have been determined on both strands using universal forward and

reverse pUC/M13 primers and a set of specially synthesized primers.

The comparison of nucleotide sequences of cloned fragments of two CAV strains and three isolates with similar sequences published by EMBL showed the

possibility of differentiation of strains and isolates of CAV.

The data obtained suggests a wide distribution of CAV in poultry farms in Russia.

EFFECTO DE LA ESTIRPE GENETICA, SEXO Y ALGUNAS PRACTICAS DE MANEJO SOBRE LOS PARAMETROS DE PRODUCCION EN EL POLLO DE ENGORDA

EFFECT OF THE STRAIN, SEX, AND MANAGEMENT PRACTICES ON BROILER PRODUCTION PARAMETERS

¹López, B.B., Ortiz, M.A. y Téllez, H.J.

Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán, UNAM. ¹ E-mail. benitolb@servidor.unam.mx

SUMMARY

The effect of the strain genetics and the sex was evaluated using three broiler strains under a 3x3 factorial model. Co-variables were day-one weight, grow-out days, and population density. Daily weight gain, final weight, overall mortality rate, feed conversion rate, and productivity index, showed no statistically significant differences between strains ($P>0.1$). When these same variables were evaluated on a per-sex basis, average daily weight gain was significantly higher in males. Therefore, average final weight was also higher. Nevertheless, mortality rates, feed conversion rates, and productivity index showed no statistically significant differences ($P>0.1$).

RESUMEN

El efecto de la estirpe genética y sexo, se evaluó en tres estirpes de engorda en un modelo factorial 3x3 y como covariables el peso al primer día, días de engorda y densidad de población. Encontrando que para ganancia de peso diaria (GDP), peso final, porcentaje de mortalidad general, conversión alimenticia e índice de productividad no presentaron diferencias estadísticas significativas entre estirpes ($p>0.1$). Al evaluar estas mismas variables por sexo, se encontró que en GDP los machos tuvieron promedios significativamente más altos y que por ende en el peso final lograron también los promedios más altos, pero que en los porcentajes de mortalidad, conversión e IP no denotaron diferencias significativas ($p>0.1$).

El presente trabajo se realizó con el objeto de evaluar el efecto de la estirpe genética, sexo, peso al primer día, días de engorda y densidad de población sobre los parámetros de producción: ganancia diaria de peso (GDP), conversión, peso final, porcentaje de mortalidad e Índice de Productividad (IP). Para dicho

fin se estudiaron 84 parvadas de engorda con un total de 1,162,803 aves, producidas durante el año 2000 en las zonas de Jalisco, Aguascalientes y Guanajuato. Las estirpes que se evaluaron fueron Arbor Acres, Ross y Shaver en tres arreglos; lotes de machos, hembras y mixtos mismos que sirvieron como criterios de clasificación para su evaluación estadística en un modelo factorial 3x3 y como covariables el peso al primer día, días de engorda y densidad de población. Encontrando que para GDP el promedio general de las aves estudiadas fue de 45.01 gr diarios y que por estirpe fue 46.6, 44.9 y 44.4 para Arbor Acres, Ross y Shaver respectivamente, mismas que no presentaron diferencias estadísticas significativas entre ellas ($p>0.1$). Para la variable peso final el promedio general fue de 2.326 Kg mientras que el peso por estirpe fue de 2.407, 2.320 y 2.288 en el mismo orden mencionado anteriormente y sin diferencias significativas. Este mismo fenómeno se observó en porcentaje de mortalidad, con 9.1 de mortalidad general 2.1 en conversión alimenticia y 202.2 de IP, sin diferencias significativas. Sin embargo al evaluar estas mismas variables por sexo, se encontró que en ganancia diaria de peso los machos tuvieron los promedios más altos 47.1 gr y que por ende en el peso final lograron también los promedios más altos 2.420 Kg, pero que en los porcentajes de mortalidad, conversión e IP no denotaron diferencias significativas ($p>0.1$). Tampoco se encontró efecto de interacción entre estirpe y sexo. Finalmente las covariables peso al primer día y días de engorda están correlacionadas positiva y significativamente con las variables de producción ya mencionadas, no así la variable densidad de población que mostró una correlación negativa significativa ($p<0.05$).

ENZYME-LINKED IMMUNOSORBENT ASSAY USING PEPTIDE SPECIFIC ANTIBODIES FOR DETECTION OF AVIAN INFECTIOUS BRONCHITIS VIRUS

ENSAYO DE INMUNOABSORCIÓN LIGADO A ENZIMAS USANDO ANTICUERPOS ESPECÍFICOS CONTRA PÉPTIDOS PARA LA DETECCIÓN DEL VIRUS DE LA BRONQUITIS INFECCIOSA

N.N. Lougovskaia, A.A. Lougovskoi, N.S. Mudrak, V.V. Drygin, A.V. Borisov, V.V. Borisov, A.A. Gusev

All-Russian Research Institute of Animal Health, Vladimir, 600900, Russia

RESUMEN

Se usó un péptido de la región inmunodominante conservada de la terminal N de la proteína del peplómero S2 del virus de la bronquitis infecciosa (IBV), para aislar los anticuerpos específicos de sueros policlonales hiperinmunes de pollo mediante cromatografía de inmunoafinidad. Estos anticuerpos se utilizaron para desarrollar un ensayo de inmunoabsorción indirecto de bloqueo en fase líquida para la detección del antígeno del virus de la bronquitis infecciosa en muestras de líquido alantoideo de embriones de pollo después de la propagación de cepas vacunales de dicho virus.

A peptide VTNAPYVSYGKFAIKPOG deduced from the N-terminal conserved immunodominant region of peplomeric S2 protein of avian infectious bronchitis virus (IBV) was used to isolate the specific antibodies from chicken hyperimmune polyclonal sera by immunoaffinity chromatography on BrCN-activated Sepharose 4B. The antibodies were employed to develop an indirect liquid-phase blocking immunosorbent assay for detection of IBV antigen in samples of allantoic fluid of chicken embryos after propagating of IBV vaccine strains. The choice of the peptide was based on the observation that the respective fragment of S2 peplomeric glycoprotein of IBV bound wide range of monoclonal antibodies as well as recognized specific immunoglobulins (IgG) in chicken polyclonal serum samples (1).

In our assay IBV coated ELISA plates were used to capture the excess of peptide-specific IgG after preincubation of them with test material. IgG bound to IBV antigen were in turn detected with anti-chicken

horseradish peroxidase conjugate and chromogenic substrate. Signal to noise ratios (S/N) were calculated from the optical densities obtained in the assay and diagnostic threshold was established from S/N ratio frequency distribution of samples positive or negative for IBV by virus titration or polymerase chain reaction. S/N ratios more than 0.8 were considered to be negative, ratios less than 0.7 were found to be positive and ratios between 0.7 and 0.8 were considered to be suspicious of IBV.

For SPF-allantoic fluid of chicken embryos S/N value obtained in the assay were above 0.85 while allantoic fluids taken after propagation of IBV vaccine strains H52, H120, M41, 4/91, D274, D1466 demonstrated the S/N values in the range from 0.2 to 0.6.

The specificity of the assay was confirmed by investigating the samples of allantoic fluid or tissue culture supernatants of heterologous viral antigens (Egg Drop Syndrome, Infectious Bursal Disease, Newcastle Disease, Reovirus) and Mycoplasma gallisepticum. The nonspecific reaction with heterologous antigen was insignificant yielding the S/N values ranging from 0.8 to 0.95 for different test samples. Relative sensitivity of the assay ranged from 105 to 106 of 50% median egg infectious doses (EID50) and were examined by investigation of consecutive two-fold dilutions of infectious allantoic fluid with known IB virus EID50 predetermined by virus titration in SPF chicken embryos.

REFERENCE

1. Kusters *et al.*, J. Immunol. 143:2692. 1989.

CHARACTERIZATION OF ND VIRUS ISOLATE FROM RECENT OUTBREAK IN CENTRAL REGION OF RUSSIA

CARACTERIZACIÓN DE UN AISLAMIENTO DEL VIRUS DE LA ENFERMEDAD DE NEWCASTLE DE UN BROTE RECIENTE EN LA REGIÓN CENTRAL DE RUSIA

T.B. Manin, I.P. Pchelkina, Y.A. Bochkov, A.V. Borisov, L.O. Scherbakova, S.K. Starov, V.V. Drygin

All-Russian Research Institute for Animal Health, 600901, Vladimir, Russia

RESUMEN

El virus de la enfermedad de Newcastle aislado de un brote reciente en la región Central de Rusia fue identificado mediante el análisis de la determinación parcial de la secuencia del gene de la proteína de fusión (F). Este aislamiento tiene la secuencia de aminoácidos del sitio de separación de la proteasa de la proteína FO (112R-R-Q-R-R-F117), un índice de patogenicidad intracerebral de - 1,97 y un tiempo medio de muerte de los embriones de 49 horas, como ocurre con las cepas velogénicas de este virus. Se sospechó que los brotes causados por el virus del genotipo VII constituyeron la cuarta panzootia de la enfermedad de Newcastle, misma que es distinta de la tercera panzootia causada por los "virus de pichón PMV-1".

The ND virus isolated from recent outbreak in Central region of Russia was identified by partial

sequence analysis of the fusion (F) protein gene. The isolate has the amino acid sequence of protease cleavage site of the FO protein (112R-R-Q-R-R-F117), intracerebral pathogenicity index - 1,97 and mean death time on embryos - 49 hours like velogenic strains of NDV. A phylogenetic tree based on sequences obtained showed that the isolate was similar to the genotype VIIb viruses. NDV isolates from southern Africa, Bulgaria and Turkey were placed into this group. The group VIIb is a part of a larger genetic cluster VII that also includes NDV strains from the Far East, East Asia, and some western European countries (VIIa). It was suspected that outbreaks caused by VII genotype have constituted the fourth panzootic of ND, which is distinct from the third panzootic caused by the "pigeon PMV-1 viruses".

EVALUACIÓN DE LA APLICACIÓN DE UNA VACUNA INACTIVADA CONTRA EL VIRUS DE LA BRONQUITIS INFECCIOSA POR ASPERSIÓN EN UNA PARVADA DE POLLO DE ENGORDA

EVALUATION OF A SPRAY-GIVEN, KILLED, INFECTIOUS BRONCHITIS VIRUS (IBV) VACCINE IN A BROILER FLOCK

MVZ. Daniel Marrufo Villa, MVZ. Alejandro Sosa PérezSandi, MVZ. Eduardo Lucio Decanini y MVZ. Enrique González Escobar.

Investigación Aplicada S.A. de C.V., 7 Norte No. 416 Col. Centro, Tehuacán Puebla, México.

Sección Técnica – Gerencia Línea Aves - Investigación Aplicada S.A. de C.V.

Tel. (2) 380-38-05, 380-38-08 y 380-38-09. Fax. (238) 380-38-06, Correo Electrónico: dmarrufo@grupoidisa.com

SUMMARY

A killed IBV vaccine was administered by fine spray to broilers at both 1 and 16 days of age. Birds showed no respiratory signs or IBV antibodies throughout the production cycle. In the potency/challenge test 100% controls, and 10% vaccinates showed clinical signs of

infectious bronchitis. Challenge IBV was re-isolated from 100% control embryos and 10% vaccinates. Spray-given killed vaccine confers 90% protection against challenge.

RESUMEN

Se realizó la aplicación al 1 y 16 día de edad de una vacuna inactivada por aspersión por gota fina contra el virus de Bronquitis Infecciosa en una parvada de pollo de engorda. Durante el ciclo de producción las aves no presentaron signología respiratoria, ni anticuerpos contra el VBI. En la prueba de potencia-desafío el 100% de aves testigo y el 10% del grupo vacunado presentaron signos clínicos de BI. El 100% de embriones testigo y 10% del grupo vacunado se reaisló el VBI de desafío. La Vacuna Inactivada por Aspersión confiere protección contra un desafío del VBI del 90%.

RESULTADOS

La Bronquitis Infecciosa (BIA) es considerada como el problema respiratorio de mayor prevalencia en la industria avícola mundial, en el caso del pollo de engorda se presentan grandes pérdidas económicas, debido a la elevada mortalidad que se puede presentar en aves jóvenes y por la interacción de agentes bacterianos secundarios (*E. Coli*). Inicialmente la forma de controlar a la Bronquitis Infecciosa era por medio de la exposición de virus no atenuados virulentos, posteriormente la vacunación con virus atenuados, sin embargo estas formas de control acarrear otro tipo de problemas como los son las reacciones postvacunales severas, los brotes de campo inducidos por virus vacunales y la aparición de cepas variantes del virus de BIA; razón por la cual nació la necesidad de crear otra alternativa de control de la enfermedad, que consiste en la aplicación del virus de BIA inactivado por aspersión con un adyuvante a base de toxinas bacterianas. Esta vacuna a su contacto con las mucosas del tracto respiratorio estimula una fuerte inmunidad de tipo local la cual es requerida para lograr la protección contra los desafíos de campo y la disminución casi absoluta de las lesiones producidas por el VBIA. El objetivo de prueba fue evaluar el nivel de protección que confiere aplicación de una vacuna inactivada por aspersión contra la BIA en una parvada de pollo de engorda mediante la valoración de la respuesta serológica y una prueba de potencia desafío. La prueba se realizó en una granja de pollo de engorda localizada en el centro del país en donde se alojaron 138,000 pollos de engorda de un día de edad. La prueba consistió en la aplicación de la vacuna inactivada por aspersión contra la BI al día y al los 16 días de edad (5 días después de la aplicación de la vacuna a virus vivo de Newcastle). La vacuna fue aplicada por medio de aspersión por gota fina a una dosis de 0.5 ml por ave. En la granja se realizaron las practicas de manejo, medidas de bioseguridad y practicas de alimentación que normalmente se llevan a

cabo en las parvadas comerciales. En la parvada se realizó un seguimiento serológico tomando muestras a los 16, 21, 28, 35, 42 y 48 días de edad con la finalidad de determinar si las aves habían sido expuestas al virus de la BI de campo mediante la técnica de ELISA y cual era la respuesta inmune a dicho desafío, así mismo correlacionarlo con el estado de salud de las aves y el nivel de protección estimulada por la vacuna. A las 6 semanas de edad se tomaron 14 pollos vacunados y 5 aves ALPES de 7 semanas (grupo testigo) y fueron trasladaron a las unidades de aislamiento del Laboratorio de Biología de IASA en donde se realizó una prueba de Potencia-Desafío con un virus patógeno de BIA aplicando por vía intraocular 0.3 ml de virus BI cepa Mass (10^4 DIE₅₀/ml). Al 5° día se tomaron muestras de exudados traquéales de ambos grupos con hisopo, de cada muestra se inocularon 5 embriones LPE de 10 días de edad para realizar el reaislamiento del virus.

Durante el ciclo de producción las aves no presentaron signología respiratoria atribuible al virus de BIA; con respecto al seguimiento serológico solo a los 16 días se observaron títulos de anticuerpos contra el VBI con un nivel bajo (anticuerpos maternos), durante el resto del ciclo productivo no se detecto la presencia de anticuerpos, por lo tanto podemos asumir que no se presento un desafío de campo. Con lo referente a la prueba de potencia-desafío se encontró entre el 3° y 5° día post-desafío que el 100% de las aves ALPES y un ave de grupo vacunado (10%) presentaron signos clínicos de Bronquitis Infecciosa. Del aislamiento al 7° día post-inoculación se evaluaron los embriones encontrando que todos los embriones del grupo ALPES presentaron lesiones causadas por el VBI (25+/25) en el grupo de embriones de las aves vacunadas solo se encontraron 5+/50, dichas lesiones fueron encorvamiento, enanismo y falta de plumas, de las aves del grupo vacunado se realizo el reaislamiento del VBI de desafío del 10% de las aves y del grupo testigo se reaislo del 100% de pollos. Por lo tanto el 100% de las aves testigo no presentaron protección ante un desafío y los pollos a los que se les aplicó la vacuna inactivada por aspersión contra BI tuvieron un 90% de protección, por tal motivo la prueba de Potencia-Desafío se considera "Satisfactoria", es decir, la vacuna si protegió a las aves ante el desafío con el VBI (Prueba realizada según lo establecido por la SAGARPA).

Del presente estudio podemos concluir que la Vacuna Inactivada por Aspersión confiere una fuerte protección a las aves contra un posible desafío de campo con el virus de BI y además que es inocua para las aves.

“EVALUACIÓN DE PARÁMETROS PRODUCTIVOS Y GRADO DE PIGMENTACIÓN EN POLLOS DE ENGORDA VACUNADOS CONTRA COCCIDIOSIS (NOBILIS COX ATM®) Y MEDICADOS CON SALINOMICINA (SACOX®).”

EVALUATION OF PRODUCTIVE PARAMETERS AND SKIN PIGMENTATION OF COCCIDIA-VACCINATED (NOBILIS COX ATM®)/SALINOMYCIN-TREATED (SACOX®) BROILERS

¹Marco A. Juárez-Estrada, ¹José F. Martínez-Bruno, ¹Verónica Dávila-Ramírez, ²Guillermo González Herrera, ²Francisco Ríos, ¹Ernesto Ávila-González.

¹Departamento de Producción Animal: Aves, Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia, Universidad Nacional Autónoma de México. Avenida Universidad 3000. Ciudad Universitaria CP. 04510 México, D.F.

²Intervet México. Av. Paseo de los Frailes 22 Parque Industrial Santiago Tianguistenco CP. 52600 Edo. de México
E-mail: britoco@servidor.unam.mx

SUMMARY

The vaccine Nobilis Cox ATM® was evaluated in combination with salinomycin after coccidial challenge. Groups were: A: challenge + vaccine + salinomycin; B: vaccine + salinomycin; C: challenge + salinomycin, and D: salinomycin. On day 28 groups A and C were challenged. On day 14 group D showed the best body weight, followed by group B. Group A showed the worst body weight. Group B showed the best feed conversion rate, followed by Groups A, C, and D. Yellowness on day 42 reached its highest value in group B, while the lowest value was observed in Group D.

RESUMEN

Se estudió la vacuna Nobilis Cox ATM® con Salinomicina ante un desafío coccidiano. Los grupos fueron (A: desafío + vacuna + salinomicina; B: vacuna + salinomicina; C: desafío + salinomicina y D: salinomicina). Al día 28, A y C fueron desafiados. Al día 14 el mejor grupo en peso fue el D, seguido del B y el menor fue el A. La conversión alimenticia fue mejor para el grupo B, seguido del A, C y D. En amarillamiento al día 42 el grupo B fue el más alto y el D el más bajo.

INTRODUCCIÓN

Una infección natural por coccidias induce una rápida y sólida inmunidad, indicando hasta ahora que los parásitos vivos son esenciales en los mecanismos inmunológicos de protección inmune¹. Se han desarrollado varios tipos de vacunas con base a oocistos vivos, las cuales han mostrado éxito variable. Se recomienda que para evitar cualquier efecto negativo de la inmunización la vacuna se administre a las aves lo más tempranamente posible; debido a que muchas ocasiones algunas aves no reciben la dosis que

inicia la respuesta inmune primaria, o bien la reciben en demasía. Las aves que no reciben la cantidad suficientes de oocistos vivos van a recibirlos únicamente hasta después de una o dos semanas cuando la dosis vacunal ya se replicó y se encuentra en la cama¹. Por lo cual durante el periodo de vacunación con oocistos vivos no se debe dar ningún tipo de tratamiento anticoccidiano que pueda factiblemente afectar la proliferación de los oocistos vacunales. En mercados donde se utilizan adicionalmente algunos ionóforos anticoccidianos como la Salinomicina para prevenir enteritis necrótica (Se conoce que *Clostridium* sp forma parte de aproximadamente el 30% de microflora regular que coloniza el tracto digestivo de las aves domésticas) la utilización de vacunas vivas puede causar problemas al inducir el retiro de este fármaco¹. La utilización de una vacuna viva que desarrolle inmunidad aún en presencia de Salinomicina es un concepto novedoso en el control de la coccidiosis aviar². Se efectuó un estudio con pollos de engorda alojados en piso con el objeto de evaluar la aplicación de la vacuna Nobilis Cox ATM® junto con la administración de Salinomicina para observar la protección contra un desafío de campo.

MATERIAL Y MÉTODOS

Animales de experimentación.- Se utilizaron 320 pollos de engorda (Ross x Ross) mitad hembras y mitad machos, de un día de edad durante 49 días de experimentación. Las aves se alojaron de manera mixta en una caseta de ambiente natural del CEIEPA de la U.N.A.M. Cada corral se separó con lámina galvanizada para evitar contaminación cruzada, se utilizó cama mixta 50% viruta de madera y 50% paja de avena. Al día 8 de edad se vacunaron contra Newcastle vía ocular (cepa B1 0.03 ml) y subcutánea (cepa La sota 0.5 ml).

Vacuna.- La vacuna Nobilis Cox ATM (Intervet International B.V. Booxmeer-Holanda) contiene cuatro cepas de oocistos vivos esporulados, estas cepas vacunales se reproducen aún en presencia de algunos anticoccidianos del tipo ionóforo como la Salinomicina, su composición por cada 5 ml (agua de bebida) es de 500 ooquistes esporulados de *Eimeria acervulina*, 100 ooquistes esporulados de *Eimeria tenella*, 50 ooquistes esporulados de *Eimeria maxima* cepa ACM y 50 ooquistes esporulados de *Eimeria maxima* cepa ACVM². La vacunación se efectuó al día cinco de edad por agua de bebida a una dilución 1:100 de acuerdo a las recomendaciones del fabricante. Se verificó que los pollitos previamente privados de agua de bebida por treinta minutos consumieran los 5 ml recomendados por el fabricante.

Inoculo de desafío.- Se utilizó un inoculo parasitario aislado y tipificado en el Departamento de Producción Animal: Aves por el MVZ Marco A. Juárez Estrada, el inoculo consistió en proporcionar directamente en el divertículo esofágico de cada ave desafiada al día 28 de edad la cantidad de 2.0×10^4 de *E. acervulina*; 1.0×10^3 de *E. máxima* y 1.0×10^4 de *E. tenella* oocistos esporulados.

Diseño experimental.- Las aves fueron distribuidas aleatoriamente en cuatro grupos de tratamiento cada uno con dos repeticiones de 40 aves por corral. Grupo A: vacuna + desafío + salinomicina; B: vacuna + no desafío + salinomicina; C: No vacuna + desafío + salinomicina y D: No vacuna + no desafío + salinomicina. Al día 28, los grupos A y C fueron desafiados con un inoculo de campo. Se suministró agua y alimento *ad libitum*, la dieta estándar se formuló con base a sorgo y pasta de soya. Se adicionaron 60 ppm de Salinomicina (Sacox, Hoechst®) y en la etapa de finalización se agregó pigmento amarillo de origen vegetal a una concentración de 80 ppm.

Evaluación del experimento.- A los siete días postinoculación (pi) se sacrificaron 5 aves de cada repetición con la finalidad de calificar las lesiones por coccidia de acuerdo a la escala de Johnson y Reid (1970)³. Durante los 49 días de evaluación, se registraron de forma semanal el peso y la conversión alimenticia. El grado de pigmentación se efectuó a nivel de la vena de la grasa en la piel de la pechuga izquierda a los 42 y 49 días de edad, utilizando un colorímetro de reflectancia Minolta CR-300 (Minolta Ltd. Japan), con el sistema CIELab de brillantez (L), intensidad de enrojecimiento (a), e intensidad de amarillamiento (b). Al día 49 se realizaron dos mediciones, la primera en la granja antes de salir a rastro y la segunda saliendo de la línea del rastro. Semanalmente se hicieron muestreos de 5 g de heces conservadas en dicromato de potasio al 2.5% por repetición. La cuantificación de oocistos se efectuó con

la Técnica de McMaster.

Análisis estadístico.- Los parámetros productivos y el número total de la excreción de oocistos se evaluaron a través de la prueba de análisis de varianza (ANDEVA). Conforme a un arreglo factorial 2x2, un factor fue vacunación y el otro fue desafío. El índice de lesiones se evaluó con la prueba no paramétrica de Kruskal-Wallis. Las diferencias se determinaron a un nivel de significancia de $P < 0.05$.

RESULTADOS

Al día 14 el peso del grupo D ($374.5 \pm 5.7a$) mostró diferencia estadística ($P < 0.05$) respecto al grupo A ($340.12 \pm 10.8c$), grupo C ($358.5 \pm 1.6b$), pero no respecto al grupo B ($367.12 \pm 11.1ab$). Al día 21 y 28 de edad no hubo diferencia estadística entre los pesos de los grupos. Al día 35 hubo interacción ($P \leq 0.043$) de los factores vacuna y desafío donde los grupos A ($1.74 \pm 0.03a$), B ($1.75 \pm 0.007a$) y C ($1.72 \pm 0.03a$), fueron diferentes ($P < 0.05$) al grupo D ($1.68 \pm 0.007b$) que mostró el menor peso. Al día 42 y 49 no hubo interacción de los factores, al día 42 el grupo D mostró el menor peso, los pesos fueron similares al día 49 de edad. Al día 14 de edad los grupos A (1,173a), B (4,400a) y C (6,187a) eliminaron oocistos que no difirieron entre grupos (grupo D: 0.0a). Al día 21 de edad los grupos que eliminaron oocistos no fueron diferentes (A: 5,547; B: 5,120; C: 6,293; D: 2,267). Al día 28 de edad los grupos no mostraron diferencias en la eliminación de oocistos (A: 533; B: 1,067; C: 853; D: 640). A los 35 días de edad los grupos no mostraron interacción de los factores en la eliminación de oocistos (A: 853; B: 853; C: 2,347; D: 533). A los 42 días de edad los grupos no mostraron interacción de los factores en la eliminación de oocistos (A: 640; B: 427; C: 320; D: 320). A los 49 días de edad los grupos no mostraron interacción de los factores en la eliminación de oocistos (A: 213; B: 213; C: 320; D: 107). En la conversión alimenticia hubo interacción entre vacuna y desafío, el mejor grupo fue el B (2.05b), luego el C (2.06b), el A (2.1b) y el D (2.19a). El promedio de los grupos con vacuna fue de 2.10 y sin vacuna 2.13. Hubo efecto de la vacuna y del desafío sobre el índice de lesiones producidas por *E. acervulina*, el efecto de aplicación de la vacuna (1.2 b) y sin vacuna (2.1 a). *E. maxima* presentó interacción de las variables, el grupo A (0.6b), el grupo C (1.16a), no afectó al grupo D y B. *E. tenella* no produjo lesiones en los grupos A, B y D pero si en el C (0.6). El grado de amarillamiento y enrojecimiento en granja al día 42 presentó interacción. El grupo D obtuvo la pigmentación roja más alta y el grupo B la más baja. En amarillos el grupo B fue el más alto (19.22a) y el D el más bajo (16.12b). Al día 49, el grado de amarillamiento fue mejor en el grupo C (22.7) y B

(20.0). El grado de amarillamiento y enrojecimiento en rastro no mostraron interacción.

DISCUSIÓN

Los resultados de la prueba en piso desarrollada durante 49 días muestran que la vacuna administrada al día 5 de edad induce una respuesta ligera dos semanas después, lo cual se pudo verificar por el número de oocistos cuantificados en heces y el peso, que únicamente se vio ligeramente afectado al día 14 de edad. Esta baja de peso fue rápidamente compensada ya que una semana más tarde no hubo diferencia significativa de los grupos vacunados respecto a los no vacunados. Esta recuperación de peso en las aves es más tardía en trabajos experimentales donde se ha utilizado esta vacuna sin emplear ningún tipo de ionóforo. La reacción postvacunal estuvo asociada al establecimiento de la infección reflejada por ligeras lesiones observadas hasta tres semanas después de la vacunación en el grupo no desafiado. La vacuna es segura para las aves y no afecta negativamente el rendimiento. Lo cual demuestra que en presencia de Salinomicina se induce una inmunidad sólida. Cuando se desafió con cepas de campo las aves vacunadas tuvieron significativamente un mejor rendimiento en conversión alimenticia y se ha reportado que con desafíos altos previene significativamente la mortalidad. Schetters *et al*² han mencionado que el peso es mucho mejor cuando las aves son vacunadas y reciben un desafío de campo que cuando no reciben la vacuna y son desafiadas. La vacuna Nobilis COX ATM[®] induce una inmunidad efectiva en las aves que reciben Salinomicina. Además garantiza una adecuada

protección contra cepas de campo durante las tres primeras semanas postvacunación antes de que se desarrolle inmunidad efectiva. El administrar Salinomicina durante el periodo de desarrollo de inmunidad previene la infección contra especies diferentes a las presentes en la vacuna, proporciona también protección contra un probable brote debido a *Clostridium perfringens*. La práctica descrita en el presente estudio ayuda a preservar la utilización de las drogas del tipo ionóforo, ya que al inducir inmunidad las cepas vacunales desplazan a las cepas de campo que pudieran en determinado momento socavar la efectividad de las drogas anticoccidiales. Schetters *et al*² mencionan que la inmunidad con la vacuna Nobilis COX ATM[®] se desarrolla efectivamente cuando han proporcionado Monensina a 100 ppm y Narasina a 60 ppm. Reportando resultados similares a los del presente estudio donde se empleó Salinomicina a 60 ppm.

REFERENCIAS

1. Juárez, E.M.A. Téllez, I.G. La inmunidad celular en la inmunoprofilaxis de la coccidiosis aviar. Memorias del curso de Inmunoparasitología y biología molecular. México, Distrito Federal. pp. 18-28. 2000.
2. Schetters, P. M. Janssen, A. J. M., and Vermeulen, A. N. A new vaccination concept against coccidiosis in poultry. World Poultry-Misset Coccidiosis Special Supplement. 26-27. 1999.
3. Johnson, J. Reid, W.M. Anticoccidial drugs: lesion scoring techniques in battery and floor-pen experiments with chickens. Experimental Parasitol. 28: 30-36. 1970.

ANÁLISIS COMPARATIVO DE ANTIBIOGRAMAS REALIZADOS EN AISLAMIENTOS DE *ESCHERICHIA COLI* DURANTE EL PERIODO 1996 – 2001

COMPATARIVE ANALYSIS OF SENSITIVITY TESTS USING *Escherichia coli* ISOLATES: 1996 – 2001

Graciela Méndez^a, Donají García^b, Diana Vázquez^a, Juan García-García^a, David Sarfati^b, Bernardo Lozano^b y Ernesto Soto^b

^aDiagnósticos Clínicos Veterinarios SA de CV. México. ^bLaboratorio Avimex SA de CV. México.

SUMMARY

E. coli was isolated from the trachea, lung, and air sacs of birds from the Mexican states of Mexico, Morelos, and Hidalgo. The antimicrobial sensitivity test was performed using a disc diffusion method known as the Kirby-Bauer test(2). Strain colonies with an inhibition zone of 8+ mm were considered as sensitive to the antibacterial. Annual sensitivity rates

were considered as follows: 33% or less, low sensitivity; 33-66% intermediate sensitivity; 66% or more, high sensitivity. Important sensitivity variations were observed throughout the time period analyzed.

RESUMEN

Se obtuvieron aislamientos de *Escherichia coli* a partir de tráquea, pulmón y sacos aéreos de aves

provenientes de los estados de México, Morelos e Hidalgo. La prueba de susceptibilidad antimicrobiana se realizó por el método de difusión con disco conocida como prueba de Kirby-Bauer (2). Se consideró sensible al antimicrobiano a las cepas con un diámetro del halo

inhibitorio de 8 mm en adelante (1). La sensibilidad anual se consideró baja con menos de 33%, media entre 33 y 66% y alta con más del 66%. Se observan variaciones de sensibilidad importantes entre los años analizados.

% de sensibilidad antimicrobiana (>33%) con cepas de *E. coli* aisladas durante el periodo de 1996 a 2001.

Antimicrobiano	Concentración en µg/disco	1996 140 cepas	1997 169 cepas	1998 160 cepas	1999 83 cepas	2000 90 cepas	2001 94 cepas
Acido nalidixico	30µg	4.8%	12.2%	6.2%	4.8%	0%	0%
Enrofloxacina	10µg	65.5%	60.3%	39.6%	43.3%	51.2%	54.2%
Norfloxacina	10µg	50.0%	53.8%	44.0%	39.7%	35.0%	55.4%
Fosfomicina	50µg	75.0%	70.8%	62.5%	58.1%	62.5%	82.5%
Magnacina	30µg	ND	ND	ND	ND	ND	91.0%
Ampicilina	10µg	48.0%	48.3%	18.3%	28.7%	0%	0%
Furaltadona	300µg	41.0%	43.6%	22.0%	30.1%	55.0%	60.0%
Tetraciclina	30µg	39.2%	10.8%	14.0%		12.5%	8.5%
Gentamicina + ácido nalidíxico	10µg+ 30µg	25.0%	42.3%	15.8%	18.9%	75.0%	67.5%
Neomicina	30µg	40.1%	46.3%	23.3%	32.8%	80.0%	75.6%

ND. No determinado.

DISCUSIÓN

Para el ácido nalidíxico y la tetraciclina se observa una sensibilidad baja en forma continua durante los cinco años de estudio, mientras que para la neomicina, así como para la combinación gentamicina/ácido nalidixico se observa una alta sensibilidad durante los últimos dos años. Para la enrofloxacina y norfloxacina se observa una sensibilidad mediana. Para la magnacina* se observa una fluctuación de la sensibilidad entre media y alta, similar a la furaltadona que presentó una tendencia a elevarse en el ultimo año. La ampicilina presentó una sensibilidad media en los dos primeros años y baja en los últimos años. Florfenicol fue probado únicamente en el último año, mostrando sensibilidad alta para las cepas de *E. coli* aisladas durante ese año.

CONCLUSIÓN

En el presente estudio se observa que para los aislamientos de *E. coli*, la fosfomicina fue el único antimicrobiano que mostró sensibilidad media y alta de forma constante durante los cinco años de estudio. El florfenicol, la fosfomicina, la neomicina y la

combinación gentamicina con ácido nalidíxico fueron los únicos antimicrobianos que mostraron alta sensibilidad durante el último año.

* Marca Registrada de Laboratorio Avi-Mex SA de CV. México para una fosfomicina estabilizada y potenciada.

REFERENCIAS

1. Gail L. Woods & John A. Washington. Antimicrobial Susceptibility Tests: Dilution and Disk Diffusion Method. In Manual of Clinical Microbiology. Edited by Patrick R. Murray. 6th Ed. 1995.
2. Jorgensen, J. H., Ferraro, M.J., Craig, W.A., Doren, G.V., Finegold, S.M., Fung-Tomc,J., Hansen, S.L., Hindler, J., Reller, L.B., Swenson, J.M., Tenover, F.C., Testa, R.T., & M.A. Wikler. Performance Standards for Antimicrobial Disk Susceptibility Tests. Approved Standart. M2-A6, Vol 17, No. 1. The National Committee for Clinical Laboratory Standards. Approved by the American National Standards Institute. 6 th edition. 1997.

ESTUDIO SEROLÓGICO Y MORFOLÓGICO DE ADENOCARCINOMAS ABDOMINALES EN GALLINAS REPRODUCTORAS SEMIPESADAS

SEROLOGICAL/MORPHOLOGICAL STUDY OF ABDOMINAL ADENOCARCINOMAS IN SEMI-HEAVY BREEDERS

Víctor M. Petrone¹, Mireya Juárez¹, Tamas Fehervari¹, Armando García¹

¹Departamento de Producción Animal: Aves, Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia, UNAM

SUMMARY

The incidence of neoplastic diseases in birds is low. Nevertheless, in breeders and commercial layers the incidence of carcinomas and adenocarcinomas is rather high. The presentation of these tumors has been associated with avian leukosis virusinfections. The purpose of this study was to perform the serological and morphological evaluation of abdominal adenocarcinomas in semi-heavy breeder hens. Serological/morphological results of this study were consistent with an adenocarcinoma of pancreatic origin, associated with avian leukosis virus infection.

RESUMEN

La incidencia de enfermedades neoplásicas en aves es baja, sin embargo en aves reproductoras o de postura comercial, la incidencia de carcinomas y adenocarcinomas es muy frecuente. Su presentación se ha asociado a infecciones por el virus de Leucosis aviar (LA). El objetivo de este estudio fue realizar la evaluación serológica y morfológica de un Adenocarcinoma abdominal en gallinas reproductoras semipesadas. Los resultados serológicos y morfológicos de este estudio fueron compatibles con un Adenocarcinoma de origen páncreático asociado a infección con el virus de LA.

INTRODUCCIÓN

El estudio de las enfermedades neoplásicas en las aves, se ha atribuido a etiologías de origen viral. La incidencia de neoplasias en pollos de engorda es muy baja; sin embargo en aves reproductoras o de postura comercial, la incidencia de neoplasias como carcinomas y adenocarcinomas es mas frecuente. Dentro de los virus que producen neoplasias en aves, el virus de la leucosis aviar perteneciente a la subfamilia oncoviridae y a la familia retroviridae, ha sido clasificado en 5 subgrupos A,B,C,D,J y E de los cuales los cinco primeros son los causantes de las principales neoplasias en aves. Dentro de las neoplasias epiteliales que originan estos virus son reconocidas las siguientes: nefroblastomas, nefromas, hepatocarcinoma, adenocarcinoma de páncreas, tenomas, carcinoma de

células de la granulosa, carcinoma de células escamosas y seminomas. La leucosis linfoide es una enfermedad viral que se caracteriza por una multiplicación anormal de linfoblastos y aparición de lesiones tumorales en órganos como bazo, riñón, hígado, bolsa de Fabricio, páncreas y ovario. Esta enfermedad afecta a las aves desde el final de la recría hasta mitad de puesta. La incidencia es muy variable puede observarse desde un 5-50% de aves afectadas. Los signos clínicos son inespecíficos ya que, puede haber inapetencia, emaciación, cresta pálida o cianótica, el abdomen esta agrandado y las plumas cercanas a la cloaca sucias de uratos. Las lesiones de esta enfermedad se presentan como infiltraciones difusas o nodulares en los órganos, a diferencia de la enfermedad de Marek no provoca neoplasias neurales, ni lesiones oculares. Para el diagnóstico de la enfermedad en la parvada es importante la realización de monitoreos serológicos tanto para detección de anticuerpos contra el subgrupo J de leucosis aviar como para captura del antígeno p27 de leucosis aviar.

Historia clínica. Se remitieron al Departamento de Producción Animal: Aves de la FMVZ 3 gallinas reproductoras semipesadas cuya signología era baja en la producción de huevo, presencia de uratos alrededor de la cloaca y disminución en el consumo de alimento.

Hallazgos macroscópicos. Durante la inspección externa se observó que las plumas presentes alrededor de la cloaca estaban húmedas y presentaba abundante material blanco de consistencia yesosa (uratos), una de las tres aves presentaba abdomen abultado y flácido, además de presentar dificultad para respirar. Al realizar la inspección interna se observó en 1/3 aves la presencia de abundante liquido en la cavidad abdominal (ascitis), en 2/3 se encontraron diversos nódulos que coalecían, de consistencia firme y de color gris-blanco. Estos nódulos se encontraban en forma masiva afectando las superficies serosas del hígado, páncreas, oviducto, mesenterio e intestinos. Las paredes del intestino estaban adheridad y engrosadas. Se realizó la disección de los tejidos afectados y se tomaron muestras para análisis histológico las cuales fueron conservadas en formol al 10%.

Hallazgos microscópicos. Se observaron al microscopio óptico diversas secciones de tejido teñidas con hematoxilina-eosina. En los cortes de páncreas, duodeno e hígado, se observó la presencia de abundante infiltrado inflamatorio constituido por linfocitos y escasos heterófilos distribuidos multifocalmente, además de una abundante cantidad de células epiteliales cúbicas formando túbulos de aspecto glandular, rodeados por abundantes septos tejido fibroso. En la luz de estas estructuras tubulares se observaba material eosinofílico de apariencia homogénea.

Pruebas complementarias. Se realizó prueba de ELISA para detección de anticuerpos contra el subgrupo J de leucosis aviar de las 3 aves, además de ELISA para captura de antígeno para la detección de la p27 de leucosis aviar a partir de hígado, intestino y médula ósea. Los resultados de estas pruebas fueron positivas tanto para la detección de anticuerpos como para captura de antígeno de hígado y médula ósea.

DISCUSIÓN Y CONCLUSIÓN

Con base en los hallazgos macroscópicos y microscópicos, este tejido neoplásico caracterizado por la presencia de abundantes células epiteliales formando túbulos de aspecto glandular secretor y el abundante infiltrado inflamatorio, así como en los resultados serológicos positivos tanto para detección de anticuerpos y antígeno para el virus de leucosis aviar se diagnóstico: una neoplasia de tipo secretora de estirpe epitelial; compatible con un Adenocarcinoma pancreático asociado a la infección con el virus de leucosis aviar. Sin embargo es conveniente realizar inmunohistoquímica para diferenciarlo de un Adenocarcinoma de ovario. En el caso de las neoplasias de origen viral que afectan a las aves es de gran importancia establecer la etiología para

determinar los métodos de control más eficientes. El virus de leucosis aviar se transmite en forma vertical lo que provoca graves pérdidas a la industria por problemas de aves retrasadas que son inmunológicamente deficientes y potenciales focos de infección para el resto de la parvada. Recientemente el subgrupo J del virus de la leucosis aviar se ha asociado al incremento de este tipo de pollos en las granjas. No obstante, es también posible que este problema sea originado por otras causas, principalmente fallas de manejo. Por lo que es importante realizar monitoreos serológicos de las parvadas para determinar tanto el nivel del anticuerpos con los que llega el pollito, así como realizar pruebas de captura de antígeno para determinar si el virus se está transmitiendo verticalmente. Para establecer programas de control a nivel de reproductoras.

REFERENCIAS

1. Fadly, A.M. and Witter R.L. Oncornaviruses: Leukosis/Sarcoma and Reticuloendotheliosis. In: A laboratory manual for the isolation and identification of avian pathogens, D.E. Swayne, J.R. Glisson, M.W. Jackwood, J.E. Pearson, W.M. Reed, eds. Kendall/Hunt Publishing Company, Pennsylvania. pp 185-196. 1998.
2. Payne L.N. and Purchase H.G. Leukosis/Sarcoma Group. In: Diseases of Poultry, Calnek, B.W. Barnes, H.J. Beard, C.W. Reid, W.M. Yorder, Jr. H.W. eds. Iowa State University Press, Ames, Iowa, USA. pp 386-439. 2000
3. Thayer S.G. and Beard C.W. Serologic Procedures. In: A laboratory manual for the isolation and identification of avian pathogens, D.E. Swayne, J.R. Glisson, M.W. Jackwood, J.E. Pearson, W.M. Reed, eds. Kendall/Hunt Publishing Company, Pennsylvania. pp 255-266 1998.

EPIZOOTIOLOGÍA DE LA LEUCOSIS MIELOIDE SUBGRUPO “J” EN AVES SEMILIGERAS Y CRIOLLAS DEL NORTE DE PUEBLA

EPIDEMIOLOGY OF MYELOID LEUKOSIS SUBGROUP “J” IN SEMI-HEAVY AND NATIVE HENS IN NORTHERN PUEBLA

¹Marco A. Juárez-Estrada, ¹Luis B Moncada, ¹Rubén Merino-Guzmán, ²María Cano-Basave, ²Carlos López-Díaz

¹Departamento de Producción Animal: Aves. ²Departamento de Economía y Administración. Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia, Universidad Nacional Autónoma de México. Avenida Universidad 3000. Ciudad Universitaria 04510 México, D.F.

SUMMARY

The presence of myeloid leucosis, sub-group “J” in backyard birds can represent an epidemiological hazard for the poultry industry. In order to learn about

the incidence of this problem in Puebla’s Northern Sierra, a serological survey was performed. One hundred and fifty six serum samples were obtained from hens belonging to 21 rural families. ELISA test

was carried out using P26 group common antigen plates. Positive results were obtained in 68.96% serum samples. When sub-group "J" was specifically tested for using ELISA plates sensitive to sub-group "J" specific G85 antigen, more than 15% positive results were obtained.

RESUMEN

La presencia de Leucosis Mieloide subgrupo "J" en aves de traspatio llega a presentar una problemática epizootiológica para la avicultura industrial. Para conocer la incidencia en la sierra norte de Puebla, se efectuó un estudio serológico, se tomaron 156 sueros sanguíneos de gallinas provenientes de 21 familias campesinas. Se empleo ELISA con placas de antígeno común de grupo P26, se observó 68.96% de sueros positivos, se probó específicamente al subgrupo "J" con placas de ELISA sensibles al antígenos específico el subgrupo "J" G85 presentando positividad mayor al 15%.

INTRODUCCIÓN

La presencia permanente de una enfermedad inmunodepresora como la Leucosis Mieloide subgrupo "J" puede llegar a ser problemática en zonas rurales o de traspatio, ya que además de disminuir el abasto de proteína para la ingesta humana, las aves actúan como reservorios potencialmente peligrosos para la industria avícola. Con la finalidad de conocer la incidencia que tiene esta enfermedad viral en la sierra norte de Puebla, se efectuó un estudio serológico de las explotaciones avícolas de traspatio ubicadas en el ejido urbano de Almeya perteneciente al municipio de Ixtacamaxtitlán que se encuentra en el estado de Puebla.

MATERIAL Y MÉTODOS

Se tomaron 156 sueros sanguíneos de gallinas semiligeras y criollas provenientes de 21 familias campesinas. En el laboratorio se corrieron los sueros a través de la prueba de inmunoabsorción enzimática (ELISA) con la finalidad de detectar anticuerpos comunes de grupo con placas sensibilizadas al antígeno P26, al obtenerse un porcentaje de positividad del 68.96% y de acuerdo a la literatura que demarca un límite de incidencia para los virus del grupo Leucosis Linfoide y Sarcoma menor al 15%, se determinó probar la presencia específica del virus de Leucosis Mieloide subgrupo "J" en embriones de 18 días y en huevos recién ovopositados, a través de ELISA utilizando placas sensibilizadas para detectar la proteína G85 específica del virus de Leucosis Mieloide subgrupo "J".

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Se determinó una presencia positiva del virus en esta zona rural. Se conoce poco de la epizootiología de esta enfermedad en el país. Lo que se puede inferir es que ante los brotes recientes en los últimos años por el virus de Leucosis Mieloide en la avicultura comercial, estos fueron controlados al eliminar a las progenitoras infectadas, sin embargo, este control no alcanzo a la avicultura de traspatio, la cual al recibir aves contaminadas con el virus y debido a las limitantes económicas y de operación para su eliminación permiten que esta enfermedad se perpetúe dentro de estas parvadas, funcionando posteriormente como reservorios del virus convirtiéndose en una amenaza para la avicultura comercial. Se requiere la implementación de nuevas estrategias de control para evitar que continúe la diseminación del virus de Leucosis Mieloide subgrupo "J" en el país.

EFFECTO DEL 25 HIDROXICOLECALCIFEROL (25-(OH)D₃) EN LOS PARÁMETROS PRODUCTIVOS E INMUNIDAD DE POLLOS DE ENGORDA

EFFECT OF 25 HYDROXY-CHOLE-CALCIFEROL (25-(OH)D₃) ON PRODUCTIVE PARAMETERS AND IMMUNITY OF BROILERS

¹Morales LR, ²Gómez VG, ¹Servin GC, ¹Ávila GE.

¹ Centro de Enseñanza, Investigación y Extensión en Producción Avícola, FMVZ-UNAM.
E-mail: sep_rene@hotmail.com., ²Depto. Producción Animal: Aves, FMVZ-UNAM.

SUMMARY

With the purpose of evaluating if whether the dietary supplementation with 25-(OH)D₃, improves broiler productive performance and immunity, a 21-day experiment was carried out using 1-day-old broilers.

Results showed that feed supplementation with 69 mg 25-(OH) D₃ (equivalent to 2 million IU vitamin D₃) per ton of feed, improved both cellular immune response and tibial calcium deposition. Therefore, this is a viable alternative to improve production.

RESUMEN

Con el objetivo de evaluar si la adición de 25-hidroxicolecalciferol (25-(OH)D₃), como suplemento en dietas para pollos de engorda mejoraba el comportamiento productivo e inmunidad, se realizó un experimento con pollos de engorda de 1 día de edad, con una duración de 21 días. Los resultados obtenidos, mostraron que la adición de 25-hidroxicolecalciferol a razón de 69 mg por tonelada, lo equivalente a 2 millones de UI de vitamina D₃ mejoró, la respuesta inmune celular y la deposición de calcio en las tibias de las aves, resultando de esta manera una alternativa viable para mejorar la producción.

MATERIALES Y MÉTODOS

Se empleó un diseño completamente al azar con cuatro tratamientos en base a dietas sorgo + pasta de soya: 1) dieta con 200,000 UIP/Ton, de vitamina D₃ (NRC 1994), 2) dieta sin vitamina D₃ + 69 mg de 25-(OH)D₃/Ton, 3) dieta con vitamina D₃ (2,000,000 UIP/Ton) similar a una premezcla comercial y 4) como T3 + 69 mg de 25-(OH)D₃/Ton; cada tratamiento contó con 4 réplicas de 10 pollos cada una. El agua y el alimento se suministraron a libre acceso.

RESULTADOS Y CONCLUSIÓN

Los resultados obtenidos en 21 días de experimentación para los parámetros productivos, mostraron que T3 y T4 que contenían un nivel de vitamina D₃ comercial sin y con adición de (25-(OH)D₃), presentaron una mayor ganancia de peso (P < 0.024 - 494.98^B, 498.78^B, 560.90^A, 596.42^Ag) y mejor conversión alimenticia (P < 0.008 - 1.37^a, 1.30^{ab}, 1.20^b, 1.25^b). Para la respuesta inmune, se observó un incremento en la respuesta inmune celular (P < 0.05- 0.0341^b, 0.0637^a, 0.0367^b, 0.0647^amm) en aquellos tratamientos T2 y T4 a los cuales fue adicionado (25-(OH)D₃). El contenido de calcio en las tibias de las aves fue mayor (P < 0.038 - 10.70^B, 11.62^{AB}, 11.13^B, 12.61^A) en los tratamientos que contenían 25-(OH)D₃. De los resultados obtenidos bajo las condiciones empleadas, se puede concluir que la adición de 25-hidroxicolecalciferol a razón de 69 mg por tonelada, lo equivalente a 2 millones de UI de vitamina D₃ mejoró en pollos de engorda de 1 a 21 días de edad, la respuesta inmune celular y la deposición de calcio en los huesos de las aves, resultando de esta manera una alternativa viable para mejorar la producción.

(El artículo completo será posteriormente publicado en la Revista Veterinaria México).

LO QUE SE DEBE CONOCER DE LAS EVALUACIONES DE ADSORBENTES DE MICOTOXINAS

WHAT WE SHOULD KNOW ABOUT MYCOTOXIN BINDERS

Joel Muñoz*, Antonio Fierro y Juan Carlos Medina

Nutek S.A. de C.V. 7 Norte 416. Tehuacán, Pue. E-mail: nutek@grupoidisa.com

SUMMARY

A problem commonly found in many mycotoxin binder (or toxin inhibitor) evaluations, is the lack of scientific support. Two ways of measuring binder efficiency exist: *in vitro* and *in vivo*. When the binding ability evaluation of a product against one particular toxin is claimed, evaluation conditions, parameters evaluated, measuring procedures, numbers of animals tested, and innocuousness measuring methods are rarely described. Sometimes only the effects on weight gains and feed conversion rates are mentioned, but these two parameters are not conclusive. The selection of a mycotoxin binder must be based on the access to all supportive technical information.

RESUMEN

Un problema encontrado con muchas evaluaciones de adsorbentes de toxinas o inhibidores de toxinas es la falta de un respaldo científico para

confirmarlas, existen dos formas de comprobar la eficiencia de los adsorbentes: "In Vitro" e "In Vivo". Cuando se menciona que se evaluó la capacidad de adsorción de un adsorbente contra determinada toxina, rara vez se dice bajo que condiciones fue evaluado, los parámetros que se midieron, como se midieron, el número de animales que se ocuparon o como se midió la inocuidad. A veces solamente se menciona los efectos sobre la ganancia de peso y conversión alimenticia, pero estos dos parámetros no son contundentes. Para la selección de un adsorbente debe estar sustentada por el acceso a la información técnica que lo respalde.

INTRODUCCIÓN

El uso de adsorbentes de micotoxinas es una alternativa de control, práctica y eficiente. Un adsorbente de micotoxinas es un material inerte, capaz de fijar a su superficie la micotoxina. De nuestra

experiencia reconocemos que algunos adsorbentes tienen gran capacidad de adsorber aflatoxinas pero muy baja o nula afinidad por otras toxinas. Existe un gran respaldo científico sobre la evaluación de adsorbentes de aflatoxinas, obteniéndose buenos resultados, pero no se puede globalizar que todos los adsorbentes van a funcionar igual. La investigación sobre otras toxinas sin embargo no es tan amplia, debido a que los estudios con micotoxinas es más complejo que por ejemplo determinar los niveles tóxicos de algún promotor de crecimiento. Un número determinado de experimentos deben realizarse para confirmar los resultados y evaluar a diferentes niveles de micotoxinas y adsorbentes. Parámetros tradicionales como la ganancia de peso o la conversión alimenticia, probablemente no son adecuados para una evaluación satisfactoria.

PLANTEAMIENTO

Una problemática que tenemos en México para realizar los estudios "In Vivo" de los adsorbentes es la adquisición de las micotoxinas, estas se deben importar, generalmente de Estados Unidos, en donde la venta de algunas toxinas esta restringida, por lo que es necesario entregar una serie de documentos que avalen el uso final. La otra alternativa es buscar alguna institución o laboratorio que pueda realizar estas pruebas. Este puede ser un motivo por el cual algunos adsorbentes sean promovidos sin haber realizado estudios sobre su eficiencia. Las evaluaciones "In Vivo" se pueden realizar con una sola toxina o con

mezcla de varias para simular las condiciones de toxicidad a las que están expuestas las aves en el campo(1). Por esta última razón hoy en día se recomienda realizar la eficiencia de adsorción contra mezclas de toxinas y a diferentes dosis de micotoxinas. Para resultados rápidos y más económico, se han desarrollado ensayos "In Vitro". En algunos de estos se puede demostrar que el adsorbente no se va ligar a la toxina. Si el producto no se une a la micotoxina "In Vitro", probablemente no tenga actividad "In Vivo". La evaluación "In Vitro" es de enorme valor tanto al desarrollar un producto como para monitorear la calidad lote a lote (4). Sin embargo las pruebas "in Vitro" nunca puede reproducir las condiciones del tracto digestivo de los animales debido a la actividad enzimática, fluctuaciones en el pH, la distribución del producto en el alimento, etc. Motivos suficientes para decir que no existe estudio más definitivo que el que se realiza "In Vivo".

REFERENCIAS

1. Lara, J.; Muñoz, J.; Rivera, L.; Medina, J.C.
2. Steve Leeson, John D. Summers y Gonzalo J. Diaz. Nutrición aviar comercial. Primera edición. Página 86 y 94
3. Kubena, L.F.; W.E. Huff, R.B. Harvey, A.G. Yersin, M.H. Elissalde, D.A. Witzel, L.E. Giroir, T.D. Phillips, and H.D. Petersen. 1991. Effects of a hydrated sodium calcium aluminosilicate on growing turkey poults during aflatoxicosis. Poultry Sci. 70:1823-1830.

EXPERIENCIA DE TRES AÑOS CON EL USO DE UNA VACUNA TERMOSENSIBLE DE *MYCOPLASMA SYNOVIAE*

THREE-YEAR EXPERIENCE USING A TEMPERATURE-SENSITIVE *MYCOPLASMA SYNOVIAE* (MS) VACCINE

Ernesto Soto, Miguel Ángel Murillo*, Manuel Méndez, David Montoya,
David Sarfati y Bernardo Lozano.

Laboratorio AVIMEX SA de CV. México.

SUMMARY

VAXSAFE* MS, a temperature-sensitive MS vaccine, strain MS-H, has been successfully used in Mexico in the recovery of productive parameters of birds previously infected with MS. Medication with anti-mycoplasma drugs has been eliminated in breeders. Also, culled bird numbers have been decreased, and both fertility and total hatch have been increased. Improved progeny livability due to lower respiratory problems has been obtained. In commercial layers the severity of clinical signs has been reduced,

together with the lesions typically observed after bacterial infections like infectious coryza; in addition up to 6 extra eggs per hen housed have been obtained.

RESUMEN

El uso de la vacuna termosensible de *Mycoplasma synoviae* cepa MS-H denominada VAXSAFE* MS ha sido utilizada eficazmente en México para recuperar los parámetros productivos afectados ante los problemas infecciosos de las aves con este microorganismo. En aves reproductoras se ha

eliminado la medicación con antimicoplásmicos, disminuido las aves de desecho, mejorado la fertilidad y el nacimiento total. En la progenie se ha mejorado la viabilidad por menores problemas respiratorios. En las gallinas comerciales se ha disminuido la severidad de los signos clínicos y las lesiones normalmente observadas en infecciones bacterianas como coriza infecciosa y recuperando hasta 6 huevos por ave encasetada.

INTRODUCCIÓN

La micoplasmosis es una de las infecciones bacterianas más importantes para la avicultura mundial por su efecto negativo en los parámetros productivos de las parvadas afectadas. Los efectos sobre los pollos de engorda, las reproductoras y gallinas de postura varían de acuerdo a diferentes factores como son la virulencia de la cepa, estado inmune de la parvada y las infecciones asociadas, pudiendo ser desde imperceptibles hasta causar serios problemas clínicos (3).

Entre los *Mycoplasma aviaries*, MS presenta la tasa más alta de invasividad y contaminación horizontal, siendo también transmitido por vía vertical. MS presenta uno de los porcentajes de infección más altos en la población avícola del México, en donde se tiene conocimiento de la infección en aproximadamente el 40% de las reproductoras pesadas, 75% de las gallinas comerciales y 70% del pollo de engorda (1).

En los Estados Unidos de América el *Mycoplasma synoviae* (MS) es considerado un patógeno de poca importancia. Sin embargo, las cepas de MS han sido clasificadas como ligeramente patógenas, moderadamente patógenas y patógenas (2). En México y otros países de Latinoamérica existen graves problemas de infecciones articulares y bajas de postura en gallinas comerciales y aves reproductoras (asociándose a virus respiratorios y a cualquier problema bacteriano), así como problemas respiratorios severos en el pollo de engorda, en donde el único agente patógeno demostrado ha sido el MS (3).

El objetivo del presente trabajo es el de compartir las experiencias de campo que se han adquirido durante los últimos tres años en más de cinco millones de aves inmunizadas anualmente con la vacuna termosensible de *Mycoplasma synoviae* cepa MS-H (VAXSAFE* MS).

RESULTADOS

VAXSAFE* MS se aplica únicamente por vía ocular una sola vez en la vida de las aves. La edad de aplicación sugerida es a partir de la segunda semana de edad, siempre y cuando se demuestre que son aves negativas (por serología en aves jóvenes y PCR en aves mayores de ocho semanas).

Es común realizar pruebas serológicas luego de la vacunación. Los resultados que se han obtenido son similares a los reportados con las vacunas vivas termosensibles de *Mycoplasma gallisepticum* (MG). A partir de seis semanas postaplicación se puede obtener entre 10 y 100% de seropositividad. Sin embargo, es común no detectar reacción alguna durante muchas semanas. Los niveles de anticuerpos detectados son totalmente variables por cualquier método de prueba que se utilice (aglutinación en placa por dilución, ELISA, HI).

La prueba de PCR ha sido utilizada con cierta frecuencia. Los resultados de esta prueba han sido positivos en muestras traqueales o de hendidura palatina a partir de 4 semanas postvacunación y hasta la salida de las aves al rastro (65 semanas de edad). También se han realizado pruebas de PCR en embriones picados no nacidos, provenientes de reproductoras inmunizadas con VAXSAFE* MS, con el fin de verificar que la inmunización de las madres evita la transmisión vertical a la progenie. Estas pruebas se han realizado cuando las madres tienen 35, 45, 55 y 65 semanas de edad, sin que hasta el momento se hubiera detectado alguna muestra positiva, mientras que de parvadas no inmunizadas e infectadas con cepas de campo si se han obtenido resultados positivos.

La bacteriología ha sido utilizada como un apoyo en casos de duda, ya que a través de la temperatura de cultivo a 33C se puede determinar la presencia de la cepa termosensible de MS ($\geq 10^6 \log_2$), misma que crece defectivamente a temperaturas superiores a los 37.5C ($\leq 10^2 \log_2$).

A nivel de campo se han obtenido los siguientes resultados:

A corto plazo, una disminución considerable de los costos por medicación con antimicoplásmicos en las reproductoras vacunadas, de aproximadamente \$ 6.00 por ave; disminución de aves de desecho por problema de patas en reproductoras y pollitas comerciales principalmente (hasta en un 90% de reducción); prevención en la transmisión vertical en el 100%.

A mediano plazo, recuperación de la fertilidad, entre 0.3 y 1.8% anual; recuperación del nacimiento total, entre 0.3 y 1.9% anual. Disminución de la magnitud de los signos clínicos y de las lesiones normalmente observadas en infecciones bacterianas como coriza infecciosa y pasterelosis en gallinas comerciales.

A largo plazo, disminución de costos por medicación en la progenie, hasta en un 30% (por disminución de reacciones respiratorias posvacunales severas), mejora la ganancia diaria de peso hasta en 2.3g, y mejora hasta en 5 décimas la conversión alimenticia. En aves ponedoras comerciales recuperación de 6 huevos por gallina encasetada.

CONCLUSIÓN

VAXSAFE* MS es una herramienta eficaz en la prevención y control de la transmisión vertical del MS de campo. Su uso ha permitido la recuperación de los parámetros productivos afectados por la presencia de MS patógeno, en reproductoras y su progenie, así como en las gallinas de postura comercial.

REFERENCIAS

1. Aneca, A.C. Situación epidemiológica de las principales enfermedades de las aves en México. Memorias de la XVIII Convención Nacional de ANECA.362-385. 1993.

2. Lockaby, S.B., Hoerr, F.J., Lauerman, L.H., Smith, B.F., Samayloc, A.M., Toivio-Kinnucan, M.A. y S.H. Kleven. Factors associated with virulence of *Mycoplasma synoviae*. Av. Dis. Vol 43. No.2: 251 – 261. 1999.

3. Soto, E., Murillo, M.A., Murillo, J.J., Gómez, M. Camacho, E., Vázquez, D., Alvarado, C., Morales, A., Villarreal, A., González, J., Caña, F., Borrego, J.L., Alvarez, E. y R. Bezares. Avances en el control de *Mycoplasma synoviae* en México. Memorias del XII Curso de Actualización AVIMEX. México.18-29. 2000.

SEROLOGIC RESPONSES AND RECOVERY OF *MYCOPLASMA GALLISEPTICUM* IN SPF VACCINATED CHICKENS

Nascimento, E.R.¹, P.A. Polo¹, V.L.A. Pereira¹, M.L. Barreto¹, M.G.F. Nascimento², M.A.F. Zuanaze³, and H. Scanavini-Neto³.

¹Universidade Federal Fluminense-UFF, Niterói, Rio de Janeiro,

²Embrapa Agroindústria de Alimentos, Rio de Janeiro-RJ,

³Laboratório Bio Vet S/A, Vargem Grande Paulista, São Paulo, Brazil.

The diagnosis of *Mycoplasma gallisepticum* (MG) infection is becoming more difficult than in the past. False positive results can arise from antimicrobial treated flocks, and false positives from vaccinated chickens or from infection by MG low virulent strains, that in both cases, could spread to non infected flocks (1, 2).

The objective of the present study is to gain an understanding of host responses to live MG vaccines as to improve MG infection diagnosis and monitoring of poultry breeding hens. Six groups of chickens, representing the MG vaccines (MG-F, TS-11, and 6/85), a field strain (MG-70), plus a control (not immunized nor challenged), and challenge group (not immunized, but challenged), each in an isolator unit, were used. All strains were given to the chickens by mouth, dropping in 0.5 ml when they were 21 and 35 days old, being the vaccine strains according to their manufacturers. The MG-70 was measured to have 10^{6.79} color change unit (CCU)/ml and used as fresh culture. All groups except the control were challenged twice with MG-R strain (titers of 10^{1.5} and 10^{4.5}, respectively), i.e., 49 days, and 63 days post 1st immunization (P1stI). Monitoring was done weekly, since day zero P1stI up to 12 weeks, by serology (Agglutination - RSA and ELISA), necropsies, and reisolation.

Under RSA (Bio Vet antigen), all the chickens remained MG negative up to 35 days P1stI. The MG-F group yielded positive results (sera at 1:10 dilution) 42 days P1stI or 21 days P2ndI. The MG-70 group yielded

positive results only 63 days P1stI (45 days P2stI, and 14 days post challenge) although suspicious reactions (undiluted sera) could be seen at 42 days P1stI. The groups immunized with TS-11 and 6/85 had identical RSA behavior, by yielding suspicious results 49 days P1stI (day of the 1st challenge) and positive reactions at 77 days P1stI (14 days post 2nd challenge. The control group remained negative while the challenge group was positive 14 days post first challenge.

The geometric mean ELISA (IDEXX Laboratories, Inc., São Paulo, SP, Brazil) titers for the challenged groups rose up beyond 21 days P1stI and continued increasing in such way that 56 days P1stI (1st challenge day) the highest value was for MG-F (8.705), followed by MG-70 (5.473), then TS-11 (1.701), and finally, 6/85 (1.574), maintaining this pattern up to 77 days P-1stI (21 days post 1st challenge). As to the serologic patterns for the immunized groups, it was observed that all them converted after the second immunization (14 days P1stI), but the increase of MG-F and TS-11 groups was fast while for MG-70 and 6/85 it was slower. A steady drop on the TS-11 group was seen 42 days P-1stI (28 days P-2ndI), not followed by the others, but all immunized groups dropped in titer after the first and/or second challenge, except MG-70. Regarding the coefficient of variation (CV), fluctuations were seen on all groups after immunization, stabilizing at 6-7 weeks P-1stI, when the smallest titers were yielded by MG-70 (20.7; 25.7), followed by TS-11 (26.5; 30.8), MG-F (32.6; 27.5), and 6/85 (48.8; 36.6); even at the end of the trial the

CV for MG-70 was small (11,30), but above that found for 6/85 (2.2), which in turn, was more inconstant than the others the week basis.

No disease was seen in any of the groups, and the histopathologic changes seen in tissues from necropsied chickens were compatible with antigenic stimulus, but on the challenge group tracheitis and airsacculitis were found. Moreover, by PCR-RAPD, all the strains used were found to be genetically different among themselves; the standard MGA5969 and MG-R being reisolation of MG accomplished during and at the end of the trial.

In conclusion, all strains used were genetically different, and yielded serologic responses under SAR and ELISA that could be regarded as positive results, but only the MG-F yielded positive results by RSA and

ELISA before the challenge. After challenge, all reactions were intensified, but the seroconversion pattern for MG-70 was more uniform than the others, and always ascendant, up to the end of the trial.

REFERENCES

1. Nascimento, E.R. Micoplasmoses. In: Doenças das Aves, 800p. A. Berchieri Jr., and C. Macari eds. FACTA, Campinas, São Paulo, Brazil, pp. 217-224. 2000.
2. Nascimento, E.R., S.M. Ferrera-Neto, M.C.M, Galleti, M.G.F. Nascimento, G. B. Lignon, and G.A. Mendonça. Chicken *Mycoplasma gallisepticum* infection, diagnosed by agent detection, hemagglutination inhibition, but not agglutination. In: AVMA Conference/AAAP, New Orleans, USA. 1999.

PATOGÉNESIS MOLECULAR DE INFECCIONES PROVENIENTES DE *SALMONELLA SPP*

MOLECULAR PATHOGENESIS OF *SALMONELLA SPP* INFECTIONS

Ortega Alvarez Daniel, García Espinosa Gary, Téllez Isaías Guillermo

D.P.A.:AVES F.M.V.Z. U.N.A.M.

SUMMARY

Salmonella spp. are intracellular, facultative bacteria than can cause disease in a great variety of animal species, including humans. Some *Salmonella* serotypes are adapted to one specific host (i.e.: *S. typhi* can infect humans, *S. gallinarum* and *S. pullorum* infect most avian species.) In contrast, other serotypes can infect a wide variety of hosts (i.e.: *S. enteritidis*.) The molecular basis for which some specific serotypes are adapted to one single host are scarcely understood.

RESUMEN

Salmonella spp. es una bacteria intracelular facultativa capaz de causar enfermedad en una gran variedad de especies animales, incluyendo los seres humanos. Algunos serotipos de *Salmonella* están adaptados a un huésped específico (p.e., *S. typhi* puede infectar a los seres humanos, *S. gallinarum* y *S. pullorum* a la mayoría de las aves). En contraste, otros serotipos pueden infectar a una amplia variedad de huéspedes (p.e., *S. enteritidis*). Las bases moleculares por la que algunos serotipos específicos están adaptados a un sólo huésped, son comprendidas escasamente.

INTRODUCCIÓN

El estudio molecular en procariontes, ha facilitado la identificación de los principales factores de virulencia de *S. typhimurium* y la caracterización de los

mecanismos moleculares involucrados en la interacción huésped-bacteria (1).

DETERMINANTES GENÉTICOS DE VIRULENCIA

La mayoría de los genes de virulencia de *S. typhimurium* están agrupados y cada grupo distinto recibe el nombre de isla de patogenicidad (IP). Las IP se encuentran también en varias enterobacterias incluyendo *Yersinia enterocolitica*, *Shigella flexneri*, y *Escherichia coli* enteropatógena (EPEC, por sus siglas en Inglés) (2), entre otras. La figura 1 ilustra la distribución de las IP de *S. typhimurium* (IPS), así como otros componentes esenciales de virulencia.

Las IPS-1 y IPS -2 codifican un aparato de secreción de tipo III, que permite la inyección de proteínas efectoras dentro del citoplasma de la célula del huésped, a través de un canal molecular especializado (3). El sistema de secreción tipo III, encontrado en otras enterobacterias, es independiente de la ruta de secreción por sec (1). La maquinaria de IPS-1 inyecta dentro de células de mamífero proteínas efectoras, que inducen al acomodo de actina del citoesqueleto, dando como resultado, membranas onduladas e internación de *Salmonella* (2).

La IPS-1 efectora también participa en la reacción inflamatoria generada por la bacteria en la mucosa intestinal. La IPS-2 consiste en genes que controlan la multiplicación bacteriana en los compartimentos

intracelulares de células epiteliales y fagocíticas (4). La IPS-3 es requerida para la sobrevivencia intracelular en macrófagos, debido a que provee productos esenciales para el crecimiento en condiciones limitadas de Mg (2,5). La IPS-4 codifica un sistema de secreción de tipo I mediante secreción de toxinas y puede llegar a participar en la adaptación de *Salmonella* en el ambiente intracelular de los macrófagos (6). Finalmente, la IPS-5 codifica factores involucrados en la secreción de fluidos y la reacción inflamatoria en la mucosa intestinal ocasionados por *Salmonella dublin* e invasión ocasionada por *S. typhimurium*, como SopB (SigD), una proteína efectora secretada por la SPI-1(7). En cuanto al papel de las proteínas codificadas por los plásmidos de *Salmonella*, éstos participan en la lisis de los macrófagos (8).

REFERENCIAS

1. Galan JE. Molecular and cellular bases of *Salmonella* entry into host cells. *Curr Top Microbiol Immunol* 1996;209:43-60.
2. Groisman EA, Ochman H. Pathogenicity island - bacterial evolution in quantum leaps. *Cell* 1997;87:791-794.

3. Hueck CJ. Type III protein secretion systems in bacterial pathogens of animals and plants. *Microbiol Mol Biol Rev* 1998;62:379-433.

4. Shea JE, Hensel M, Gleeson C, Holden DW. Identification of a virulence locus encoding a second type III secretion system in *Salmonella typhimurium*. *Proc Natl Acad Sci USA* 1996;93:2593-2597.

5. Blanc-Potard AB, Solomon F, Kayser J, Groisman EA. The SPI-3 pathogenicity island of *Salmonella enterica*. *J Bacteriol* 1999;181:998-1004.

6. Wong KK, McClelland M, Stillwell LC, Sisk EC, Thurston SJ, Saffer JD. Identification and sequence analysis of a 27-kilobase chromosomal fragment containing a *Salmonella* pathogenicity island located at 92 minutes on the chromosome map of *Salmonella enterica* serovar *typhimurium* LT2. *Infect Immun* 1998;66:3365-3371.

7. Wood MW, Jones MA, Watson PR, Hedges S, Wallis TS, Galyov EE. Identification of a pathogenicity island required for *Salmonella* enteropathogenicity. *Mol Microbiol* 1998;29:883-891.

8. Guilloteau LA, Wallis TS, Gautier AV, MacIntyre S, Platt DJ, Lax AJ. The *Salmonella* virulence plasmid enhances *Salmonella*-induced lyses of macrophages and influences inflammatory responses. *Infect Immun* 1996;64:3385-3393.

BIENESTAR Y PRODUCTIVIDAD EN LA INDUSTRIA AVÍCOLA

WELFARE AND PRODUCTIVITY IN THE POULTRY INDUSTRY

Ariel Ortiz Muñiz, Esther Buendía Sánchez y Fernando Ingalls Herrera

Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán, UNAM.

SUMMARY

The assembly of facilities and husbandry management procedures used in poultry production to provide the birds with conditions to enhance productivity may not comply with the requirements demanded by animal welfare associations. Thus, as poultry producers and specialists we must take in consideration such demands, but doing it under conditions that allow us to remain profitable, without affecting consumers prices. Otherwise, decreased consumption might result, since today poultry prices are affordable by the majority of the population.

RESUMEN

El conjunto de instalaciones y manejos zootécnicos y sanitarios que se implementan en la producción aviar para proporcionar las condiciones que favorezcan la productividad, pueden no cumplir con los requisitos que demandan las sociedades protectoras de animales, por lo que como productores

y especialistas hay que considerar dichas demandas pero en condiciones que nos permitan seguir produciendo en forma rentable y que no afecte los precios al consumidor, ya que podría representar una baja en el consumo de estos productos que actualmente son accesibles para la mayor parte de la población.

Campañas recientes dirigidas por grupos de las sociedades protectoras de los animales piden a la industria avícola que descontinúe prácticas tales como el uso de jaulas, el despique y la pelcha forzada argumentando que: "Dichas prácticas condenan a las aves a la inmovilidad y a la frustración en un sistema en que al nacer, a los polluelos se les aparta brutalmente de sus madres para ser sometidos a un manejo donde se les corta dolorosamente su sensible pico con un cuchillo al rojo vivo y que les provocara un dolor crónico de por vida"(3). Muchas veces, las propuestas y normatividades, que en teoría van en mejora del bienestar animal, no tienen base científica y encubren una simple operación de imagen, como es el

caso de la cadena de alimentos McDonalds que ahora requiere garantías de que las gallinas sean tratadas de una manera humanitaria a raíz de que ha sido acusada de fomentar las practicas de "fabricas de huevo"(2).

Por lo que hay una imperiosa necesidad de establecer normatividades que mejoren las condiciones en que crecen y producen nuestras parvadas para evitar que se nos impongan medidas como la prohibición de las jaulas para la producción de huevo comercial que se dio en Europa. En relación con la densidad de población, probablemente se ha trabajado con densidades mayores a las óptimas para el bienestar tratando de obtener mayores utilidades por lo que es conveniente pensar en utilizar densidades menores, en donde podamos obtener menores índices de mortalidad y mejores conversiones que nos indiquen el punto en donde convergen el bienestar de las aves y una productividad aceptable(4)

En Europa los sistemas que se han considerado para la producción de huevo comercial en piso tienen como mayor desventaja el incremento hasta en más del 100% de los costos de producción y en dichas sociedades quizá muchos estarían dispuestos a pagar un precio más alto por tener una conciencia tranquila, aunque no se ha considerado la competencia externa y que tanto este dispuesto el público de la Comunidad Europea en general a pagar un mayor precio o consumir productos avícolas importados producidos en condiciones comerciales actuales, pero que se oferten a un precio más bajo(1). En los países en desarrollo este

incremento en los precios tendría una repercusión negativa en los consumos de estos productos y por lo tanto en la nutrición y bienestar de la población humana. Además dichos sistemas aumentan la incidencia de infecciones parasitarias y un mayor riesgo de agresión entre las aves.

Debemos pensar en sustituir las prácticas actuales de restricción de alimento y agua para inducir la muda o pelecha forzada que han sido consideradas como tratamientos crueles e inhumanos con practicas menos agresivas que ya se están implementando(2).

Con relación al corte de pico es necesario publicar y hacer hincapié de que el canibalismo y mortalidad pudieran ser mayores en parvadas sin despigar, pero también pensar en cortes menos severos, estirpes menos agresivas y uso de analgésicos en los días posteriores a dicho manejo(1).

REFERENCIAS

1. Dunn Norman.; Jaulas para ponedoras: el mejor sistema a pesar de la critica. ;Avicultura Profesional. Vol.16.,No.2., Año 1998.
2. Martínez Abelardo. ; La campaña de la UPC contra la muda inducida. ;Correo Avícola., Año XIII, No.12, Diciembre 2000
3. Mosterín Jesús.; ¡Vivan los animales!.; Editorial Debate, D.L.; Primera edición.; Madrid 1998.
4. Zuidhoff Martín. ; Producción de pollo de engorda: una perspectiva europea. ;Correo Avícola., Año XIV, No.4, Abril 2001.

SCREENING BROILERS WITH HALOTHANE AND SUCCINYLCHOLINE TO IDENTIFY BIRDS PRONE TO DEVELOPING PALE, SOFT, EXUDATIVE (PSE) MEAT

ANÁLISIS DEL POLLO DE ENGORDA CON HALOTANO Y SUCCINILCOLINA PARA IDENTIFICAR A LOS INDIVIDUOS SUSCEPTIBLES AL DESARROLLO DE CARNE PÁLIDA, SUAVE Y EXUDATIVA (PSE)

C. M. Owens, L. C. Cavitt and B. M. Hargis

Department of Poultry Science, University of Arkansas, Fayetteville, AR 72701

RESUMEN

La industria avícola ha observado un dramático incremento en la incidencia de carne *PSE*, similar a lo ocurrido en la carne de cerdo. Este problema se ha asociado con factores genéticos y ambientales. La prueba general con halotano se ha usado en la industria porcina con gran éxito, pero los resultados en pavos son sólo marginales. También se ha utilizado la

succinilcolina en combinación con el halotano para la identificación más precisa de los animales susceptibles al estrés. Aun cuando es necesario comprender mejor la situación, la sensibilidad al halotano junto con el uso de succinilcolina no ha logrado identificar a los pollos de engorda susceptibles al desarrollo de carne *PSE*.

Meat that is PSE is paler in color, forms soft gels, and has lower water holding capacity. The condition is a problem in the poultry industry and has been associated with genetic and environmental factors. The use halothane has been used in the swine industry and experimentally in turkeys to identify animals prone to developing PSE meat. In addition, succinylcholine has been used with halothane in swine to more accurately identify animals with the genetic mutation in the ryanodine receptor, especially those that are heterozygotes for the defective gene. The purpose of this study was to determine if using halothane with succinylcholine to screen broilers could improve the identification of birds prone to developing PSE meat. Succinylcholine was used to serve a triggering agent (prior to slaughter) for the PSE condition. At four wk of age, broilers (n=1000) were subjected to 3% halothane gas and were evaluated for muscle rigidity in the legs. If birds exhibited signs of muscle rigidity in

the legs, they were classified as halothane positive and if not, birds were classified as halothane negative. Overall, approximately 14% of the birds were classified as HAL+. All HAL+ birds and an equal number of HAL- birds were grown to 7 wk and were commercially processed. At time of processing, half of the birds were injected intravenously with succinylcholine and were slaughtered at 0.25 h post-injection. Pectoralis samples were collected at 0.25, 2, 5, and 24 h PM for the evaluation of rigor development (muscle pH) and meat quality (L*value, moisture, and cook loss). Halothane sensitivity had no consistent effect on rigor development, muscle color, or water holding capacity. The halothane-succinylcholine screening test was not successful in identifying birds prone to developing PSE meat.

(Present research will be published as a full-length article in *Poultry Science*).

CHARACTERIZATION OF vv+MDVs HAVING MUTATIONS IN GLYCOPROTEIN L (gL)

CARACTERIZACIÓN DE LOS VIRUS MUY VIRULENTOS DE LA ENFERMEDAD DE MAREK QUE PRESENTAN MUTACIONES EN LA GLUCOPROTEÍNA L (gL)

Parcells, Mark S.¹, Elizabeth Santin², Christine E. Shamblin³, and Robert L. Dienglewicz¹

¹ Center of Excellence for Poultry Science, University of Arkansas, Fayetteville, AR 72701;

² Departamento de Patología Veterinaria, FCAV – UNESP, Jaboticabal, SP, Brasil

³ St. Jude Children's Research Hospital, Memphis, TN 38105

RESUMEN

La enfermedad de Marek es un cáncer de células T de los pollos causado por el virus de la enfermedad de Marek. Han evolucionado tres patotipos de este virus: el virulento, el muy virulento y el muy virulento plus (*vMDV*, *vvMDV*, *vv+MDV*, respectivamente), aun cuando se desconoce la base molecular de estas diferencias en la virulencia. Nosotros detectamos cepas del *vv+MDV* que presentan una mutación en el gene de la gL y hemos generado la hipótesis de que esta mutación puede afectar la capacidad de estos virus de interactuar con la cepa vacunal del virus herpes del pavo (*HVT*). Los resultados de un estudio *in vivo* indicaron que esta mutación no afecta la interacción entre el *vv+MDV* y el *HVT*, sino que sugiere que puede afectar la transmisión del *vv+MDV* a aves de mayor edad.

Field strains of Marek's disease virus (MDV) have increased in virulence since the advent of high density poultry production during the late 1950s. The most

recent isolates of MDV fall into a hyper-virulent or *vv+MDV* pathotype and induce profound immune suppression, stunting and neurologic lesions (2). Another characteristic associated with some *vv+MDVs* has been a conference of rapid horizontal transmission to vaccine virus HVT (1). We recently identified several *vv+MDV* strains that had mutations in glycoprotein L (gL), a glycoprotein important to the proper processing and surface expression of glycoprotein H (gH). The mutations in the gL coding region mapped to the signal cleavage site and would affect its putative processing (3). We theorized that these mutations may have provided a molecular basis for a complementation between MDV-1 and HVT strains, via gL/gH interactions. We have tested this hypothesis *in vivo* via co-infection of SPF chickens with *vvMDV*, *vv+MDV* (gLmut), *vv+MDV* (gL wild type) with and without HVT co-inoculation. We have found that co-infection of chickens with HVT did not affect: 1. viremias of MDV-1 or HVT, 2. mortality, 3. tumor incidence or 4. horizontal spread to day-old

contact chickens. We did observe a slight increase in horizontal transmission and associated mortality in contacts exposed at 2 and 6 weeks of age to vv+MDV(gLmut). Our results suggest that although the mutations in gL are not causative of the vv+ phenotype, these mutations may be one of several mechanisms affecting increased spread of these viruses, particularly to older birds.

REFERENCES

1. Rosenberger, J. K., S. S. Cloud and N. Olmeda-Miro. Epizootiology and adult transmission of

Marek's disease. Avian Tumor Virus Symposium, Reno, NV, 30-32. 1997.

2. Witter, R. L. Increased virulence of Marek's disease virus field isolates. Avian Dis 41:149-63. 1997.

3. Wu, P., W. M. Reed and L. F. Lee. Glycoproteins H and L of Marek's disease virus form a hetero-oligomer essential for translocation and cell surface expression. Arch Virol 146:983-92. 2001.

EFFECTO DE EDAD DE LA REPRODUCTORA EN PESO DE HUEVO, PÉRDIDA DE HUMEDAD, MORTALIDAD EMBRIÓNICA, TIEMPO DE REPOSO, Y VIABILIDAD DE PROGENITURA DURANTE LA PRIMERA SEMANA DE VIDA

EFFECT OF BREEDER AGE ON EGG WEIGHT, MOISTURE LOSS, EMBRYO MORTALITY, RESTING TIME, AND FIRST WEEK BROILER LIVABILITY

Prado-Rebolledo OF¹., García-Márquez LJ¹., Vázquez –García JL¹., Gómez-Bucio JR¹., Quintana-López JA²

¹ Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia. Universidad de Colima. Autopista Colima-Manzanillo Km. 40. Crucero de Tecomán, Col. CP. 28100. e-mail: omarpr@ucol.mx

² Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia. Departamento de Producción Animal: Aves. UNAM

SUMMARY

This research determined chick optimum resting time, since this parameter has not been established by routine hatchery practices. Two thousand two hundred and sixty nine eggs laid by Ross x Ross breeders of three different ages: 1 (35); 2 (45) y 3 (55) weeks of age, with six treatments and 3 repetitions: 1 (4), 2 (8), 3 (12), 4 (16), 5 (20) and 6 (24) resting hours, respectively. Results showed that extended resting periods in the hatchery affect broiler livability and weight gain at all three breeder ages.

Dentro de las prácticas de rutina de las plantas incubadoras no se ha establecido el tiempo óptimo de reposo de los pollos por lo que se determinó. Se utilizaron 2 269 huevos fértiles de la estirpe Ross x Ross de tres edades 1 (35); 2 (45) y 3 (55) con 6 tratamientos y 3 repeticiones de 1 (4), 2 (8), 3 (12), 4 (16), 5 (20) y 6 (24) horas de reposo respectivamente. Los datos mostraron que al prolongar el tiempo de reposo en la incubadora se afecta la viabilidad y ganancia de peso, en las tres edades de reproductoras.

(El trabajo completo se pretende publicar en la revista de *Veterinaria México*).

EFECTO DE DOS RÉGIMENES ALIMENTARIOS EN REPRODUCTORAS HUBBARD

EFFECT OF TWO BROILER BREEDER FEEDING PROGRAMS (HUBBARD)

Quintana J.A.¹, Avila E.², Herrera J.³, López C.¹, Téllez G.¹, Ponce G.⁴, Saldivar S.⁴

¹Departamento de Producción Animal:aves FMVZ Universidad Nacional Autónoma de México

²CEIEPA FMVZ Universidad Nacional Autónoma de México

³Colegio de Postgraduados, Montecillo México, ⁴Grupo Avícola El Peñón México

SUMMARY

Two feed intake regimes were tested. Higher feed intake resulted in higher production peak. Birds fed less feed had a lower peak, but their body weight increase was similar to that of birds with a higher feed intake, probably because lower production diets feed to a higher body fat accretion.

El objetivo del experimento fue evaluar el porcentaje de postura, peso corporal, pico de producción y porcentaje de mortalidad en gallinas reproductoras pesadas que recibieron dos programas de alimentación.

MATERIAL Y METODOS

El experimento se realizó en una granja comercial ubicada en el municipio de Yecapixtla al noreste del estado de Morelos a 1500 msnm. Con una temperatura promedio anual de 22°C, mínima de 5°C y máxima de 35°C con una precipitación pluvial de 150mm en la época de verano. Se utilizó una parvada de 6000 gallinas reproductoras pesadas de 25 semanas de edad con peso corporal similar, de la estirpe Hubbard, en dos casetas comerciales con tres divisiones cada una, para alojar a 1000 aves por división.

A continuación se describen los dos tratamientos empleados, aleatorizados en un diseño en bloques completos al azar, cada uno con tres repeticiones:

Tratamiento A: Alimentación de gallinas con 159.6 gramos de alimento/ave/día promedio durante todo el ciclo.

- Tratamiento B: Alimentación de las gallinas con 166.3 gramos de alimento/ave/día promedio, durante todo el ciclo.

Las variables medidas fueron: Porcentaje de producción gallina-día, porcentaje de mortalidad durante el ciclo de postura, porcentaje del pico de postura, consumo diario de alimento y los pesos corporales promedios de las aves a las 30, 40 y 50 semanas de edad. La parvada se sacrificó a las 50 semanas de edad. Los resultados promedio obtenidos se analizaron según el diseño mencionado, los porcentajes de mortalidad se transformaron por el arco seno de la raíz cuadrada, de acuerdo a lo señalado por Herrera y col. (2000).

RESULTADOS

El porcentaje de mortalidad presentó variaciones fuertes entre las repeticiones de cada tratamiento. Cabe señalar que la parvada sufrió leucosis aviar, ocasionando el 50 % de la mortalidad; sin embargo, en la repetición 1 del tratamiento A prácticamente el 60% de la mortalidad fue debido a leucosis aviar. Independiente de la anterior, hubo una tendencia numérica a presentar menor mortalidad, a mayor consumo de alimento ($P > 0.05$) entre tratamientos.

El número de huevos producidos por gallina en el ciclo, fue mayor para la aves que consumieron mas alimento (Tratamiento B) ($P < 0.09$). El pico de producción fue 10% mayor ($P < 0.05$) para el tratamiento B (Cuadro 1).

Cuadro 1. Número de huevos por gallina durante el ciclo de postura y porcentaje al pico de postura en gallinas reproductoras Hubbard.

Tratamiento	Número de huevos por gallina	Pico de postura (%)
A	111.5 a*	68.7 a
B	124.7 b*	78.3 b

a*,b* y a, b, Medias con la misma literal en columna son diferentes: $P < 0.09$ y $P < 0.05$ respectivamente

El peso corporal alcanzado a las 30 semanas fue de 3.4Kg por gallina y a las 50 semanas de edad de 4.1 Kg; fue similar ($P > 0.05$) para ambos tratamientos,

correspondiendo a un 37% de aumento con respecto al peso obtenido a las 25 semanas de edad.

DISCUSIÓN

La mortalidad ocurrida en una repetición fue muy alta, correspondiendo a las aves que consumían 6 gramos menos de alimento por gallina durante todo el ciclo. Aunque no hubo diferencias estadísticas entre tratamientos, se hace notar que la parvada sufrió la enfermedad de leucosis aviar y la mitad de las aves murieron por dicha enfermedad.

Independientemente de la enfermedad, las gallinas del tratamiento A (6 gramos menos de consumo de alimento), tuvieron menor porcentaje al pico de postura. Estos resultados son similares a los del Experimento 1, donde se encontró que con aves que consumen mas alimento tienen mayor pico de postura.

El incremento de peso de las 25 a las 50 semanas fue alrededor de 37%, el cual es similar al registrado en el Experimento 1. Es interesante observar como aún consumiendo 6 gramos menos las aves del tratamiento A, alcanzaron el mismo peso que las del tratamiento B. La causa posiblemente sea que las gallinas al no poner, almacenan los nutrientes, transformándolos en grasa (Wilson, 1998).

En este experimento, no fue posible medir la fertilidad, ya que al ser gallinas reproductoras es importante que además de que la gallina produzca el mayor número de huevos, estos tengan una mayor incubabilidad. Para poder medir la fertilidad, algunos autores (Goerzen y cols. 1996), han realizado estudios al respecto en gallinas reproductoras pesadas en jaula, en las cuales es mas fácil controlar las variables incluyendo la fertilidad, (Tinch, 1996).

Recientemente se le está dando importancia al bienestar de las gallinas reproductoras pesadas en relación a la restricción alimenticia, ya que Mench y

Falcone (2000) mencionan que las gallinas reproductoras muestran evidencias de estrés fisiológico, porque se incrementan los comportamientos anormales por el “hambre crónica” de las gallinas. Estos autores sugieren métodos alternativos para disminuir el consumo de alimento como es la restricción cualitativa de la dieta, y evitar que los controles del peso corporal afecten el bienestar en las gallinas. Van Middelkoop y Van der Haar (2000) probaron un comedero que proporciona el alimento “al boleó” sobre la cama y observaron que había menos uniformidad en el peso de la parvada, pero que las gallinas tardaban mas tiempo comiendo, y se mantenían más tranquilas.

REFERENCIAS

1. Goerzen, P.R., Julsrud, W. L. and Robinson, F. E. (1996). Duration of fertility in Ad Libitum and feed-restricted caged broiler breeders. *Poultry Science*
2. Mench, J.A. and Falcone, C. (2000). Welfare concerns in feed restricted meat type poultry stocks. XXI Worlds Poultry Congress 20-24, Montreal, Canada
3. Tinch, A. (1996). Novel methods in broiler breeding. *International Hatchery Practice*, 11, 7-9.
4. Van Middelkoop, J.H. and Van der haar, J.W. (2000). The application of scatter feeding in managing feed restriction during the rearing of broiler breeders. XXI World’s Poultry Congress 20-24. Montreal Canada.
5. Wilson, J.L. (1998). Manejo en naves sin ventanas de reproductores pesados mediante restricción de luz. *Selecciones Avícolas*, 3, 155-163.

PRODUCTIVIDAD EN REPRODUCTORAS DE MAYOR CONSUMO DE COMIDA

PRODUCTIVITY OF BROILER BREEDERS WITH A HIGHER FEED INTAKE (AVIAN FARMS)

Quintana J.A.¹, Avila E.², Herrera J.³, López C.¹, Téllez G.¹, Rojas L.A.⁴, León F.⁴

¹Departamento de Producción Animal:aves FMVZ Universidad Nacional Autónoma de México

²CEIEPA FMVZ Universidad Nacional Autónoma de México,

³Colegio de Postgraduados, Montecillo México, ⁴Reproductoras del Valle de México

SUMMARY

Two feed intake levels were compared during lay. No statistical differences in mortality rates were found. The highest production peak was observed in hens with standard body weight fed 10 extra grams of feed; nevertheless, heavier birds with this same feed intake showed the lowest production peak. Birds require more

feed to satisfy appetite and production needs, but bony fat accretion must be prevented.

El objetivo del experimento fue comparar el comportamiento productivo de gallinas reproductoras de raza pesada, cuando se les proporciona dos cantidades diferentes de alimento durante la postura.

MATERIAL Y METODOS

Se realizó en una granja comercial localizada en el municipio de Amecameca al oriente del Estado de México a 2470 msnm. Entre los paralelos 18° 49' latitud Norte y 98° 57' latitud Oeste. La zona presenta una temperatura media anual de 14.4°C, mínima de 0°C y máxima de 29°C con una precipitación pluvial de 1001 mm en época de verano (García, 1981). Se utilizó una parvada de 9000 gallinas reproductoras Avian Farm alojadas en tres casetas de ambiente natural con 6 lotes de 1500 aves cada uno, manteniendo una densidad de 4 aves/m².

A las 25 semanas de edad se seleccionaron todas las aves según el peso corporal y se uniformaron los lotes quedando 4 divisiones con aves de aproximadamente 3.0 Kg y dos divisiones con gallinas de 3.2 Kg. Estos dos últimos lotes quedaron como tratamiento control.

Se llevó a cabo un diseño experimental completamente al azar de tres tratamientos con dos réplicas cada uno de la siguiente forma:

Tratamiento A: gallinas (ligeras) con el peso estándar recomendado por el manual de la estirpe al inicio de postura, A estas aves se les alimentó con un máximo de 195 g de alimento/ave/día (556 Kcal de EM/ave/día).

Tratamiento B: gallinas (ligeras) con el peso estándar al inicio de postura. A estas aves se les alimentó con un máximo 205 g de alimento/ave/día, (10 gramos más que el tratamiento A) (584 kcal de EM/ave/día).

Tratamiento C: Gallinas (pesadas) con 5% de sobrepeso, con respecto al estándar de la estirpe, alimentadas con 205 g /alimento/ave/día (584 kcal de EM/ave/día)

A toda las gallinas se les administró la cantidad arriba señalada hasta el pico de producción.

Después del pico de postura, se retiró el alimento sobrante, en razón de la hora del día a la cual se terminaba; procurando 5 horas diarias de consumo, a excepción de un lote del tratamiento C en el cual se les dejó una hora más.

El alimento empleado fue para gallinas reproductoras pesadas con base en sorgo y soya. La dieta consumida en los tres tratamientos contenía 2850 Kcal de EM/Kg y 16.5 % de proteína cruda.

Se cuantificó el huevo total e incubable por gallina, el pico de postura, edad al pico de postura, el porcentaje de mortalidad al ciclo y la clasificación del huevo no incubable, así como el peso corporal al pico y al final del experimento que fue hasta la 60 semanas de edad.

Los resultados se analizaron con el paquete estadístico SAS para un diseño completamente al azar utilizando ANDEVA. Las medias fueron comparadas mediante la prueba de Tukey (Herrera y Barreras, 2000).

RESULTADOS

La mortalidad durante el ciclo de producción en las aves ligeras con menos alimento fue de 29.4%, en las de mayor consumo 25.9% y en las aves pesadas con más alimento 23.4%. No existió diferencia significativa ($p>0.05$)tratamientos.

El análisis estadístico de las variables de respuesta del pico de postura y edad al pico; mostró diferencias entre tratamientos ($P<0.01$), el pico de postura presentó el mayor porcentaje para el tratamiento B (aves ligeras con mayor consumo de alimento) y el menor porcentaje para el tratamiento C (las aves pesadas). La edad de las gallinas para llegar al pico de postura fue similar en los tres tratamientos como se puede observar en el Cuadro 1.

Con respecto al número de huevos no incubables: huevos chicos menos de 50 gramos (4 a 6 /GE), huevo sucio, huevo roto y huevo de doble yema(1.3 a 1.9) por gallina encasetada. No existió diferencia estadística $p>0.05$ entre tratamientos.

Los resultados globales de huevo incubable, así como los de los huevos totales por gallina encasetada; mostraron diferencias estadísticas, siendo similares para las aves ligeras y pesadas con mayor consumo de alimento con mas de diez huevos por gallina ($P<0.05$), que las aves ligeras con menor consumo de alimento (Cuadro 1).

Cuadro 1. Huevos incubables y no incubables y total de huevos producidos por gallina encasetada.(GE)

Trat.	% pic postura	Huevos Incubable/GE	Huevos incubable/GE	No Huevos Totales/GE
A	83.0b	126.2b	7.3a	133.3b
B	85.8a	135.7a	8.7 ^a	144.4 ^a
C	80.6c	136.3a	8.8a	145.2 ^a

a,b,c,. Medias con diferente literal son estadísticamente diferente $P<0.05$

Hubo diferencias ($P<0.05$) en el consumo total de alimento por gallina en el ciclo, siendo similar para los

tratamientos A y B (aves ligeras) y alrededor de 5 Kg. mas para el tratamiento C (aves pesadas), el promedio

de consumo por ave/ día durante todo el ciclo, fue de alrededor de 170 gramos para los tratamientos A y B (484.5 Kcal/ave) y de 193 gramos para el tratamiento C (550 kcal/ave). El índice de conversión (gramos de alimento para obtener un huevo incubable) y el peso promedio del huevo fue similar ($P>0.05$) para los tres tratamientos

Las aves ligeras con menor consumo al pico de producción tuvieron menos peso corporal, que las aves con mayor consumo (tratamientos B y C), resultado que se conservó hasta las 60 semanas de edad ($P>0.05$). El incremento de peso corporal de las 25 a las 60 semanas fue de 31% para las aves ligeras con menos consumo al pico y de 37% para las aves ligeras y pesadas con más consumo al pico.

DISCUSIÓN

Aunque se notó en las aves una tendencia numérica a menor mortalidad cuando consumen más alimento, no hubo diferencias estadísticas significativas entre tratamientos, quizá por el reducido número de repeticiones empleadas y debido al efecto que ejercen los factores ambientales sobre este parámetro, según Seemann (1997). Estos resultados son similares a los reportados por Moye (1996) y Quintana y cols. (1998).

Existieron diferencias significativas en el porcentaje del pico de producción, siendo el mayor en las aves con peso estándar pero con diez gramos extra de alimento. Sin embargo las aves más pesadas con este mismo consumo fueron las que peor pico de postura alcanzaron. Posiblemente, las aves requieran un incremento en el consumo para satisfacer su apetito y completar los requerimientos para la postura pero sin que se engrasen, de acuerdo con Brake y Peak (1999).

No existieron diferencias entre tratamientos en el número de huevos no incubable; sin embargo, hubo una fuerte tendencia a presentar diferencias el caso de huevos con doble yema en las aves más pesadas con mayor consumo de alimento, datos similares a los de Yu y cols. (1992b).

La producción total de huevo, incluyendo el incubable, fue menor para las aves con el peso estándar que sugiere la línea genética y que en promedio consumieron 10 gramos menos de alimento por gallina, que el resto de las aves, esto corrobora hallazgos anteriores de Quintana y cols. (1998).

Se notó que el consumo de alimento total, fue idéntico para los tratamientos A y B (aves ligeras), durante todo el ciclo; aún cuando el segundo consumió 10 gramos más hasta el pico. Posiblemente haya alguna compensación fisiológica para ajustar el consumo total del ave a lo largo del ciclo productivo. Por otro lado las aves más pesadas tienden a comer más para mantener su conformación, independientemente que lleguen más pesadas al final. La conversión de alimento fue mejor para el tratamiento B, debido a que

produjo más huevos, información que está de acuerdo con Brake y cols. (1994).

Se pudo observar que las aves de los tratamientos B y C alcanzaron el mismo porcentaje de incremento de peso. Las aves que consumieron menor cantidad de alimento, alcanzaron seis por ciento menos del peso al final del ciclo. Sin embargo el porcentaje de aumento de este último corresponde a lo esperado por algunos autores para mayor productividad y fertilidad (Brake y Peak, 1999 y Wilson, 1998).

Lien y Hess (1999) encuentran 5 huevos menos por gallina cuando se restringe en forma brusca el consumo de alimento; también observaron que el peso del ovario y el número de folículos fueron menores.

Jensen (2000) comenta que la productividad de una parvada de gallinas reproductoras pesadas depende del control del desarrollo folicular ovárico, el cual está directamente influenciado por la mortalidad, la cual aumenta si el sistema metabólico no es controlado adecuadamente. El mismo autor observó que cuando existe un sobrepeso de 5% de las gallinas a las 20 semanas de edad, mayor es el número de pollitos por cada gallina reproductora. Fancher (2000) menciona que las gallinas reproductoras alcanzan 3.9 Kg. de peso al final del ciclo productivo. En el presente estudio las gallinas que produjeron mayor cantidad de huevos, pesaron al final del ciclo 200 a 500 gramos más que lo reportado por Fancher (2000).

Resulta interesante comentar que Leeson (2000), recientemente afirmó que con frecuencia se encuentra hasta un 20% de diferencia mundial en las especificaciones de nutrientes en las dietas y cantidades de alimento a consumir en hembras y machos y de todas maneras el pico de postura constantemente alcanza el 86% y la incubabilidad oscila entre 84 y 85% durante toda la vida de la gallina.

Estudios realizados en pavos sugieren que después de una restricción de alimento en el período de desarrollo debe seguir un rápido crecimiento por dos semanas antes del inicio de la postura (Ferket, 2000). Esto podría explicar porqué el lote B de gallinas ligeras produjo más huevos.

Los resultados de este experimento coinciden con los encontrados en 1995, por Wilson y cols., los cuales encontraron que cuando se incrementaba el consumo de alimento rápidamente al inicio de postura y el peso corporal por arriba de lo recomendado, había más huevos fértiles y más pollitos por gallina que cuando se alimentaba lentamente. Renema y cols. (2000) también observaron que las gallinas con un sobrepeso de 18% con respecto a los parámetros de la estirpe al inicio de la madurez sexual presentaron más folículos que en las gallinas de bajo peso. Otros autores señalan la relación que existe entre la productividad y el estímulo de luz cuando se realiza a las 22 semanas de

edad, en comparación a las 20 semanas obteniendo hasta 30 huevos; de la misma manera cuando se consumen 8.7 gramos menos al día, de alimento por gallina, se obtienen 15 huevos menos (Brown y cols. 2000). En otro estudio Robinson y cols. (2000) señalan que el peso del ovario fue 14.7% del peso vivo en las gallinas alimentadas con las cantidades recomendadas por el manual de la estirpe y de solamente 6.7% en las gallinas alimentadas con una reducción 8.7% del consumo de la dieta.

REFERENCIAS

1. Brake, J.T. (1994, Marzo). El papel de la nutrición en la fertilidad. III Curso de actualización en manejo de reproductoras e incubación. ANECA. 24-27, México D.F.
2. Brake, J. and Peak, S.D. (1999). Feeding programs to maximize broilers breeder fertility. Abstracts. Concurrent Meeting Southern Poultry Science Society 20th annual
3. Brown B. Robinson, F.E., Renema, R.A. and Hyatt, D. (2000). Effects of feeding profile and photoestimulation in age in female broiler breeder 2. Reproductive performance and efficiency. Poultry Science Association. 89 Annual meeting abstracts, Montreal Canada. 1 63.
4. Fancher, B. I. (2000). Aplicaciones prácticas de los modelos de nutrición avícola. VII Simposium avícola. Universidad de Zacatecas. Sección nacional de progenitores de aves de la Unión Nacional de Avicultores. p 35-50
5. Ferket, R.P. (2000). Nutrición de las reproductoras comerciales de pavos. Avicultura profesional., 18, 5: 24-27.
6. Jensen, L.E. (2000) Desarrollo ovárico y problemas asociados con el calcio en reproductoras pesadas. Tecnología avícola en latinoamérica. 13, 147: 36-40
7. Lien, R.J., and Hess, B.J. (1999). Effects of post-peak feed allotment decrease rate on egg production by broilers breeder hens. Abstracts, Concurrent Meeting Southern Poultry Science Society 20th annual meeting and Southern Conference on Avian Diseases Society 40th annual meeting 18-19. Atlanta Ga. S. 107
8. Moye, J. (1996). Broiler breeder hen feeding programs to reduce mortality. World Poultry Elsevier, 12, 41-42.
9. Quintana, J.A., Ávila, G.E., Téllez, G.I., López, C.C., Herrera, H.J., Rojas, O.L.A. and León, P.F. (1998b). Relationship between body weight and the hens at 20, 25 and 30 weeks-of-age. Abstracts Concurrent Meeting Southern Poultry Science Society and Southern Conference on Avian Diseases 20-21. Atlanta Ga. S 139.
10. Renema, R.A. and Robinson, F.E. (2000). Reproductive implications of full feeding female meat type poultry parent stocks. Poultry Science Association 89 th annual meeting abstracts. Montreal Canada. 18-20, 163.
11. Robinson F.E., Renema RA., Brown B. and Hyatt, D. (2000). Effects of feeding profile and photostimulation in age in female broiler breeder 3. Carcass characteristics at 64 wk of age. Poultry Science Association 89 th annual meeting abstracts. Montreal Canada 18-20. 1 63
12. Seemann, G. (1997). Environmental management. International Hatchery Practice, 11, 27-29.
13. Wilson, J.L. (1998). Manejo en naves sin ventanas de reproductores pesados mediante restricción de luz . Selecciones Avícolas, 3, 155-163.
14. Yu, M.H., Robinson, F.E., Charles, R.G., Weingardt, R. (1992b). Effect of feed allowance during rearing and breeding on female broiler breeders. 2. Ovarian morphology and production. Poultry Science, 71, 1750-1761.

DETECCIÓN DE HORMONAS SEXUALES Y TIROIDEAS EN MUESTRAS DE SUERO IMPLEMENTANDO UN MÉTODO RADIO IMMUNO ANÁLISIS HUMANO

DETECTION OF SEXUAL AND TYROID HORMONES IN BROILER BREEDER SERUM USING HUMAN RADIO IMMUNO ASSAY

Quintana J.A.¹, Avila E.², Herrera J.³, López C.¹, Téllez G.¹, Rojas L.A.⁴, León F.4 Bravo L.M.⁵

¹Departamento de Producción Animal:aves FMVZ Universidad Nacional Autónoma de México.

²CEIEPA FMVZ Universidad Nacional Autónoma de México, ³Colegio de Postgraduados, Montecillo México, ⁴Reproductoras del Valle de México, ⁵Laboratorio Clínico Tlapan México.

SUMMARY

The purpose of this trial was to compare serum sexual and thyroid hormone levels in laying and non-laying hens at the onset of sexual maturity, using a radio immuno assay. Total tiroxine (T4) levels increase as the age of pullets increases, and growth hormone (ST) decreases. Feed restriction results in increased ST and T4, while tri-iodine-tyronine (T3) decreases. On feed days these hormones return to normal levels, but T3 remains low. Laying hens had higher follicle-stimulating hormone (FSH), and estradiol levels than non-laying hens. Average body weights at 25 weeks of age were also higher in layers. Prolactine and T3 tended to be higher in non-laying hens since this birds had not reached sexual maturity.

El objetivo del experimento fue comparar los niveles de hormonas sexuales y tiroideas en sangre de gallinas ponedoras y no ponedoras al inicio de la madurez sexual utilizando el método de Radio Inmuno Análisis.

MATERIAL Y METODOS

De una parvada de gallinas reproductoras de estirpe Ross, a las 25 semanas de edad alojadas en una granja comercial localizada en el Estado de México a 2470 msnm, se obtuvieron al azar 30 gallinas; las cuales se pesaron individualmente, por sus características físicas se determinó si ya habían iniciado o no la postura y se recolectó una muestra de sangre sin anticoagulante de cada una de ellas. La sangre se centrifugó en la misma granja en un lapso inferior a 5 minutos para obtener el suero, los cuales fueron analizados por el método de Radio Inmuno Análisis (RIA), para determinar las hormonas sexuales y tiroideas. Se utilizó un contador gama Cobra II Packard de RIA en fase sólida que emplea yodo-125 como trazador.

Se determinaron las hormonas: Luteinizante (LH), folículo estimulante (FSH), prolactina (PRL), estradiol (E2), progesterona (P4), Testosterona (TT).

Además se midieron las hormonas tiroideas: triyodotironina (T3) y Tiroxina total (T4).

Los resultados se analizaron mediante un análisis de varianza para datos completamente al azar usando el paquete estadístico SAS (Herrera, 1997).

RESULTADOS

La hormona (LH) en suero de gallinas ponedoras y no ponedoras a las 25 semanas de edad, presentó una tendencia numérica no estadística de aumento en las ponedoras (Cuadro 1); también se encontraron valores para la prolactina (PRL) en el suero de gallina no ponedoras, con una alta variabilidad entre los tratamientos, lo que determinó que no hubiera diferencia estadística ($p > 0.05$).

En el Cuadro 1 se muestra la presencia de la hormona (FSH) en el suero, con diferencia altamente significativa ($P < 0.01$) entre gallinas, siendo más alto el valor en las gallinas ponedoras. También se resumen los resultados de la presencia de la hormona estradiol (E2) en el suero de gallinas ponedoras y no ponedoras al inicio de la madurez sexual, con una diferencia de casi 3 veces (301 pg / ml) mayor ($P < 0.003$) en las gallinas ponedoras.

Los resultados de la cuantificación de la hormona progesterona (P4) se observan en el mismo Cuadro 1, existiendo tendencia estadística ($P = 0.08$) entre aves, siendo más alta en las gallinas ponedoras, se nota también diferencia altamente significativa ($P < 0.01$) para TT en el suero de gallinas ponedoras con respecto a las no ponedoras.

Cuando se analizó las presencia de las hormonas tiroideas T3 y T4, no existió diferencia significativa ($P > 0.05$) entre tratamientos de gallinas ponedoras y no ponedoras.

Se pudo detectar que las gallinas ponedoras tenían un peso mayor promedio de 235 gramos que las no ponedoras ($P < 0.05$), siendo las primeras con 3.16Kg y las no ponedoras 2.93 Kg.

Cuadro 1. Cantidad de la hormona Luteinizante (LH), Prolactina (PRL), Foliculo estimulante (FSH), Estradiol (E2), Progesterona(P4), Testosterona (TT), Triyodotironina (T3), Tiroxina(T4), en suero de gallinas ponedoras y no ponedoras a la edad de la madurez sexual.

Promedio	Ponedoras			No ponedoras		
	mU/ml	DE	CV	mU/ml	DE	CV
LH	6.59	2.86	43	5.43	3.6	66
PRL	ng/ml 4.45	0.66	148	Ng/ml 7.57	0.96	127
FSH	4.2 ^a	1.6	39	3.2b	1.7	51
E2	Pg. / ml			pg./ml		
	301.2 ^a	176	58	7.5b	3.5	50
	ng/ml	DE	CV	ng/ml	DE	CV
P4	0.18 a	0.14	80	0.4 b	0.01	13
TT	0.2 a*	0.05	26	0.16 b*	0.05	33

a,b, medias con literales distintas son estadísticamente significativas (P<0.01)

	ng/dl	DE	CV	ng/dl	DE	CV
T3	68.0	22.2	32	77.4	49.8	64
	Micg/dl			Micg/dl		
T4	2.0	0.5	27	1.8	0.3	18

No se encontraron diferencias estadísticas (P>0.05)

DE= Desviación estándar. CV= Coeficiente de variación.

No se encontraron diferencias significativas (P>0.05)

DISCUSION

Brugeman y cols. (1999 a y b) no encontraron diferencias en los niveles de hormonas sexuales que pudieran correlacionarse con el tipo de restricción alimenticia empleado durante el desarrollo y sugieren que el comportamiento reproductivo está influenciado por el tamaño de los órganos sexuales y la edad de la madurez sexual. Tampoco detectaron alguna correlación entre la producción de huevos y los niveles de hormonas sexuales.

No se encontraron diferencias estadísticas para las hormonas LH, PRL, T4, y T3 entre ponedoras y no ponedoras. Los niveles observados para LH, se encuentran entre los valores basales reportados por Bercovitz (1988) y por Lea y cols. (1996).

Noddegaard y cols. (2000) mencionan que al retardar la fotoestimulación no se produce un efecto sobre la LH. Estos investigadores observaron que al incrementar la LH en la sangre, también aumenta la producción de huevo. En el presente estudio, aunque la LH fue ligeramente mayor para las gallinas ponedoras no fue estadísticamente significativo.

En el caso de la PRL los valores obtenidos también son similares a los reportados por Bedecarrats

y cols. (1997). Los valores de T3 concuerdan con los niveles basales informados por Wingfield y Farner (1975) y Bercovitz y Sarver (1988).

Conforme aumenta la edad en las pollas en desarrollo, se incrementa la producción de T4 y decrece la hormona del crecimiento esto se observa principalmente en las pollas seleccionadas su gran peso corporal. Cuando las pollas están sometidas a un programa de restricción alimenticia se incrementan las hormonas del crecimiento y T4, mientras que la T3 disminuye. En el día que comen las pollas estas hormonas retornan a los niveles normales, excepto la T3 que se mantiene en los mismos niveles (Nir y cols. 1987). Dewil y cols. (1996), observaron que las estirpes sensibles al síndrome ascítico, tenían niveles mas bajos de las hormonas triyodotironina (T3) y tiroxina (T4).

Existió diferencia para la FSH siendo mayor en las gallinas ponedoras que en las no ponedoras, los valores son más altos que los reportados por Erb y cols. (1982). Cuando la gallina pone el primer huevo los niveles de LH y FSH son estables, independiente del régimen alimenticio (Bruggeman y cols. 1999 a y b). Sin embargo estos autores, no establecieron

claramente; como podrían afectar las concentraciones de LH o FSH, la cantidad de alimento consumido o el tiempo de restricción alimenticia.

El estradiol fue mas alto en gallinas ponedoras, los valores se encuentran entre los rangos de las mujeres. Winfield y Farner en 1975 reportan valores basales con un rango de 74 a 108 pg/ml, en este estudio los datos fueron mas altos. Theriault y cols. (2000) observaron que al adicionar 30 gramos extra de alimento al día por gallina a las 20 semanas de edad antes del inicio de la producción, los niveles de Estradiol E2 iban aumentando de 20 pg/ml hasta 135 pg/ml a las 35 semanas de edad. Renema y cols. (2000) demostraron que al adicionar 30 gramos extra de alimento por gallina al día al inicio de la madurez sexual, a los 7 días posteriores a la fotoestimulación, los niveles de estradiol se encontraron al doble que cuando no se sobrealimentaba a la gallina.

Los valores para progesterona, aunque con diferencias estadísticas entre tratamientos, son inferiores a los reportados por Bercovitz y Sarver (1988) de 1.18 a 1.65 ng/ml; igualmente en humanos los valores son mayores a 4 ng, posiblemente el método de RIA no detecte los valores reales de progesterona en las gallinas. Las diferencias observadas en la testosterona, con valor más alto en las ponedoras, coincide con valores para los humanos. Los pesos corporales promedio de las gallinas ponedoras fueron más altos que en las no ponedoras a las 25 semanas es posible que el menor peso corporal de las gallinas no ponedoras este relacionado a la falta de madurez sexual, en las gallinas no ponedoras con valores de hormonas sexuales fueron más bajos. De la misma forma las hormonas prolactina y T3 tienen una tendencia a valores más altos en las no ponedoras; gallinas que no han alcanzado la madurez sexual. Y estas hormonas se detectan en mayor niveles en aves que no han alcanzado la madurez sexual.

Renema y Robinson (2000) mencionan que debido a que el crecimiento y masa muscular de lo pollos de engorda se ha incrementado en las últimas décadas; se deberá redefinir el consumo de alimento en las gallinas reproductoras. Comentan que los programas de alimentación *ad libitum* en las pollas pueden provocar: obesidad, debilidad, lesiones del aparato locomotor y menor producción de folículos ováricos; en estas aves se altera el metabolismo y sus hormonas reproductivas debido al balance energético siempre positivo, crónico. En la actualidad se discute entre el apropiado manejo del alimento y el bienestar de la gallina, contra la productividad de huevos incubables y pollitos. Los genetistas y fisiólogos están trabajando para combinar e identificar los factores ligados al crecimiento y reproducción y la capacidad de producir pollitos que crezcan rápidamente sin la

necesidad de una fuerte restricción de alimento o del peso corporal (Whitehead, 2000).

Actualmente se está observando la actividad hormonal de una proteína llamada "leptina" que podría ayudar a regular el apetito de las gallinas. La leptina se ha encontrado en el tejido graso e hígado de los pollos. Se ha asociado con la obesidad, infertilidad y diabetes de humanos (Tarshis, 2000). Ashwell y Czerwinski (1999) han cuantificado los niveles expresión de la hormona leptina. Denbow y cols. (2000) inyectaron 10 mcrg. de leptina intracerebral en pollos de engorda y en pollas Leghorn, (rápido y lento crecimiento respectivamente), notaron que en ambos casos se redujo el consumo de alimento, sin afectar el consumo de agua.

Finalmente Dridi y cols. (2000) vieron que la cantidad de leptina en las gallinas no modifica el comportamiento frente al comedero, pero disminuye el tiempo que permanece la gallina comiendo. Se sugiere realizar estudios utilizando la hormona leptina como inhibidor del apetito en gallinas reproductoras pesadas como método alternativo de restricción alimenticia para evitar el estrés excesivo del hambre y la competencia por el alimento.

REFERENCIAS

1. Ashwell, C.M. Czerwinski, S.M.(1999). Hormonal regulation of leptin expression in broiler chickens. *American journal of physiology: regulatory, integrative and comparative physiology*. 45: 1 226 .
2. Bedecarrats, G., Guemene, D. and Richard-Yris, M.A. (1997). Effects of environmental and social factors on incubation behavior, endocrinological parameters, and production traits in turkey hens (*Meleagris gallopavo*). *Poultry Science*, 76, 1307-1314.
3. Bercovitz A.B. and Sarver, P.L. (1988). Comparative sex-related differences of excretory sex steroids from day-old andean condors (*Vultur gryphus*) and peregrine falcons (*Falco peregrinus*) : non-invasive monitoring of neonatal endocrinology. *Zoo Biology*, 7, 147-153. Obtenido en la red mundial el 7 de Agosto de 1999: <http://www.agris.com> Bercovitz A.B. Mirsky, A. and Frye, F. Jr. (1985). Non-invasive assessment of endocrine differences in day-old chicks (*Gallus domesticus*) by analysis of the immunoreactive oestrogen excreted in the egg. *Journal Reproduction Fertility*, 74, 681.
4. Bruggeman, V., Onagbesan, O., D'hondt, E., Buys, N., Safi, M., Vanmonfort, D., Berghman, L., Vandesande, F. and Decuypere E. (1999 b) Feed restriction in broiler pullets. *Poultry Science* 78, 10: 144-154.
5. Denbow, D.M., Meade, S., Robertson, A., Mc Murtry, J.P., Richards, M. and Ashwell C, (2000).

Leptin-induced decrease in food intake in chickens. *Physiology Behaviour*, 69:3 359-62.

6. Dewil, E., Buys, N., Albers, G.A. and Decuyper, E. (1996). Different characteristics in chick embryos of two broiler lines differing in susceptibility to ascites. *British Poultry Science* 37, 1003-1013.

7. Dridi, S., Raver, N., Gussakovskiy, E.E., Derouet, M., Picard, M., Gertler, A., Taouls, M. (2000). Biological activities of recombinant chicken , leptin C4S analog compared with unmodified leptins. *American Journal Endocrinology Metabolism*. 279:1 E116-23.

8. Erb, L., Lasley, B.L., Czekala, N.M. Monfort, S.L. and Bercovitz, A.B. (1982). A dual radioimmunoassay and cytosol receptor binding assay for the measurement of estrogenic compounds applied to urine, fecal and plasma samples. *Steroids*, 39, 1.

9. Lea, R.W., Richard-Yris, M.A., and Sharp, P.J. (1996). The effect of ovariectomy on concentrations of plasma prolactin and LH and parental behavior in the domestic fowl. *Genetic and Comp Endocrinology*, 101, 115-121. Nir, I., Harvey S., Cherry, J.A., Dunnington, E.A., Klandorf, H., Siegal, P.B. (1987) Growth-associated traits in parenteral and

F1 population of chickens under different feeding programs. 4 growth and thyroid hormones. *Poultry Science*. 66, 32-37.

10. Noddegaard, E., Talbot, R.T., Sharp, P.J.(2000). Effect of delayed step-up lighting on plasma luteinizing hormone and reproductive function in broiler breeders. *Poultry Science*, 79,5: 778-83.

11. Renema, R.A. and Robinson, F.E. (2000). Reproductive implications of full feeding female meat type poultry parent stocks. *Poultry Science Association 89 th annual meeting abstracts*. Montreal Canada. 18-20, 163.

12. Tarshis, S. New technique to measure leptin activity.(2000). *Agricultural research* 48, 5: 22-12.

13. Theriault, C., Tremblay, N., Robinson, F.E., Renema, R.A. and Proudman, J.A. (2000, August) Changes in plasma estradiol concentration and plasma lipid level in broiler breeder pullets in response to bonus feeding during sexual maturation. *Poultry Science Association 89th annual meeting 18-20 abstracts*. Montreal Canada. Whitehead, C.C. (2000) Nutrition: the interrogative science. *British Poultry Science*. 41, 5-15.

PRIMER HALLAZGO EN MÉXICO DEL ÁCARO *PTERYGOCRUSOLICHUS CHANAYI* EN GUAJOLOTES DE MÉXICO

FIRST REPORT IN MEXICO OF THE MITE *PTERYGOCRUSOLICHUS CHANAYI* IN TURKEYS

Ma.Teresa Quintero M..

Departamento de Parasitología, Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia, U.N.A.M. Coyoacán, C.P. 04510 México D.F.

SUMMARY

This paper reports the presence of mites characterized as *Pterygocrusolichus chanayi* (Trouessart), family *Pterolichidae*, in turkey feathers. Mites were found in turkeys in Palizada, Campeche, Mexico, suffering feather loss. Mites were fixed using Hoyer's fluid, to be further analyzed under the light microscope. This particular mite has been isolated elsewhere from both domestic and wild turkeys. Nevertheless, this is the first report of its presence in Mexican turkeys.

RESUMEN

En el presente trabajo se comunica la presencia de ácaros en plumas de guajolotes, a los que se determinó como *Pterygocrusolichus chanayi* (Trouessart) pertenecientes a la familia *Pterolichidae*, los ácaros fueron encontrados en guajolotes de Palizada,

Campeche, México, que presentaban caída de plumas, con los ácaros encontrados se realizaron preparaciones empleando líquido de Hoyer y más tarde se observaron al microscopio compuesto. Estos ácaros, han sido aislados de guajolotes domésticos y silvestres sin embargo esta la primera vez que se comunica presencia en guajolotes de México

INTRODUCCIÓN

Los ácaros de las plumas de guajolotes constituyen una gama de diversos géneros y especies pertenecientes a diversas familias, entre las que se encuentra la familia *Pterolichidae* en la que se incluyen al género *Pterolichus* entre otros. En el presente trabajo se comunica la presencia de ácaros en plumas de guajolotes a los que se determinó como *Pterygocrusolichus chanayi*

MATERIAL Y METODOS

El material consistió en plumas separadas de guajolotes criados en Palizada, Campeche, los guajolotes mostraban caída de plumas, dichas plumas fueron transportadas al laboratorio a donde se les examinó bajo el microscopio, estereoscópico, de las plumas positivas a ácaros se fueron separando éstos y se les montó entre porta y cubreobjetos empleando líquido de Hoyer

RESULTADOS

Al realizar la observación de las preparaciones obtenidas, bajo el microscopio compuesto, se llegó a la conclusión de que se trataba de ácaros de la familia Pterolichidae y se les identificó como *Pterygocrusolichus chanayi* (Trouessart and Megnin) se encontraron ácaros en todas sus fases evolutivas. Según Gaud y Atyeo, 1996 estos ácaros se caracterizan por presentar epímeros libres no articulados, asimismo presentan un par de sedas verticales; una característica sobresaliente en el macho

es que presentan los fémures de las patas I Y II expandidos, así como que las patas posteriores son sublaterales, estos ácaros han sido encontrados en guajolotes domésticos y en silvestres.

DISCUSION Y CONCLUSIONES

La importancia de esta comunicación, radica en el hecho de que estos ácaros pudieran estar provocando la caída de plumas; los ácaros encontrados se caracterizan. Al parecer esta es la primera vez que se identifica a este ácaro en México por lo que deberá ponerse atención sobre el diagnóstico de estos ácaros a fin de no confundirlos con otros muy cercanos como son los del género *Pterolichus* y asimismo establecer el daño que estos organismos causen en las plumas de guajolotes.

REFERENCIAS

1. Gaud, J. and Atyeo W. Feather mites on the world (Acarina, Astigmata) Ann Zoologische Wetenschappen 277:100 1996.

MODULATION OF PHAGOCYTE FUNCTION BY OVOTRANSFERRIN, A CHICKEN ACUTE PHASE PROTEIN

MODULACIÓN DE LA FUNCIÓN DE LOS FAGOCITOS POR LA OVOTRANSFERRINA, PROTEÍNA DE FASE AGUDA EN EL POLLO

N. C. Rath, H. Xie, W. E. Huff, G. R. Huff, and J. M. Balog,

PPPSR, ARS, USDA, University of Arkansas, Fayetteville, AR 72701

RESUMEN

Las proteínas de fase aguda son proteínas plasmáticas cuyas concentraciones séricas se elevan durante los procesos de infección e inflamación. Una de ellas es la ovotransferrina en las aves. Para comprender el significado de la elevación de sus niveles en la inflamación estudiamos sus efectos *in vitro* sobre una línea celular de macrófagos de pollo (HD11) y sobre los heterófilos de la sangre periférica. La ovotransferrina indujo la producción de interleucina-6 y de metaloproteinasa de la matriz; además, estimuló las actividades de estallido respiratorio en ambos tipos de células. Sólo las células HD11 produjeron nitrito bajo el estímulo con la ovotransferrina y ésta indujo la desgranulación de los heterófilos. Estos resultados sugieren que la ovotransferrina tiene efectos inmunomoduladores sobre los macrófagos y los heterófilos.

Inflammation induces many physiological changes one of which is the increases in the levels of several serum proteins called acute phase proteins

(APP). The exact functions of APPs during inflammation is not clear but it is thought that these proteins may modulate immune response and help restore physiological homeostasis. Serum transferrin is a major APP in poultry [1, 2]. We recently showed that it is the same protein as ovotransferrin, a major egg white protein [3]. The serum level of ovotransferrin increases in response to inflammation and a variety of bacterial and viral infections [3]. To understand the role of ovotransferrin during inflammation, we studied its effects on a chicken macrophage cell line HD11 and heterophils in culture. We used ovotransferrin at concentrations 0,1,10,100, and 1000

□g/ml of culture medium and measured the changes in the levels of interleukin-6 (IL-6), nitrite, and matrix metalloproteinases (MMP) in the conditioned media after 24 h of culture, the respiratory burst activities within 2 h, and the degranulation of heterophils between 6-24 h. The methods used have been described previously [3, 5, 6]. The results of these experiments are summarized in Table 1. Ovotransferrin at doses of 100

□g/ml MMP production II

in both cell types, stimulated nitrite production by HD11 cells and potentiated phorbol myristate acetate (PMA)-induced respiratory burst in HD11 cells measured by the oxidation of dichlorofluorescein diacetate. On the other hand, heterophils did not produce nitrite but exhibited an increase in respiratory burst activities with ovotransferrin alone. Like PMA, ovotransferrin induced loss of fluorescein isothiocyanate stained cytoplasmic granules in

heterophils. Ovotransferrin was neither mitogenic nor cytotoxic to these cells. These results suggest that ovotransferrin can modulate macrophage and heterophil functions in chickens. The need for a high threshold concentration of ovotransferrin by these cells implies that regulation occurs only under emergency situations such as inflammation or infection, because many of the APPs are normal constituents of blood.

Table 1. Effects of ovotransferrin on HD11 macrophage and heterophils.

Cell type	IL-6	Nitrite	MMP	Respiratory burst	Degranulation	Viability
HD11	□	□	□	□	N/A	□
Heterophils	□	N/A	□	□	□	□

□ = increased, □ = no change, N/A = not applicable

REFERENCES

- Hallquist, N. A. and K. C. Klasing. Serotransferrin, ovotransferrin and metallothionein levels during an immune response in chickens. *Comp. Biochem. Physiol.* 108B:375-384, 1994.
- Chamanza, R, Toussaint, M. J. M, van Ederen, A. M, van Veen, L., and Hulskamp-Koch, C. A. preliminary investigation of using acute phase variables to assess diseases in chickens. *Vet. Quart.* 21: 158-162. 1999.
- Xie, H., G. R. Huff, W. E. Huff, J. M. Balog, P. Holt, and N. C. Rath. Identification of ovotransferrin as an acute phase protein in chickens. *Poultry Sci.*, 81: 112-120. 2002.
- Xie, H., L. Newberry, D. C. Clark, W. E. Huff, G. R. Huff, J. M. Balog, N. C. Rath. Changes in serum ovotransferrin levels in chickens with experimentally-induced inflammation and diseases. *Avian Dis.*, in press, 2002.
- Rath, N. C., G. R. Huff, J. M. Balog, W. E. Huff. Fluorescein isothiocyanate staining and characterization of avian heterophils. *Vet. Immunol. Immunopathol.* 64: 83-95. 1998.
- Xie, H., N. C. Rath, G. R. Huff, J. M. Balog, W. E. Huff. Inflammation-induced changes in serum modulate chicken macrophage function. *Vet. Immunol. Immunopathol.* 80:125-135. 2001.

ENFERMEDAD DE MAREK EN POLLO DE ENGORDA INFORME DE UN CASO

MAREK'S DISEASE (MD) IN BROILERS: A CASE REPORT

Revelo SU¹, Juárez RM¹, Petrone VM¹

¹ Departamento de Producción Animal: Aves, Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia, Universidad Nacional Autónoma de México, 04510, México, D.F.

SUMMARY

A case of MD in broilers is described. Prostration, green feces, paralysis of one or more extremities, and skin lesions were observed. Mortality was increased starting early in the cycle, and cumulative mortality at the end (56 days) was 25.4%. By the 8th week (processing) signs were characterized by enlarged feather follicles in wings and legs, and around the vent.

Loss of iris pigmentation (iritocyclitis) was also observed. Histological results showed lesions typical of MD. Nevertheless lesions in the thymus and bursa of Fabricius suggest infections with other viruses like infectious bursal disease virus, chicken anemia virus, or reovirus.

RESUMEN

Se describió un caso de la Enfermedad de Marek en pollo de engorda. Se observaron pollos postrados, heces verdes, parálisis de una o más de las extremidades además de lesiones cutáneas. La mortalidad se incrementó desde el inicio del ciclo y la mortalidad acumulada para el fin del ciclo (56 días) fue de 25.4%. Para la 8ª semana cuando las aves salieron a rastro los signos se caracterizaron por el aumento de tamaño del folículo de la pluma en extremidades superiores e inferiores y alrededor de la cloaca y se observó despigmentación del iris (iridociclitis). Los resultados de la histología mostraron lesiones características con la Enfermedad de Marek, sin embargo las lesiones en timo y bolsa de Fabricio sugieren infecciones por otro virus como el de Gumboro, Anemia Infecciosa o Reovirus.

INTRODUCCIÓN

La Enfermedad de Marek (EM) es una enfermedad infecciosa, causada por un herpesvirus, caracterizada por causar infiltrado linfocítico neoplásico. El virus se replica en las células del folículo de las plumas y éste encuentra su vía de salida a través de la piel mediante las descamaciones. La importancia de esta enfermedad es la inmunosupresión así como en las pérdidas económicas por decomisos en rastro y desechos de pollos retrasados. Últimamente esta enfermedad se ha presentado en aves aún vacunadas, aves adultas, y en lugares que tenían poca incidencia de esta.

El objetivo principal del trabajo es describir un caso de la enfermedad de Marek, y la forma como se elaboró el diagnóstico.

Historia clínica. El caso se presentó en una explotación de pollo de engorda, estirpe Ross, en el estado de México. El calendario de vacunación consistió en: al 1º día Marek, 8º día Gumboro Oral, 12º enfermedad de Newcastle (ENC) simultánea y BI Ocular, 21º Gumboro oral. Las aves tuvieron un desarrollo inicial sin problemas clínicos aparentes hasta la semana 5 donde se observó pollos postrados, heces verdes, parálisis de una o más de las extremidades además de lesiones cutáneas. A la semana 7 la mortalidad acumulada fue de 20.2%. La mortalidad se incrementó desde el inicio del ciclo. La mortalidad acumulada para el fin del ciclo (55 días) fue de 25.4%. Para la 8ª semana cuando las aves salieron a rastro los signos se caracterizaron por el aumento de tamaño del folículo de la pluma que se observaron generalmente en extremidades superiores e inferiores y alrededor de la cloaca y se observó despigmentación del iris (iridociclitis).

Hallazgos macroscópicos. En la inspección externa se observaron costras distribuidas multifocalmente sobre la piel, además de áreas de hemorragias

equimóticas. En la inspección interna se observó hidropericardio, y en corazón se apreciaban nódulos blancos. En la cavidad abdominal se observó ascitis, el hígado amarillo y aumentado de tamaño, con bordes redondeados (cambio de grasa), disminución moderada en el tamaño de la bolsa de Fabricio y aumento de tamaño del bazo con presencia de nódulos blancos. Se colectaron muestras de los órganos afectados y fueron conservados en formol al 10%.

Pruebas Complementarias. Además se colectaron sueros para estudios de: ELISA de Reovirus y Inhibición de la Hemoaglutinación (HI) de ENC e Influenza Aviar (IA), así como órganos para aislamiento viral para la enfermedad de Newcastle y Marek, a partir de pulmón, tráquea, encéfalo y piel.

Hallazgos microscópicos. Se observó panofalmitis fibrinopurulenta severa, atrofia tímica cortical severa, infiltración linfocitaria moderada en la mucosa del proventrículo, infiltración linfocitaria leve en nervio ciático, depleción linfocítica severa en bazo, duodenitis linfocítica de moderada a severa, abundante infiltración de linfocitos neoplásicos en hígado, en bolsa de Fabricio se encontró bursitis crónica de leve a moderada y atrofia de folículos linfocitarios, y nefrosis de leve a moderada.

Resultados de Serología. Para la prueba de ELISA de reovirus 5/7 sueros resultaron con títulos de anticuerpos para reovirus. Sin embargo los resultados de aislamiento para el virus de Newcastle y Marek fueron negativos, así como los títulos de HI tanto para influenza como para Newcastle.

DISCUSIÓN Y CONCLUSIONES

Las lesiones microscópicas fueron características con la Enfermedad de Marek, sin embargo las lesiones en timo y bolsa de Fabricio sugieren infecciones por otro virus como el de Gumboro, Anemia Infecciosa o Reovirus. Las lesiones hepáticas y renales sugieren una intoxicación exógena, mientras la enteritis linfocítica sugiere un proceso tóxico o viral. El uso de antibióticos u otros fármacos pudieron producir lesiones similares en hígado y riñón. Los daños linfocitarios sugieren inmunosupresión.

Los resultados serológicos mostraron un coeficiente de Variación de 58% y resultado negativo de dos de siete sueros a la ELISA de reovirus, lo cual representa un estado inmune diferente de los pollos. Aunque el aislamiento del virus de Marek fue negativo las lesiones observadas fueron compatibles con Marek, señalando la exposición temprana del virus en concentraciones suficientes para provocar la enfermedad, lo que hace hincapié en reforzar medidas de bioseguridad, así como no permitir el alojamiento de aves de diferentes edades. La limpieza y desinfección, así como el descanso sanitario de las instalaciones reduce significativamente la exposición del virus de la

enfermedad de Marek y a otros agentes patógenos que interactúan con el virus de esta enfermedad.

El diagnóstico diferencial fue principalmente con ENC, y se descartó por el aislamiento y títulos de HI negativos.

Evaluar la aplicación eficaz de la vacuna, desde el tiempo en que ésta es preparada, temperatura de almacenamiento y título, asegurar que este adecuadamente manejada y aplicada desde el tanque de Nitrógeno hasta el contacto con el ave; así como también evitar mezclar la vacuna con antibióticos que disminuyan el título.

Los parámetros productivos como la mortalidad, ganancia de peso y por lo tanto el índice de productividad, kilos por metro cuadrado etc., no alcanzaron los valores estimados, la mortalidad se elevó considerablemente y los decomisos en rastro contribuyeron con las pérdidas económicas.

Otro aspecto importante es implementar la evaluación de la calidad que cada día se vuelve una actividad de rutina que ayuda en muchos casos a

detectar tempranamente posibles problemas; así como realizar un monitoreo para Anemia Infecciosa Aviar, Infección de la bolsa de Fabricio contra virus que afecten el sistema linfático o procesos tóxicos. Todos aquellos factores que comprometan la integridad fisiológica del sistema inmunológico deben ser identificados e implementados los programas necesarios para su control.

REFERENCIAS

1. Calnek B. W. Diseases of Poultry. 9° Ed. Editorial Manual Moderno. 1995. 1148 páginas.
2. Muñoz Ricardo. Control de Marek. Industria Avícola, Diciembre 2000.
3. Petrone García, Hernández Velasco y Téllez Isaías. Enfermedad de Marek. Veterinaria México 31 (4), 2000.
4. Petrone García V. M., Salado Carvajal R. y Téllez Isaías G. Enfermedad de Marek. En: Sistemas de Producción Animal II Aves, Volumen 2, Sistema de Universidad Abierta. 1999.

MANEJO DE LOS DESECHOS EN LA INDUSTRIA AVÍCOLA (ESTUDIO RECAPITULATIVO)

WASTE MANAGEMENT IN THE POULTRY INDUSTRY (A SUMMARY REPORT)

¹Gonzalo N. Salazar Matalí, ¹José A. Quintana López, ²René Rosiles Martínez

¹Departamento de Producción Animal: Aves. ²Departamento de Nutrición
Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia Universidad Nacional Autónoma de México

SUMMARY

The poultry industry is formed by high technology/high productivity complexes that generate large amounts of waste, i.e.: cadavers (either natural mortality or culled birds) and feces. Therefore, a waste management program should exist. Major waste systems are listed, described and discussed herein, together with some suggested guidelines.

RESUMEN

La industria avícola se integra por complejos tecnificados con alta productividad por lo que se producen grandes cantidades de desechos entre los que se encuentran cadáveres de las aves muertas o seleccionadas durante el ciclo y excretas de los animales, por lo que se debe contar con un programa integral de manejo de los desechos que se producen. Se enlista describe y discute en el texto las principales formas de manejar los desechos y se acompaña de una serie de lineamientos que se sugieren para el manejo adecuado de los mismos.

INTRODUCCIÓN

La industria avícola en los últimos 50 años ha pasado de ser una actividad de traspatio a una industria consistente en complejos altamente tecnificados y concentrados, con el correspondiente incremento en los desechos producidos. El impacto del nitrógeno, fósforo y agentes patógenos en el medio ambiente ha forzado a la industria avícola a implementar medidas para el manejo de desechos.

MANEJO DE LOS DESECHOS SÓLIDOS EN LA INDUSTRIA AVÍCOLA

Algunas de las prácticas más comunes para manejar desechos se discuten a continuación:

1. Rellenos sanitarios. Pueden usarse para eliminar desechos de incubadoras, cadáveres de las aves y decomisos en el rastro, su aplicación se limita por: accesibilidad, costo y regulaciones ambientales.
2. Molienda. Se aplica para convertir los desechos del proceso del pollo en un ingrediente útil

para alimentación animal. La ubicación de la granja, facilidad de transporte, y costo pueden ser limitantes.

3. Extrusión. Consiste en forzar mecánicamente el material a través de un orificio pequeño, se puede utilizar para desechos de incubadoras y cadáveres.

4. Compostas. Este proceso reduce el volumen de los materiales, destruye la mayoría de las bacterias patógenas, y estabiliza el material, para ser utilizado como fertilizante o ingrediente para alimentación animal, incluso de aves. En otros países se realiza de manera comercial.

5. Pozos de desecho. Utilizados comúnmente, y aprobados para el desecho de cadáveres en algunas áreas. Se deben construir de manera que se garantice su impermeabilidad.

6. Lagunas y tanques cerrados. Se utilizan desde la década de 1960 para gallinas de postura y otras explotaciones animales. Deben contar con recubrimientos adecuados.

7. Aplicación a la tierra como fertilizante. Es una práctica muy antigua y aún aplicable. Se recomienda aplicar 9 toneladas de desechos por hectárea en una sola aplicación al año, y 14 toneladas por hectárea si son múltiples las aplicaciones.

8. Los desechos se utilizan como ingrediente para la dieta de rumiantes, se agrega melaza, se debe

separar la mortalidad de los desechos, para prevenir la presentación de botulismo en los rumiantes. Es importante controlar la cantidad de microminerales en las excretas de las aves para evitar la presentación de toxicidad en rumiantes, también se debe observar la susceptibilidad de las especies.

CONCLUSIONES

Las regulaciones ambientales tienden a hacerse más estrictas, lo que obliga a los productores pecuarios a buscar mecanismos para dar valor agregado a los desechos convirtiéndolos en subproductos. Los mercados potenciales para los desechos de las granjas avícolas se pueden agrupar de la siguiente forma: 1) fertilizantes para el suelo, 2) ingrediente para el alimento de animales, y 3) fuente de energía.

El uso de desechos de aves para alimentar al ganado bovino es exitoso bajo circunstancias adecuadas y buen manejo, igualmente la aplicación de los desechos como fertilizante, especialmente cuando los suelos son infértiles por naturaleza y los desechos son aplicados de manera local, es decir que el costo por transportación no sea excesivo.

REFERENCIAS

Disponible con el autor.

COMPARISON OF SURVEY DATA ON ANTIBIOTIC GROWTH PROMOTANTS AND RESPONSES TO ALTERNATIVES

COMPARACIÓN DE LOS DATOS DE UNA ENCUESTA SOBRE LOS PROMOTORES ANTIBIÓTICOS DEL CRECIMIENTO Y LAS RESPUESTAS A OTRAS ALTERNATIVAS

A.E. (Ted) Sefton and Steve Collett

Alltech, Inc., 3031 Catnip Hill Pike, Nicholasville, KY 40356

RESUMEN

Los antibióticos promotores del crecimiento se han convertido en un estándar de inclusión en las raciones para pollos de engorda y pavos. Este trabajo resume los estudios realizados para investigar la respuesta sobre un suplemento alternativo (Bio-Mos®, Alltech, Inc., Nicholasville, KY, EE.UU.) en dietas libres de promotores del crecimiento u otras que contenían promotores antibióticos. Bio-Mos es un oligosacárido manano fosforilado, derivado del material de la pared celular de las levaduras. Estos reportes indican que, cuando no se utiliza un antibiótico promotor del crecimiento, la inclusión de Bio-Mos representa una ventaja en el rendimiento de las dietas para pollos de engorda y pavos. Bio-Mos se

puede usar para sustituir a un antibiótico promotor del crecimiento con la expectativa de obtener resultados comparables de rendimiento.

INTRODUCTION

Antibiotic growth promotants have become a standard inclusion in broiler and turkey rations. Rosen (1) reported improvement in gain and/or feed conversion in 72% of 12,153 studies of 14 antibacterials in poultry and swine tests. Recently, the American Medical Association, House of Delegates urged the United States Food and Drug Administration to “phase out all anti-microbials except under veterinary prescription for defined therapeutic purposes” (2). This pressure is based on the perceived

link between the agricultural use of antibiotics and the presence of antibiotic resistant bacteria found in human infections (3). There has been consumer pressure to find alternatives to antibiotic growth promoters, which has lead to a number of producers to evaluate alternative programs.

This paper summarizes published and unpublished studies investigating the response to an alternative supplement (Bio-Mos®, Alltech, Inc., Nicholasville, KY) in growth promoter-free diets and those containing antibiotic growth promoters. Bio-Mos is a phosphorylated mannan oligosaccharide derived from yeast cell wall material. In all cases, the summary is broken down into published papers, abstracts of material presented at scientific meetings and non-published commercial evaluations.

BIO-MOS RESPONSE IN ANTIBIOTIC-FREE PROGRAMS

Broilers. Birds supplemented with Bio-Mos had greater weight for age compared to those on antibiotic-free programs. Differences ranged from +0.54 to +4.81% in the seven papers. The overall improvement with Bio-Mos was 2.72% average (each study given equal weight). The difference was +0.54% in published papers, +3.76% for papers published as abstracts and +2.75% for unpublished evaluations.

In all seven studies, Bio-Mos fed birds had improved feed conversion, compared to those on program not containing an antibiotic growth promotant. The difference ranged from -0.54 to -8.96%. The overall average improvement was -3.17%. The difference was 1.42% for the single published paper, 6.10% for abstracts, and 2.35% for the unpublished reports.

These reports indicate that broiler performance improved when Bio-Mos was fed, both in terms of growth rate and feed efficiency, when compared to a program not containing a growth promotant antibiotic.

Turkeys. The overall average improvement in growth rate was 1.49% in flocks fed Bio-Mos compared to those given no antibiotic growth promotant. Of seven comparisons, Bio-Mos fed birds had better weight for age in four (57%) of the comparisons. The difference ranged from -2.72 to +5.86%. The difference was +2.63% for published papers, +5.86% for abstracts and 0.39% for unpublished reports.

Overall average improvement in feed conversion was 1.99% in flocks fed Bio-Mos compared to those given an antibiotic growth promotant. Of the seven comparisons, the Bio-Mos fed birds had the better-feed conversion in 6 (86%). The difference ranged from -8.17 to +0.44%. The average improvement was 0.39% for the single published paper, 7.42% for the single abstract and 2.49% for unpublished reports.

Similar to the response in broilers, Bio-Mos improved turkey performance both in terms of growth rate and feed efficiency when compared to a program not containing a growth promotant antibiotic.

COMPARISON OF BIO-MOS TO ANTIBIOTIC GROWTH PROMOTANT PROGRAMS

Broilers. On average, growth rate was 1.34% greater for flocks fed Bio-Mos than for those given an antibiotic growth promotant. In 10 of 16 (62%) comparisons, the market weight of broilers fed Bio-Mos was greater than the antibiotic growth promotant fed birds. The differences ranged from -2.91 to +8.34%. Average difference was -2.12% in the single published paper, -2.91% in the single abstract and +1.89 in unpublished reports.

Feed efficiency averaged 1.70% better for broiler flocks given Bio-Mos compared to the antibiotic-fed flocks. Of the 16 comparisons, 10 (62%) favored Bio-Mos. The difference ranged from -13.37 to +4.41%. The single published study showed Bio-Mos and the antibiotic growth promotant to give equal feed efficiency at market. The single abstract showed a 0.83% advantage for the antibiotic growth promotant, while the unpublished reports showed a 2.59 % advantage for Bio-Mos.

These studies indicate that Bio-Mos and antibiotic growth promotants will yield comparable response in terms of growth and feed efficiency.

Turkeys. Growth rate was 0.66% better on average when an antibiotic growth promotant was used compared to Bio-Mos. Bio-Mos flocks had greater market body weight than antibiotic growth promotant flocks in six of 10 comparisons. In published papers there was a 0.62% advantage to Bio-Mos, a 0.87% advantage in the single abstract and a 1.27% disadvantage in the unpublished reports.

Feed efficiency averaged 1.01% better in the Bio-Mos fed flocks compared to those supplemented with antibiotic growth promotants. In eight of the 10 comparisons, the Bio-Mos flocks showed an advantage. In published papers there was a 0.02% advantage for the antibiotic growth promotant flocks, in the single abstract the advantage was 0.95% in favor of the Bio-Mos flocks, and in the unpublished reports the advantage was 1.31% in favor of the Bio-Mos fed flocks.

These reports would indicate that Bio-Mos and growth promotant antibiotics give comparable responses.

CONCLUSIONS

Overall, these reports indicate that when an antibiotic growth promotant is not used, there is a performance advantage to including Bio-Mos in diets fed either broilers or turkeys. They further indicate

that Bio-Mos can be substituted for a growth promotant antibiotic with the expectation of comparable performance results.

REFERENCES

1. Rosen, G. D., 1996. The Nutritional Effects of Tetracyclines in Broiler Feeds. Proceedings of World's Poultry Congress Volume II, New Delhi, India, pg. 141-146.

2. Anonymous, 2001. Antimicrobials Phase Out? World Poultry-Elsevier. 17(11): 6.

3. Salyers, A., 1999. Agricultural Use of Antibiotics and Antibiotic Resistance in Human Pathogens: Is There a Link? Biotechnology in the Feed Industry. Proceedings of Alltech's 15th Annual Symposium. Eds T. P. Lyons and K. A. Jacques. Pg. 155-171.

AISLAMIENTO Y CARACTERIZACION DE *ORNITHOBACTERIUM RHINOTRACHEALE* OBTENIDO DE PAVOS CON ENFERMEDAD CORIZOIDE

ISOLATION AND CHARACTERIZATION OF *ORNITHOBACTERIUM RHINOTRACHEALE* FROM TURKEYS WITH A CORYZA-LIKE INFECTION

Soriano VE¹, Longinos GM², y RP Fernández²

¹Departamento de Investigación y Desarrollo Avícola, Biosíntesis Laboratorios SA. Toluca 50130, México.

²Centro de Investigación y Estudios Avanzados en Salud Animal, FMVZ-UAEM. Toluca 50000, México.

SUMMARY

O. rhinotracheale was isolated from 6-week-old turkeys with a coryza-like disease. Biochemical properties (API 20NE system), and hemagglutinating activity of these turkey isolates were similar to those of chicken isolates. Isolates were genetically typified using the ERIC-PCR test.

RESUMEN

Se obtuvo el aislamiento de *Ornithobacterium rhinotracheale* a partir de pavos de 6 semanas de edad con enfermedad corizoide. Las propiedades bioquímicas (sistema API 20NE) y actividad hemoaglutinante de los aislamientos fueron similares a las observadas para aislamientos de pollo. Los aislamientos fueron tipificados genéticamente mediante la prueba de ERIC-PCR.

Pavos de 6 semanas de edad con enfermedad respiratoria y una mortalidad registrada del 30% fueron remitidos al CIESA-FMVZ-UAEM. Se realizó el aislamiento de *Ornithobacterium rhinotracheale* a partir de senos infraorbitarios y pulmón. A la necropsia, se observó congestión de pulmón y de hígado, entre otras lesiones.

Las propiedades bioquímicas de los aislamientos obtenidos fueron probadas mediante el sistema comercial API 20NE, registrándose el siguiente código: 0-2-2-0-0-4. Este mismo código ha sido obtenido de forma uniforme a partir de aislamientos *O. rhinotracheale* de pollo (2).

Los aislamientos obtenidos mostraron actividad hemoaglutinante empleando eritrocitos de pollo fijados con glutaraldehído. Esta misma característica ha sido observada en aislamientos obtenidos de pollo (1, 2). Los aislamientos obtenidos fueron incluidos en pruebas de aglutinación en placa e inhibición de la hemoaglutinación empleando un antisuero preparado contra la cepa de referencia B-3263/91 (serovar A) (3), obteniéndose resultados positivos.

Dos aislamientos fueron tipificados genéticamente mediante la prueba de ERIC-PCR, observándose el mismo patrón de amplicones.

De acuerdo con otros autores, *O. rhinotracheale* puede ser un agente patógeno importante en explotaciones de pavos.

REFERENCIAS

1. Fitzgerald, S. L., Greyling, J. M., Bragg, R. R. Correlation between ability of *Ornithobacterium rhinotracheale* to agglutinate red blood cells and susceptibility to fosfomicin. Onderstepoort J. Vet. Res. 65:317-320. 1998.

2. Soriano, V. E., Longinos, G. M., Navarrete, G. M., and R. P. Fernández. Characterization and adherence tests of *Ornithobacterium rhinotracheale* isolates from Mexico. Proc. 49th West. Poultry Dis. Conf. Sacramento, California. p. 50. 2000.

3. Van Empel, P., Van Den Bosh, H., Loeffen, P., and P. Storm. Identification and serotyping of *Ornithobacterium rhinotracheale*. *J. Clin. Microbiol.* 35:418-421.

(Al artículo completo se publicará en *Avian Diseases*).

IN VITRO* EVALUATION OF VARIOUS ANTIBIOTIC AGAINST *MYCOPLASMA SYNOVIAE

***IN VITRO* MICROBIOLOGICAL DETERMINATION OF THE SUSCEPTIBILITY OF *MYCOPLASMA SYNOVIAE* TO FIVE ANTIMICROBIALS**

Ernesto Soto¹, Richard Yamamoto², Clemente Lemus¹ y Ariel Ortíz³

¹Facultad de Agricultura, Universidad Autónoma de Tepic, México. ²University of California-Davis, USA.

³FES-Cuatitlán, Universidad Nacional Autónoma de México, México

SUMMARY

The microdilution antimicrobial susceptibility test was used to determine the minimum inhibitory concentration (MIC) against WVU 1853 strain of *M. synoviae*, in agreement with NCCLS. Eight replicates were used in the trial. The test was concluded when a color change was observed in the positive control, meaning bacterial growth. The lowest and highest MIC's were obtained with tylosin tartrate, and lincomycin hydrochloride, respectively. Statistically significant differences ($P < 0.01$) were found between both drugs. No difference was observed between the MIC's for enrofloxacin HCl and chlortetracycline HCl, or any other way. No antimicrobial activity was determined with erythromycin estolate at the concentrations tested.

RESUMEN

Se utilizó la prueba de susceptibilidad antimicrobiana con microdilución, determinando la CIM hacia la cepa WVU 1853 de *Mycoplasma synoviae* de acuerdo al NCCLS. La prueba se dio por terminada cuando el grupo control positivo cambió el color indicando crecimiento bacteriano. Los resultados de la prueba realizada con ocho réplicas indican que la menor CIM fue obtenida con tartrato de tilosina y la mayor con clorhidrato de lincomicina, detectándose diferencias estadísticas significativas entre ellos ($P < 0.01$). No hubieron diferencias entre las CIMs para clorhidrato de enrofloxacin y clorhidrato de clortetraciclina, ni de cualquier otra forma. No se detectó actividad antimicrobiana hacia estolato de eritromicina en las diluciones probadas.

(The entire paper has been submitted to *Avian Pathology* for publication).

EFFECTO EN LA CANTIDAD DE PIGMENTO SINTÉTICO EN PLASMA DE POLLO DE ENGORDA DESPUÉS DE LA VACUNACIÓN CONTRA *EIMERIA ACERVULINA*, *E. MAXIMA*, *E. MIVATI* Y *E. TENELLA* Y TRATADO CON TOLTRAZURIL

SYNTHETIC PIGMENT PLASMA LEVELS IN BROILERS AFTER *EIMERIA ACERVULINA*, *E. MAXIMA*, *E. MIVATI*, AND *E. TENELLA* VACCINATION AND TREATMENT WITH TOLTRAZURIL

Tejeda VR¹, Petrone VM¹, Hernández VX¹.

¹Departamento de Producción Animal: Aves, Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia, Nacional Autónoma de México, México, D.F.

SUMMARY

This research evaluated synthetic pigment plasma levels in broilers after vaccination against *E. acervulina*, *E. maxima*, *E. mivati*, and *E. tenella*, and treatment with toltrazuril. At 24 days of age no synthetic pigment plasma difference was found between the vaccinates and the negative controls. At 31 days of age the vaccinated group showed no difference when compared with the vaccinated/challenged group. At 38 days of age the vaccinated/challenged/toltrazuril-treated group showed no difference when compared with the negative controls. The vaccinated group, the vaccinated/challenged group, and the challenged/toltrazuril-treated group showed no difference when compared with the vaccinated/challenged/toltrazuril-treated group. At 45 days of age all groups showed no difference with the negative control group, since no coccidia was present in the intestine.

RESUMEN

Se evaluó semanalmente a partir de la tercer semana y hasta 45 días de edad la cantidad de pigmento sintético en plasma de pollo de engorda después de haber sido vacunados contra *Eimeria acervulina*, *E. maxima*, *E. mivati* y *E. tenella* y tratados con toltrazuril.

A los 24 días de edad el grupo vacunado y el grupo testigo negativo no mostraron diferencia en la cantidad de pigmento en plasma. A los 31 días de edad el grupo vacunado es igual al grupo vacunado y desafiado. A los 38 días de edad el grupo vacunado, desafiado y tratado con toltrazuril es igual al grupo testigo negativo. El grupo vacunado, el grupo vacunado /desafiado y el grupo desafiado /tratado con toltrazuril son iguales al grupo que fue vacunado, desafiado y tratado con toltrazuril. A los 45 días de edad todos los

grupos fueron iguales al testigo negativo debido a la ausencia de *Eimeria* spp. en intestino.

INTRODUCCION

La coccidiosis aviar (CA) es un parasitosis de distribución mundial y actualmente es la de mayor importancia en el pollo de engorda afectando principalmente entre la tercera y sexta semana de edad. La CA produce una mala absorción de nutrientes y pigmentos, lo que ocasiona retraso en el crecimiento, alta conversión alimenticia, bajos niveles séricos de carotenos en el plasma, mala pigmentación cutánea, y grandes pérdidas al productor.

Para el control de la CA se puede usar el toltrazuril es un coccidicida que pertenece al grupo químico de las triazinonas simétricas que ejerce un efecto perjudicial sobre la mitosis y las mitocondrias. Provoca vacuolización del retículo endoplásmico en todos los estadios evolutivos intracelulares de la CA.

El toltrazuril no tiene ninguna relación con otros agentes anticoccidianos por lo que hasta la fecha no se han informado de Eimerias resistentes. Se usa en el agua de bebida y es efectivo para la reducción de lesiones intestinales producidas por la CA, disminuye las pérdidas de peso y mortalidad en la parvada, además de que puede ser usado como terapia y tratamiento intermitente en infecciones por Eimerias.

El objetivo de este trabajo fue evaluar la cantidad de pigmento sintético en plasma de pollo de engorda después de haber sido vacunados contra *Eimeria acervulina*, *E. maxima*, *E. mivati* y *E. tenella*, y tratados con toltrazuril.

MATERIAL Y METODOS

Se utilizaron 210 de pollos de engorda sin sexar de un día de edad. Los pollos fueron alojados en batería con calefacción eléctrica y consumieron alimento comercial con 65 ppm de pigmento amarillo sintético éster C30 (etil éster del ácido β -apo-8'-carotenóico) y

agua a libre acceso. Se formaron dos grupos de aves. El grupo "A" incluyó 120 pollos y el grupo "B" incluyó 90 pollos hasta los 20 días de edad.

El grupo "A" recibió cuatro vacunaciones (título de 426,000 ooquistes esporuados y viables/ml con 50% *Eimeria acervulina*, 11% *E. maxima*, 15% *E. mivati* y 24% *E. tenella*) vía oral con dosis (1x =1000 ooquistes) 1x, 2x, 3x y 4x, los días 5, 10, 15 y 20 de edad, respectivamente. El grupo "B" no recibió vacunación.

A los 25 días de edad 90 pollos del grupo "A" y 30 pollos del grupo "B" se desafiaron con dosis 80x. A los 32 y 33 días de edad 30 pollos del grupo "A" desafiados con 80x y 30 pollos desafiados con 80x del grupo "B" fueron tratados vía oral con toltrazuril en dosis de 7 mg/kg de peso corporal.

A los 39 días de edad se desafiaron con dosis 160x a 30 pollos del grupo "A" que fueron vacunados, desafiados con 80x y tratados con toltrazuril; y 30 pollos del grupo "A" que fueron vacunados y desafiados con 80x.

A los 39 días de edad se desafiaron con dosis de 160x a 30 pollos del grupo "B" sin tratar y a 30 pollos que fueron desafiados con dosis de 80x y tratados con toltrazuril. Los 30 pollos sobrantes del grupo "B" no tuvieron vacunación, desafío, ni tratamiento (testigo negativo). (Cuadro)

A 10 pollos de cada grupo de manera aleatoria y semanalmente a partir de los 24 días de edad fueron sangradas (1.5 ml) obteniendo una mezcla en proporción de 1:10 de EDTA:sangre de la vena radial y tres horas después de haber iniciado a ingerir alimento. Se extrajo 0.5 ml de plasma de cada muestra y se mezcló con 4.5 ml de acetona por medio de un agitador. De cada muestra se midió la densidad óptica con una longitud de onda de 478 nm.(Allen,1987)

RESULTADOS

A los 24 días de edad el grupo vacunado y el grupo testigo negativo no mostraron diferencia en la cantidad de pigmento en plasma. A los 31 días de edad el grupo vacunado muestra absorbancia de 0.440 y es igual al grupo vacunado y desafiado con 80x con absorbancia de 0.384. El grupo vacunado es igual al grupo testigo negativo con absorbancia de 0.532; el grupo desafiado con 80x con absorbancia de 0.205 es menor a los otros tres grupos. A los 38 días de edad el grupo vacunado, desafiado con 80x y tratado con toltrazuril con absorbancia de 0.315 es igual al grupo testigo negativo con absorbancia de 0.377. El grupo vacunado con absorbancia de 0.242, el grupo vacunado y desafiado con 80x con absorbancia de

0.257 y el grupo desafiado con 80x y tratado con toltrazuril con absorbancia de 0.257 son iguales al grupo vacunado, desafiado con 80x y tratado con toltrazuril con absorbancia de 0.315. A los 45 días de edad todos los grupos fueron iguales al testigo negativo con absorbancia de 0.119 (Cuadro).

DISCUSION Y CONCLUSIONES

A los 24 y 31 días de edad los pollos vacunados con *Eimeria* spp. la cantidad de pigmento en plasma es igual a los pollos no vacunados (testigo negativo). A los 31 días de edad, los grupos que fueron vacunados previamente con *Eimeria* spp la cantidad de pigmento en plasma es igual ante un desafío; en cambio un grupo que no fue vacunado y ante un desafío de *Eimeria* spp la cantidad de pigmento en plasma es menor.

A los 38 días de edad los pollos que han sido vacunados con *Eimeria* spp. son iguales a los pollos que presentaron un desafío y que fueron tratados con toltrazuril. Los pollos que fueron vacunados, presentaron un desafío y que fueron tratados con toltrazuril la cantidad de pigmento en plasma es igual a los pollos que no han tenido contacto con Eimerias. A los 45 días de edad los pollos vacunados con *Eimeria* spp., desafiados con *Eimeria* spp., tratados con toltrazuril y nuevamente desafiados con *Eimeria* spp. la cantidad de pigmento es igual a los pollos que no han tenido contacto con Eimerias (testigo negativo) debido a que ya no existen ciclos reproductivos de Eimerias hay ausencia de estas en intestino y se permite la absorción de pigmento.

REFERENCIAS

1. Aramadan, K, El-Sooud A, El-Bahy MM, Anticoccidial efficacy of toltrazuril and halofuginone against *Eimeria tenella* infection in broiler chickens in Egypt. Research in Veterinary Science 1997;62:175-178.
2. Allen CP. Physiological Responses of Chicken Tissue to Coccidial Infection: Comparative Effects of *Eimeria acervulina* and *Eimeria mitis* on Mucosal Mass, Carotenoid Content, and Brush Border Enzyme Activity. Poultry Science 1987;66:1306-1315.
3. Laczay P, Gabor V, Gabor S. Comparative studies on the efficacy of Sulphachloropyrazine and Toltrazuril for the treatment of cecal coccidiosis in chickens. International Journal for Parasitology 1995; 25 (6): 753-756
4. Piracés SF, Cortés CR. Factores que afectan la pigmentación del pollo de carne. X Ciclo de Conferencias Internacionales sobre avicultura. AMENA 1991: 103-127.

Cuadro 1. Media de la cantidad de pigmento plasmático medido por absorbancia de pollo de engorda vacunados contra *Eimeria* spp. y tratados con toltrazuril .

		Edad en días					
		24	31	38	45		
Vacunado "A"	0.921 ^a	Vacunado/ Desafío 80x	0.384 ^a	Vacunado/Desafío 80x	0.257 ^a	Vacunados/Desafío 80x	0.130 ^a
				Vacunado/Desafío80x/ Toltrazuril	0.315 ^{ab}	Vacunados/Desafío80x/ Toltrazuril/ Desafío 160x	0.162 ^a
		Vacunado	0.440 ^{ab}	Vacunado	0.242 ^a	Vacuna/Desafío 80x/ Desafío 160x	0.182 ^a
Testigo negativo "B"	0.905 ^a	Testigo negativo	0.532 ^b	Testigo negativo	0.377 ^b	Testigo negativo	0.119 ^a
				Desafío 80x/Toltrazuril	0.249 ^a	Desafío80x/Toltrazuril/ Desafío 160x	0.115 ^a
		Desafío 80x	0.205 ^c			Desafío 160x	0.109 ^a

Las diferentes literales indican diferencia estadística significativa ($p < 0.05$).

COMPLETE VP1 NUCLEOTIDE SEQUENCES OF FIELD GOOSE AND MUSCOVY DUCK PARVOVIRUS ISOLATES AND THEIR ATTENUATED DERIVATIVES

SECUENCIAS COMPLETAS DE LOS NUCLEÓTIDOS VP1 DE AISLAMIENTOS DE CAMPO DE PARVOVIRUS DE GANSOS Y PATOS RUSOS, Y SUS DERIVADOS ATENUADOS

H.J. Tsai*, C.H. Tseng, K. Mei Graduate Institute of Veterinary Medicine, National Taiwan University, 142 Chou-San Road, Taipei, Taiwan

RESUMEN

Analizamos las secuencias completas de los nucleótidos de la VP1 del parvovirus del ganso (*GPV*) y del parvovirus del pato ruso (*MDPV*) aislados en Taiwán, y estudiamos también sus derivados atenuados. Descubrimos que las cepas del *GPV* taiwanesas y de otros países comparten del 96.2 al 96.8% de homología en la secuencia de los nucleótidos de la VP1, y que las cepas del *MDPV* comparten del 98.2 al 98.3% de homología. Al mismo tiempo, la homología de las secuencias de los nucleótidos de la VP1 entre las cepas del *GPV* y las del *MDPV* fue sólo del 78.3 al 79.7%. Asimismo, hubo sólo aproximadamente 5% de divergencia entre los aislamientos de campo del *GPV* y el *MDPV* y sus derivados atenuados. Se concluye que el *GPV* y el *MDPV* son un grupo genético distinto y que su atenuación produjo un cambio genético de menor importancia en la PV1.

To understand the genetic relationships between the goose and duck parvovirus and their attenuated

derivatives, we analyzed the complete nucleotide sequences of viral structural protein (VP1) of a goose parvovirus (*GPV*) isolated in 1982 (1982F) and a Muscovy duck parvovirus (*MDPV*) isolated in 1990 (1990F), their attenuated derivatives (1982V and 1990 V), and a goose parvovirus isolated in 2001 (2001F). After comparing the nucleotide sequences of Hungarian isolates obtained from GenBank, we discovered that Taiwanese and Hungarian *GPV* strain (U25749) share 96.2% to 96.8% VP1 nucleotide sequence homology, and Taiwanese *MDPV* strains share 98.2% to 98.3% homology with Hungarian *MDPV* (U22967). VP1 nucleotide sequences homology between *GPV* strains and *MDPV* strains were only 78.3% to 79.7%. There was only about 5% divergence on *GPV* and *MDPV* between field isolates and their attenuated derivatives. It is concluded that *GPV* and *MDPV* are distinct genetic group and attenuation of the *GPV* and *MDPV* resulted in minor genetic change in VP1.

		Percent Identity								
		1	2	3	4	5	6	7		
Divergence	1		96.5	96.8	96.2	79.7	79.4	79.3	1	GPV U25749
	2	3.5		96.7	99.5	78.5	78.4	78.3	2	GPV 1982F
	3	3.2	3.3		96.3	78.9	78.8	78.6	3	GPV 1982V
	4	3.8	0.5	3.6		78.6	78.5	78.4	4	GPV 2001F
	5	21.4	22.7	22.4	22.7		98.3	98.2	5	MDPV U22967
	6	21.6	22.9	22.5	22.8	1.7		99.9	6	MDPV 1990F
	7	21.7	23.0	22.6	22.9	1.8	0.1		7	MDPV 1990V
		1	2	3	4	5	6	7		

Fig. 1. The homology and divergence of goose and Muscovy duck parvovirus viral protein 1 nucleotide sequences of Taiwanese field isolates, their attenuate derivatives and Hungarian isolates.

FRECUENCIA EN EL DIAGNÓSTICO DE LAS ENFERMEDADES AVIARES EN EL LABORATORIO DE DIAGNÓSTICOS CLÍNICOS VETERINARIOS DURANTE LOS DOS ÚLTIMOS AÑOS.

FREQUENCY OF POULTRY DISEASE DIAGNOSTICS IN DIAGNÓSTICOS CLÍNICOS VETERINARIOS IN RECENT YEARS

Diana Vázquez¹, Catalina Alvarado¹, Graciela Méndez¹, Agustín Morales¹, David Sarfati², Bernardo Lozano², Marco Rico¹, Juan García-García¹ y Ernesto Soto²

¹Diagnósticos Clínicos Veterinarios SA de CV. México. ²Laboratorio Avimex SA de CV. México.

SUMMARY

Samples from the states of Mexico, Morelos, and Hidalgo are typically submitted to this laboratory, located in central Mexico. Results reported herein correspond to broiler and broiler breeder flocks. The diseases/entities most frequently diagnosed in broilers include infectious bronchitis, colibacillosis, *Salmonella enteritidis*, *Ornithobacterium rhinotracheale*, infectious bursal disease, Marek's disease, coccidiosis, and cryptosporidiosis. In broiler breeders the most frequent diagnosis corresponded to *Mycoplasma synoviae* and *S. enteritidis*

RESUMEN

El laboratorio se localiza en la región centro de México y principalmente recibe muestras de los estados de México, Morelos e Hidalgo. Los resultados del presente trabajo corresponden a casos de pollo de engorda y reproductora pesada. Las entidades patológicas diagnosticadas con mayor frecuencia en el pollo de engorda fueron la bronquitis infecciosa, colibacillosis, *S. enteritidis*, *O. rhinotracheale*, Gumboro, Marek, coccidiosis y criptosporidiosis. En las reproductoras pesadas fueron *M. synoviae* y *S. enteritidis*.

Frecuencia de diagnóstico de las principales enfermedades de las aves (casos positivos sobre el total de muestras sospechosas).

Área	Etiología o enfermedad	2000	2001
Virología	Enfermedad de Newcastle (ENC)	10 / 849	0 / 963
	Influenza aviar (IA)	0 / 849	1 / 963
	Bronquitis infecciosa (BI)	45 / 81	8 / 85
	Laringotraqueítis aviar (LTI)	0 / 10	0 / 10
	Viruela aviar (VA)	0 / 10	2 / 10
Bacteriología	Haemophilus paragallinarum (Hpg)	3 / 20	1 / 12
	<i>Salmonella</i>	65 / 1010	69 / 971
	<i>Ornithobacterium rhinotracheale</i> (Ort)	1 / 40	5 / 22
	<i>Pasteurella multocida</i> (Pm)	2 / 16	3 / 11
	<i>Escherichia coli</i> (Ec)	148 / 363	367 / 460
Histología	Infección de la bolsa de Fabricio (IBF)	367 / 539	404 / 600
	Criptosporidiosis	30 / 33	31 / 31
	Micotoxinas	49 / 59	25 / 25
	Enfermedad de Marek (EM)	66 / 88	60 / 67
	Hepatitis con cuerpos de inclusión (HCI)	8 / 10	2 / 10
Serología	<i>Ornithobacterium rhinotracheale</i> (Ort)	129 / 218	340 / 496
	Pneumovirus (TRT)	68 / 618	46 / 165
	Leucosis mieloide J	29 / 1295	50 / 1148
	Leucosis linfoide	8 / 462	52 / 914
PCR	Mycoplasma synoviae (Ms)	30 / 53	70 / 98
Parasitología	Coccidiosis	432 / 537	309 / 403

DISCUSIÓN

Los aislamientos de ENC corresponden a la zona de La Laguna (norte de México) durante el brote que se presentó en los meses de marzo a mayo. El aislamiento de IA fue enviado a CPA para su identificación. El reporte final indica que se trató de un virus de baja patogenicidad. Los aislamientos de BI fueron serotipificados. Durante el año 2000 se determinó que 36 aislamientos fueron del serotipo Massachusetts (Mass), 1 cepa correspondió a Arkansas, 4 aislamientos pertenecieron al serotipo BL 56 y 4 aislamientos al serotipo DS57. Durante el año 2001 se aislaron únicamente cepas del serotipo Mass. TRT se detectó por pruebas de ELISA con relativa frecuencia, aumentando su porcentaje de seropositividad en el año 2001.

La detección de positividad para leucosis linfoide o leucosis mieloide tipo J en reproductoras ha sido relativamente baja.

Los resultados de *Salmonella* corresponden en un 100% a *S. enteritidis*. No se diagnosticó *S. pullorum* ó

S. gallinarum en ningún caso. El Ort ha sido aislado pero también determinado por pruebas de ELISA.

El diagnóstico de micotoxinas ha sido realizado principalmente por lesiones histológicas en hígado que sugieren este problema.

El diagnóstico de criptosporidiosis fue realizado al analizar histológicamente las bolsa de Fabricio. El diagnóstico de coccidiosis fue determinado mediante pruebas de Mc Master, detectándose principalmente *E. tenella*, *E. máxima* y *E. acervulina*.

CONCLUSIÓN

Las principales enfermedades y agentes etiológicos identificados en el pollo de engorda fueron la bronquitis infecciosa, el pneumovirus, la colibacilosis, *Ort* y *Ms* en problemas respiratorios. Las principales enfermedades inmunológicas detectadas fueron Gumboro y Marek, mientras que la coccidiosis y la criptosporidiosis se diagnosticaron como las enfermedades parasitarias más frecuentes.

Para las reproductoras pesadas, *S. enteritidis* y *Ms* fueron las infecciones mayormente detectadas.

INDIRECT ENZYME-LINKED IMMUNOSORBENT ASSAY FOR THE QUANTITATIVE DETECTION OF ANTIBODIES TO AVIAN ADENOVIRUS GROUP 1 SEROTYPE 4

ENSAYO DE INMUNOABSORCIÓN LIGADO A ENZIMAS INDIRECTO PARA LA DETECCIÓN CUANTITATIVA DE ANTICUERPOS CONTRA EL ADENOVIRUS AVIAR, SEROTIPO 4, GRUPO 1

M.A. Volkova, N.S. Mudrak, V.V. Drygin, V.V. Borisov, D.S. Surnev, A.A. Gusev

All-Russian Research Institute of Animal Health, Vladimir, 600900, Russia

RESUMEN

Los adenovirus aviares del serotipo 4, grupo 1 (AAV-4) se asocian con brotes del síndrome de hidropericardio en pollos y causan alta mortalidad. El objetivo de la presente investigación fue desarrollar una técnica de *ELISA* rápida, sencilla y sensible para detectar y cuantificar los anticuerpos contra el AAV-4 en suero de pollo. Los resultados mostraron que dicha prueba de *ELISA* se puede usar para la evaluación del estado inmunológico de las aves después de la vacunación, para el diagnóstico de laboratorio del síndrome de hidropericardio y para realizar pruebas de escrutinio en lotes de reproductoras y en parvadas libres de patógenos específicos, en busca de la presencia de anticuerpos contra el adenovirus aviar del serotipo 4, grupo 1.

Avian adenovirus group 1 serotype 4 (AAV-4) are associated with hydropericardium syndrome (HPS) outbreaks in chickens, causing high mortality. Diagnosis of HPS is done by either isolation of the virus or serology using an agar gel precipitation (AGP) and serum neutralization test. But they have low sensitivity or are time consuming and expensive. The aim of the present investigation was to develop a rapid, simple, and sensitive *ELISA* to detect and quantitate antibodies to AAV-4 in chicken sera.

This test utilizes purified 10% liver suspension of chicken, inoculated of AAV-4, as the coated antigen. A

chicken serum against AAV-4 with *ELISA* titer 1:3200 was used as positive control, normal SPF-chicken serum as negative control, and ABTS as a substrate. The absorbance values were read at 405 nm. Antibody titer of chicken sera samples was detected in the single working dilution from S/P (sample to positive) ratio. The equation for the calculated antibody titer was: $\log_{10}(T) = 2.8714 * \log_{10}(S/P) + 3.611$. The working dilution was established at 1:400; also the optimal absorbance values of positive and negative control sera and positive/negative threshold were established. The *ELISA* results were characterized as: positive ($T > 1:900$), doubtful ($1:225 < T < 1:900$) and negative ($T < 1:225$). We observed low cross-reactivity with reference sera against different avian adenoviruses group 1.

The results of testing by *ELISA* and AGP of 300 sera from vaccinated chicken and of positive and negative reference sera have shown that the lowest positive AGP+ titer corresponded to an *ELISA* titer of 1:1600. Taking into consideration the above results, an *ELISA* kit was formulated for antibody detection against AAV-4 in chicken sera. The *ELISA* kit can be used for evaluating the immune status of poultry after vaccination, for laboratory diagnosis of HPS and for screening breed and SPF- flocks for the presence of antibodies to avian adenovirus group 1 serotype 4.

DEVELOPMENT OF LIQUID-PHASE BLOCKING ENZYME-LINKED IMMUNOSORBENT ASSAY FOR THE QUANTITATIVE DETECTION OF AVIAN ADENOVIRUS GROUP 1 SEROTYPE 4

DESARROLLO DE UN ENSAYO DE INMUNOABSORCIÓN LIGADO A ENZIMAS DE BLOQUEO EN FASE LÍQUIDA PARA LA DETECCIÓN CUANTITATIVA DE ADENOVIRUS AVIAR SEROTIPO 4, GRUPO 1

M.A. Volkova, N.S. Mudrak, D.S. Surnev, V.A. Lobanov, G.W. Batchenko, V.V. Drygin,
V.V. Borisov, A.A. Gusev

All-Russian Research Institute of Animal Health, Vladimir, 600900, Russia

RESUMEN

El objetivo de la presente investigación fue desarrollar una prueba de inmunoabsorción ligada a enzimas, de bloqueo, en fase líquida, rápida, sencilla, sensible y específica (*LPB-ELISA*) para detectar y cuantificar el adenovirus aviar serotipo 4, grupo 1 (*AAV-4*) directamente en homogeneizados de tejidos de pollo. Encontramos que la *LPB-ELISA* se puede emplear para valorar la concentración del antígeno del *AAV-4* en materiales en bruto usados para producir vacunas y para detectar aislamientos de campo del citado virus.

The aim of present investigation was to develop a rapid, simple, sensitive, and specific liquid - phase blocking enzyme-linked ELISA (*LPB-ELISA*) to detect and quantitate avian adenovirus group 1 serotype 4 (*AAV-4*) directly in chicken tissue homogenates. Coated microplates *AAV-4* antigen from purified 10% liver suspension of chicken, inoculated of *AAV-4* were used to capture the excess of specific immunoglobulin after pre-incubation of them in liquid phase with the sample under the test. A hyperimmune chicken serum against *AAV-4* was used as blocking antibodies. Bound immunoglobulins were detected by anti-chicken

IgG peroxidase conjugate and substrate ABTS. The mixture of normal liver suspension pre-incubated with specific IgG was used as negative control, none of immunoglobulins added to the wells as background control. The working concentration of the antigen, the blocking serum and conjugate, and positive/negative threshold were established. The blocking percent in samples was calculated using the formula: $B(\%) = 100 - (100(OD_{sample} - OD_{background}/OD_{neg.control} - OD_{background}))$, where OD = optical density.

The *LPB-ELISA* results were characterized as: positive ($B\% > 30$), doubtful ($20 < B\% < 30$) and negative ($B\% < 20$). All samples were tested in twofold dilution method. Calculation of results was done from the end point of titration. The highest dilution of the sample giving $B\% > 30$ was taken as the virus titer.

We haven't observed cross-reactivity with reference control avian adenoviruses group 1. There was a significant correlation between the results of testing of 50 positive and negative reference and tissues samples by *LPB-ELISA*, PCR and AGP. *LPB-ELISA* was 100-200 times more sensitive than AGP. Thus, *LPB-ELISA* can be employed to assess *AAV-4* antigen concentration in raw materials used to produce vaccine and to detect field isolates *AAV-4*.

CRIOPRESERVACIÓN Y EVALUACIÓN FISIOLÓGICA DE LOS ESPERMATOZOIDES DE AVES

CRYO-PRESERVATION AND PHYSIOLOGICAL EVALUATION OF POULTRY SPERM CELLS

J. A. Herrera¹, J. A. Quintana², M. Betancourt¹, R. Fierro¹

1.- Departamento Ciencias de la Salud. D.C.B.S. U.A.M.-Iztapalapa. México.

2.- Departamento de Producción Animal: Aves. Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia, U.N.A.M. México.

SUMMARY

The semen of domestic birds can be cryo-preserved in a liquid medium. This allows for the creation of semen banks of commercial and wild species. There are only a few papers reporting the basic evaluation of the physiology and the fertilizing ability of sperm cells. Therefore, we propose to determine the effect of the cryo-protectors dimethyl sulfoxide (DMSO) and polyvinylpyrrolidone (PVP) among the indicators of the basic evaluation, as well as carbohydrate distribution on the membrane surface by fluorescence microscopy, and flow cytometry.

RESUMEN

El semen de aves domésticas se puede conservar en medio líquido y criopreservado. Esto permite la creación de bancos de semen para especies comerciales y silvestres. No existen suficientes trabajos que integren la evaluación básica con la fisiología y capacidad fertilizante de los espermatozoides. Por esto, se propone determinar el efecto de los crioprotectores dimetilsulfóxido (DMSO) y polivinilpirrolidona (PVP) en los indicadores de la evaluación básica, así como la distribución de carbohidratos en la superficie membranal mediante microscopía de fluorescencia y citometría de flujo.

INTRODUCCIÓN

En 1937 se describió un método para obtener semen de gallos, con el propósito de realizar inseminación artificial (IA), conservación y/o evaluación seminal. La IA se ha utilizado como un método para mantener y reproducir líneas puras de reproductores primarios y cuando la reproducción se interfiere por condiciones de clima adverso e incompatibilidad física. El almacenamiento del semen en medio líquido es una práctica común y se puede conservar con capacidad fertilizante hasta por 24 horas. Para esto, es necesario proporcionar oxígeno, mantener el pH en intervalo de 6.0 a 8.8, osmolaridad entre 250 a 460 mosmol/kg H₂O y mantener a temperatura de 5-7°C (1).

La criopreservación espermática se desarrolló hace aproximadamente 50 años. Esta ha permitido la creación de bancos de semen en la industria avícola y la conservación de las células germinales de individuos o especies que están en riesgo de extinguirse. A pesar de los esfuerzos realizados en el campo de la criopreservación espermática, pocas técnicas permiten supervivencias elevadas. Los crioprotectores conocidos se dividen en dos grupos: los que atraviesan la membrana celular tales como glicerol, eritritol, adonitol, dimetilsulfóxido (DMSO) y dimetilacetamida (DMA), y los que actúan desde el exterior, como la glucosa, fructosa, sacarosa, lactosa y polivinilpirrolidona (PVP).

En la IA, la evaluación del semen proporciona información de su calidad y de la concentración espermática en eyaculados posteriores. Se haincrementado el uso de técnicas *in vitro* para determinar el efecto de la conservación como el daño por criopreservación, entre éstas están: la morfología por microscopía de luz y electrónica, movilidad, prueba de resistencia osmótica, tasa de utilización de oxígeno, niveles de ATP, peroxidación de lípidos, integridad de membrana plasmática, viabilidad por tinción y unión (2) y penetración *in vitro* de proteínas en la membrana perivitelina(3).

No existen suficientes trabajos que integren la evaluación básica, con la fisiología y capacidad fertilizante de los espermatozoides recién eyaculados y/o criopreservados de aves domésticas y/o silvestres, por lo cual se propone investigar este tema mediante la siguiente metodología.

En espermatozoides de gallo (*Gallus domésticus*), faisán de collar (*Phasianus colchicus*) y hoco faisanes (*Crax rubra*), se analizarán dos crioprotectores, DMSO y PVP. Se determinarán los indicadores de evaluación básica. Evaluación específica, mediante microscopía de fluorescencia y citometría de flujo (4) para evaluar la viabilidad, con Rodamina, (R-123), y la distribución de carbohidratos en la superficie membranal, con lectinas

conjugadas a isotiocianato de fluoresceína (FITC): *Triticum vulgaris* aglutinina (WGA), que se une a residuos de N-acetilglucosamina y/o ácido siálico; *Ulex europaeus* aglutinina (UEA) a residuos de fucosa y *Concanavalina ensiformis* aglutinina (Con-A), a residuos de manosa. La fertilidad se evaluará mediante IA de hembras de la misma especie para determinar la proporción de huevos fértiles mediante la incubación artificial de éstos durante el periodo de IA (5).

REFERENCIAS

1. Etches, J. R. (1996). Artificial insemination. En *Reproduction in poultry*, pp. 234-262. Edited by INTERNATIONAL, C. Cambridge.

2. Donoghue, A. M. Wishart, G. J. (2000). Storage of poultry semen. *Anim Reprod Sci* 62:213-32.

3. Barbato, G. F., Cramer, P. G. Hammerstedt, R. H. (1998). A practical in vitro sperm-egg binding assay that detects subfertile males. *Biol Reprod* 58:686-99.

4. Fierro, R., Daniel, M., Foliguet, B., Bene, M. C., Barbarino-Monnier, P., Faure, G. C., Grignon, G. (1996). Acrosome reaction of human sperm: application of TEM/flow cytometry. *Advances in Contraceptive Deliver Systems* 12:109-111.

5. Van Voorst, A. Leenstra, F.R. (1995). Fertility rate of daily collected and cryopreserved fowl semen. *Poult Sci* 74: 136-40.

EVALUACIÓN DE VACUNAS INACTIVADAS CONTRA INFLUENZA AVIAR

EVALUATION OF KILLED AVIAN INFLUENZA (IA) VACCINES

M.V.Z. Eduardo Lucio Decanini, M.V.Z. Daniel Marrufo Villa, M.V.Z. Enrique González Escobar.¹

¹Investigación Aplicada S.A. de C.V., 7 Norte No. 416 Col. Centro Tehuacán, Pue, México.

SUMMARY

Several Newcastle disease/avian influenza vaccines, and vaccination programs were evaluated in a poultry company located in central Mexico. As a result of this field study, birds vaccinated at 7 days of age with the ENC+IA combination vaccine, but non vaccinated against infectious bronchitis (BI) or infectious bursal disease (IBF) showed a better performance than those vaccinated against IA at 14 days and also immunized against BI and IBF (intermediate plus) after challenge with a low pathogenicity IA virus. A better bird performance was also seen with high antibody levels against IA, as compared with those having low titers.

RESUMEN

En una empresa avícola del centro de México se evaluaron diferentes vacunas y calendarios de vacunación contra la enfermedad de Newcastle e Influenza aviar. Como resultado del estudio de campo se observó que las aves vacunadas a 7 días de edad con la vacuna combinada ENC+IA y no vacunadas contra BI ni contra IBF cepa intermedia agresiva, tuvieron, después de ser desafiadas con el virus IA de baja patogenicidad mejor comportamiento productivo que aquellas vacunadas contra IA a los 14 días y también inmunizadas contra BI e IBF cepa intermedia agresiva. También se observó un mejor comportamiento de las

aves con niveles altos de anticuerpos contra IA comparado con aquellas que tuvieron títulos bajos.

INTRODUCCIÓN

La presencia de un virus de influenza aviar (IA) fue reconocida oficialmente en México el mes de Mayo de 1994. El virus fue clasificado como un virus H5N2 de baja patogenicidad. Para el fin de año se estaban reportando los primeros brotes de alta patogenicidad debidos a la mutación del virus. A partir de este momento, se autorizó el empleo de vacunas en contra de la IA en nuestro país, cuyo objetivo primordial estaba centrado en evitar la presentación y las pérdidas debidas a los brotes de IA de alta patogenicidad. El virus de alta patogenicidad fue erradicado de nuestro país para el año de 1995. Sin embargo, prevaleció la presencia del virus de baja patogenicidad dando como resultado bajas en la productividad y propensión de las aves a sufrir problemas respiratorios complicados.¹

El empleo de la vacunación ha sido una herramienta en la Campaña para el control y erradicación de la IA en México. Para ello, las autoridades sanitarias expidieron una normativa que especifica los criterios para la producción de las vacunas y la calidad que deben reunir. Aunque la norma para el control y erradicación se encuentra en revisión, el empleo de las vacunas se ha permitido

únicamente con la autorización de las autoridades sanitarias.

Los criterios de calidad que se han establecido en nuestro país, así como los modelos existentes a nivel mundial para la evaluación de las vacunas contra la IA consisten en evaluar la capacidad de la vacuna para evitar la mortalidad causada por el virus de la IA, en el caso de México para el virus de alta patogenicidad. Los estudios realizados por las autoridades sanitarias han indicado el adecuado funcionamiento de todos los biológicos empleados para proteger a las aves desafiadas contra la mortalidad causada por el virus de alta patogenicidad. Sin embargo este virus no ha estado presente en México desde 1995, mientras que el virus que ha estado involucrado en pérdidas para los productores debidas a problemas respiratorios complicados ha sido el virus de baja patogenicidad.⁹ Aunque existen trabajos que claramente establecen los beneficios de inducir altos niveles de anticuerpos para disminuir la reproducción viral y por ende el número de partículas virales excretadas durante la infección en el caso de vacunas inactivadas, no existe un modelo de evaluación que claramente le indique al médico veterinario si existen diferencias apreciables en parámetros productivos con vacunas de diferentes calidades medidas por la cantidad de anticuerpos inducida.^{2,3,5} Por otra parte, algunas experiencias en el uso de vacunas contra la IA en México incluye la detección de problemas en algunos de los productos comerciales en cuanto al balance de anticuerpos para las fracciones de Newcastle e IA y en la consistencia de la respuesta serológica de lote a lote.¹

El virus vacunal de la bronquitis infecciosa ha sido empleado en el laboratorio en modelos que buscan la reproducción de un cuadro de enfermedad respiratoria crónica complicada, tal como se presenta en el campo.

Existen en el mercado veterinario mexicano dos tipos de vacunas aprobadas contra la IA, siendo la más utilizada la vacuna emulsionada en aceite (H5N2) aplicada por vía subcutánea, misma que toma alrededor de 3 a 4 semanas postvacunación para producir los máximos niveles de anticuerpos. También existe una vacuna recombinante resultado de la inserción de material genético del virus de la IA en un poxvirus de la Viruela Aviar, que le confiere la capacidad de expresar la hemoaglutinina del virus de la IA en su superficie.^{1,6,7,8}

OBJETIVO

Establecer un modelo de evaluación de vacunas contra la IA que permita medir diferencias en la calidad de las vacunas para evitar problemas respiratorios secundarios, empleando una prueba de desafío con un virus de baja patogenicidad combinado con un virus vacunal de la bronquitis infecciosa y evaluar la

respuesta serológica y de protección al desafío empleando el modelo descrito en aves que recibieron una vacuna combinada ENC-IA o emulsiones monovalentes para las fracciones.

MATERIAL Y MÉTODOS

Las aves empleadas en el estudio se alojaron en una granja de pollo de engorda ubicada en el centro del país bajo condiciones de explotación comercial común. Se seleccionaron cuatro casetas, cada una de 15,000 pollos de engorda de un día de edad, a los cuales se le aplicó uno de tres calendarios de vacunación diferentes con la finalidad de evaluar el nivel de anticuerpos y por lo tanto de protección que confirieron las vacunas emulsionadas contra la ENC e IA unitarias y bivalentes y el papel que tienen sobre éstas la vacuna a virus vivo contra la Bronquitis Infecciosa (BI). Los calendarios de inmunización quedaron integrados como se describe en la gráfica 1.

A los grupos A C y D se les aplicaron vacunas emulsionadas producidas por el mismo laboratorio (Laboratorio I) a diferencia del grupo B que recibió vacunas de otro laboratorio (Laboratorio B). Las vacunas emulsionadas fueron aplicadas por vía subcutánea en la parte posterior media del cuello. Los biológicos a virus vivo contra la ENC fueron cepa La Sota y para la BI cepa Massachusetts y se suministraron a las aves por instilación ocular. Las vacunas contra la IBF fueron cepa tipo Lukert intermedia en el agua de bebida. A los 16 días de edad se tomaron 10 pollos de cada grupo y se trasladaron al laboratorio para alojarlas en unidades de aislamiento tipo Horsfall-Bauer con aire filtrado a presión negativa. Los 4 grupos fueron desafiados a los 21 días de edad aplicando 0.03 ml de un virus de baja patogenicidad H5N2 del virus de IA (10^4 DIE₅₀/ml) por vía ocular. A los 14, 21, 29 y 36 días de edad se tomaron 10 muestras de sueros de las aves de cada grupo alojadas en las unidades de aislamiento, con la finalidad de evaluar el comportamiento de anticuerpos contra la IA y la ENC. A las muestras de sueros se les realizó la técnica de Inhibición de la Hemoaglutinación (HI) para IA empleando la prueba oficial y 8 UHA para la prueba de HI contra la ENC. A los 29 días de edad se tomaron los pesos corporales (aves sobrevivientes al desafío de todos los grupos), al igual que a las aves de los grupos A, B y C que fueron pesadas a los 45 días de edad en la granja. A todas las aves se les realizaron las mismas prácticas de manejo de acuerdo a las que normalmente se llevan a cabo en la granja y se les proporcionó alimento balanceado con iguales características nutricionales y en la misma disponibilidad.

RESULTADOS

En la gráfica 1 se muestran los resultados serológicos de los títulos de anticuerpos producidos por

la aplicación de las vacunas emulsionadas y la respuesta al desafío, en donde podemos observar que en las aves a las que se les aplicaron las vacunas emulsionadas bivalentes (ENC-IA) a los 7 días de edad presentaron las mayores curvas de anticuerpos (C y D), en el caso de las vacunas de ENC e IA aplicadas a los 7 y 14 días de edad respectivamente (Grupos A y B) se encontraron curvas de anticuerpos más bajas, siendo menor aún la cantidad de anticuerpos de la vacuna producida por el Laboratorio B (Grupo B), quien supera el nivel de 5 logaritmo base dos, una semana después que los grupos A y D y dos después del grupo C. Para la ENC se observaron curvas de anticuerpos con un comportamiento similar para los cuatro grupos. En el caso de la prueba de potencia-desafío se encontró que las aves del grupo A presentaron un porcentaje de mortalidad del 26.7%, grupo B de 40%, grupo C de 26.4% y grupo D de 0%. Finalmente en relación a los pesos corporales a los 29 días de edad los pollos sobrevivientes del grupo A presentaron un peso promedio de 1.051 Kg., las de grupo B 0.961 Kg., grupo C de 1.240 y 1.150 Kg. para el grupo D; los pesos corporales a los 45 días de edad de aves en granja y sin desafío aparente fueron de 2.066 Kg. para el grupo A (Laboratorio I), de 2.020 Kg. para el grupo B (Laboratorio B) y el Grupo C de 2.055 kg. (Laboratorio I).

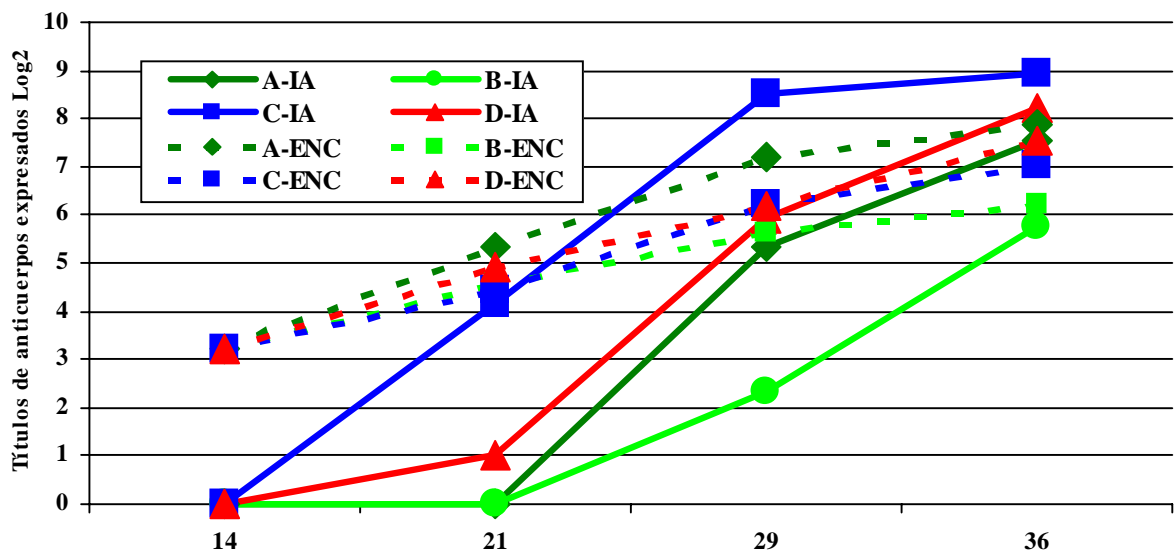
DISCUSIÓN Y CONCLUSIONES

- En este trabajo se observó que las aves inmunizadas con la vacuna (I) a la edad ideal (7 días para esa zona) obtuvieron mayores niveles de anticuerpos y un comportamiento superior en cuanto a viabilidad y ganancia de peso comparado con las aves inmunizadas con la vacuna (B). Aunque hay reportes de protección contra (IA) aún cuando se tienen bajos niveles de anticuerpos, este estudio muestra que las aves con niveles de anticuerpos superiores tuvieron mejor viabilidad y comportamiento productivo.
- Las curvas de anticuerpos para la ENC fueron satisfactorios o protectivos ante un posible desafío de campo y no se observaron diferencias entre la aplicación de vacunas emulsionadas unitarias y bivalentes contra la ENC.
- Se observó que las aves a las cuales se aplica la vacuna de (BI) a los 18 días de edad tuvieron un comportamiento negativo. Esto nos confirma que en algunos casos la vacuna contra BI puede fungir como complicante de (IA). También se observó en el estudio un deterioro en el comportamiento de las aves así como de sus parámetros productivos (Grupos A, B y C).

REFERENCIAS

1. Arriola J. M. Experiencias de campo en el uso de vacunas contra Influenza Aviar. Simposio Internacional sobre Influenza Aviar, Sociedad Venezolana de Veterinarios Especialistas en Aves 4 y 5 noviembre 1999, Maracay Venezuela.
2. Beard W. C. The role of vaccines and vaccination. Memorias del Third international symposium on Avian Influenza. Madison Wisconsin USA Mayo 27-29 1992. International Organizing Committee Avian Influenza.
3. Brugh, M. Beard C. W., Stone H. D. Immunization of chickens and turkeys against avian influenza with monovalent and polyvalent oil emulsion vaccines. *Am. J. Vet Res.* 40:165-169. 1979.
4. Cowen B. S., Wilson R.A., Harris S. K., Hyde R. L., Pearson, J. E. Avian Influenza Vaccine (H5n2) Studies In light and heavy breeds of chickens. Western Poultry Disease Conference. Mayo, 1986.
5. Donahoe, J.P., Inactivated Avian Influenza Whole Virus Vaccines. *Proc. Fourth International Symposium on Avian Influenza.* May 1997. 228-236
6. Halvorson A. D. Experience With Avian Influenza Control In Minnesota. Extension Veterinarian-Avian Health Agricultural Extension Service University of Minnesota Western Poluty Deseas Conference Proceedings Marzo 1995.
7. Stone, H.D. Efficacy of avian influenza oil-emulsion vaccines in chickens of various ages. *Avian Dis.* 31:483-490. 1987.
8. Webster, R. G. Enfrentando al Virus de la Influenza Aviar H5N2 Altamente Patógeno. II Curso de Actualización sobre Influenza Aviar. ANECA México D.F. Noviembre 1994. 36-47
9. Wood, J M., Kawaoka, Y., Newberry, L. A., Bordwell E, Webster, R.G. Standardization of inactivated H5N2 influenza vaccine and efficacy against lethal A/Chicken/Pennsylvania/1370/83 infection. *Avian Dis.* 29 867-872 1985.

TÍTULOS DE ANTICUERPOS CONTRA INFLUENZA AVIAR Y ENFERMEDAD DE NEWCASTLE (Expresados en Log₂).



Calendario de Vacunación	GRUPO					EDAD EN DÍAS				
	5	7			14	16	21			
A	IBF	ENC emulsión, ENC virus vivo y BI virus vivo.			IA emulsión	IBF	ENC virus vivo			
B	IBF	ENC emulsión, ENC virus vivo y BI virus vivo.			IA emulsión	IBF	ENC virus vivo			
C	IBF	IA-ENC emulsión, ENC virus vivo y BI virus vivo.			-----	IBF	ENC virus vivo			
D	IBF	IA-ENC emulsión y ENC virus vivo.			-----	-----	ENC virus vivo			

ORGANIC CHICKEN PRODUCTION

AVICULTURA ORGANICA

Jon Ratcliff

Church Farm Barn, Chapel Lane, Milton, Banbury, Oxon, UK

RESUMEN

Una serie de factores, en su mayoría relacionados con la seguridad alimentaria (resistencia bacteriana a los antibióticos, encefalopatía esponjiforme del bovino, intoxicación con dioxinas, etc.) ha hecho que pequeños pero poderosos segmentos de consumidores en países primermundistas, principalmente europeos, exijan a sus gobiernos la imposición de medidas tendientes a la producción pecuaria “orgánica”. Existe todavía mucha confusión sobre lo que significa este término, pero en general es la oposición a la producción intensiva y la engorda de animales con raciones que llevan aditivos artificiales. Avicultura orgánica es pues, la producción de pollos en pastoreo “lo que da a la carne mejor sabor y textura” y, además, su alimentación es a base de materiales producidos orgánicamente y sin antibióticos promotores del crecimiento. El costo de producción más que duplica al de la avicultura intensiva.

People who have been in the European poultry industry for more than 30 years are witnessing a return to systems of management that were common before intensification transformed the industry. Legislation, particularly in the EU, has been unforgiving to the industry particularly in relation to welfare and feed additives. This has led to a small sector of the industry returning to traditional chicken production to supply a high premium niche market. Mainstream intensive production has also developed in response to consumer pressure resulting in a range of systems that although not true organic, are referred to as free range and drug or additive free.

The last ten years has seen a number of high profile food scares in Europe which include Bovine Spongiform Encephalopathy (BSE), salmonella and dioxin poisoning. The most recent of these scares, dioxin contaminated animal feed in Belgium, served to highlight the ineffectiveness of self regulation within the food industry and strengthen the deep distrust felt by most European consumers towards political efforts to regulate food safety. Against this general distrust felt by most consumers towards commercial chicken production, a combination of factors has led to the growth of the organic and additive or drug free sectors. Firstly, there are those consumers, mainly in Europe, that have been against intensive chicken production, preferring instead the slower growing free range system that is claimed to produce a mature chicken

with better flavour and texture. Secondly, there has been the move away from in-feed antibiotic growth promoters and other additives due to concerns about human resistance to antibiotics. Recent studies, such as DanMap from Denmark, have highlighted the decline in antibiotic resistance in *Enterococcus faecium* following the removal of antibiotic growth promoters in 1995. Thirdly, a very small percent of consumers have supported the return to organic chicken production, free of any additives and only using organically produced feed materials.

Organic production in the UK is controlled by a governing body (UKROFS) which has to comply with the European standards for organic feeds and systems. Until last year the requirements for organic chicken production were based on a free range system of production fed a ration derived from seventy percent organic raw materials, restrictions on the use of additives such as growth promoters but no restriction on flock sizes. Last year, in an attempt to restrict large scale commercial production of organic chicken, the rules were significantly tightened. Flock size was limited to 4800, the minimum content of organic raw materials was raised to eighty percent and perhaps most alarming of all, synthetic amino acids were also banned. This move has had serious welfare implications because of resulting vent pecking and cannibalism. UKROFS has been widely criticized for the move to ban synthetic amino acids, but within Europe countries such as Germany support the move. Needless to say these changes have effectively stopped any further expansion into the organic production. The size of the market is less than 3 percent and has peaked. In the UK a surplus of organic eggs and chicken has led to a significant fall in prices. The cost of organic production is at least twice that of commercial broiler production and failure to recover these costs makes the venture financially unviable. Supermarkets supply most of the organic products sold in Europe and retail prices are around five times that of normal commercial chicken.

France has traditionally been the leader in free range chicken production in Europe with the Label Rouge system. Chickens are reared outdoors according to strict regulations that are audited by the French Agriculture department. Although not true organic, it is a system that has been extremely successful, accounting for around thirty percent of the French

market. Other countries have followed with similar systems of production although market share elsewhere in Europe is not as great as in France. Many consumers consider Label Rouge to be an affordable system that incorporates many of the ethics of organic production, but without the requirement to feed organic feed materials, although it does require a diet that excludes any animal protein.

Intensive indoor chicken production has also adapted to the demand from consumers and supermarkets to end the reliance on antibiotic growth promoters (AGPs). The EU ban on avoparcin in 1997 was a clear signal that politicians were beginning to take seriously consumer concerns surrounding the potential risk of the transfer of antibiotic resistant micro-organisms from animals to humans arising from the feeding of antibiotic growth promoters. The ban was extended by the EU in 1998 to include tylosin phosphate, zinc bacitracin spiramycin and virginiamycin, leaving only avilamycin and flavomycin as the two growth promoters currently registered for use in pigs and poultry. The EU has signaled the likely ban on the remaining growth promoters within two years. However, certain retailers, including the UK's largest and most influential supermarket group, Tesco, have taken their own lead in implementing a complete ban on AGPs in broiler feeds. This has come on the back of a number of significant developments within Europe within the past few years.

Sweden and Denmark implemented a voluntary ban on AGPs in 1986 and 1997 respectively. Their

experience has been well documented and demonstrated that the impact on animal performance and health has been less than expected. Their strategy not only focused on alternative products but the type of in-feed coccidiostat used (ionophore or chemical), stocking density, ventilation, hygiene standards, chick quality and feed composition. In October 1999, the UK's largest poultry company, Grampian Country Food Group, announced the removal of AGPs from all broiler and breeder feed. Although not the first company to do so, the impact from a volume perspective was very significant. Their decision came on the back of extensive trials with alternative products, under commercial conditions, over a two year period in conjunction with a review of management practices. Significantly, there were no reported detrimental effects with regard to bird health, suggesting there would be no greater use of therapeutic antibiotics to treat flocks. As a result, most other chicken producers in the UK now exclude all antibiotic growth promoters but use alternative products of which the most successful would be organic acids, essential oil extracts and mannan oligosaccharide.

Not surprisingly, the consumer is often confused by the many different systems of production that are labeled organic or drug free. Price, for many consumers, is the limiting factor and that is why the lower cost alternatives to organic have been more successful. The policy of the commercial broiler industry to remove antibiotic growth promoters has been widely applauded.