

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

April 9-12, 2008 Puerto Vallarta, Jalisco, Mexico



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

9 al 12 de abril de 2008 - Puerto Vallarta, Jalisco, México

IN MEMORY OF “ROSY”

Arnold S. “Rosy” Rosenwald, Extension Poultry Pathologist, Emeritus, University of California, Davis, whose career and contributions to poultry medicine spanned more than 70 years, died in Davis, CA, Jan. 23, 2008. He was 98. “Rosy” was born in 1909 in Albuquerque, in what was then the Territory of New Mexico. Fittingly, his birth was contemporary with the passing of the Smith-Lever Act (1914) establishing the Extension Service in the US, a service in which Rosy would devote a large part of his professional career.

Upon receiving his veterinary degree from Kansas State University in 1936, Dr. Rosenwald took his first professional position at the Department of Veterinary Medicine, Oregon State University because “there was a job and a challenge.” Here he learned first-hand under the tutelage of Dr. W. T. Johnson of many serious diseases afflicting the poultry industry at the time, such as pullorum, coccidiosis, fowl pox, and erysipelas.

Between 1942 and 1946, Dr. Rosenwald was a veterinary officer with the rank of captain in the Veterinary Corps of the United States Army, where he served as a veterinary bacteriologist for the War Department’s Special Project Division.

After serving in the army, Rosy accepted a position as Extension Poultry Veterinarian at the University of California in 1946 (the first Extension veterinarian for UC dedicated solely to poultry). He spent 30 years at UC, first at Berkeley, then from 1951 on at Davis, finally “retiring” in 1977. During those eventful years, he took a sabbatic leave to complete a Ph.D. degree at the University of Wisconsin. Even after official retirement, Rosy maintained a frequent presence in the UCD Extension hallway until just recently. “For more than 30 years after his retirement, Dr. Rosenwald continued to play an active role in maintaining a collegial network of professionals in industry and academia,” says Carol Cardona, Extension Poultry Veterinarian at UC Davis and close friend of Rosy’s.

Dr. Rosenwald's contributions to the poultry industry were numerous, but most importantly was his unique ability to communicate and extend knowledge from the laboratory to the field. “I don’t believe there was a person trained in poultry at any level at UC Davis who didn’t have Rosy as a part of their training program—he was just that influential,” says Arthur Bickford, former associate director of the California Animal Health and Food Safety Laboratory. “Though diminutive in stature, Rosy was a giant in the field.” Many former students and interns have been influenced by Rosy’s problem-solving approach to disease investigation, and learned to appreciate his statement that, “it’s no sin to say ‘I don’t know.’ But it is wrong to indicate that you really don’t care.”

In 1967, Rosy initiated the Annual Poultry Health Symposium for poultrymen, which continued until 1982 as an agricultural Extension Service activity in coordination with the Western Poultry Disease Conference. “He was the first person I knew of from the university to come down to Modesto to talk to the members of the poultry industry at the Ag Extension office—he was extremely informative about poultry diseases,” says Jim West of the J.S. West Milling Company, a member of the Pacific Egg and Poultry Association. “The industry is losing one of our finest teachers.”

Dr. Rosenwald was an ambassador of good-will and “extender” of knowledge to the scientific and lay community at the regional, national and international levels.

The Western Poultry Disease Conference (WPDC), originally known as the Western States Poultry Disease Worker's Conference until 1957, was initiated in 1951 by Rosy and a small group of veterinarians from private practice, the California Department of Food and Agriculture, and the University, as a means of exchanging ideas on regional poultry health problems.

The close international ties that the WPDC has had, in particular with its colleagues in Mexico and Latin America, may be traced directly to Rosy. His close relations with the Sonora group (Gabriel Galvan, Celedonio Garrido and Eduardo Rivera) helped in the creation of the oldest poultry association in Mexico (APYZAN). He strongly encouraged their participation in WPDC and promoted the nomination of Gabriel Galvan as Program Chairman of WPDC in 1976. Rosy attended and strongly supported the Asociación Nacional de Especialistas en Ciencias Avícolas (ANECA) since its very first annual meeting in Guadalajara, Mexico, bringing WPDC proceedings and other materials for sale (profits to go to ANECA). Everybody was a recipient of Rosy’s generosity; upon arrival in Mexico, his suitcases were stashed full of whiskey and cigarettes to be abundantly distributed among the group. When alcohol and tobacco became “politically incorrect” health-wise, he brought pistachios, almonds, and other goodies instead. Rosy attended every annual ANECA meeting until 2006 as their guest of honor.

He insisted on having simultaneous translation from English to Spanish at the WPDC. This translation service began in 1976 and continued until 1998. It served as a bridge during this period facilitating the attendance of many Spanish-speaking participants not proficient in English who may not have come had translation not been available.

The mutually beneficial relationship between WPDC and ANECA, nurtured by Rosy, has also been exemplified by periodic joint meetings held in Mexico, starting in 1980 in collaboration with Angel Mosqueda who calls Rosy “everybody’s friend, one of the brightest minds among the avian pathologists, with a huge heart.” Relations between WPDC and ANECA grew stronger with Rosy’s support for these joint meetings. He was always very attentive to the needs of the Latin American veterinarians, drawing attendance all the way from Mexico to Argentina. There is no doubt Rosy was justly proud of his role in bringing together these close ties with our neighbors to the South and expanding it later to the True North, bringing the WPDC to Vancouver in 1999 and 2005.

Rosy was the “formal” secretary for the WPDC from 1972 through 1979. Beginning in 1980 Dr. Rosenwald was appointed as secretary-treasurer. Not only did he serve in these two offices, but also as program chair mentor, promoter of speakers and attendees, fund-raiser, industry liaison, symposium supporter, travel agent, publicity officer, proceedings editor and producer (until 1985), proceedings sales and marketing, problem solver, and welcome committee. To Rosy no detail was too large or too small to ensure the success of the conference and the well-being of every participant.

Many fondly remember the open house events at the Rosenwalds on “A” Street, for which a special thanks is in order to his supporting wife Jo. A deep debt of gratitude is due to Jo for her unwavering support given to Rosy over the many years. Many people, particularly those of ANECA, express their heartfelt thanks to Jo for the warmth and kindness she has shown towards them.

Rosy and Jo often invited WPDC attendees and spouses from other countries for dinner and introduced them to researchers who had common interests. Rosy made special efforts to facilitate potential collaboration among these groups. Innumerable times he transported WPDC guests to and from the airport and other places. They would get into the car, up to seven or so piled on top of each other, for the ride to their destination. This act of kindness continued until he wasn’t allowed to drive anymore – at the age of 93.

Rosy loved to talk on the phone. Serving as program chair for the WPDC, David Frame recalls that Rosy often called to chat, sometimes three or four times a week. “I loved every minute of it and learned so much from him – particularly of his generosity.” Ernesto Soto adds that he maintained a close relationship with Rosy. “For several years we had phone conversations until in spite of his hearing aids he was not able to hear. I used to call him ‘Grandpa.’”

A propensity to persuade people to his way of thinking was one of Rosy’s exceptional attributes. Rich Chin says of Rosy, “I would say that the one word that comes to mind when thinking of Rosy is ‘persistence.’ Whatever he was working on, whether seeking contributions to WPDC, promoting an individual for a position or award, or trying to prove a point, he never backed down and, in the end, got his way.” Benjamin Lucio remembers Rosy “sweet-talking” a customs officer into letting him through with bottles of whisky and cigarettes for his friends of ANECA at the Puerto Vallarta airport, and getting away with it!

Dr. Rosenwald served on the 1959 committee of the National Academy of Sciences National Research Council to develop *Methods for the Examination of Poultry Biologics*, the first report of its kind.

He was a Charter and Lifetime member of the American Association of Avian Pathologists (AAAP), serving as president of that organization in 1968-69, and as editor of *Avian Diseases* from 1961 to 1965. Rosy was awarded the AAAP Special Service award in 1980. In recognition of Rosy’s efforts to advance avian medicine with students, in 2000, the AAAP initiated the A.S. “Rosy” Rosenwald Student Poster award, presented to the best student poster at each annual meeting. In addition, in 1999, Rosy became an Honorary member of the American College of Poultry Veterinarians.

As a token of their great appreciation colleagues and friends generously supported the creation of the “Rosenwald Classroom” at the new Gladys Valley Hall at UCD, which was dedicated to Rosy in 2006.

The Rosenwalds have been long-time contributors to Poultry Science, American Veterinary Medical Foundation, and numerous other professional, university, and community organizations.

At the age of 91, Rosy gave his last formal WPDC presentation in 2001. Noticeably slowing down in later years, Rosy nonetheless faithfully attended, supported, and continued to provide the vision necessary to pilot the WPDC into an optimistic future.

“Rosy will continue to be an inspiration to all who have known him,” says Donald Klingborg, Director of Veterinary Medicine Extension and Associate Dean for Public Programs at the UC Davis, School of Veterinary Medicine. “He gave unselfishly of his time and incredible knowledge, brought people together to create effective networks and accomplish important tasks, and contributed significantly to others to the end. He was a gentleman’s gentleman, had an infectious smile and inquiring mind, and helped people achieve more from themselves with his presence. He is missed.”

“I will fondly remember him for his encouragement and generosity,” says Carol Bates, manager of Poultry Veterinary Services in Auckland, New Zealand. “He was a master at networking and helping people by putting them in touch with each other.”

The legacy of Rosy will continue on in all who had the exceptional privilege of having known, worked with, and loved this great man and ambassador of good-will.

EN MEMORIA DE “ROSY”

Arnold S. “Rosy” Rosenwald, Extensionista Emérito en Patología Avícola de la Universidad de California, Davis, cuya carrera y contribuciones a la medicina avícola cubrieron más de 70 años, murió en Davis, California, el 23 de enero del 2008, a los 98 años de edad. “Rosy” nació en Albuquerque, en aquel entonces Territorio de Nuevo México. Apropiadamente su nacimiento fue contemporáneo de la aprobación del Decreto Smith-Lever (1914), que estableció el Servicio de Extensionismo en los EUA, un servicio al que Rosy dedicaría gran parte de su carrera profesional.

Cuando recibió el título de Médico Veterinario de la Universidad del Estado de Kansas (Kansas State University) en 1936, el Dr. Rosenwald aceptó su primer puesto profesional en el Departamento de Medicina Veterinaria en la Universidad del Estado de Oregon (Department of Veterinary Medicine, Oregon State University), porque “había un trabajo y un reto”. Aquí aprendió por experiencia propia, bajo la tutela del Dr. W. T. Johnson, acerca de las numerosas y graves enfermedades que asolaban a la industria avícola en esa época: pulorosis, coccidiosis, viruela de las gallinas y erisipela.

Entre 1942 y 1946 el Dr. Rosenwald fue oficial veterinario con grado de capitán en el Cuerpo de Veterinarios del Ejército de los EUA (Veterinary Corps of the United States Army), en donde sirvió como bacteriólogo en la División de Proyectos Especiales del Departamento de Guerra (War Department’s Special Project Division).

Después de servir en el ejército, Rosy aceptó el puesto de Veterinario Avipatólogo Extensionista en la Universidad de California (UC) en 1946 (el primer Veterinario Extensionista de la UC dedicado exclusivamente a las aves de corral). Pasó 30 años, primero en UC Berkeley y desde 1951 en UC Davis (UCD), hasta que se “retiró” en 1977. Durante estos años llenos de actividades, tomó un año sabático para obtener el grado de Doctor en Filosofía (PhD) en la Universidad de Wisconsin. Aún después de su jubilación oficial y hasta hace poco tiempo, Rosy frecuentaba los pasillos del edificio de Extensión en la UCD. “Después de jubilarse, durante más de 30 años, el Dr. Rosenwald siguió jugando un papel activo en el grupo de colegas profesionales industriales y académicos”, dijo Carol Cardona, Veterinaria Extensionista Avícola de UCD y amiga cercana de Rosy.

Las contribuciones del Dr. Rosenwald a la industria avícola son innumerables, pero lo más importante fue su habilidad única para comunicar y divulgar los conocimientos del laboratorio al campo. El Dr. Bickford, ex director asociado del Laboratorio de Salud Animal e Inocuidad de los Alimentos (California Animal Health and Food Safety Laboratory), dice “no creo que haya una persona con entrenamiento en avicultura, a ningún nivel en UCD, que no haya tenido a Rosy como parte de su programa de entrenamiento – tal era su influencia. Aún cuando era diminuto en estatura era un gigante en su campo”. Muchos de sus ex-estudiantes e internos fueron influenciados por su forma de enfocar la investigación de las enfermedades, usando la técnica de resolver los problemas y aprendieron a apreciar su aseveración “no es pecado decir ‘no sé’, lo malo es indicar que no te importa.”

En 1967, Rosy inició el Simposio Anual de Salud Avícola para avicultores, el que él continuó hasta 1982, como una actividad del Servicio de Extensión agrícola en coordinación con la Conferencia de Enfermedades de las Aves del Oeste [Western Poultry Disease Conference (WPDC)], conocida entre los asistentes de habla hispana como “la Western”.

Jim West de J.S. West Milling Co., miembro de la Asociación de Huevo y Pollo del Pacífico (Pacific Egg and Poultry Association) dice que “él fue la primera persona de la universidad de la que sé que vino a la oficina de Extensión Agrícola en Modesto a hablar con los miembros de la industria avícola – era sumamente efectivo en la transmisión de información. La industria pierde uno de sus mejores maestros.”

El Dr. Rosenwald fue un embajador de la buena voluntad y extendió el conocimiento a la comunidad científica y laica a nivel regional, nacional e internacional.

La WPDC, originalmente conocida como ‘Western States Poultry Disease Worker’s Conference’ hasta 1957, fue iniciada en 1951 por Rosy y un pequeño grupo de veterinarios de práctica privada, el Departamento de Alimentos y Agricultura de California (California Department of Food and Agriculture) y la Universidad, como un foro para el intercambio de ideas de problemas de salud avícola en la región.

El estrecho vínculo internacional que la WPDC ha tenido, en particular con sus colegas en México y América Latina es resultado directo del trabajo de Rosy. Su cercana relación con el grupo de Sonora (Gabriel Galván, Celedonio Garrido y Eduardo Rivera) ayudó a crear la asociación de patólogos avícolas más antigua de México (APYZAN). Insistió con fervor en que participaran en la WPDC y promovió que Gabriel Galván fuera nombrado Director de Programa de la WPDC en 1976. Rosy asistió y apoyó con devoción a la Asociación Nacional de Especialistas en Ciencias Avícolas (ANECA) desde su primera Convención Anual en Guadalajara, México, a donde llegó cargado de Memorias y otros materiales de la WPDC para su venta (con beneficio económico para ANECA). Todos se beneficiaban de la generosidad de Rosy, quien llegaba con su equipaje repleto de whisky y cigarrillos para

ser distribuidos entre el grupo. Cuando el alcohol y el tabaco dejaron de ser un regalo apropiado por razones de salud, llevó pistaches, almendras, y otras golosinas. Rosy asistió a todas las Convenciones Anuales de ANECA hasta el 2006, como huésped de honor.

Insistió en proveer traducción simultánea de inglés a español en la WPDC. Este servicio se inició en 1976 y continuó hasta 1998. El servicio actuó como un puente que alentó la asistencia de muchos hispano-parlantes que no dominaban el inglés y quienes difícilmente hubieran asistido sin la traducción simultánea.

Los beneficios mutuos de la relación de la WPDC con ANECA, alentados por Rosy, se refleja en las reuniones periódicas celebradas en México, iniciadas en 1980 con la colaboración de Angel Mosqueda, quien se expresa de Rosy como, “un excelente amigo de todos, una de las mentes más brillantes entre los avipatólogos y una persona de gran corazón.” Las relaciones entre la WPDC y ANECA se fortalecieron con el apoyo que Rosy daba a éstas reuniones. Siempre se aseguró que los veterinarios de América Latina recibieran la atención necesaria, atrayendo asistentes desde México hasta Argentina. No hay duda de que Rosy estaba justamente orgulloso de sus estrechas relaciones con nuestros vecinos del sur y las extendió hacia el “verdadero norte” al llevar la WPDC a Vancouver en 1999 y 2005.

Rosy fue Secretario “oficial” de la WPDC de 1973 a 1979. En 1980 el Dr. Rosenwald fue nombrado Secretario-Tesorero. Al tiempo que servía en estos puestos, también era mentor del Director del Programa en turno, promovía la asistencia de ponentes y asistentes, recaudaba fondos, establecía contactos con la industria, apoyaba el simposio, actuaba como agente de viajes, hacía publicidad, editaba y producía las memorias (hasta 1985), vendía memorias y participaba en mercadeo, resolvía los problemas y actuaba como comité de bienvenida. Para Rosy no había detalle que fuera demasiado grande o demasiado pequeño con tal de asegurar el éxito de la conferencia y el bienestar de cada participante.

Muchos recuerdan con cariño las reuniones de los Rosenwald en la Calle “A”, por los que hay que dar un agradecimiento especial a Jo, la esposa que tanto ayudó al éxito de éstas. Tenemos una enorme deuda de gratitud para Jo por los muchos años de infalible apoyo a Rosy. Mucha gente, particularmente de ANECA, expresan de todo corazón su gratitud a Jo por su bondadosa y calurosa amistad.

Rosy y Jo con frecuencia invitaron a los extranjeros asistentes a la WPDC y a sus esposas a cenar y organizaban reuniones con investigadores con los que hubiera intereses comunes. Rosy se esmeraba en facilitar la colaboración potencial entre estos grupos. En ocasiones incontables transportó a los asistentes entre el aeropuerto y la reunión o a otros lugares. En su auto se apilaban, uno encima de otro seis o siete de sus amigos y salían a su destino con Rosy al volante. Estos actos de amabilidad continuaron hasta que ya no se le permitió manejar, a los 93 años de edad.

A Rosy le encantaba hablar por teléfono. Cuando David Frame fue Director del Programa de la WPDC, recuerda que Rosy con frecuencia lo llamaba para platicar, en ocasiones tres o cuatro veces a la semana. “Disfrutaba cada minuto y aprendí una barbaridad con él – particularmente de su generosidad”. Ernesto Soto añade que mantuvo una relación cercana con Rosy, a quien llamaba “Granpa” (abuelito). “Por años tuvimos conversaciones telefónicas, hasta que aún con su aparato ya no podía oír.

La tendencia que tenía Rosy de convertirlo a uno a su forma de pensar era uno de sus atributos especiales. Rich Chin dice de Rosy, “la palabra que me viene a la mente cuando pienso en Rosy es ‘persistencia’. Fuera lo que fuera que estuviera haciendo, solicitando contribuciones para la WPDC, apoyando a alguien para que se le otorgara un reconocimiento o un trabajo, nunca cejaba en su intento y al final, lograba su objetivo.” Benjamín Lucio recuerda a Rosy tratando de convencer a un agente aduanal de que le dejara pasar whisky y cigarros para sus amigos de ANECA. Después de unos minutos, Rosy se salió con la suya y pasó triunfante con su cargamento!

El Dr. Rosenwald fue parte del comité de la Academia Nacional de Ciencias del Consejo Nacional de Investigación en 1959, para el desarrollo de *Métodos para el Examen de Biológicos Avícolas*, el primero de este tipo.

Fue Miembro Fundador y Vitalicio de la Asociación Americana de Patólogos Avícolas [American Association of Avian Pathologists (AAAP)], de la que fue presidente 1968-1969, y fue editor de *Avian Diseases* de 1961 a 1965. Rosy recibió el galardón de Servicios Especiales de la AAAP en 1980. Como aprecio del trabajo que Rosy realizó para impulsar la medicina avícola entre los estudiantes, en el año 2000 la AAAP instituyó el premio A.S. “Rosy” Rosenwald que se otorga al estudiante con el mejor cartel en la reunión anual. Aunado a esto, Rosy fue nombrado miembro honorario del Colegio Americano de Veterinarios en Avicultura (American College of Poultry Veterinarians).

Como muestra de su gran aprecio, los colegas y amigos de Rosy apoyaron generosamente la creación del “Salón de clase Rosenwald” en el edificio Gladys Valley de la Escuela de Veterinaria, UCD. El salón fue dedicado a él en el 2006.

Los Rosenwald han contribuido por largos años a Poultry Science, American Veterinary Medical Foundation, y muchas otras organizaciones profesionales, universitarias y de la comunidad.

A los 91 años de edad, Rosy presentó su última plática formal en la WPDC en el 2001. Perceptiblemente más lento en los últimos años, Rosy religiosamente asistió, apoyó y continuó aportando la visión necesaria para guiar a la WPDC hacia un futuro lleno de optimismo.

“Rosy continuará siendo una inspiración para todos los que lo conocimos”, dijo Donald Klingborg, Director de Extensión Veterinaria y Director Asociado de Programas Públicos de la Escuela de Medicina Veterinaria, UCD. “Aportó desinteresadamente su tiempo é increíble conocimiento, unió gentes para crear redes que alcanzaron importantes objetivos en forma efectiva y contribuyó con los demás hasta el final de manera significativa. Fue un caballero entre los caballeros, tenía una sonrisa contagiosa y una mente inquisitiva, su sola presencia ayudaba a que otros logaran más. Lo extrañamos”.

“Lo recordaré con cariño por su estímulo y generosidad,” dice Carol Bates, administradora de los Servicios Veterinarios Avícolas en Auckland, Nueva Zelanda. “Era un maestro en establecer vínculos y ayudar a la gente, conectando a unos con otros.”

La herencia de Rosy continuará en todos quienes tuvieron el privilegio excepcional de haberlo conocido, trabajado con él y estimado a este gran hombre y embajador de la buena voluntad.

WPDC SPECIAL RECOGNITION AWARD DR. BARBARA DAFT

Dr. Barbara Magdalene Daft was born and raised in Germany. She immigrated to the USA in the 1960s, earned her BS in microbiology from The Ohio State University and worked as a medical technologist in the microbiology departments of hospitals in Ohio. She then spent two years as a Peace Corps volunteer and worked in the Tonga Islands of the South Pacific as a bacteriologist at the local hospital. Barbara returned to Ohio and worked as a technical assistant in the Department of Veterinary Science at the Ohio Agricultural Research and Development Center, in Wooster, where she met Dr. Mo Saif.

Barbara received her DVM from The Ohio State University in 1979 and moved to California to work as an associate veterinarian in a dairy cattle practice in Ontario, CA. After two years of dairy practice, she decided that it was time to get back to the lab and she was hired as a diagnostician by the California Department of Food and Agricultural in the San Bernardino laboratory. She continued at this position when the University of California, Davis, School of Veterinary Medicine, took over administration of the laboratory system. Barbara retired from the laboratory system in 2007 as an associate professor.

Barbara has been one of the key poultry pathologists in California, in particular, serving the layer industry of Southern California. Her knowledge and attention to detail has led to the diagnosis of many difficult disease cases. Barbara participated and presented at numerous WPDC meetings. She was the WPDC program chair for the 2002 joint meeting with ANECA in Puerto Vallarta, Mexico.

Barbara received her board certifications in both the American College of Poultry Veterinarians and the American College of Veterinary Pathologists.

Barbara continues to live in Southern California with her husband and enjoys spending time with her grandchildren.

SPECIAL ACKNOWLEDGMENTS

The 57th Western Poultry Disease Conference (WPDC) is honored to acknowledge the many contributions and support to the Conference. The financial contributions provide support for outstanding presentations and to help pay for some of the costs of the Conference, thus helping us to maintain a relatively low registration fee for an international conference. More than 40 organizations, companies and individuals have once again given substantial financial support. Many companies and organizations, including some that also contribute financially, send speakers at no expense to the Conference. We thank all these people, and acknowledge their support and contribution.

We are extremely pleased to give a special acknowledgement to two supporters at the Benefactor level. They are the **American Association of Avian Pathologists** and **Schering-Plough / Intervet**. 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 sincerely thank them and their representatives.

Dr. Rocio Crespo would like to thank the ANECA and WPDC Executive Committees. This conference has really been a team effort, and without the input of either committee this conference would have failed. It is not an easy task to sort through more than 200 submitted titles and manage dual sessions for both oral and poster presentations. I would like to thank Ms. Rebecca Gonzales for her assistance in the initial compilation of oral and poster presentation requests. A special thanks to Dr. Richard Chin for his invaluable input and reminders of deadlines. Last, but not least, I thank all the presenters for their time and effort in making this an outstanding program.

The Executive Committee of the Western Poultry Disease Conference extends a heart-felt thanks to the ANECA group in-charge of organizing this meeting and serving as local arrangement coordinators. In particular, we thank Dr. Ernesto Soto, long time ANECA liaison to the WPDC, for his exceptional diligence (and patience!) in working with us on this, as well as past conferences. Also deserving special recognition is Dra. Martha Silva, long time treasurer for ANECA, for her untiring behind-the-scenes labors to help make this joint meeting a reality. Others certainly are also worthy of special recognition, including Drs. Marco Rebollo, Maritza Tamayo, and Julian Carillo. And a special thanks to all those working for ANECA of whom we may not even be aware. Thank you so very much!

Many have provided special services that contribute to the continued success of this conference. The WPDC would like to thank Ms. Helen Moriyama and Ms. Rebecca Gonzales, of the Fresno branch of the California Animal Health and Food Safety Laboratory System (CAHFS), for their secretarial support. For this year's meeting, the WPDC has contracted Conference & Event Services, of the University of California, Davis, for providing budgetary support for the conference. We would like to thank Ms. Teresa Brown, Ms. Katrina Evans and Ms. Alma Contreas for their work with our conference.

We thank Dr. David Frame for editing and producing another outstanding Proceedings of this meeting. Dr. Frame is indebted to Ms. Sherry Nielson, Staff Assistant III of Utah State University Extension, for her seemingly endless hours of proofreading and formatting the Proceedings for publication. We express our gratitude to all authors who submitted manuscripts. A special thanks goes to Victor Mireles for reproducing the CD-ROM and for translating the summaries. We again acknowledge and thank Ominpress (Madison, WI) for the handling and printing of this year's Proceedings, Dr. Rocio Crespo (CAHFS-Fresno) for original design of the CD label, and Sherry Nielson (USU Extension) for this year's design of CD label and box insert.

57TH WPDC CONTRIBUTORS LIST

2008 BENEFACTORS

American Association of Avian Pathologists

Athens, GA

Schering-Plough / Intervet

Millsboro, DE

2008 PATRONS

Fort Dodge Animal Health

Fort Dodge, IA

Hygieia Biological Laboratories

Woodland, CA

IDEXX Labs, Inc.

Westbrook, ME

Merial, Inc.

Gainesville, GA

Nippon Biologicals, Inc.

Tokyo, Japan

2008 DONORS

Alpharma, Inc.

Fort Lee, NJ

Aviagen, Inc.

Huntsville, AL

Biomune Company

Lenexa, KS

Charles River Laboratories, Inc.

Storrs, CT

Cobb-Vantress, Inc.

Siloam Springs, AR

Cutler Associates International

Moorpark, CA

Eli Lilly and Company / Elanco Animal Health

Indianapolis, IN

Foster Poultry Farms, Inc.

Livingston, CA

G. Yan Ghazikhanian, DVM, PhD, DACPV

Sonoma, CA

Lohmann Animal Health International

Winslow, ME

NOVUS International, Inc.

St. Louis, MO

Pfizer Poultry Health Division

Durham, NC

Phibro Animal Health

Fairfield, NJ

Dr. & Mrs. A. S. "Rosy" Rosenwald

Davis, CA

Sunrise Farms, Inc.

Catskill, NY

Vega Farms

Davis, CA

Veterinary Service, Inc.

Salida, CA

2008 SUSTAINING MEMBERS

Bayer Animal Health
Shawnee Mission, KS

Canadian Poultry Consultants Ltd.
Abbotsford, BC, Canada

Robert Edson, DVM, PhD
Lewisburg, WV

Marion Garcia, DVM
Barron, WI

Hy-Line International
Dallas Center, IA

ImmunoBiosciences, Inc.
Raleigh, NC

Moroni Feed Company
Moroni, UT

Orlopp Turkey Breeding Farms
Orosi, CA

Pacific Egg & Poultry Association
Sacramento, CA

Preserve International
Turlock, CA

Carlos H. Romero, DVM, PhD
Gainesville, FL

Walco International, Inc.
Ceres, CA

Zacky Farms
Fresno, CA

2008 FRIENDS OF THE CONFERENCE

Arthur A. Bickford, VMD, PhD, DACPV
Turlock, CA

California Poultry Federation, Inc.
Modesto, CA

Marion Hammarlund, DVM
Riverside, CA

J.S. West Milling Company
Modesto, CA

Lasher Associates
Millsboro, DE

Richard Yamamoto, PhD
Davis, CA

57th WESTERN POULTRY DISEASE CONFERENCE OFFICERS

PRESIDENT

Dr. Bruce Charlton
California Animal Health & Food Safety
Laboratory System - Turlock
1550 N. Soderquist Rd.
Turlock, CA 95380-2204

PROGRAM CHAIR

Dr. Rocio Crespo
California Animal Health & Food Safety
Laboratory System - Fresno
2789 S. Orange Ave.
Fresno, CA 93725-1919

PROGRAM CHAIR-ELECT

Dr. Victoria Bowes
Animal Health Centre
1767 Angus Campbell Road
Abbotsford, BC V3G 2M3

PROCEEDINGS EDITOR

Dr. David Frame
Utah State University
Cooperative Extension
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 93725-1919

CONTRIBUTIONS CHAIR

Dr. Yan Ghazikhanian

57th WPDC PROCEEDINGS

The **Proceedings** of the 57th Western Poultry Disease Conference 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.

Copies of these Proceedings are available from:

Dr. R. P. Chin
CAHFS-Fresno
University of California, Davis
2789 S. Orange Ave.
Fresno, CA 93725-1919
rpchin@ucdavis.edu

Price per copy (includes shipping & handling):

US\$20.00 for USA shipment.

Book and CD (sold together)

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

US\$20.00 for Canada and Mexico.

US\$25.00 for all other countries.

Book or CD (sold separately)

US\$12.00 for AAAP members and orders of 5 or more for USA.

US\$18.00 for Canada and Mexico.

US\$22.00 for all other countries.

US\$15.00 for USA shipment.

Make checks payable to: UC Regents

Still available...

50th WPDC Anniversary CD-ROM. This CD contains all printed proceedings of the first fifty Western Poultry Disease Conference meetings. Copies can be purchased from the AAAP. Phone: 706-542-5645. Fax: 706-542-0249. E-mail: aaap@uga.edu. Web: <http://www.aaap.info/>

Five-year Compilation (2000–2006) Proceedings of the WPDC. This CD contains the printed proceedings of the 51st through the 55th Western Poultry Disease Conferences. Copies can be purchased from the WPDC Secretary-Treasurer.

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. Hammarlund | 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 | G. Yan Ghazikhanian | P. P. Levine | |
| 14 th PHS | | | | |
| 5 th ANECA | Angel Mosqueda T. | | | |
| 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 | Duncan A. McMartin | J. A. Allen | |

| | PRESIDENT | PROGRAM CHAIR | DEDICATION | RECOGNITION |
|------------------------------|-------------------|----------------------|---------------------------------|--|
| 11 th ANECA | Jorge Basurto | Mario Padron | 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 | Richard P. Chin | A. S. Rosenwald | |
| 16 th ANECA | Martha Silva M. | David Sarfati M. | 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 Royal A. Bagley G. B. E. West A. J. DaMassa Gabriel Galvan Walter F. Hughes W. D. Woodward R. Yamamoto Pedro Villegas Ben Lucio M. Mariano Salem Victor Mireles Craig Riddell Roscoe Balch Paul DeLay J. W. Dunsing Don Helfer D. E. Stover Marcus Jensen Duncan Martin |
| 42 nd WPDC – 1993 | R. J. Terry | A. S. Dhillon | W. W. Sadler | |
| 43 rd WPDC – 1994 | A. S. Dhillon | Hugo A. Medina | | |
| 44 th WPDC – 1995 | H. A. Medina | David D. Frame | W. M. Dungan (posthumous) | |
| 45 th WPDC – 1996 | D. D. Frame | Mark Bland | Don Zander | |
| 21 st ANECA | R. Salado C. | G. Tellez I. | M. A. Marquez | |
| 46 th WPDC – 1997 | Mark Bland | James Andreasen, Jr. | Bryan Mayeda | |
| 47 th WPDC – 1998 | J. Andreasen, Jr. | H. L. Shivaprasad | W. J. Mathey | |
| 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 Don Bell Art Bickford Bachoco S.A. de C.V. Productos Toledano S.A. |
| 50 th WPDC – 2001 | P. Wakenell | Ken Takeshita | | |
| 51 st WPDC – 2002 | K. Takeshita | Barbara Daft | Hiram Lasher | |
| 27 th ANECA | J. C. Valadéz | Ernesto P. Soto | | |
| 52 nd WPDC – 2003 | B. Daft | David H. Willoughby | | Roland C. Hartman G. Yan Ghazikhanian |
| 53 rd WPDC – 2004 | D. H. Willoughby | Joan Schrader | | |
| 54 th WPDC – 2005 | J. Schrader | Stewart J. Ritchie | W.D. Woodward | R. Keith McMillan |
| 55 th WPDC – 2006 | S. J. Ritchie | Peter R. Woolcock | | M. Hammarlund |
| 56 th WPDC – 2007 | P.R. Woolcock | Bruce Charlton | R. Keith McMillan | M. Matsumoto |
| 57 th WPDC – 2008 | B. Charlton | Rocio Crespo | A. S. Rosenwald (posthumous) | B. Daft |
| 33 rd ANECA | M. A. Rebollo F. | Maritza Tamayo S. | A. S. Rosenwald (posthumous) | |
| 58 th WPDC – 2009 | R. Crespo | Victoria Bowes | | |

MINUTES OF THE 56TH WPDC ANNUAL BUSINESS MEETING

President Woolcock called the meeting to order on Tuesday, 27th March 2007, at 4:38 PM, at the Riviera Hotel and Casino, Las Vegas, NV. There were 22 people in attendance.

APPROVAL OF 55th WPDC BUSINESS MEETING MINUTES

The minutes from the 55th WPDC business meeting were reviewed and a motion was carried to approve them as printed in the Proceedings of the 56th WPDC.

ANNOUNCEMENTS

President Woolcock acknowledged all the contributors; in particular, those contributing at the Benefactor level, which included the American Association of Avian Pathologists and Merial, Inc. He also thanked all the contributors for their generous donations. President Woolcock acknowledged the efforts of the current WPDC officers for their work and participation in the organization of this year's meeting. President Woolcock asked that we have a moment of silence for Dr. Keith McMillan, who passed away in June 2006, and for whom the meeting is dedicated.

REPORT OF THE SECRETARY-TREASURER

Dr. R.P. Chin presented the Secretary-Treasurer report. There were 203 registrants for the 55th WPDC held at the Capitol Plaza Holiday Inn, March 6-8, 2006. Contributions for the 55th WPDC were \$26,700, with a total income of \$67,262. There were expenses of \$55,042 for WPDC for the meeting, resulting in a net gain of \$12,219. The current balance in the WPDC account was \$70,040.

Contributions for this year's meeting (56th WPDC) were outstanding, with \$29,800 contributed. Dr. Chin thanked Dr. Ghazikhanian for an outstanding job as contributions chair. Last year, with the meeting moving to Las Vegas, NV, Dr. Chin guesstimated about 235-250 registrants. As of the business meeting, we had approximately 235 registrants. Estimated expenses for this year are approximately \$85,000 due to increase cost in travel and hotel expenses.

REPORT OF THE PROCEEDINGS EDITOR

Dr. D. Frame presented the Proceedings Editor report. Omnipress produced the Proceedings hard copy at an approximate cost of about \$6.00 per book; up significantly from last year. The CD's were again provided by Utah State University Cooperative Extension at no cost to the Conference.

OLD BUSINESS

None discussed.

NEW BUSINESS

President Woolcock reported that the WPDC Executive Committee nominated Dr. Victoria Bowes for Program Chair-elect of the 58th WPDC in 2009. There were no other nominations and Dr. Bowes was elected unanimously as program chair-elect. President Woolcock nominated the following officers for 2007-2008:

Program Chair: Dr. Rocio Crespo
President: Dr. Bruce Charlton
Past-President: Dr. Peter Woolcock
Contributions Chair: Dr. Yan Ghazikhanian
Proceedings Editor: Dr. David Frame
Secretary-Treasurer: Dr. Richard Chin
Program Chair-elect: Dr. Victoria Bowes

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

In 2008, the 57th WPDC will be in Puerto Vallarta, Mexico, at the Sheraton Buganvillas Resort and Convention Center, jointly with the XXXIII ANECA. Dr. Ernesto Soto, representing ANECA, discussed the location and the preliminary preparations done by ANECA in securing the hotel. A planning meeting is scheduled for Wednesday with representatives from ANECA and WPDC.

The WPDC Executive Committee recommended that the 58th WPDC be held in Sacramento, CA, in 2009. It was unanimously approved. There was discussion as to the location of future WPDCs. Dr. Chin asked if we should set-up a rotation of various locations, such as Sacramento, Vancouver, BC, Mexico and Las Vegas. Dr. Edson commented that he enjoyed going to different locations and suggested that we look at other places such as San Diego, Palm Springs, and Seattle. Dr. Chin commented that going to new locations is fine as long as there is a local arrangements coordinator to work with.

Someone asked about the dates of the WPDC meeting, and suggested that later in March was preferred. Dr. Chin said that traditionally it was the last week of February and the first week of March. However, we have moved it to different dates depending on the location of the meeting. The dates for this year's meeting were the only days we could get into the Riviera Hotel. Dr. Chin said that we need to keep in mind other meetings, such as the North Central Avian Disease Conference which now meets with the Midwest Poultry Federation show in the middle of March.

Dr. Cutler agreed to continue as the WPDC CE Coordinator.

President Woolcock passed the presidency to Dr. Bruce Charlton who thanked those involved in the organization of the meeting. President Charlton adjourned the meeting at approximately 5:45 PM.



PRÓLOGO

Nuevamente llegó el momento de celebrar el evento conjunto entre la WPDC y ANECA, en esta ocasión repetimos la sede de Puerto Vallarta, Jalisco (México), una excelente localidad para un evento de talla internacional como lo es este. Una vez más cosechamos frutos de los esfuerzos de nuestros predecesores, donde merece especial mención Arnold Rosenwald, quien apoyó a nuestros colegas y quien ayudó a gestionar que se unieran ambas asociaciones. Ahora ya no podremos contar con su amable presencia pero siempre le recordaremos y le tendremos un especial aprecio y agradecimiento.

En este evento que se titula "La ciencia detrás de las recomendaciones de manejo en la avicultura" hemos alentado enfáticamente la presentación trabajos sobre de casos de campo, uso de antimicrobianos y su resistencia, programas de vacunación, nuevas vacunas, nuevos métodos de aplicación, enfermedades emergentes, actualidades en alimentación y nutrición, producción orgánica de aves y bienestar animal. Aun cuando el énfasis fue en el lado práctico del manejo, fueron también bienvenidas presentaciones científicas sobre salud aviar. La industria avícola está aun luchando con problemas respiratorios y entéricos que han causado pérdidas por muchos años. Dada la situación mundial de la industria pecuaria sobre el encarecimiento y escasez de granos, por el desarrollo súbito de la industria de los biocombustibles, no podíamos dejar de lado el tema incluyendo pláticas magistrales que analicen dicho tema y propongan alternativas.

De nuestras experiencias anteriores es sabido que la unión entre la WPDC y ANECA dan como resultado un excelente evento para encontrar, conocer y establecer relaciones con otros expertos en avicultura y no solo para profesionales sino también para estudiantes, nuevos graduados y productores. Esperamos que esta reunión con nuestros colegas de la WPDC que ha resultado en un programa científico excepcional sea de su total agrado.



AGRADECIMIENTOS

Agradecemos la colaboración con el grupo que por parte de la WPDC integraron: el Dr. Richard Chin, la Dra. Rocio Crespo y el Dr. David Frame con quienes trabajamos intensamente para hacer posible este evento.

Nuestro más sincero agradecimiento a la comisión formada por parte de ANECA, para la organización de este evento, encabezados por el Dr. Ernesto Soto, como Chairman; las doctoras Maritza Tamayo y Martha Silva, y el Dr. Julian Carrillo.

AGRADECEMOS TAMBIÉN A NUESTROS LEALES PATROCINADORES:

Allabinc de México S.A. de C.V.
ALPHARMA
Boehringer Ingelheim VETMEDICA, S.A. DE C.V.
BIOTECNOLOGIA INDUSTRIAL
BFI Innovations
Bayer de México
Ceva-Kemia, S.A. de C.V.
DE ANDA
Degussa México, S.A. de C.V.
DSM Nutricional Products México S.A. de C.V.
Elanco Animal Health Divison
Fort Dodge
Investigación Aplicada S.A. de C.V. IASA
Intervet México, S.A. de C.V.
IQF Enamex S.A. de C.V.
LubingMesoamericana
Laboratorios AVIMEX, S.A. de C.V.
QUIMICA PUMEX
Laboratorios SANFER, S.A. de C.V.
Merial México S.A. de C.V.
Novus International México S.A. De C.V
Pisa Agropecuaria, S.A. de c.V.
Sistemas Agropecuarios JAT, S.A. de C.V.
Servicios Veterinarios Integrados
SCHERING PLOUGH
Zinpro Performance Minerals



MESA DIRECTIVA GESTIÓN 2007-2008

| | |
|------------------------|---|
| Presidente: | MVZ. Marco Aurelio Rebollo Franco |
| Vicepresidente: | MVZ. Maritza Tamayo Salmorán |
| Tesorero: | Dra. Martha Silva Maldonado MVZ. Fernando de la Colina Treviño |
| Secretario: | Dra. Xóchitl Hernández Velasco |
| Vocales: | Dra. Odette Urquiza Bravo MVZ. Miguel Angel Zamora |

CÓMITES DE APOYO ANECA 2007-2008

| | |
|--|--|
| Comité Técnico – Científico: | MVZ. Susano Medina Jaramillo MVZ. Jose Quezada Fox BIOL. Francisco Ríos Cambre |
| Relaciones Comerciales: | MVZ. Julián Carrillo Valadéz MVZ. Martín Torres Rojo |
| Relaciones Nacionales: | MVZ: Manuel Méndez MVZ. Danilo Merino MVZ. Benjamín Fuente |
| Relaciones Internacionales: | MVZ. Mariano Salem MVZ. Alberto Torresa |
| Relaciones Institucionales: | MVZ. Roberto Señas MVZ. Nestor Ledesma Dra. Pilar Castañeda |
| Coordinación WPDC: | MVZ. Ernesto Soto |
| Comisión: CONASA – CONAPROZ | MVZ. Leopoldo Pasch |
| Comité Pro-oficinas: | MVZ. David Sarfati MVZ. Francisco Baez |
| Membresías: | Dra. Cecilia Rosario Cortés |
| Estatutos: | MVZ. Bernardo Lozano |
| Coordinador Simposium de Enfermedades Emergentes: | MVZ. Juan Carlos Valladares |
| Coordinador de Procesamiento Mundial de Aves: | MVZ. Pilar Castañeda |

TABLE OF CONTENTS

CONTENIDO

Note: Both the oral and poster presentations of the 57th WPDC - XXXIII ANECA are listed below in alphabetical arrangement by presenter. Authors and titles of all papers scheduled for presentation at the conference are listed.

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 las Convención XXXIII ANECA - 57th WPDC.

| PRESENTER AUTOR | TITLE TITULO | PAGE PÁGINA |
|----------------------------|--|------------------------|
| Abbassi, H. | Comparison of Five Commercial Kits for the High throughput Molecular Diagnostic of Avian RNA Viruses Comparación de Cinco "Kits" Comerciales para el Manejo de Grandes Volúmenes de Muestras en el Diagnóstico Molecular de Virus Aviáres del Tipo ARN..... | 84 |
| Ahmad, M. | Control of Necrotic Enteritis in Commercial Broilers Control de la Enteritis Necrótica en Pollos de Engorda Comerciales | 154 |
| Alfonso, M. | Practical Aspects of Long Term Coccidiosis Control Management in Commercial Broilers Aspectos Prácticos del Control Prolongado de la Coccidiosis en el Pollo de Engorda Comercial | 79 |
| Bautistia, C. B. | Comparación de los títulos de ELISA e Inhibición de la hemoaglutinación para Newcastle, en reproductoras vacunadas Comparison of Newcastle Disease ELISA and HI Titers in Vaccinated Breeders..... | 16 |
| Bautista, D. A. | Pathogen Inactivation by In-house Composting of Poultry Litter Using an Aerator/Windrowing Equipment Inactivación de Patógenos Preparando Composta en la Granja con la Cama mediante un Equipo Aerator/Windrowing | 197 |
| Bland, M. C. | Interactive Problem Solving of Field Cases Involving Commercial Poultry, an Audience Participation Presentation Solución Interactiva de Problemas de Campo de la Avicultura Comercial del Occidente de Estados Unidos y Canadá, con la Participación de los Asistentes..... | 160 |
| Bradley, F. A. | Strategies for Incorporating Game Fowl Producers into a Statewide Biosecurity Plan Estrategias para Incorporar a los Productores de Aves de Presa a un Plan Estatal de Bioseguridad | 199 |
| Buscaglia, C. | Surveillance for Newcastle Disease Conducted since 1998 in Argentina Programa de Vigilancia de la Enfermedad de Newcastle Realizado en 1998 en Argentina | 9 |
| Buscaglia, C. | Caso Clínico de Candidiasis en Guacamayo Azul y Amarillo (<i>Ara ararauna</i>) Nacido en Cautiverio en un Aviario de Argentina A Clinical Case of Candidiasis in a Blue/Yellow Macaw (<i>Ara ararauna</i>) Hatched in Captivity in an Aviary in Argentina | 188 |
| Camacho-Fernández, D. | Evaluación de la Inclusión de Minerales Traza Orgánicos en el Alimento Sobre los Parámetros Productivos, Calidad de Patas, Calidad de Canal, Respuesta Inmune y Calidad de Hueso en Pollos de Engorda Evaluation of Feeding Organic Trace Minerals on the Productive Parameters, Feed Quality, Carcass Traits, Immune Response, and Bone Strength in Broilers | 50 |

| | | |
|----------------------|--|-----|
| Carver, D. K. | Co-infection of Multiple <i>Campylobacter</i> Strains in Turkeys: What Co-infection Means for Sample Collection Coinfección con Varias Cepas de <i>Campylobacter</i> en Pavos y sus Efectos sobre la Recolección Significativa de Muestras | 165 |
| Castilla Aguilar, G. | Comparativo de la Eficacia de dos Antibióticos Compuestos de una Combinación de Fosfomicina y Trimetoprim, en el Tratamiento de una parvada de Pollo de Engorda en la Primer Semana de Edad Efficacy Comparison of Two Fosfomycin-Trimetoprim Combination Products on First Week Broiler Performance | 151 |
| Charlton, B. R. | Experiences behind <i>Salmonella</i> Enteritidis Testing at the CAHFS – Turlock Branch Respaldo Científico de la Prueba de <i>Salmonella</i> enteritidis en el CAHFS, Sucursal Turlock | 175 |
| Chowdhury, S. R. | Effects of Feed-Borne <i>Fusarium</i> Mycotoxins on Health and Performance of Laying Hens Efectos de las Micotoxinas de <i>Fusarium</i> Generadas en el Alimento sobre la Salud y el Rendimiento de las Ponedoras | 200 |
| Christy Santiago, N. | Comparativo del Efecto Antimicrobiano <i>in vitro</i> de dos Antibióticos, Compuestos de una Combinación de Fosfomicina y Trimetoprim, Contra una Cepa de <i>Escherichia coli</i> Comparison of the <i>In Vitro</i> Antimicrobial Effect of Two Fosfomycin-Trimetoprim Combination Products Against one <i>E. coli</i> Strain | 149 |
| Clark, S. | Effect of Nitarsona (Histostat®) on Roundworms in Turkeys Efecto de Histostat® (Nitrasona) sobre los Nematodos del Pavo | 186 |
| Cookson, K. | Comparison of Ten Avian Pathogenic <i>E. coli</i> Strains in Commercial Broiler Chickens Comparación de Doce Cepas de <i>E. coli</i> Patógenas para las Aves en Parvadas Comerciales de Pollo de Engorda..... | 180 |
| Cortes, C. A. | Lisina Biodisponible de cuatro Harinas de Subproductos Avícolas en Pollos de Engorda en Crecimiento Lysine Availability in Four Poultry Byproduct Meals in Growing Broilers | 24 |
| Cortes, C. A. | Evaluación de Diferentes Niveles de Inclusión de Glutamina en Dietas Para Pollos de Engorda Evaluation of Feeding Broilers with Different Glutamine Levels..... | 30 |
| Cruz-Coy, J. | Efficacy of a Live Coccidiosis Vaccine Containing Attenuated Strains of <i>Eimeria maxima</i> , <i>E. acervulina</i> , and <i>E. tenella</i> Administered by Spray to One-Day-Old SPF Chickens Eficacia de una Vacuna Viva contra la Coccidiosis que Contiene Cepas Atenuadas de <i>Eimeria maxima</i> | 98 |
| Cutler, G. | Reduction of Mouth Lesions in Layers: A Case Study Reducción de Lesiones Orales en Ponedoras: Estudio de un Caso | 138 |
| Day, J. M. | Detection, Isolation and Characterization of Turkey-Origin Rotaviruses Present in Commercial Flocks in the United States Detección, Aislamiento y Caracterización de Rotovirus Originados en Pavos y Presentes en Parvadas Comerciales de Estados Unidos..... | 91 |
| DeKich, M. A. | Growing Chickens “In an Oven”: Key Management Practices For a Hot/Dry Climate Cómo Producir Pollos "En un Horno": Importantes Prácticas de Manejo para el Clima Cálido y Seco | 42 |
| Delamer, M. | Un Nuevo Síndrome en aves Aparentemente Causado por un Novel Poxvirus New Syndrome in Poultry Apparently Caused by a Novel Poxvirus | 88 |

| | | |
|-------------------|---|-----|
| Dhillon, A. S. | Active Motility is not Required for <i>Campylobacter</i> Colonization of Chickens <i>Campylobacter</i> no Requiere Ser Activamente Móvil para Colonizar al Pollo..... | 164 |
| Dhillon, A. S. | Severe Cryptosporidiosis in Several Flocks of Chukars Raised on Wire Criptosporidiosis Severa en Perdices Chukar | 187 |
| Dufour-Zavala, L. | VLT in Georgia 2006-2007 Laringotraqueítis en Georgia, EE.UU.: 2006-2007 | 87 |
| Effler, J. | Effects of the IBDV Variant Strain AL2 in Young Chickens Efectos de la Cepa Variante AL2 del Virus de la Infección de la Bolsa de Fabricio en Pollos Jóvenes | 59 |
| Esparza, C. C. | Efecto de la Inclusión de Diferentes Niveles de Granos Secos de Destileria Con Solubles (DDGS) en Dietas Sorgo-Soya Para Pollos de Engorda The Effect of Different DDGS Inclusion Levels in Broiler Diets | 26 |
| Fierro, H. J. A. | Efectos Toxicos Provocados por la Ingesta de Alimento Contaminado con Aflatoxina B1 y Ocratoxina A en Pollo de Engorda Aflatoxin B1 and Ochratoxin A Toxicity in Broilers | 132 |
| Fitz-Coy, S. H. | Why Commercial Poultry Production Should be Interested in Coccidiosis Por qué la Avicultura Comercial se Debe Interesar en la Coccidiosis? | 72 |
| Fitz-Coy, S. H. | It's Cocci, but what Species? OK, Es Coccidia, pero ¿Qué Especie? | 92 |
| Fletcher, O. J. | Clinical Cases with Histopathology Casos Clínicos con Histopatología | 1 |
| França, M. | Septicemia Associated with <i>Aeromonas hydrophila/caviae</i> in an Adult Male Ostrich Septicemia Asociada con <i>Aeromonas hydrophila</i> en un Avestruz Macho Adulto..... | 202 |
| Garcia, A. | Respuesta Inmune – Duracion- en Dos Diferentes Tipos de Aves, Usando Vacuna Inactivada de Influenza Aviar (H5N2) Estandarizada Duration of Immunity in Two Bird Types Using a Killed, Standardized H5N2 Avian Influenza Vaccine..... | 126 |
| Gardin, Y. | Interest of Using an Antigen Antibody Complex IBD Vaccine in the Prevention of IBD Interés de Usar una Vacuna Complejo Antígeno-Anticuerpo Contra la Infección de la Bolsa de Fabricio | 60 |
| Gómez, R. S. | Alternativas de Producción Orgánica 3: Sustitución de los Antibióticos Promotores del Crecimiento por un Extracto de Ajo en Pollos de Engorda Organic Production Alternatives 3: Replacing Antibiotic Growth Promoters with a Garlic Extract in Broilers | 22 |
| Gómez, R. S. | Alternativas de Producción Orgánica 1: Sustitución de los Antibióticos por Mananoligosacáridos y un Cultivo de Levaduras y/o un Microorganismo Vivo en la Dieta de Pollos de Engorda Organic Production Alternatives 1: Replacing Antibiotics with Mannanligosaccharides + a YeAst Culture and/or a Live Organism in Broiler Diets | 203 |
| Gómez, R. S. | Efectos del tipo de proteína y la inclusión de paredes celulares y cultivo de levaduras en la dieta de pollos en crecimiento Organic Production Alternatives 2: Effects of Including Mannanligosaccharides AND a YeAst Culture and a Protein Source in Broilers | 205 |

| | | |
|-----------------------|--|-----|
| Grilli, G. | Parvovirus-like Hepatitis in Grey Partridge (<i>PERDIX PERDIX</i>): Preliminary Observations Hepatitis Causada por un Agente Similar al Parvovirus en la Perdiz Gris (<i>Perdix perdix</i>): Observaciones Preliminares | 207 |
| Gustafson, C. | Efficacy Study Comparing the Effect of Administering a Live <i>E. coli</i> Vaccine by Various Routes Estudio de Eficacia para Comparar el Efecto de la Administración de una Vacuna Viva de <i>E. coli</i> Mediante Varias Vías | 183 |
| Gustin, S. | A Survey of <i>Salmonella</i> Serotypes Found in Environmental and Feed Ingredient Samples Encuesta Sobre los Serotipos de <i>Salmonella</i> Encontrados en Muestras Ambientales y de Ingredientes Alimenticios | 176 |
| Hein, R. G. | Newcastle Disease (ND) Efficacy in Broilers Vaccinated at One Day of Age with the Recombinant HVT/F(ND):INNOVAX [®] -ND-SB Challenged with the Mexican vND Virus Isolate Chimalhuacan Eficacia de la Vacuna Recombinante HVT/F(ND)-(INNOVAX-ND-SB) en Pollos de Engorda Vacunados al Día de Edad y Desafiados con el Aislamiento Mexicano Chimalhuacán del Virus de la Enfermedad de Newcastle | 32 |
| Hofacre, C. L. | The Future of Postgraduate Education and Training for Avian Veterinarians El Futuro de los Estudios de Postgrado y la Capacitación de Médicos Veterinarios Especialistas en Aves.... | 189 |
| Icard, A. | Reverse Genetics of Infectious Bursal Disease Virus as Diagnostic Tool La Genética Inversa del Virus de la Infección de la Bolsa de Fabricio como Herramienta Diagnóstica | 62 |
| Juárez-Estrada, M. A. | Efecto de la Harina de <i>Aspergillus</i> spp., o un Complejo Enzimático (Amilasa, Xilanasa, y Proteasa) Sobre la Microbiota Intestinal de Pollos de Engorda Desafiados con <i>Eimeria</i> spp. The Effect of <i>Aspergillus</i> spp. Meal (<i>HA</i>) or an Enzyme Complex (<i>CE</i> , AmYlase, XYlanase, Protease) on the Intestinal Microbiota of Broilers Challenged with <i>Eimeria</i> spp. | 102 |
| Juárez-Estrada, M. A. | Evaluación de Leucocitos Sanguíneos, pH Intestinal y Grado de Lesiones en Pollos de Engorda Suplementados con un Complejo Enzimático o Harina de <i>Aspergillus</i> spp. y Desafiados con <i>Eimeria</i> spp. Evaluation of Blood Leukocytes, Intestinal pH and Lesion Scores of Broilers Fed either an Enzyme Complex (<i>CE</i>) or <i>Aspergillus</i> spp. Meal (<i>HA</i>) and Challenged with <i>Eimeria</i> spp. | 109 |
| Juárez-Estrada, M. A. | Modelo de Aprendizaje Basado en Problemas (ABP) con Metodología de Triple Salto Basado en un Caso Clínico de Infección del Saco Vitelino en Avestripollos Neonatos A Problem-Based (APB) Model with Triple Jump Methodology Using an Egg Yolk Sac Infection in Neonatal Ostriches | 209 |
| Kelly, B. J. | Does Fluoroquinolone Susceptibility Status Effect Clinical Disease Severity in Campylobacteriosis? A New Look at an Old Question <i>Campylobacter</i> de Origen Alimentario, Resistente a las Fluoroquinolonas. Nueva Información Sobre Riesgos y Daños a la Salud Pública | 162 |
| Klein, P. N. | Biosecurity in the Live Bird Marketing Systems in Central America and the Dominican Republic La Bioseguridad en los Sistemas de Mercados de Aves Vivas en Centroamérica | 118 |
| Linares, J. A. | Case Studies from the Poultry Diagnostic Laboratory Estudio de Casos Presentados en el Laboratorio de Diagnóstico Avícola | 58 |
| Linares, J. A. | Interesting Cases from the Poultry Laboratory (2007) | 266 |

| | | |
|--------------------|---|-----|
| Lucio-Martínez, B. | <p> Inmunocromatografía en el Diagnóstico de la Influenza Aviar Use of Immunochromatography in the Diagnosis of Avian Influenza </p> | 143 |
| Macklin, K. S. | <p> Direct Application of Acid to Control Ammonia and Bacteria Levels in Litter Aplicación Directa de Ácido para Controlar el Amoníaco y los Niveles de Bacterias en la Cama..... </p> | 213 |
| Marrufo Villa, D. | <p> Efecto de los Anticuerpos Maternos en la Respuesta Inmune de Pollos de Engorda Vacunados a Diferentes Edades y con Diferentes Vacunas Inactivadas y Emulsionadas Contra el Virus de Influenza Aviar The Effect of Maternal Antibodies on the Immune Response of Broilers Vaccinated at Different Ages against Avian Influenza Using Killed, Oil Emulsion Vaccines </p> | 138 |
| Marsh Johnson, T. | <p> Management Factors in the Development and Prevention of Pododermatitis Factores de Manejo en el Desarrollo y Prevención de la Pododermatitis..... </p> | 216 |
| Medina, J. C. | <p> Inocuidad de los Adsorbentes de Micotoxinas The Safety of Mycotoxin Binders </p> | 130 |
| Mendoza Avitia, D. | <p> Evaluación del Comportamiento Productivo de Dos Programas Anticoccidiales Comerciales en el Control de la Coccidiosis Aviar en una Parvada de Pollos de Engorda Evaluation of the Productive Performance of Two Commercial Anticoccidial Programs in the Control of Coccidiosis in a Broiler Flock </p> | 81 |
| Merino, R. | <p> Relación Filogenética de Aislamientos del Virus de la Enfermedad de Newcastle Phylogenetic Relationship of Several Newcastle Disease Virus Isolates </p> | 11 |
| Micheluzzi, L. | <p> Eficacia de Diferentes Combinaciones Estratégicas en la Reducción de los Efectos de T-2 y Aflatoxina B1 Sobre el Desempeño Productivo de Pollos Efficacy of Different Combination Strategies to Decrease the Effect of T2 Toxin and Aflatoxin B1 on Broiler Performance..... </p> | 135 |
| Montoya, A. | <p> Compatibillty Study of a Live <i>E. coli</i> Vaccine and a Live <i>Salmonella thyphimurium</i> Vaccine when they are Co-administered to SPF Leghorns Estudio de la Compatibilidad de Dos Vacunas Vivas (<i>Escherichia coli</i> y <i>Salmonella typhimurium</i>) para Administrarlas en Conjunto..... </p> | 218 |
| Morales Garzon, A. | <p> Protection after Challenge with a Low Pathogenicity Avian Influenza Virus in Birds Vaccinated with a Water- Solution Vaccine Administered by Aerosol Route Combined with an Emulsion Vaccine Compared with a Group Vaccinated with Emulsion Vaccine Only Protección Después del Desafío con un Virus de Influenza Aviar de Baja Patogenicidad en Aves Inmunizadas con una Vacuna en Solución Acuosa Administrada por Aerosol y Combinada con una Vacuna Emulsionada, en Comparación con un Grupo que Recibió sólo la Vacuna Emulsionada..... </p> | 220 |
| Moran, C. A. | <p> Structure Defines Function - Mannan Oligosaccharides for the Post-Antibiotic Growth Promoter Era La Estructura Define la Función – Oligosacáridos Mananos para la Era Posterior a los Antibióticos Promotores del Crecimiento..... </p> | 44 |
| Morfin, R. | <p> Evaluación de la Eficacia de la Aplicación Simultánea de las Vacunas de Marek y Emulsión de NC en Pollitos de Un Día de Edad Field Evaluation of the Simultaneous Administration of Marek's Disease and Oil-Emulsion Newcastle Disease Vaccines in Day-Old Chicks..... </p> | 19 |

| | | |
|------------------------|--|-----|
| Mosqueda Taylor, A. | Algunas Patologías en Reproductoras Pesadas Some pathologic Conditions in heavy breeders..... | 3 |
| Muñoz, J. | Las Limitantes Para la Inclusión de los DDGS de Maíz Limiting Factors for Feeding Corn DDGs | 222 |
| Muñoz, P. | Aislamiento y Serotipificación de Cepas de Bronquitis Infecciosa Isolation and Serotyping of Infectious Bronchitis Virus Strains | 145 |
| Nagaraja, K.V. | Monensin on Quantitative Reduction of <i>Salmonella</i> in the GI Tract of Turkeys Uso de la Monensina para la Reducción Cuantitativa de <i>Salmonella</i> en el Tracto Gastrointestinal del Pavo.. | 177 |
| Newman, L. | The significance of observed patterns of subclinical <i>Eimeria</i> spp. challenge on broiler performance Significado de los Patrones Observados con Coccidiosis Subclínica sobre el Rendimiento del Pollo de Engorda..... | 73 |
| Nuño, J. L. | Parámetros de Optimización para los Procesos de Vacunación en Aspersión y en el Agua de Bebida Optimum Parameters for Both Spray and Drinking Water Vaccination Processes..... | 65 |
| O'Connor, R. | <i>Salmonella</i> and <i>Listeria</i> – True Control... <i>Salmonella</i> y <i>Listeria</i> : Su Control Verdadero | 165 |
| Ojkic, D. | Genotyping of Canadian Isolates of Fowl Adenoviruses Genotipificación de Aislamientos Canadienses de Adenovirus Aviares..... | 90 |
| Ortega, R. | Aplicación de las Técnicas de PCR en el Diagnóstico de Enfermedades de las Aves PCR Techniques in Poultry Disease Diagnosis | 226 |
| Ortiz Garcia, O. | Evaluación <i>in vitro</i> de Dos Desinfectantes Sobre la Viabilidad de <i>Eimeria</i> spp. <i>In vitro</i> Evaluation of Two Disinfectants on the Viability <i>Eimeria</i> spp. | 223 |
| Ortiz Muñiz, A. | El ABP en la Enseñanza Clínica Avícola (Aprendizaje a Base de Problemas) Problem-Based Learning (PBL) in Poultry Medicine Education..... | 225 |
| Palya, V. | Comparative Efficacy of Several Vaccination Programs Including or not Including Recombinant HVT-ND Vaccine against Challenge with Mexican Chimahuacan NDV Strain Eficacia Comparativa de Varios Programas de Vacunación, Incluyendo o No a la Vacuna Recombinante HVT-ND Contra el Desafío con la Cepa Mexicana Chimalhuacán del Virus de la Enfermedad de Newcastle..... | 36 |
| Palya, V. | New Technology of Bursal Disease by an Immune Complex Vaccine Nueva Tecnología para la Enfermedad de Gumboro Complejo Inmune Vacunal | 228 |
| Perozo, F. | Mucosal Immunity and Protection Afforded by the VG/GA Strain of Newcastle Disease Virus Inmunidad Mucosal y Protección con la Cepa VG/GA del Virus de la Enfermedad de Newcastle..... | 14 |
| Pierce, J. L. | Defining Organic Trace Mineral Requirements for Poultry Definición de los Requerimientos de Minerales Orgánicos en Aves | 48 |
| Prado-Rebolledo, O. F. | Oxígeno Adicional en Incubación del Pollo de Engorda Incubating Broiler Eggs Adding Extra Oxygen..... | 230 |

| | | |
|---------------------|--|-----|
| Pulido, M. | Tifoidea Aviar en Ponedoras Comerciales: Diagnóstico y Propuesta de Control de una Enfermedad Emergente Fowl Typhoid in Commercial Layers: Diagnosis and a Control Proposal for an Emerging Disease | 172 |
| Quintero, M. M. T. | Primer Hallazgo en Mexico de Ácaros de la Familia Syringobiidae = Auscourascaridae Hallados en el Cañón de la Pluma de <i>Aratinga canicularis</i> First Report in Mexico of <i>Syringobiidae</i> Family Mites in the Feather Shafts of <i>Aratinga canicularis</i> | 233 |
| Quiroz, M. A. | Managing Gastrointestinal Health and Gangrenous Dermatitis Manejo de la Salud Gastrointestinal y la Dermatitis Gangrenosa | 156 |
| Radu, J. | The Significance of Coccidia Oocyst Shedding Pattern in Commercial Turkeys Significado del Patrón de Diseminación de Ooquistes de Coccidias en Pavos Comerciales | 76 |
| Raviv, Z. | Intraspecific Differentiating Real-Time PCR for <i>Mycoplasma gallisepticum</i> Live Vaccine Evaluation Studies Evaluación de una PCR de Tiempo Real para la Diferenciación Intraespecífica de una Vacuna Viva de <i>Mycoplasma gallisepticum</i> | 194 |
| Richardson, K. | Sources of Microbial Contamination of Feed and its Impact on Animal Performance Las Fuentes de Contaminación del Alimento y su Impacto Sobre el Rendimiento Animal | 234 |
| Ríos Cambre, J. F. | Efecto del Uso de una Vacuna Recombinante HVT/ND+SB-1 en Aves Comerciales en el Reaislamiento de la Cepa Chimalhuacán de la Enfermedad de Newcastle The Effect of Using a HVT/ND+SB-1 Recombinant Vaccine on the Reisolation of Newcastle Disease Virus Chimalhuacan Strain | 35 |
| Rodríguez, M. C. R. | Influencia de la Temperatura de Almacenamiento Sobre Los Huevos Fértiles Contaminados Influence of Storage Temperature on Contaminated Fertile Eggs | 236 |
| Rodríguez, M. C. R. | Eficacia de la Desinfección de Huevos Fértiles Recolectados del Suelo Sobre la Incubación The Efficacy of Disinfecting Floor Eggs on Incubation..... | 237 |
| Romero, G. N. | Clasificación de los Virus de Laringotraqueítis Infecciosa Aislados en México Entre 2005 y 2007 Mediante PCR y RFLPS PCR and RFLP Classification of Infectious Laryngotracheitis Viruses Isolated in Mexico between 2005 and 2007 | 239 |
| Rubio, M. E. | Desafíos a los que se Enfrentan las Parvadas Vacunadas Contra Coccidiosis Challenges Faced by Coccidiosis-Vaccinated Flocks | 95 |
| Ruiz, G. J. V. | Reporte de Dos Casos en Reproductoras Pesadas Asociados a Laringotraqueítis Infecciosa en México Infectious Laryngotracheitis in Broiler Breeders in Mexico: Two Case Reports | 85 |
| Saini, R. | The Use of PI 60/45 Water Treatment in the Production of Broilers without the use of Antibiotics El Tratamiento del Agua con PI 60/45 Mejora el Rendimiento de las Aves sin Usar Antibióticos | 240 |
| Salem, M. | Incremento de Casos de Tifoidea Aviar (<i>Salmonella enterica</i> , subespecie <i>enterica</i> , serovar <i>pullorum</i> - <i>gallinarum</i>) en America Latina Fowl Typhoid (<i>Salmonella gallinarum</i>) Re-emergence in Latin America: Causes and Measures Adopted to Decrease its Incidence..... | 170 |

| | | |
|---------------------|--|-----|
| Sánchez Ramírez, E. | Evidencia de Espermatecas o Nidos Espermáticos en un Lote de Gallinas Reproductoras Aisladas del CEIEPAv-UNAM y su Efecto Sobre la Fertilidad del Huevo Evidence of Spermathecae (Sperm Nests) in an Isolated Breeder Flock and their Effect on Egg Fertility 243 | 243 |
| Sánchez, H. I. | El Efecto del Butirato de Sodio en Dietas para Gallinas Sobre el Comportamiento Productivo y Calidad del Huevo The Effect of Sodium Butyrate in Layer Diets on Egg Production and Quality..... 28 | 28 |
| Sánchez, H. I. | La Implementación de Perchas Para Disminución de Estrés en la Crianza de Pavos Using Perches to Decrease Stress in Poults..... 246 | 246 |
| Sánchez, H. I. | Análisis Comparativo de Dos Tipos de Comederos Para Pavos Comparison of Two Feeder Types for Turkeys..... 247 | 247 |
| Santoyo, F. A. | Frecuencia de Ascarioideos Encontrados en Aves Psitácidas de la Ciudad de Cuernavaca Morelos Ascarid Frequency in Psitacine in Cuernavaca, Mexico 185 | 185 |
| Santoyo, F. A. | Efecto del Tipo de Iluminación (Fluorescente vs. Incandescente) Sobre los Parámetros Productivos en Reproductoras Pesadas en una Explotación en el Estado de Coahuila de la Semana 25 a la 34 The Effect of Lighting Type (Fluorescent vs. Incandescent) on Broiler Breeder Performance in a Coahuila Farm from Weeks 25 to 34..... 249 | 249 |
| Santoyo, F. A. | Efecto Sobre la Incubabilidad de Huevo Fértil con dos Tipos de Iluminación (Fluorescente vs. Incandescente) en una Explotación de Reproductoras Pesadas del Estado de Coahuila de la 29 a la 39 Semana The Effect of Lighting Type (Fluorescent vs. Incandescent) on Hatchability in a Coahuila Broiler Breeder Farm from Weeks 29 to 39..... 250 | 250 |
| Sarfati, D. | Potencia de Vacunas Comerciales Contra la Enfermedad de Newcastle Potency of Commercial Newcastle Disease Vaccines 33 | 33 |
| Sarfati, D. | Sinergia del Virus de la Enfermedad de Newcastle Lentogénico con el Virus de Influenza Aviar de Alta Patogenicidad Synergy between Lentogenic Newcastle Disease and High Pathogenicity Avian Influenza Viruses 40 | 40 |
| Sarfati, D. | Efectividad de una Vacuna Activa Recombinante Contra la Influenza Aviar en Vector Newcastle Prevenir la Excreción del Virus de Influenza Aviar de Baja Patogenicidad The Effectiveness of a Live, Recombinant Newcastle Disease Virus-Vectored Avian Influenza Vaccine in the Prevention of the Reisolation and Spread of a Low Pathogenicity Avian Influenza Virus 123 | 123 |
| Sarfati, D. | Sistema DIVA Contra la Influenza Aviar Utilizando una Vacuna Activa Recombinante en Vector Newcastle A DIVA System for Avian Influenza Using a Live Recombinant a NDV-Vectored Vaccine 124 | 124 |
| Sarfati, D. | Caracterización Molecular del Virus de Bronquitis Infecciosa en Aislamientos de 10 Años Utilizando la Técnica de RT- PCR- RFLP PCR/RFLP Molecular Characterization of Infectious Bronchitis Viruses Isolated Throughout Ten Years 146 | 146 |
| Sarfati, D. | Uso de la prueba de RT-PCR Anidado para la Detección de Partículas de RNA Del Virus de Influenza Aviar a Partir de Vacunas Emulsionadas Comerciales Using a NESTED RT-PCR for the Detection of Avian Influenza Virus DNA Particles in Commercial, Oil Emulsion Vaccines 252 | 252 |
| Sefton, A. E. T. | Trace Mineral levels and Egg Shell Quality Los Niveles de Minerales Traza y la Calidad del Cascarón 253 | 253 |

| | | |
|-----------------|--|-----|
| Seletskaja, E. | Development of a Suspension Microarray Assay for Antibodies to Marek's Disease Virus in Chicken Serum Desarrollo de un Ensayo Serológico Basado en Microesferas para la Detección de Anticuerpos Contra el Virus de la Enfermedad de Marek en Suero de Pollo..... | 255 |
| Sellers, H. S. | Re-emergence of Nephropathogenic Infectious Bronchitis in the U.S.? Resurgimiento del Virus Nefropatógeno de la Bronquitis Infecciosa en EE.UU..... | 148 |
| Senne, D. A. | Options for Control of Low Pathogenicity Notifiable Avian Influenza (LPNAI) Opciones para Controlar la Influenza Aviar de Baja Patogenicidad, Notificable (LPNAI)..... | 120 |
| Spencer, J. L. | Review of Factors that Influence Survival of Avian Influenza Viruses and Newcastle Disease Viruses in the Environment and during Composting Revisión de los Factores que Afectan la Supervivencia de los Virus de la Influenza Aviar y de la Enfermedad de Newcastle en el Medio Ambiente y durante la Elaboración de Composta | 39 |
| Stanford, M. A. | Utilización de Nucleótidos en Gallinas Productoras de Huevo Using Nucleotides in Breeders | 257 |
| Stoute, S. T. | A Field Comparison of Farm Production Parameters in Beak Trimmed Layers Versus Non Beak Trimmed Layers in Northern California Comparación de Campo de los Parámetros Productivos en Ponedoras Sometidas o No a Recorte del Pico en la Región Norte de California | 52 |
| Tapia, E. | Análisis de los Resultados de Sensibilidad Antimicrobiana Realizados en Aislamientos Bacterianos de Aves Durante el Periodo 2005 a 2006 Antimicrobial Sensitivity of Bacteria Isolated in 2005 – 2006 | 259 |
| Teeter, R. G. | Calorimetry Applications Quantify the Variable Cost of Subclinical Coccidiosis ("Coccidiosis") at Various Points in the Broiler Growth Curve Aplicaciones de la Calorimetría para Cuantificar el Costo Variable de la Coccidiosis Subclínica ("Coccidiosis") en Diferentes Puntos de la Curva de Crecimiento del Pollo de Engorda | 99 |
| Thachil, A. J. | Cellulitis in Turkeys: A primary Clostridial Disease Celulitis en Pavos: Una Enfermedad Clostridiana Primaria | 159 |
| Toro, H. | Effects of Chicken Anemia Virus and Infectious Bursal Disease Virus in Commercial Chickens Efectos de los Virus de la Anemia del Pollo y de la Infección de la Bolsa de Fabricio | 71 |
| Tripathy, D. | Strategies to Develop Fowlpox Virus Vected Polyvalent Vaccines Estrategias para el Desarrollo de Vacunas Polivalentes Usando como Vector al Virus de la Viruela Aviar... | 115 |
| Trujano, R. I. | Evaluación Bacteriológica de Huevo de Reproductoras Pesadas Recolectado de Piso Previamente Desinfectado Bacteriological Evaluation of Previously-Disinfected Broiler Breeder Floor Eggs | 261 |
| Uzal, F. A. | Progression of Peripheral Neural Lesions in Riboflavin Deficiency of Chickens Progresión de las Lesiones Neurales Periféricas en Pollos con Deficiencia de Riboflavina..... | 191 |
| Velek, K. | Development of an Innovative Multi-Species Avian Influenza Antibody Blocking ELISA Desarrollo de una Nueva Técnica Multiespecies de ELISA de Bloqueo de Anticuerpos para la Influenza Aviar | 140 |

| | | |
|------------------|--|-----|
| Venne, D. | Thermographic Evaluation of Aerosol Vaccination Evaluación Termográfica de la Uniformidad de la Vacunación por Aspersión | 195 |
| Venosa, P. F. J. | <i>Brachyspira pilosicoli</i> , la Importancia de un Nuevo Agente Etiológico Presente en México <i>Brachyspira pilosicoli</i> : The Importance of an Emerging Pathogen in Mexico | 166 |
| Woolcock, P. R. | Nephritis Associated with Infectious Bronchitis Virus Infection in Young Layer Chickens Nefritis Asociada con el Virus de la Bronquitis Infecciosa en Ponedoras Jóvenes | 263 |
| Yegani, M. | Effects of Feed-Borne <i>Fusarium</i> Mycotoxins on Health and Reproductive Performance of Broiler Breeders Efecto de las Micotoxinas de <i>Fusarium</i> en el Alimento sobre la Salud y el Rendimiento Reproductivo de las Hembras Reproductoras Pesadas | 264 |
| Yiannikouris, A. | Mycotoxin Impact on Gastrointestinal Function: Use of the Sequestering Properties of <i>Saccharomyces cerevisiae</i> Cell Wall Glucans to Alleviate the Risk Impacto de las Micotoxinas sobre la Función Gastrointestinal: Uso de las Propiedades Secuestrantes de los Glucanos de la Pared Celular de <i>Saccharomyces cerevisiae</i> para Contrarrestar este Riesgo | 129 |
| Youil, R. | Development of an Injectable Live Attenuated Vaccine against Fowl Cholera - Vaxsafe [®] PM Desarrollo de una Vacuna Viva Atenuada Inyectable contra el Cólera Aviar: Vaxsafe [®] PM | 55 |
| Zavala, G. | Practical Use of Molecular Tools for Epidemiological Studies of Current Mycoplasma Respiratory Problems Uso Práctico de Herramientas Moleculares para Estudios Epizootiológicos de Problemas Respiratorios Actuales | 191 |
| Zhang, G. | Efficacy of Microencapsulated Inovapure [®] 222 on the Control of Clostridial Necrotic Enteritis in Broiler Chickens Eficacia de Inovapure [®] 222 Microencapsulada en el Control de la Enteritis Necrótica Clostridiana en Pollo de Engorda..... | 155 |
| Zhang, G. | Microencapsulation of Lysozyme, a Natural Antimicrobial for Controlling Necrotic Enteritis by Radiant Energy under Vacuum (REV) Technology Microencapsulamiento de la Lisozima, Antimicrobiano Natural, para el Control de la Enteritis Necrótica, Utilizando la Tecnología de Energía Radiante al Vacío (REV) | 265 |

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

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

CLINICAL CASES WITH HISTOPATHOLOGY

CASOS CLÍNICOS CON HISTOPATOLOGÍA

Oscar J. Fletcher, Tahseen Abdul-Aziz, and H. John Barnes

Department of Population Health and Pathobiology, College of Veterinary Medicine, NC State University, Raleigh, NC and NC Department of Agriculture & Consumer Services, Rollins Diagnostic Laboratory, Raleigh, NC

RESUMEN

La histopatología es una importante herramienta para obtener información útil en la determinación de las causas y entender la patogenia de las enfermedades. Los patólogos y los médicos encargados del diagnóstico la utilizan rutinariamente en los laboratorios para determinar la causa de la muerte de los animales. Presentaremos una serie de casos clínicos desde el punto de vista de los patólogos aviares para examinar laminillas y generar informes de histopatología. Se tratará de una sesión interactiva en la que los asistentes determinarán las respuestas histológicas básicas de los tejidos de las aves a las enfermedades. Será necesario relacionar los hallazgos histopatológicos con la historia clínica y demás información que se proporcione para llegar a los diagnósticos diferenciales, sugerir procedimientos diagnósticos adicionales y determinar el diagnóstico definitivo.

CASE REPORTS

Histopathology is an important tool available for obtaining information that is useful in determining the causes and understanding the pathogenesis of diseases. This diagnostic tool is used routinely by diagnosticians and pathologists at veterinary diagnostic laboratories to determine the cause of death of animals. A series of avian clinical cases will be presented from the perspective of avian pathologists who examine slides and generate histopathology reports.

This will be an interactive session in which members of the audience will recognize the basic histologic responses of avian tissues to injuries, and will correlate the histopathologic findings with history and other information provided to arrive at differential diagnoses, suggest additional diagnostic procedures that could/should be done, and determine a final diagnosis.

Participants will observe in the cases presented some or all of the following basic responses of avian tissues to injury.

1. Congestion and Hemorrhage
2. Inflammation
Edema

- Fibrin
- Platelets
- Heterophils
- Lymphocytes (Lymphoid Cells)
- Macrophages/Histiocytes
- Giant Cells
- 3. Cell Degeneration
 - Hydropic
 - Fatty Change
- 4. Necrosis
 - Liquafactive
 - Coagulative
 - Fibrinoid
 - Caseous
- 5. Disturbances of Growth
 - Hypoplasia
 - Atrophy
 - Hyperplasia
 - Metaplasia
 - Neoplasia
- 6. Things
 - Viral Inclusions
 - I/N
 - I/C
 - Bacteria
 - Fungi
 - Parasites
 - Urates
 - Mineral
 - Pigments

Terms used to describe lesion patterns are focal, multifocal, and diffuse. Acute, subacute, and chronic are commonly used terms that are subject to interpretation as are the terms mild, moderate, and severe. Members of the audience are encouraged to question our use of any of these expressions as the lesion description and diagnoses are developed for each of the cases presented.

The importance of history, clinical observations, gross lesions, results of laboratory testing including microbiological cultures, serology, virus isolation, and other diagnostic procedures such as immunofluorescence, immunohistochemistry, and PCR techniques can not be over emphasized. Someone has

to put all of the case data together. In most situations this is the clinician, not the histopathologist. Somebody has to be the quarterback for the case. Efforts in generating information from histopathology are to support the quarterback.

The following cases, most selected from current accessions, demonstrate some of the diagnostic challenges commonly faced. Some of these cases are related either by similarity of lesions or by challenge in demonstrating a specific agent or diagnostic features. Case substitutions may be made prior to the presentation. The contribution of materials from the Georgia Poultry Laboratory, Oakwood, GA is acknowledged.

Case 1. Broilers (43d): Sick birds – elevated mortality with respiratory signs. Tissues submitted are tracheas and eyelids.

Lesions are:

Dx:

Differentials; suggestions; comments:

Case 2. Broilers (43d): Sick birds – elevated mortality with respiratory signs. Tissues submitted are tracheas and eyelids.

Lesions are:

Dx:

Differentials; suggestions; comments:

Case 3. Broiler breeders (59wk): Sick birds – elevated mortality with respiratory signs. Tissues submitted are tracheas and eyelids.

Lesions are:

Dx:

Differentials ;suggestions; comments:

Case 4. Pheasants (24-25wk): Flock of 3000 was experiencing increased mortality over a period of one month. “Birds just lay down and die”. Multiple tissues submitted.

Lesions are:

Dx:

Differentials; suggestions; comments:

Case 5. Hobby bird – Turkey (4m2wk): Sick bird with skin/feathering problem. Skin was submitted.

Lesions are:

Dx:

Differentials; suggestions; comments:

Case 6. Commercial layers (50wk): Sick birds – elevated mortality. Two dead birds had tumors in kidneys and visceral gout; four live birds had liquefied ova, but no lesions in visceral organs. Submitted tissues included kidney and trachea.

Lesions are:

Dx:

Differentials; suggestions; comments:

Case 7. Broiler Breeder (6wk): Sick birds – elevated mortality in flock of 22,000. Gross lesions were ulcers in cecum with extensive peritonitis. Tissues submitted were ceca and small intestine.

Lesions are:

Dx;

Differentials; suggestions; comments:

Case 8. Broiler Breeder (10-11wk): Males. Downer birds. Suspect Ca tetany. Tissues submitted include vertebral column.

Lesions are:

Dx:

Differentials; suggestions; comments:

Case 9. Turkeys (39wk and 57wk): Turkeys submitted were culled due to stunting and lameness. Submitted tissues included vertebral column.

Lesions are:

Dx:

Differentials; suggestions; comments:

Pre-break lesion recognition exercise. For each of following cases give tissue, lesion(s), and Dx .

1. Pheasant
2. Pea Fowl
3. Broiler Breeder
4. Quail
5. Guinea Fowl

6. Broiler
7. Turkey
8. Broiler Breeder
9. Broiler breeder
10. Broiler breeder
11. Broiler breeder
12. Broiler Breeder

ALGUNAS PATOLOGÍAS EN REPRODUCTORAS PESADAS

SOME PATHOLOGIC CONDITIONS IN HEAVY BREEDERS

Angel Mosqueda Taylor

Asesoría Técnica Especializada en Avicultura, almosta@hotmail.com

SUMMARY

This is primarily a findings and practical-based presentation. It is simply to show in realistic terms some of the many pathologic conditions afflicting heavy breeders – whether in the growth and development stages or in the production phase. It is therefore more of the author’s commentary of day-to-day real-life experiences rather than a formal treatise of any particular abnormality or disease.

OBJETIVO

Esta presentación es eminentemente documental y práctica, y no pretende sino mostrar con realismo algunas de la múltiples condiciones patológicas que sufren las aves reproductoras pesadas, ya sea en su etapa de crecimiento y desarrollo o en producción. Es pues, más un testimonial y narrativo de experiencias vividas por el autor durante su trabajo cotidiano en granjas, que un estudio formal de algún padecimiento en particular.

Temas a tratar:

1. Artritis purulenta en aves en crecimiento y desarrollo.
2. Coccidiosis posvacunal y de campo.
3. Canibalismo en producción.
4. Mortalidad por picadura de alacrán en crianza y producción.

5. Enfermedades “emergentes”:
 - a. Tifoidea aviar
 - b. Micoplasmosis
 - c. Laringotraqueítis
 - d. Cólera aviar

ARTRITIS PURULENTA

Este padecimiento es siempre un riesgo potencial en la crianza de reproductoras pesadas, y llega a constituir un concepto de pérdidas económicas considerables por la afección tanto de hembras como de machos. Hay parvadas donde es casi inexistente y otras donde puede ser una de las causas de mortalidad y desecho más importantes en distintos estadios de la crianza y desarrollo de parvadas. Aunque sus orígenes son en lo general conocidos por los criadores de reproductoras, no siempre se tiene éxito en la prevención de esta manifestación clínica, la cual se caracteriza por la inflamación de articulaciones de elevada tensión corporal, como la tibiotarsiana, la fémoro-tibial, y en ocasiones, también la articulación del pié (tarso-metatarsiana).

Las circunstancias que favorecen la presentación de este problemas son, por ejemplo, el exceso de humedad (y contaminantes bacterianos) en la cama, presencia de salientes punzo-cortantes, traumatismos como los causados por el corte de pico, rasgaduras de la piel, lesiones traumáticas por picoteo, aftas por micotoxinas, etc. En cierto tipo de equipos de

comedero, como los de cadena, hemos observado el frecuente atoramiento de las patas y piernas en las crestas de alambre que delimitan cada división del comedero, causando daños a las articulaciones que después pueden fomentar la implantación de bacterias como *Staphylococcus aureus*, *Enterococcus* spp., *Streptococcus* spp. y *Escherichia coli*, bacterias que migran a través de la sangre a partir de lesiones respiratorias o entéricas. La aplicación de vacunas con agujas o punzones contaminados constituye también una oportunidad para introducir parenteralmente bacterias que forman parte del micro-ambiente natural de las aves, pero que de esta forma adquieren la oportunidad de actuar de manera patológica.

Las enfermedades inmuno-supresoras son, en lo general, un fuerte predisponente a que las aves sufran la invasión sistémica de bacterias como las antes mencionadas, y es común que ocurran después de padecimientos de tipo respiratorio complicados.

No hay una estadística como tal que defina la magnitud de este padecimiento en términos de porcentaje de desecho o mortalidad, pero ha habido casos donde se convierte en el principal concepto de descarte de aves durante la crianza y desarrollo.

Tal vez lo que hace más importante su presencia es la impredecible probabilidad de éxito para su tratamiento efectivo, pues los agentes bacterianos causales suelen ser resistentes a múltiples antibióticos de uso común. Por otro lado, la propia localización de la lesión y la formación de exudados dificulta la difusión de los anti-microbianos en la zona infectada.

La prevención de la artritis purulenta no se basa en la eliminación del agente en la granja, pues frecuentemente es un habitante normal de ella y del cuerpo de las aves, sino en **evitar condiciones que puedan facilitar la multiplicación de las bacterias causales, como la prevención de traumatismos en el ave, control de la calidad de la cama, cuidado de la integridad del sistema inmuno-competente (prevención de enfermedades inmuno-supresoras como micotoxicosis, infección de la bolsa de Fabricio, enfermedad de Marek, etc.), buen manejo de la salud intestinal y diseñar estrategias para que los manejos habituales, como son la aplicación de vacunas, el corte de pico, el pesaje, etc., no se conviertan en una oportunidad para que los estafilococos patógenos y bacterias asociadas entren en acción.**

COCCIDIOSIS VACUNAL Y DE CAMPO

La coccidiosis es de las pocas enfermedades que tienen garantizada su presencia en cualquier granja avícola, y su severidad es simplemente modulada a través de las acciones de manejo, inmunológicas y

terapéuticas emprendidas durante el levante de las parvadas.

En vista de la popularidad que ha alcanzado el uso de vacunas contra coccidiosis en reproductoras, los brotes de campo que ocurren a temprana edad se asocian principalmente a fallas en la aplicación de la vacuna, o bien a un estado sanitario deplorable de la granja al momento de recibir la nueva parvada. Lo más común es observar brotes de coccidiosis de campo semanas después del periodo en que ocurrió la reacción pos-vacunal, por la acción tanto de coccidias de campo residentes de la granja, como de coccidias vacunales, y la causa es básicamente la ausencia de una buena inmunidad.

La vacunación contra coccidiosis se realiza ya sea en la planta incubadora o en la granja. **La vacunación en la incubadora es el método que ha producido los resultados mejores y más consistentes.**

El manejo de la reacción pos-vacunal se ha convertido en un arte, y solo cuando se tiene suficiente experiencia o asesoría esta reacción transcurre sin mayor novedad. Aparte de la enorme importancia que reviste la calidad de la aplicación de la vacuna, los demás factores que entran en juego para que una reacción pos-vacunal resulte severa son los mismos que determinan la magnitud de un brote de campo, es decir: el estado de inmuno-competencia del ave, la humedad de la cama, la ventilación y el espacio vital. En el caso de la vacunación, la manipulación de los factores ambientales se vuelve una especie de juego estratégico donde se pretende, por un lado, permitir que las coccidias vacunales tengan varios ciclos de replicación en el ave para inducir una buena inmunidad, y por el otro, controlar en un momento dado ese reciclaje en el ave y siembra continua de oocistos en la cama para impedir que la reacción se transforme en un brote.

Merece especial atención la incertidumbre que siempre queda después de que pasa el periodo de reacción pos-vacunal clásico, que es entre la 3ª y 4ª semana de edad, ya que el siguiente momento de comprobación de que todo fue exitoso es entre la 8ª y 14ª semana de edad, donde hay que asegurarse que *Eimeria necatrix* no emerja como un problema patológico. Cuando no se está alerta de esta posibilidad, el desarrollo lento y silencioso de una infección por esta coccidia suele causar sorpresas muy desagradables, ya que el daño que produce en el intestino y la posibilidad de que se asocie con bacterias como *Clostridium perfringens* la convierte en una enfermedad realmente temible. Las consecuencias sobre la producción entonces pueden ser graves, al alterarse la uniformidad de la parvada, incrementarse la mortalidad, deteriorarse la salud de las aves y mermar el potencial de producción de huevos. **El buen manejo de las técnicas de vacunación, el mantenimiento de la capacidad inmuno-competente, el cuidado**

esmerado del micro-ambiente del ave, el monitoreo constante de la reacción pos-vacunal mediante necropsias y el conteo de oocistos son ayudas valiosas para el control de la coccidiosis en reproductoras.

CANIBALISMO

En las estirpes modernas de reproductoras pesadas ha sido cada vez menos común enfrentar casos de canibalismo, y ahora son varias las empresas con parvadas a las que no se realizó el corte de pico. Su predisposición a adquirir este vicio de comportamiento es ahora mucho menor que antes, a pesar de la elevada productividad que suelen tener algunas estirpes. Además, la tecnología que se utiliza en la elaboración de alimentos balanceados ha registrado avances notables y con ello se han logrado prevenir deficiencias nutricionales que antes eran comunes. A pesar de esta ausencia de predisposición, y a pesar de la elevada tecnología nutricional, aún es posible presenciar problemas de canibalismo a nivel de parvada, ya que el error humano es un factor que en cualquier momento entra en acción.

La investigación de la causa de un problema de canibalismo en reproductoras pesadas no siempre es exitosa, ya que cuando se revisan las fórmulas de alimento, estas resultan “correctas”, y cuando se investiga la serie de procesos encadenados para la elaboración del alimento balanceado es muy poco probable detectar fallas que expliquen convincentemente la situación. Pero lo más complicado es, al final de cuentas, la investigación de la calidad de diversos ingredientes, cuyo análisis se hace imposible por la escasez de laboratorios capaces de realizar, por ejemplo, determinaciones de vitaminas, minerales, aminoácidos, etc.

Por esta razón, cuando se está frente a un caso de canibalismo se crea una situación confusa, y ante la incierta posibilidad de acertar en la causa, nos vemos obligados a poner en práctica diversas acciones de manejo y de tipo nutricional de manera un tanto empírica, basados en hipótesis inspiradas en las causas de todos conocidas.

MORTALIDAD POR PICADURA DE ALACRÁN

Esta peculiar patología puede parecer trivial en regiones donde los alacranes son poco frecuentes o pertenecen a especies poco venenosas, pero hay varios estados de la república donde las pérdidas económicas debidas al piquete de alacrán son muy elevadas, llegando en ciertas épocas del año a constituir la principal, o una de las principales causas de muerte en reproductoras en crianza y producción.

Son muchas las variedades de alacranes presentes en México, y destacan por su ponzoña las de estados como Nayarit, Morelos y Guerrero, donde la avicultura de pollo de engorda y reproductoras conoce desde siempre la letalidad del piquete de alacrán en las aves, otros animales y frecuentemente también en humanos.

La capacidad de supervivencia de estos antiquísimos habitantes del planeta (presentes desde hace más de 350 millones de años), su resistencia a muchos de los insecticidas de uso común y la estrecha cercanía entre su hábitat y las granjas avícolas generan una buena oportunidad para que estos arácnidos entren a las casetas, donde encuentran resguardo del frío, calor, viento y agua.

En los lugares donde la presencia de alacranes muy venenosos es común, se tienen que utilizar aplicaciones de insecticida dirigidas al control del alacrán, e incluso hay empresas que para lograr un mejor control han hecho adaptaciones a los contornos de las casetas para dificultar que estos animales trepen por las bardas y entren a las casetas.

Entre las especies de alacranes más temibles están *Centruroides noxius* (Nayarit), *C. suffusus* (Durango) y *C. limpidus* (Guerrero y Morelos).

El tratamiento de las reproductoras picadas de alacrán es prácticamente inútil, pues cuando son detectadas las aves con signos sugestivos suele ser demasiado tarde. Además, el uso de suero anti-alacrán no se justifica debido a su elevado costo.

ENFERMEDADES “EMERGENTES”

Solemos referirnos con el término de “emergentes” a aquellas enfermedades que, siendo antiguas y bien conocidas en la avicultura, vuelven a presentar una imagen de resurgimiento o reactivación después de un periodo donde eran consideradas como padecimientos bajo control. Tal es el caso de la tifoidea aviar, la micoplasmosis, la laringotraqueítis y el cólera aviar. Estas cuatro enfermedades nunca han dejado de estar presentes en la avicultura de muchos países, incluyendo el nuestro. El aparente “resurgimiento” de las enfermedades mencionadas tiene relación con la evolución de nuestra avicultura, la cual ha crecido de manera sorprendente en las últimas décadas, rodeada de rezagos importantes en materia sanitaria, y en medio de la escasa organización que ha caracterizado la coexistencia de las distintas facetas de la avicultura mexicana. Me refiero expresamente a la falta de orden en el establecimiento de granjas avícolas, avicultura de traspatio, aves de combate, rastros, plantas de incubación y plantas de alimento. Sin pretender generalizar, lo cual sería injusto, debo mencionar que existen numerosas granjas comerciales de diverso tipo, incluyendo reproductoras pesadas, que en su momento fueron construidas en predios alejados de la población,

pero que al paso del tiempo han sido rodeadas por caseríos en los que de manera familiar se practica la avicultura de traspatio, la cual puede constituir un riesgo para la salud de las aves comerciales. En muchos de estos casos fue obvia la falta de precaución al construir granjas en terrenos apenas suficientes para la edificación de las naves avícolas, sin considerar la permanente necesidad de estar alejado de la población humana y la avicultura rural o de traspatio. En otros casos, la población se acerca a las granjas aprovechando la infraestructura eléctrica, hidráulica, carretera, etc. que se construye para dar vida al negocio avícola.

Desde hace mucho ha sido tentador el culpar a las aviculturas de traspatio y de combate de ser reservorios de agentes patógenos que luego invaden las granjas avícolas, pero la verdad es que debieran haberse establecido normas bien elaboradas y llevadas a la práctica, para que cada tipo de explotación quedara en el lugar que le corresponde. Los agentes patógenos también pueden transmitirse de las aves comerciales a las de traspatio o rurales. En efecto, los riesgos de esa informal “convivencia” y cercanía entre las distintas actividades avícolas no siempre han sido debidamente ponderados, y más bien ha habido exceso de confianza, desdeñándose la posibilidad de intercambio de patógenos bacterianos o virales a través de trabajadores que tienen aves en sus casas, lo que constituye una importante falla de bioseguridad.

COMENTARIOS SOBRE TIFOIDEA AVIAR

En los años 60s, 70s y parte de los 80s, la infección por *Salmonella gallinarum* hizo grandes estragos en diversas compañías avícolas de México, y su presencia abarcó desde pollo de engorda hasta progenitoras. Poco a poco se pusieron en marcha esfuerzos para lograr el control y eventual erradicación de este padecimiento, alcanzándose importantes avances, de manera que desde hace buen tiempo se ha considerado erradicada de los planteles de aves progenitoras, facilitando el mantenimiento de granjas de reproductoras y pollo de engorda libres de tifoidea aviar.

Esto ha hecho que en años recientes se haya centrado la atención en otras infecciones por salmonelas móviles como la *S. enteritidis*, cuyos efectos patológicos en la gallina son insignificantes comparados con los producidos por *S. gallinarum*, aunque en contraste con esta última, *S. enteritidis* es muy importante en salud pública.

Fuera de la vacuna con la cepa R-9 de *S. gallinarum*, bajo control oficial, en México no hay registros autorizados de vacunas y bacterinas para la prevención de estas dos infecciones, por considerarse que interfirieren con los lineamientos de la Norma

Oficial que regula la campaña Nacional de Erradicación de la Tifoidea Aviar.

El método clásicamente probado para la erradicación de brotes en reproductoras es la eliminación de la parvada, seguida de escrupulosos procedimientos sanitarios en la preparación de la granja para recibir la nueva parvada. Esta decisión (la eliminación de la parvada enferma) puede o no ser considerada de inmediato, dependiendo de muchas razones, y lo que resulta innegable es que, independientemente de las acciones que se decida emprender y la velocidad con que se lleven a cabo, SE TIENEN QUE IMPLEMENTAR FORZOSAMENTE MEDIDAS PARA PROTEGER A LOS DEMÁS LOTES DE LA EMPRESA, ANTE EL RIESGO DE QUE CONTRAIGAN LA INFECCIÓN EN ALGÚN MOMENTO.

Esta necesidad parece ser ignorada cuando se considera de manera rigorista la aplicación de las normas oficiales, pero es algo que tiene su propio sustento. Es, por lo tanto, muy recomendable conocer las características de las herramientas modernas, tanto de tipo inmunológico como terapéutico para hacer uso de ellas en caso necesario, pues NADA ES PEOR ANTE UN BROTE DE TIFOIDEA AVIAR, QUE DEJAR DESPROTEGIDAS A LAS DEMAS PARVADAS DE LA COMPAÑÍA. EL NO HACERLO Y SOLO CONCENTRARSE EN EL TRABAJO CON EL LOTE DE AVES ENFERMAS ES UN GRAVE ERROR DE CONSECUENCIAS NEGATIVAS.

Hoy en día se cuenta con bacterinas y vacunas de *Salmonella enteritidis*, que al parecer han resultado ser una buena alternativa para la prevención y control de la tifoidea aviar y, por supuesto, de la infección homóloga. Así mismo, la propia vacuna y bacterina a base de la cepa de *S. gallinarum* R-9 son herramientas muy útiles, advirtiendo que su elaboración debe estar en manos de laboratorios totalmente capacitados para ello.

Cuando se trata de controlar la presencia de tifoidea aviar en una empresa, hay que tener en cuenta que las posibilidades de diseminación de la infección hacia otras parvadas son muchas, por lo que no debe perderse el control de todos los movimientos de personal, alimento, materiales, equipo, etc. Al momento de enviar una parvada enferma al rastro se deben emplear métodos apropiados para la desinfección y remoción de la cama, así como precauciones sanitarias específicas atendiendo a la importancia del caso durante todo el proceso de saneamiento de la granja.

No se conocen datos precisos sobre el origen de los brotes recientes de tifoidea aviar en México, pero se sabe de un incremento coincidental de casos en otras partes de Latinoamérica. Personalmente creo que puede

relacionarse con un debilitamiento en los procedimientos integrales de bioseguridad, quizá relacionado con la inexacta percepción de que enfermedades como la tifoidea aviar estaban ya muy controladas, y sin prestar la debida atención al continuo crecimiento de la avicultura de traspatio y su cercanía a la avicultura comercial. No se tienen pruebas, pero uno de los materiales de los que hay que sospechar como fuente de contaminación para las granjas de reproductoras es el material usado como cama, pues en el campo hemos comprobado el contacto de aves de traspatio con dicho material (ya sea viruta o aserrín de madera, cascarilla de arroz, etc.), dejando en él materia fecal. Entre una parvada infectada y la siguiente, los restos de cama y porciones de cadáveres son un reservorio de la infección.

Tomando en cuenta la presencia de tifoidea aviar en algunas regiones, independientemente de los esfuerzos que esas compañías han realizado para librarse del problema, hay que estar alerta realizando los monitoreos bacteriológicos respectivos, no solo para cumplir con exigencias oficiales sino principalmente para tener conocimiento de todo lo que suceda con nuestras aves, y así poder implementar las medidas preventivas o de control que se considere pertinentes.

COMENTARIOS SOBRE MICOPLASMOSIS

La infección por *M. gallisepticum* y/o *M. synoviae* en progenitoras, y por ende en reproductoras, es un problema mucho menor de lo que fue hace muchos años. Tradicionalmente se ha mantenido la idea de que las reproductoras, en su mayor parte, si no es que todas, han estado naciendo libres de estas bacterias, y las infecciones registradas en el campo se consideran adquiridas horizontalmente por la contaminación de equipo, materiales, cama o por la entrada de pájaros a las casetas. Su control en muchas granjas de reproductoras ha estado basado en dos prácticas fundamentales: 1) los tratamientos pulsátiles con antibióticos antimicoplásmicos y 2) el uso de vacunas y bacterinas.

El éxito de estos métodos depende de muchos factores. En el caso de las acciones terapéuticas el resultado es bueno cuando se usan las dosis adecuadas y cuando el agente es sensible. Esto, como es de suponerse, no siempre se cumple y por lo tanto los resultados son variables.

El uso y selección apropiados de vacunas y bacterinas es un método más acorde con la realidad actual, ya que se logra que el ave desarrolle sus propias defensas, en vez de depender únicamente de la presencia del antibiótico en sus tejidos.

La exigencia por obtener pollitos que reaccionen de manera “suave” a las vacunaciones con virus

respiratorios, y que en momentos difíciles (estrés, inmunosupresión, infecciones respiratorias de campo) no sufran de enfermedad respiratoria crónica complicada, con los consecuentes gastos de medicación y merma de los parámetros productivos, **ha hecho que se renueve el interés por tener parvadas libres de *Mycoplasma*.**

La micoplasmosis ha crecido en importancia, no tanto porque las manifestaciones sean tan catastróficas como hace veinte años, sino porque el nivel de tolerancia hacia estas infecciones se ha reducido a medida que se necesita mayor eficiencia, mayor competitividad y menor costo de producción.

Al estar las progenitoras libres de *Mycoplasma* se ha podido tener parvadas de reproductoras también libres de este agente, que pueden mantenerse en ese estado SIEMPRE Y CUANDO SE TENGAN SUFICIENTES PRECAUCIONES EN MATERIA DE BIOSEGURIDAD PARA IMPEDIR LA INFECCIÓN HORIZONTAL. La dificultad para controlar la entrada de pájaros a las casetas de reproductoras en muchas empresas, las fallas de bioseguridad con el personal y materiales que ingresan a la granja y la posible contaminación del material que es utilizado como cama (viruta o aserrín de madera, cascarilla de arroz, etc.) tienen que ver con la contaminación de parvadas que nacieron libres de *Mycoplasma*.

En definitiva, la mejor prevención y control de estas infecciones en reproductoras se logra estableciendo buenos programas de vacunación. Las vacunas ts-11 (termo-sensible) y F-Vax (cepa F) de *M. gallisepticum* son las más populares, y esta última posee el mayor potencial para crear un estado de exclusión competitiva. A medida que más parvadas son vacunadas, esta cepa va imponiendo su presencia en las parvadas y prevaleciendo sobre la bacteria patógena de campo, por lo que en zonas de mayor riesgo es una vacuna muy recomendable. Cuando el nivel de bioseguridad de la granja es muy alto, y se logra impedir de manera efectiva la entrada de *Mycoplasma* a la parvada durante la etapa de levante, ambas vacunas ofrecen buenos resultados.

El uso de bacterinas de *M. gallisepticum* constituye un excelente complemento al programa de vacunación con vacunas vivas, lográndose producir una inmunidad muy sólida y duradera.

En el caso de *M. synoviae*, sus repercusiones patológicas se consideran inferiores a las producidas por *M. gallisepticum*. Sin embargo, al realizar estudios serológicos es mayor la incidencia de muestras positivas a *M. synoviae*, lo que no necesariamente significa que su importancia sea mayor en términos de daño a los parámetros productivos. Comúnmente, cuando en una empresa se emprende un programa de prevención y control de micoplasmosis se abarcan

ambas especies, siendo también popular el uso de la vacuna contra *M. synoviae*.

No son pocas las empresas de reproductoras que deciden emplear antimicoplásmicos durante la etapa de producción, con objeto de evitar que se eleven los niveles de *Mycoplasma* de campo.

COMENTARIOS SOBRE LARINGOTRAQUEITIS INFECCIOSA

Después de ser considerada durante muchos años una enfermedad bien controlada en pollo de engorda, y prácticamente ausente de granjas de gallinas reproductoras, de pronto el panorama cambió y la laringotraqueitis (LT) pasó a ser de nuevo un problema grave en este tipo de aves. Hace cerca de tres años que comenzaron a registrarse brotes en parvadas de pollo de engorda en diversos estados de la República Mexicana, conociéndose además de casos en reproductoras pesadas y gallinas de postura comercial. Existen fuertes sospechas de que la diseminación de la enfermedad ocurrió a partir de la reactivación de virus originalmente vacunales en gallinas ponedoras pelechadas y transportadas a sitios distantes para cumplir un segundo ciclo de postura. Al no existir una cultura de prevención y control de esta enfermedad en pollo de engorda en México, y por ser un tanto desconocida para el personal de granjas, la implementación de programas de vacunación se desarrolló lentamente y con escepticismo. Debido a la escasa incidencia de la enfermedad, había muchas parvadas de reproductoras que no contemplaban en su calendario de vacunación el uso de vacunas contra LT, de manera que al incrementarse el número de brotes aumentaron también las posibilidades de contaminación de granjas de reproductoras no vacunadas, en algunas de las cuales se presentaron brotes de consecuencias realmente graves, especialmente en la producción de huevo.

Con el uso continuo de vacunas de LT elaboradas en cultivos celulares en reproductoras y pollo de engorda la incidencia de brotes ha disminuido considerablemente, y en varias empresas se ha ido retirando el uso de vacunas paulatinamente de acuerdo a los resultados observados. En algunas granjas de reproductoras, en cambio, se ha agregado al programa de vacunación una o dos aplicaciones de vacuna contra LT elaborada en cultivos celulares, aunque otras continúan utilizando vacunas con virus multiplicados en embrión de pollo.

La presencia de enfermedades como la LT es impredecible, y aunque ya se ha logrado controlar y prevenir en la mayoría de las regiones, nadie puede garantizar la ausencia de una nueva epidemia. Por lo pronto, es pertinente que las granjas de reproductoras no vacunadas contra LT que se encuentran cercanas a

granjas de gallinas ponedoras o de pollo de engorda piensen seriamente en comenzar a vacunar contra este padecimiento, prefiriendo el uso de vacuna con virus multiplicado en cultivo celular, el cual no revierte a su virulencia original ni es capaz de propagarse a otras granjas.

COMENTARIOS SOBRE CÓLERA AVIAR

Una de las enfermedades más antiguas de la avicultura comercial es, sin duda, el cólera aviar, cuya causa es la infección por *Pasteurella multocida*. De esta bacteria se conocen diversos serotipos y diferentes grados de patogenicidad entre cepas. Esta enfermedad es una amenaza constante en las parvadas de reproductoras pesadas y ponedoras comerciales ya que cuenta con amplias posibilidades para entrar en contacto con las aves. Los reservorios naturales de la bacteria son numerosos, entre los que se cuentan principalmente las aves que quedan como portadoras después de un brote; animales como el mapache y el cerdo han sido reconocidos también como portadores de cepas patógenas de *P. multocida*. Cuando ocurre un brote, las ratas, los gorriones y otros pájaros pueden infectarse y contribuir a la propagación del padecimiento. Tal ocurre también con las moscas y otros insectos, que de esta manera se convierten en diseminadores hacia otras casetas o incluso entre granjas. El humano puede, de manera transitoria, infectarse sin enfermar y contagiar a aves susceptibles.

No es nada fácil conocer el origen de un brote pues la presencia de la enfermedad está sujeta a numerosos factores de tipo inmunológico, sanitario y de manejo de la parvada. Sin embargo, una vez que se presenta se convierte en un riesgo potencial para las demás parvadas, por lo que lo mejor es tomar acciones encaminadas a su prevención y control. Entre estas destacan: a) El aislamiento del agente causal, su serotipificación (de ser posible) y utilización posterior como inmunógeno autógeno. Lo mejor es incorporar este aislamiento a una bacterina comercial que contenga los serotipos tradicionalmente presentes y de mayor patogenicidad en la avicultura, ampliando de esta forma el espectro antigénico. b) Como se conocen 16 serotipos de *P. multocida* se aconseja la utilización de vacuna aplicada por punción en el ala. Las bacterias vivas contenidas en la vacuna generan una buena inmunidad contra la mayoría de los serotipos. Se logran mejores resultados cuando se aplica una bacterina semanas antes del uso de la vacuna, ya que en parvadas debilitadas, la *P. multocida* vacunal puede causar algunas manifestaciones de tipo crónico.

El manejo terapéutico del cólera aviar resulta costoso, y además de la mortalidad, el brote conduce a secuelas patológicas como inflamación de las barbillas, artritis, peritonitis, diarrea, involución ovárica e

incremento de las aves de desecho. Se observa también disminución de la fertilidad e incremento de la contaminación del huevo por bacterias de asociación,

que repercute consecuentemente en la calidad del pollito producido.

SURVEILLANCE FOR NEWCASTLE DISEASE CONDUCTED SINCE 1998 IN ARGENTINA

PROGRAMA DE VIGILANCIA DE LA ENFERMEDAD DE NEWCASTLE REALIZADO EN 1998 EN ARGENTINA

C. Buscaglia^{A,B}, C. Espinoza^C, M. V. Terrera^D, R. De Benedetti^D, P. Borgna^C,
A. Kaloghlian^D, M. L. Cannillia^D, and E. Parrado^B

^ACátedra de Zootecnia Especial III (Aves y Pilíferos), Facultad de Ciencias Veterinarias, Universidad Nacional de La Plata, CC 296 (B190AVW) La Plata, Argentina. E- mail: cb235@yahoo.com

^BComisión de Investigaciones Científicas de la Provincia Buenos Aires, Argentina

^CServicio Nacional de Sanidad y Calidad Agroalimentaria, Paseo Colon 367, Buenos Aires, Argentina CP 1063

^DServicio Nacional de Sanidad y Calidad Agroalimentaria, Av. Fleming 1656 Martinez, Buenos Aires, Argentina CP 1640

RESUMEN

La enfermedad de Newcastle se diagnosticó por primera vez en Argentina en 1961. El último brote de la enfermedad, producido por una cepa velogénica, se reportó en la provincia de Entre Ríos, en 1987. El objetivo de la vigilancia epizootiológica es establecer la presencia o ausencia de anticuerpos o virus de la enfermedad de Newcastle en toda la población aviaria. Existen en el país dos regiones de donde se obtuvieron las muestras, a saber: a) región A, que incluye la población avícola de nuestras fronteras con Brasil, Bolivia y Paraguay, y b) la región B que incluye a todas las demás provincias del país. El presente estudio es parte del programa de prevención de influenza aviar y de la enfermedad de Newcastle velogénica en Argentina e incluye a poblaciones avícolas tales como pollos de traspatio, avicultura comercial y todos los controles para la importación y exportación de aves vivas, además de las muestras obtenidas a partir de 1998. Se utilizaron más de 30,000 muestras de suero e improntas traqueales o cloacales que se sometieron a las pruebas de *ELISA* y/o *HI* y a aislamiento viral en embriones de pollo libres de patógenos específicos (*SPF*), respectivamente. Los resultados fueron negativos al virus velogénico de la enfermedad de Newcastle.

SUMMARY

Newcastle disease (ND) was diagnosed for the first time in Argentina in 1961. The last outbreak of the

disease produced by a velogenic strain was reported in the province of Entre Ríos in 1987. The aim of the epidemiological surveillance is to establish the presence or absence of antibodies or velogenic virus of ND in all the avian population. There are three regions in the country where the samples are obtained: a) region A that include the avian population in the border with Brazil, Bolivia, and Paraguay, b) region B that include the rest of the provinces of the country, and c) include places near the coast, lakes and lagoons where aquatic migratory birds arrived.

This study is part of the prevention program of avian influenza (AI) and velogenic ND in Argentina that includes the avian populations such as noncommercial birds that are not only backyard chickens, but also purebred poultry presented at expositions and fairs, commercial poultry, all the controls for importation and exportation of live birds, wild migratory birds and the samples obtained from suspicious cases with mortality since 1998. More than 45.000 sera samples and tracheal or cloacal swabs were tested by HI and/or ELISA, and for virus isolation in embryonated SPF eggs or RT PCR respectively. The results were negative for velogenic or exotic NDV.

INTRODUCTION

Newcastle disease (ND) was diagnosed for the first time in Argentina in 1961. Exotic Newcastle Disease (END) previously known as velogenic viscerotropic or neurotropic Newcastle disease is a highly contagious viral disease of many species of

birds. The last outbreak of the disease produced by a velogenic strain was reported in the province of Entre Ríos in July 1987. Argentina, a country located in the south of Latin America, was declared at the Office of International Epizootics (OIE) free of velogenic Newcastle disease virus (NDV) with vaccination in 1997. The avian population included in this report are commercial poultry, controls for importation and exportation of live birds, and noncommercial poultry such as backyard poultry and purebred poultry presented at expositions and fairs (Exposición Rural de Palermo, Chivilcoy, Río Cuarto, Pigüé, Bahía Blanca, etc.), all the controls for importation and exportation of live birds, and samples obtained from suspicious cases with mortality. A surveillance program has been conducted since 1998 and in 2005 samples from wild, especially from migratory birds and pigeons were formally added. However, sera and samples mainly from aquatic wild birds had been tested previously (2, 9). The aim of the epidemiological surveillance is to establish the presence or absence of NDV activity in all the avian population not only to demonstrate and preserve the virulent MDV-free status for commercial flocks in the country, but also to detect the presence of ND pathogenic virus and be able to proceed in order to prevent an outbreak of the disease.

MATERIALS AND METHODS

Serology. The ND hemagglutination inhibition (HI) test was used to detect antibodies in serum to NDV. A commercial NDV enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) was also performed to some serum samples in parallel.

Virus isolation. Tracheal and cloacal swabs were clarified by centrifugation and inoculation was performed in embryonated SPF eggs. Five chicken embryos, 9-11 days old, were inoculated via the allantoic sac, incubated, candled every day for five days and then refrigerated. Blind passages were performed. Allantoic fluid from live and dead embryos was tested for hemagglutination activity.

Virus characterization. The pathogenicity of any new NDV isolate has been assessed by biological methods, such as intracerebral pathogenicity index (ICPI) and mean death time (MDT) (1). Since 2005/6 molecular methods such as reverse transcription-polymerase chain reaction (RT-PCR) for Paramyxovirus 1 and nucleotide sequencing are available.

There were two epidemiological regions in the country where the samples are obtained until 2005: a) region A that include the commercial and non-commercial poultry from provinces in the border with Brazil, Bolivia, and Paraguay, and b) region B that include the rest of the provinces of the country.

During 2006 a third region was added, region C, which included places near the coasts, lakes, and lagoons where aquatic migratory birds arrived.

RESULTS AND DISCUSSION

This study is part of the prevention program of avian influenza (AI) and velogenic ND in Argentina. AI surveillance data has been reported in part (6, 7) and presented at the World Veterinary Poultry Congress in Beijing during September 2007 (8). However, although a case report was published in 1999 (2), this is the first time the surveillance on velogenic or exotic ND as part of the prevention program implemented by Servicio Nacional de Sanidad y Calidad Agroalimentaria (SENASA) is presented. Previous results obtained from backyard hens that do and do not belong to the social program for food security called Pro-Huerta that belong to INTA (Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria) where chickens are given to poor families are included in this study. They were presented during an AVMA-AAAP meeting (3) and at the WPDC in 2003/2006 (4, 5) and were done not only to evaluate the sanitary status to NDV, recommend ways of control, emphasized the importance of maintaining strict biosecurity measures and vaccination programs, but to compare the ELISA and the HI tests which were performed for the detection of NDV antibodies. As a result good correlations were determined between both tests. Some of the backyard hens should be considered positive and exposed to NDV since they were not vaccinated and no evidence of disease was observed.

Currently, there is a nationwide systematic vaccination program in poultry that is implemented by SENASA. All commercial layers and broilers showed titers due to vaccination against ND. Some HI antibodies titers were high not only in birds from commercial farms where they are vaccinated, but also in backyard poultry. Nevertheless, no pathogenic viruses were isolated in either group of birds; only a few viruses from vaccine origin could be detected. In the case of the commercial poultry it can be speculated that due to the high density of chickens and the re-use of litter during several grow out periods, the quantity of circulating vaccine viruses that could be seen in certain birds is increased and is translated as a considerable increase in the titer of antibodies. In the case of backyard birds it has to be pointed out that some of them are vaccinated or live nearby commercial chickens.

It can be concluded and reassured that no cases of ND by pathogenic strains were detected or isolated in more than 45,000 samples checked since 1987 and that 80% of the avian population is protected against ND by the use of harmless vaccines.

(The full-length article will be published in a refereed journal.)

REFERENCES

1. Alexander, D.J. Newcastle disease. In: A laboratory manual for 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. American Association of Avian Pathologists, Kennett Square, PA. pp. 150–155. 1998.
2. Berinstein, A., B.S. Seal, F. Zanetti, A. Kaloghlian, G. Segade, and E. Carrillo. Newcastle Disease Virus Surveillance in Argentina: Use of Reverse Transcription-Polymerase Chain Reaction and Sequencing for Molecular Typification. *Avian Dis.* 43: 792-797. 1999.
3. Buscaglia, C., M.V. Prío, G. Prío Lofeudo, M. A. Risso. Comparison of the Enzyme Linked Immunosorbent Assay for the Detection of Antibody to Newcastle Disease Between Commercial Flocks and Non-commercial Chickens Raised in the Backyard of Poor Families From Argentina. PP38, 139th AVMA annual convention notes, Nashville TN, July 2002.
4. Buscaglia, C., M.V. Prío, M.C. Villat, V. Rodríguez, M.A. Risso, G. Albo, N. Pedretti, and D. Durante. Serological survey for Newcastle disease in noncommercial layers that belong to a social program from Argentina called “Pro-Huerta”. In: Proceedings of the 51st Western Poultry Disease Conference, Sacramento, CA pp. 81–82. 2003.
5. Buscaglia, C., M.C. Villat, and G. Prío Lofeudo. Comparison of the HI test and the ELISA for Ab to Newcastle Disease in Non-commercial Layers Raised in the Backyard of Poor Families and a Commercial Farm from Argentina. In: Proceedings of the 55th Western Poultry Disease Conference, Sacramento, U.S.A. 6 -8 de marzo de 2006. pp.-2007.
6. Buscaglia, C., C. Espinoza, M.V. Terrera, and R. De Benedetti. Avian Influenza Surveillance in Backyard Poultry of Argentina. *Avian Dis.* 51: 467–469. 2007.
7. D’Amico, V.L., Bertellotti, M., Baker, A.J. and L.A. Diaz. Exposure of Red Knots (*Calidris canutus rufa*) to select Avian Pathogen; Patagonia, Argentina. *Journal of Wildlife Diseases* 43:794-797. 2007
8. Espinoza, C. Terrera, M.V. De Benedetti, R. Borgna, E. Parrado, and C. Buscaglia. Surveillance Program for Avian Influenza Conducted during 1998-2006 in Argentina. XV World Veterinary Poultry Congress Abstract Book p.111 Beijing, China, 10-15 September, 2007.
9. Zanetti, F., A. Berinstein, A. Pereda, O. Taboga, and E. Carrillo. Molecular Characterization and Phylogenetic Analysis of Newcastle Disease Virus Isolates from Healthy Wild Birds. *Avian Dis.* 49:546–550. 2005.

RELACIÓN FILOGENÉTICA DE AISLAMIENTOS DEL VIRUS DE LA ENFERMEDAD DE NEWCASTLE

PHYLOGENETIC RELATIONSHIP OF SEVERAL NEWCASTLE DISEASE VIRUS ISOLATES

Rubén Merino^A, Norma Calderon^A, Francisco Perozo^B, Pedro Villegas^B, y Claudio Afonso^C

^ADepartamento de Producción Animal: Aves, Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia, UNAM, México DF, 04510 México

^B Poultry Disease Research Center, University of Georgia, Athens, GA 30602, USA

^CSoutheast Poultry Research Laboratory, United States Department of Agriculture, Athens, GA 30605, USA

SUMMARY

The 2000 velogenic Newcastle disease outbreak in Mexico's La Laguna region resulted in quarantine and stamping out of several millions of birds in 90+ affected farms. This velogenic virus keeps causing outbreaks in different areas of the country. The phylogenetic analysis of 12 virus isolates in Central Mexico and classified as velogenic using the mean embryo mortality time assay is reported herein. The

amino acid sequencing in the F protein activation site predicts that 11 of these isolates are velogenic and one is lentogenic (Ulster strain-like). The F protein gene amino acid sequencing-based phylogenetic tree classified these isolates in genotypes I, V and VIII (one, ten, and one isolate, respectively). Genotype V isolates are related with both Largo71 and GamefowlUS/02 strains.

RESUMEN

En el año 2000, el brote de enfermedad de Newcastle velogénico en la región de La Laguna ocasionó la cuarentena y sacrificio de millones de aves en más de 90 granjas afectadas. El virus velogénico sigue ocasionando brotes en diferentes áreas del país. En este trabajo se realizó el análisis filogenético de 12 cepas, clasificadas como velogénicas por el tiempo medio de mortalidad embrionaria, del virus de la enfermedad de Newcastle aisladas en el centro del país. El análisis de la secuencia de aminoácidos del sitio de activación de la proteína F predice que 11 son velogénicos y uno lentogénico (parecido a la cepa Ulster). El árbol filogenético basado en la secuencia de aminoácidos del gen de la proteína F clasifica a estos aislamientos en los genotipos I, V y VIII (uno, 10 y un aislamiento, respectivamente). Los aislamientos del genotipo V están relacionados con las cepas Largo71 y GamefowlUS/02.

INTRODUCCIÓN

La enfermedad de Newcastle (EN) es una infección viral de distribución mundial, contagiosa y letal de las aves domésticas y silvestres, causa alta morbilidad y mortalidad, se incluye en la lista de enfermedades de la Organización Mundial de Sanidad Animal (OIE) y en muchos países es uno de los mayores problemas de la industria avícola (2). El brote de Newcastle velogénico en el año 2000 en la comarca Lagunera, Coahuila, ocasionó el sacrificio de más de 13.6 millones aves de 93 granjas afectadas, con pérdidas estimadas en 250 millones de pesos (5).

La EN es ocasionada por un paramixovirus aviar que contiene ARN, del género Avulavirus que pertenece al serogrupo 1 de la familia Paramyxoviridae (4).

La patogenicidad depende grandemente de la ruptura de una proteína de fusión precursora, F0 en las proteínas subunitarias F1 y F2 (3). Para que el virus sea virulento aparentemente se requiere de un par doble de aminoácidos básicos en los residuos 112 y 113 y en los residuos 115 y 116, más una fenil alanina en el residuo 117 (1). Son pocos los estudios de este tipo con aislamientos mexicanos del virus que permitan identificar el o los grupos genéticos o la relación filogenética que tienen los VEN que circulan en las parvadas comerciales de aves en México.

El objetivo de este trabajo fue identificar la virulencia de aislamientos mexicanos del VEN mediante pruebas biológicas y establecer la relación filogenética mediante el análisis de la secuencia de aminoácidos de la proteína F.

MATERIAL Y MÉTODOS

Se analizaron 12 aislamientos del VEN, la mayoría de ellos conservados en ultra congelación desde el año 1997 en el cepario del Departamento de Producción Animal: Aves, de la FMVZ-UNAM. La clasificación de la virulencia de los aislamientos, se determinó por el tiempo medio de mortalidad embrionaria -TMME- y por el Índice de Patogenicidad Intracerebral (IPIC).

Pruebas de biología molecular. Las muestras de líquido alantoideo positivo al VEN se inactivaron en tarjetas FTA® (Cat., WB120306, Whatman Inc, NJ 07932, USA) para transportar el ácido nucleico al Poultry Disease Research Center, University of Georgia (Athens, GA, USA), donde se resuspendió el ácido nucleico de la muestra en FTA Purification Reagent (Cat., WB120204 Whatman Inc, NJ 07932, USA). Para extraer el ARN, se utilizó el High Pure RNA Tissue Kit (Cat. 12033674001, Roche Diagnostics Corporation, IN 46205, USA) de acuerdo con las instrucciones del fabricante. El ARN extraído se conservó a -80° C hasta su análisis posterior.

RT-PCR. Se realizó la amplificación del gen que codifica para la proteína F de las cepas virales, con el SuperScript™ One-Step RT-PCR System with Platinum® Taq DNA Polymerase (Cat. 11922-042, Invitrogen Corporation, CA 92008, USA) y el uso de los siguientes iniciadores (Operon Biotechnologies, Inc., AL 35805, USA) Positivo 4331:

5'-GAGGTTACCTCYACYAAGCTRGAGA-3' y Negativo 5090:

5'-TCATTAACAAAYTGCTGCATCTTCCCWAC-3'. Estos iniciadores representan un fragmento de 759 pb de la secuencias del gen F que rodea a aquella que codifica el sitio de ruptura de la proteína F. Las condiciones para RT-PCR fueron 50°C/30 minutos, 94°C/2 minutos (1x); 94°C/15 segundos, 56°C/30 segundos, 68°C/1 minuto (40x) y 68°C/5 minutos, 4°C/∞. Posterior al RT-PCR, se corrió la electroforesis del producto de PCR en condiciones convencionales.

Secuencia de nucleótidos y análisis filogenético. Después del RT-PCR, se obtuvo el ADNc a partir del gel de electroforesis, con el uso del QuickClean DNA Gel Extraction Kit (Gen Script Corporation, NJ 08854, USA, Cat., L00199), posteriormente se llevó a cabo la secuenciación de las dobles cadenas de las 12 cepas del VEN con dideoxinucleótidos fluorescentes en un secuenciador automático (ABI 3700 automated sequencer; Applied Biosystems Inc., Foster City, CA) en el Southeast Poultry Research Laboratory, United States Department of Agriculture, Athens, GA, USA. La edición y análisis de la secuencia de nucleótidos se completó con el programa de computación LaserGene

(LaserGene, version 5.07; DNASTar, Inc., Madison, WI).

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Los resultados del TMME e IPIC se muestran en el cuadro 1. Los 12 aislamientos Se clasificaron como velogénicos. La prueba de RT-PCR resultó positiva para todas las muestras, cuadro 1.

La secuencia de aminoácidos de los residuos 112–117 del sitio de ruptura de la proteína F, así como la clasificación genotípica y la cepa de referencia de tal clasificación se muestran en el cuadro 1. El análisis filogenético muestra que estos virus velogénicos se clasifican en los genotipos II (2), V (10) y VIII (1). Los 10 virus dentro del genotipo V están divididos en dos linajes, uno compatible con virus que ha circulado desde principios de los años 1970's (relacionados con la cepa Largo71) y otro identificado a finales de la década de 1990's (del tipo de la cepa gamefowlUS02). Esta es la primera ocasión en que se identifica en México un virus perteneciente al genotipo VIII.

La predicción de la virulencia con base en la secuencia de aminoácidos en el sitio de ruptura de la proteína F de las cepas identificadas como velogénicas por la prueba de TMME e IPIC, confirmaron la identidad de los aislamientos, excepto la cepa H que se clasificó como velogénica por TMME e IPIC, pero por la secuencia de nucleótidos es semejante a la cepa lentogénica Ulster, lo que sugiere que en la muestra se

encuentran tanto el virus lentogénico, que se amplificó e identificó por las pruebas de biología molecular como el virus velogénico, que demostró su actividad biológica en las pruebas de TMME e IPIC.

REFERENCIAS

1. Al-Garib, S.O., Gielkens, A.L.J., Gruys, E. and Koch, G. Review of Newcastle disease virus with particular references to immunity and vaccination. *World's Poultry Sc J*, 59: 185-200, 2003.
2. Alexander, D.J. Newcastle diseases, other avian paramyxoviruses, and pneumovirus infections. In: Saif YM, editor. *Diseases of poultry*. Ames, Iowa: Iowa State University Press, pp 63-92, 2003.
3. Panda, A., Z. Huang, S. Elankumaran, D.D. Rockemann, and S.K. Samal. Role of fusion protein cleavage site in the virulence of Newcastle disease virus. *Microbial Pathogenesis* 36: 1–10, 2004.
4. Pedersen, J.C., D.A. Senne, P.R. Woolcock, H. Kinde, D.J. King, M.G. Wise, B. Panigrahy, and B.S. Seal. Phylogenetic relationships among virulent Newcastle disease virus isolates from the 2002-2003 outbreak in California and other recent outbreaks in North America. *J Clin Microbiol* 42: 2329-2334, 2004.
5. Solís, S. Situación de la campaña nacional contra la enfermedad de Newcastle: Memorias curso de enfermedades emergentes ANECA; México (DF): Asociación Nacional de Especialistas en Ciencias Avícolas, AC, pp 20-28, 2000.

Cuadro 1. Aislamientos virulentos del virus de la enfermedad de Newcastle, resultados del tiempo medio de mortalidad embrionaria (TMME), índice de patogenicidad intracerebral (IPIC), RT-PCR, secuenciación de aminoácidos (Saa), clasificación genotípica (CG), y cepa de referencia para la clasificación del genotipo.

| Virus | Año de aislamiento | TMME | IPIC | RT – PCR | Saa 112-117 | CG | Cepa de Referencia |
|--------------|--------------------|------|------|----------|-------------|------|--------------------|
| Chimalhuacán | 1947 | 39.7 | 1.89 | + | RRQKRF | V | Largo71 |
| Querétaro | 1947 | 43.2 | 1.73 | + | RRQKRF | VIII | Argentina-Malasia |
| Torreon | 2000 | 59.7 | 1.64 | + | RRQKRF | V | gamefowlUS02 |
| CLAM | ND | 44.9 | 1.80 | + | RRQKRF | V | Largo71 |
| 048 2 | ND | 48.8 | 1.83 | + | RRQKRF | V | gamefowlUS02 |
| C | 1998 | 45.2 | 1.88 | + | RRQKRF | V | gamefowlUS02 |
| F | 2000 | 50.3 | 1.83 | + | RRQKRF | V | gamefowlUS02 |
| G | 2001 | 62.0 | 1.59 | + | RRQKRF | V | gamefowlUS02 |
| H | 2001 | 44.1 | 1.89 | + | GKQGRL | I | Ulster |
| K | 2004 | 44.6 | 1.93 | + | RRQKRF | V | Largo71 |
| N | 2005 | 44.3 | 1.91 | + | RRQKRF | V | Largo71 |
| O | 2006 | 47.0 | 1.94 | + | RRQKRF | V | Largo71 |

ND: No determinado

MUCOSAL IMMUNITY AND PROTECTION AFFORDED BY THE VG/GA STRAIN OF NEWCASTLE DISEASE VIRUS

INMUNIDAD MUCOSAL Y PROTECCIÓN CON LA CEPA VG/GA DEL VIRUS DE LA ENFERMEDAD DE NEWCASTLE

Francisco Perozo^A, Pedro Villegas^A, Linda Purvis^A, Rafael Fernandez^B, and Julio Cruz^B

^APoultry Diagnostic and Research Center, Athens, GA, USA

^BMerial, Gainesville, GA, USA.

RESUMEN

La cepa Villegas-Glisson (VG/GA) del virus de la enfermedad de Newcastle aislada del intestino de pavos sanos, se multiplica en los tractos respiratorio e intestinal del pollo. Se ha informado sobre la adecuada inmunidad en las mucosas y la eficacia contra el desafío letal en pollos libres de patógenos específicos (SPF). Para evaluar estos parámetros en pollos de engorda comerciales, se utilizaron lavados traqueales y muestras de bilis que se analizaron en busca de la presencia de anticuerpos IgA y se compararon con anticuerpos contra la cepa LaSota, a diferentes tiempos posvacunación. El día 28 todas las aves se desafiaron con una dosis letal de la cepa GB de Texas. Los niveles de IgA en el intestino de las aves vacunadas con la cepa VG/GA fueron superiores que los de los grupos que recibieron la cepa LaSota. A pesar de la presencia de anticuerpos maternos en los pollos de engorda, la vacunación temprana con la cepa VG/GA brindó de 95 a 100% de protección contra el desafío letal, equivalente al obtenido con la cepa LaSota. Estos resultados validan los datos anecdóticos obtenidos mediante observaciones de campo y confirman los resultados en aves SPF.

SUMMARY

The Villegas-Glisson strain (VG/GA) of Newcastle disease virus (NDV) isolated from the intestine of healthy turkeys, replicates in the respiratory and intestinal tract of chickens. Adequate mucosal immunity and efficacy against lethal challenge has been reported in specific pathogen free chickens (SPF). To evaluate these parameters in commercial broilers, tracheal washings and bile samples were tested for IgA antibodies and compared with those of the LaSota strain at different times after vaccination. On day 28, all birds were challenged with a lethal dose of Texas GB strain. The IgA levels in the intestine of VG/GA vaccinated birds were higher than in the LaSota groups. Despite of the presence of the maternal antibodies in broilers, early vaccination with the VG/GA strain

afforded 95 to 100%, protection against lethal challenge, equivalent to the protection offered by LaSota strain. These results validate anecdotal data obtained from field observations and confirm the SPF bird's results.

INTRODUCTION

Newcastle disease virus (NDV) is one of the most important infectious agents in the poultry industry, affecting a wide variety of birds and causing important economical losses (1). The Villegas-Glisson/University of Georgia (VG/GA) strain of NDV replicates both in the respiratory and intestinal tract, with preference for the intestine (4). The VG/GA strain's intestinal tropism and the consequent induction of local immunity may be important for protection against velogenic-viscerotropic strains of NDV that have been reported to induce massive destruction of intestinal lymphoid areas and intestinal epithelium (3).

The VG/GA strain, when applied to immune competent specific pathogen free (SPF) chickens induces protection against lethal NDV challenge (2). In this study, local and systemic humoral immune response and the protection against lethal challenge in commercial broiler chickens conferred by vaccination with the VG/GA strain were evaluated and compared with LaSota strain of NDV.

MATERIALS AND METHODS

Experimental design. A total of 288 one day-old broiler chickens with average maternal antibody ELISA titres of 1840, were randomly divided into nine groups of 32 birds each and vaccinated by eye drop at days 1 and/or 14 with a total dose of 10^7 EID₅₀ in 0.1 mL of the VG/GA and/or LaSota strains, one group remained as unvaccinated control. The treatment combinations are shown in Table 1. On days 14, 21, and 28 the NDV specific ELISA test was performed on serum samples from eight birds per group. The IgA levels in trachea washings and bile were measured each

sampling day in four birds per group as previously described (4). On day 28 of the experiment the birds were challenged by the intramuscular route with a dose of 10^4 EID₅₀ per bird of the velogenic Texas GB strain.

RESULTS AND DISCUSSION

The different vaccination schedules assessed resulted in protection against lethal challenge, all the unvaccinated-challenged controls died within the observation period. The results for the experimental vaccine-challenge trial and the immunoglobulin measurements are summarized in Table 1. IgA levels in the intestine of VG/GA vaccinated broilers were higher. Despite the presence of the maternal antibodies in broilers, early vaccination with the VG/GA strain afforded 95 to 100% protection against lethal challenge, equivalent to the protection offered by LaSota strain. These results validate anecdotal data about VG/GA protection obtained from field observations and confirm results from vaccine-challenge trials performed in SPF chickens (2) and in quails (5). Furthermore, the efficacy of the different treatment combinations using both VG/GA and LaSota strains, demonstrated the feasibility of using a multiple

strain vaccine protocol with VG/GA strain for initial vaccination when high challenge is present.

REFERENCES

1. Alexander, D.J. Gordon Memorial Lecture. Newcastle disease. *Br Poult Sci* 42:5-22. 2001.
2. Beard, C.W., P. Villegas, and J.R. Glisson. Comparative efficacy of the B-1 and VG/GA vaccine strains against velogenic viscerotropic Newcastle disease virus in chickens. *Avian Diseases*. 37: 222-5. 1993.
3. Brown, C., D.J. King, and B.S. Seal, Pathogenesis of Newcastle disease in chickens experimentally infected with viruses of different virulence. *Veterinary Pathology*. 36:125-32. 1999.
4. Perozo., F., P. Villegas, I. Alvarado, and L. Purvis. Mucosal immunity against VG/GA and LaSota strains of Newcastle disease virus. *Proceedings of the 143rd AVMA Annual Convention* . Honolulu, Hawaii. July 15–19, 2006.
5. Silva, F., E. Santin, A. Pulillo, L. Doretto, V. Barbosa, N. Queiroz, and R. Schocken-Iturrino. Evaluation of different programs of Newcastle Disease Vaccination in Japanese Quail. *International Journal of Poultry Science*. 3, 354-356. 2004.

Table 1. NDV Vaccine-challenge trial, humoral immunity and protection against challenge.

| GROUP | AGE (DAYS) | | | | | | | | | Challenge results: # of dead (% protection) |
|-------------------------|------------------------------|---------------------------------|-------------------|-------------------|--------------------|-------------------|-------------------|--------------------|-------------------|---|
| | 14 | | | 21 | | | 28 | | | |
| | ELISA ^a Titers | Trachea ^b NDV IgA | Bile IgA | ELISA Titers | Trachea NDV IgA | Bile NDV IgA | ELISA Titers | Trachea NDV IgA | Bile NDV IgA | |
| VG/GA day 1 | 134 ^A | 0.45 ^B | 0.93 ^A | 403 ^B | 1.02 ^B | 1.16 ^A | 1172 ^B | 1.21 ^B | 1.96 ^A | (1/19) 95% |
| VG/GA days 1 + 14 | 62 ^A | 0.41 ^B | 1.01 ^A | 261 ^C | 1.04 ^B | 1.57 ^A | 1865 ^A | 1.18 ^B | 2.41 ^A | 0/18 (100%) |
| VG/GA day 14 | 25 ^A | 0.05 ^C | 0.02 ^C | 47 ^C | 0.19 ^C | 0.31 ^B | 952 ^B | 0.90 ^B | 1.40 ^B | 0/20 (100%) |
| LaSota day 1 | 271 ^A | 0.80 ^A | 0.42 ^B | 1049 ^A | 1.33 ^A | 0.42 ^B | 1578 ^A | 1.76 ^A | 1.04 ^B | 0/19 (100%) |
| LaSota days 1 + 14 | 209 ^A | 0.72 ^A | 0.39 ^B | 1231 ^A | 1.23 ^A | 0.57 ^B | 1913 ^A | 1.98 ^A | 1.27 ^B | 0/19 (100%) |
| LaSota days 14 | 5 ^A | 0.02 ^C | 0.06 ^C | 483 ^C | 0.65 ^B | 0.21 ^C | 874 ^B | 1.82 ^A | 0.42 ^C | 0/19 (100%) |
| VG/GA day 1 + LaSota 14 | 92 ^A | 0.40 ^B | 1.01 ^A | 437 ^B | 0.72 ^B | 1.81 ^A | 1514 ^A | 1.44 ^B | 2.13 ^A | 0/20 (100%) |
| LaSota day 1 + VG/GA 14 | 216 ^A | 0.74 ^A | 0.48 ^B | 547 ^B | 1.44 ^A | 1.74 ^A | 1485 ^A | 1.67 ^A | 2.29 ^A | 1/19 (95%) |
| Control challenged | 24 ^A | 0.05 ^C | 0 ^C | 22 ^C | 0.07 ^C | 0 ^C | 42 ^C | 0.05 ^C | 0.1 ^C | 9/9 (0%) |

^a Eight birds per group were tested and results are expressed as the GMT of the ELISA titres.

^b Four birds per group were sampled for local immunity; results are expressed as the average of the corrected optical densities (COD).

^c Birds were challenged with a lethal dose of Texas GB strain at 28 days of age and observed for 14 days. Same capital letters within columns indicate no significant differences ($P < 0.05$).

COMPARACIÓN DE LOS TÍTULOS DE ELISA E INHIBICIÓN DE LA HEMOAGLUTINACIÓN PARA NEWCASTLE, EN REPRODUCTORAS VACUNADAS

COMPARISON OF NEWCASTLE DISEASE ELISA AND HI TITERS IN VACCINATED BREEDERS

C. B. Bautista, B. J. Chapa, F. M. García, y F. L. Barrón

Investigación Aplicada SA de CV., 7 Norte No 416, Colonia Centro, Tehuacán, Puebla

SUMMARY

This paper attempts to evaluate the maximum hemagglutination inhibition (HI) and enzyme-linked immunosorbant assay (ELISA) titers of breeder

populations vaccinated against Newcastle disease (ND) with different vaccination programs. Correlation between ELISA and HI titers is also analyzed, as well as the importance of learning about the advantages of using ND ELISA statistics. The advantages of ELISA

over HI are also discussed. Breeders in both rearing and production stages were used in this study. Twenty three serum samples were collected per flock. Serum samples were analyzed using HI and a commercial ELISA kit. Titers were transformed to log 2, and the kappa correlation coefficient was established between these two assays.

RESUMEN

Se realizó un estudio para comparar los títulos obtenidos por la inhibición de la hemoaglutinación y ELISA de Newcastle, en reproductoras con distintos calendarios de vacunación. Se analizaron 340 sueros por ambas pruebas. Para conocer el título final se realizaron más diluciones a los sueros analizados de los que rutinariamente se realizan en IH. Se observaron títulos y medias geométricas por arriba de 1,280 en IH; en la ELISA los títulos fueron de hasta 18,000 y medias geométricas de hasta 13,547. Se obtuvo una concordancia de 93.23% y kappa 0.777 ($p < 0.05$) entre ambas pruebas. Estos resultados demuestran que la ELISA puede ser utilizada para dar seguimiento a los calendarios de vacunación de Newcastle, además de proporcionar información estadística útil para realizar un mejor análisis de la condición inmunológica de las parvadas.

INTRODUCCIÓN

Para el control y prevención de la Enfermedad de Newcastle en las explotaciones de reproductoras, se manejan programas de vacunación más intensos que en el pollo de engorda o postura. Este manejo de las gallinas genera niveles de anticuerpos más altos y por más tiempo. Por otro lado la práctica usual de la Inhibición de la Hemoaglutinación (IH), limita la determinación serológica del título máximo en estas poblaciones de manera directa. La ELISA detecta mayores niveles de anticuerpos de manera directa sin necesidad de realizar diluciones adicionales por lo que puede ser una muy buena opción (6).

MATERIAL

Sueros. Se analizaron 340 sueros de gallinas de 3 empresas, cada una con un calendario de vacunación distinto. Empresas: A: reproductoras pesadas, edades: 3, 9, 15, 35 y 50 sem; B: reproductoras pesadas, edades: 11, 16, 22, 29 y 41 sem; y C: reproductoras ligeras, edades: 8, 12, 31, 36 y 43 sem.

IH. Reactivos para la prueba de IH.

ELISA. Kit comercial de ELISA.

Diseño experimental.

Los sueros fueron evaluados con las pruebas de IH y ELISA.

Para la realización de la técnica de ELISA, se siguieron los lineamientos establecidos por el fabricante. Interpretación de la prueba: sueros con valor S/P menor a 0.2 se consideran negativos; sueros con valor S/P igual o mayor 0.2 se consideran positivos.

La IH se realizó de acuerdo a la metodología descrita por Thayer et al (7). Interpretación de la prueba: sueros con títulos de 10 o menores se consideran negativos; títulos iguales o mayores a 20 se consideran positivos.

RESULTADOS

La información de los títulos de IH, se ingresaron en una hoja de excell para transformar los títulos a Log2 y calcular las medias geométricas (MG). Los resultados de ELISA se procesaron con la ayuda del software del fabricante, se obtuvieron los títulos y Log2 de cada suero de manera directa, además de obtener las MG, desviaciones estándar (SD) y coeficientes de variación (CV) de cada uno de los lotes analizados.

Se observaron MG superiores a 1280, para la empresa "A":16,584; 2,115 y 5,276; en "B": 2,004; 4023 y 15,22; y "C":1,488. Ver cuadro 1.

En el caso de los títulos de ELISA se detectaron MG tan altas como 12,108 y 13,547.

De los 340 sueros analizados 317 (93.23%) fueron positivos por ambas pruebas, 15 negativas (4.41%); 1 fue negativo por IH pero positivo por ELISA (0.29%) y finalmente 7 (2.06%) fueron positivos por IH pero negativo por ELISA. Se observó una concordancia de 97.6% y valor kappa de 0.777 ($p < 0.05$) ver cuadro 2.

DISCUSIÓN

El propósito de este trabajo fue determinar los títulos altos por lo que se solicitó al laboratorio se hicieran mas diluciones para IH, por lo que se determinaron MG por arriba de 1,280. La práctica usual de la IH en los laboratorios de diagnóstico en México utiliza como dilución máxima del suero 1:1280.

El control de Newcastle se ha llevado a cabo gracias a la aplicación de calendarios de vacunación eficientes, considerando el número de dosis, tipo de vacuna; las edades en las que aplican dependen directamente de la ubicación geográfica de la explotación y la presencia del virus. El éxito de los calendarios de vacunación está en función de la protección de las parvadas ante el desafío de los virus de campo.

Es importante para los Médicos Veterinarios poner especial atención en los estudios serológicos y

determinar el costo beneficio de los programas de vacunación.

La decisión de continuar o modificar un calendario de vacunación dependerá de la protección que tengan las parvadas, por lo que es importante contar con herramientas diagnósticas que ayuden a determinar y analizar los niveles de anticuerpos antes y después de la administración de vacunas, por ello es importante conocer e interpretar la MG, DE, CV, títulos mínimos y máximos.

Para la elección de una prueba de diagnóstico deben considerarse que sea sensible, específica, estandarizada, rápida, disponible y fácil de interpretar.

Se han realizado trabajos en México y en otros países que han determinado la buena concordancia entre las pruebas de IH y la ELISA (1,3,5,8). En este estudio se observó una concordancia de 97.6% (kappa 0.777).

Es importante considerar al elegir una prueba serológica que esta sea estandarizada ya que esto nos dará confiabilidad en los resultados. Es conocido que en el procedimiento de la IH, se deben cuidar variables como la titulación del antígeno, los glóbulos rojos, pH del buffer, temperatura, calidad de los sueros, tiempo de incubación, etc., una desviación en alguna de éstas puede alterar la confiabilidad de los resultados (2,4).

La prueba IH en los laboratorios de diagnóstico en nuestro país, limita su realización hasta la dilución de 1:1280, por lo que no es frecuente ver resultados de títulos tan altos en las reproductoras. La determinación de títulos altos puede dar información sobre la transmisión de inmunidad en la progenie. La interpretación de los resultados de la IH por los laboratorios es limitada ya que solo se reportan la frecuencia de los títulos y las medias geométricas.

CONCLUSIÓN

El análisis de los coeficientes de variación de los títulos de IH en Newcastle no son proporcionados por los laboratorios. Es necesario empezar a considerar esta información tal y como se hace en otras enfermedades.

La Prueba de ELISA está diseñada de tal manera que permite determinar con precisión los títulos que pueden alcanzar parvadas con programas de vacunación amplios.

En las ELISAs comerciales, la técnica, los reactivos, la lectura y la interpretación de resultados

están estandarizados. El procesamiento de resultados se realiza con el apoyo de softwares; éstos proporcionan de manera inmediata los títulos, MG, CV, SD, entre otras. Por otro lado elaboran histogramas y almacenan la información de manera sistematizada para que pueda ser consultada las veces que sea necesaria, sin necesidad de tener resultados impresos.

REFERENCIAS

1. Bautista C.B., F.M. García, y F.L. Barrón. Estudio Comparativo de Títulos de las pruebas de inhibición de la hemoaglutinación y ELISA para el diagnóstico de la enfermedad de Newcastle, en aves de postura. *Los Avicultores y su entorno*. 7:109-114. 2005.
2. Beard C.W. and W.J. Wilkes. A Comparison of Newcastle Disease Hemagglutination-Inhibition Test results from Diagnostic Laboratories in the Southern United States. *Avian Dis.* 29: 1048-1056. 1985.
3. Brown J., R.S. Resurrección, and Dickson T.G. The Relationship between the Hemagglutination-Inhibition Test and the Enzyme-Linked Immunosorbent Assay for the Detection of Antibody to Newcastle Disease. *Avian Dis.* 34:585-587. 1990.
4. Brugh, M., Jr., C.W. Beard, and W.J. Wilkes. The influence of Test Conditions on Newcastle Disease Hemagglutination Inhibition Titers. *Avian Dis.* 22: 320-328. 1978.
5. Flock chek Newcastle Disease Antibody Test kit. Newsletter IDEXX. Julio 2003.
6. Sayd S. and M. Bass. Análisis de los títulos serológicas de Newcastle por las pruebas de ELISA e inhibición de la hemoaglutinación. *Memorias del XVI Congreso Latinoamericano de Avicultura*.
7. Thayer, S.G. and C.W. Beard. Serologic procedures. In: *A laboratory manual for the isolation and identification of avian pathogens*, 4th ed. W.M. Reed, Ed. American Association of Avian Pathologists Kennel Square, PA. pp 255-266. 1998.
8. Viamontes O., A. Canovas, I. Acosta, y D. Quintero. Valoración comparativa de los niveles de anticuerpos medidos por las pruebas de HI y ELISA en pollos de engorde vacunados contra la enfermedad de Newcastle. *Rev. Cubana Cienc. Avícola* 16:17-24. 1989.

Cuadro 1. Medias geométricas (título y Log2) de cada uno de los lotes analizados por IH y ELISA.

| Empresa | Edad (sem) | ELISA | | IH | |
|-----------|------------|---------|-------|---------|-------|
| | | Título | Log2 | Título | Log2 |
| Empresa A | 3 | 214.8 | 7.57 | 13.74 | 3.63 |
| | 9 | 4243.1 | 11.99 | 459.4 | 8.32 |
| | 15 | 13547 | 13.72 | 16584.9 | 14 |
| | 35 | 9292.8 | 13.18 | 2115.9 | 10.94 |
| | 50 | 11892 | 13.53 | 5276.6 | 12.3 |
| Empresa B | 11 | 6495 | 12.65 | 1134.6 | 10.1 |
| | 16 | 8497.3 | 13.03 | 2004.4 | 10.81 |
| | 22 | 9198.7 | 13.16 | 4023 | 11.93 |
| | 29 | 7535.7 | 12.87 | 1522 | 10.49 |
| | 41 | 5409.6 | 12.4 | 600.9 | 9.05 |
| Empresa C | 8 | 2097.8 | 10.93 | 209.8 | 7.61 |
| | 12 | 2534.8 | 11.24 | 180.5 | 7.49 |
| | 31 | 12108.3 | 13.55 | 1488.2 | 10.39 |
| | 36 | 5335.5 | 12.28 | 445.8 | 8.69 |
| | 43 | 5663.2 | 12.44 | 292.3 | 8.13 |

Cuadro 2. Determinación de la concordancia de los títulos obtenidos por IH y ELISA.

| | | IH | | |
|-------|-----|-----|-----|-----|
| | | Pos | Neg | |
| ELISA | Pos | 317 | 1 | 318 |
| | Neg | 7 | 15 | 22 |
| | | 324 | 16 | 340 |

Concordancia: 97.6%

Kappa: 0.777

EVALUACIÓN DE LA EFICACIA DE LA APLICACIÓN SIMULTÁNEA DE LAS VACUNAS DE MAREK Y EMULSIÓN DE NC EN POLLITOS DE UN DÍA DE EDAD

FIELD EVALUATION OF THE SIMULTANEOUS ADMINISTRATION OF MAREK'S DISEASE AND OIL-EMULSION NEWCASTLE DISEASE VACCINES IN DAY-OLD CHICKS

Vilmos Palya and Rogelio Morfin F.

SUMMARY

The purpose of this study was to evaluate the efficacy of the simultaneous administration of a cell-associated Marek's Disease Vaccine and an Oil Emulsion Newcastle Disease Vaccine at day of age in the hatchery. Four 50,000 chicken farms located in the Valley of Mexico were used. Marek's disease vaccine was given in the hatchery simultaneously with an oil emulsion Newcastle Disease/Avian Influenza (ND-AI)

combination vaccine, plus a live ND vaccine by spray, with one vaccination (live virus + killed oil emulsion), and two killed, oil emulsion ND/AI vaccines at 9 and 23 days. Hemagglutination inhibition (HI) tests for both ND and AI were performed weekly. Productive parameters were also recorded. Conclusions: a) Serological difference to both AI and ND were found; b) Productive parameters showed no difference.

INTRODUCCIÓN

La tendencia actual en medicina preventiva es aplicar vacunas en la planta incubadora para minimizar el estrés por manejo, además de facilitar un ambiente higiénico y controlado al momento de la vacunación. Para realizar esta práctica es necesario demostrar la compatibilidad de los antígenos aplicados para asegurar una respuesta inmunológica adecuada.

OBJETIVO

El objetivo del estudio es investigar el efecto de la aplicación simultánea de las vacunas de Marek (EM) y Emulsionada de Newcastle (NC E), para evaluar la protección y respuesta inmunológica de las aves ante estos antígenos.

MATERIALES Y MÉTODO

Este estudio se realizó en unidades de aislamiento en las instalaciones de Phylaxia, en Budapest, Hungría. En el estudio se utilizaron las vacunas de Marek (cepa FC-126) HVT asociada a células y Newcastle Emulsionada (NC E). Para este estudio, se ocuparon cuatro grupos de aves SPF de un día de edad y el control.

Al grupo 1 (30 aves) se aplicaron 0.2mL por ave (3,54 log₁₀ UFP/dosis) de la vacuna EM HVT vía subcutánea en el primer día.

El grupo 2 (50 aves) se aplicaron 0.1mL por ave de la vacuna NC E vía subcutánea y 0.2mL por ave de la vacuna EM HVT vía subcutánea en el primer día. Las dos vacunas fueron aplicadas al mismo tiempo y en la misma área del cuello con agujas separadas.

El grupo 3 (20 aves) sólo se aplicaron 0.1mL por ave de la vacuna NC E vía subcutánea.

Al grupo 4, grupo control de 35 aves, no se le aplicó ninguna vacuna.

Los grupos 1, 2 y 4 fueron desafiados con el virus de Marek cepa MDV RB1B (Virus virulento de la enfermedad de Marek) vía subcutánea al noveno día post vacunación. En el caso del grupo 2, se hicieron dos subgrupos. El primer subgrupo (20 aves) no se desafió. El subgrupo 2 (30 aves) fue desafiado con el virus Marek cepa MDV RB1B (tabla 2). Después del desafío, las aves fueron observadas diariamente por 70 días.

Se tomaron muestras de sangre a los 21, 28 y 43 días después del desafío, del subgrupo 1 del grupo 2 y del grupo 3 (aves no desafiadas), también se tomaron muestras sanguíneas del grupo control desafiado (tabla 2).

Las aves que murieron y las sobrevivientes que mostraron signos clínicos de la enfermedad de Marek, fueron recolectadas diariamente para realizar los

estudios correspondientes. En el caso de aves que presentaron signos clínicos de la enfermedad, pero no lesiones macroscópicas, se tomaron muestras de órganos para la realización de un estudio histopatológico.

Las pruebas de laboratorio realizadas fueron las siguientes: **Serología**, HI para NC y prueba de ELISA (Phylaxia y BioChek kits); **histología**, de riñón, hígado, corazón, nervio ciático, bazo, cerebro y/o cerebelo; y **pruebas moleculares – PCR**, de bazo, hígado, riñón, nervio ciático y pluma de aves vacunadas y desafiadas. Para estas pruebas se utilizaron dos aves del grupo que recibieron EM HVT y dos aves del grupo que recibieron EM HVT + NC emulsionada e inactivada.

RESULTADOS

Observaciones clínicas. Después de la vacunación no se observaron muertes o signos clínicos traumáticos relacionados con la vacunación. Dos aves del grupo 1 murieron por causas de incubación, un ave del grupo 4 fue retirada por lesiones en una pata antes del desafío. Posterior al desafío con el virus Marek cepa MDV RB1B, se observó lo siguiente:

Grupo control: Se observaron signos clínicos asociados con enfermedad de Marek en la mayoría de las aves.

45 días después del desafío, 33 de 34 aves murieron. El ave que se mostró clínicamente sana, mostró neoplasia en bazo e hígado a la necropsia.

Grupos desafiados vacunados: Grupo 1 (vacunado HVT) – El 14.3 % (4), de las aves de este grupo mostraron signos clínicos asociados con EM, 32 días post desafío. Grupo 2 (vacunados HVT + ND E) - El 10 % (3), de las aves de este grupo mostraron signos clínicos asociados con EM, 32 días post desafío.

Al final del periodo de observación los sobrevivientes fueron sacrificados y se les practicó la necropsia, no presentaron lesiones indicativas de enfermedad de Marek.

Tomando en cuenta lo anterior, se puede utilizar la siguiente fórmula, que dará como resultado la protección relativa de las vacunas aplicadas.

$$PR = \frac{V-C}{100-C} \times 100$$

V = % Porcentaje de aves vacunadas y que sobrevivieron al desafío sin signos y lesiones de Marek

C = % Porcentaje de aves no vacunadas y que sobrevivieron al desafío sin signos y lesiones de Marek.

| | |
|------------------------|------------|
| Vacunados con HVT | 85.7% (24) |
| Vacunados con HVT + NC | 90.0% (27) |
| Control No Vacunado | 0-0% |

Con estos resultados, podemos concluir lo siguiente: 1) La eficacia de la vacuna de Marek no fue afectada cuando fue administrada simultáneamente con NC E. y 2) la protección relativa fue muy similar en el grupo vacunado con HVT (85.7%) y el vacunado con HVT + NC emulsionado (90%).

Pruebas serológicas. Las pruebas serológicas utilizadas fueron, Inhibición de la Hemoaglutinación (HI), ELISA (BioCheck) y ELISA (Phylaxia).

Los resultados de la prueba HI fueron los siguientes:

HI (Log 2)

| | |
|------------|---|
| NC E | 21 días 6.5, 28 días 7.22, 43 días 6.72 |
| HVT + NC E | 21 días 6.53, 28 días 7.26, 43 días 7.5 |

PRUEBA DE ELISA (BIO CHECK):

Log 2

| | |
|------------|--|
| NC E | 21 días 12.68, 28 días, 13.07, 43 días 12.98 |
| HVT + NC E | 21 días 12.62, 28 días, 12.88, 43 días 13.14 |

PRUEBA DE ELISA (PHYLAXIA):

Log 2

| | |
|------------|--|
| NC E | 21 días 8.12, 28 días 8.06, 43 días 8.13 |
| HVT + NC E | 21 días 8.13, 28 días 8.11, 43 días 8.63 |

Diseño de los grupos.

| | Grupo 1 | Grupo 2 | | Grupo 3 | Grupo 4 |
|-----------------|------------------------------|-------------------------------|-------------------------------|---------------------------|------------------------------|
| Día 1 | Vacunados HVT 30 aves | Vacunados HVT + NC 20 aves | Vacunados HVT + NC 30 aves | Vacunados NC 20 aves | No Vacunados 35 aves |
| Día 9 | Desafiados (RB1B) 30 aves | No Desafiados 20 aves* | Desafiados (RB1B) 30 aves | No Desafiados 20 aves* | Desafiados (RB1B) 30 aves |
| Día 21 | - | M S** 20 aves | - | M S** 20 aves | M S** 20 aves |
| Día 28 | - | M S** 20 aves | - | M S** 20 aves | M S** 20 aves |
| Día 43 | - | M S** 20 aves | - | M S** 20 aves | - |
| Día 9-79 | OC*** | - | OC*** | - | OC*** |

No fue significativo la diferencia en títulos entre los grupos vacunados con HVT y HVT + NCE

Una diferencia significativa fue observada en los títulos de NC solo a los 28 días (BioChek ELISA kit) en el grupo que recibieron solo la NC E, el título de (13.07±0.22) fue significativamente mas alto que al grupo que recibió HVT + NC E (12.88±0.28).

Estudio molecular. La cepa de desafío RB1B (MDV Serotipo 1) fue detectada en los órganos tomados de animales saludables al final de la fase experimental animal. La cepa vacunal FC-126 (MDV Serotipe 3) fue detectada en bazo, hígado, y riñón de los grupos que recibieron la vacuna HVT. Por los resultados, se observa que la cepa de desafío (RB1B) y la cepa vacunal (HVT FC-126), se detectó en aves que recibieron la vacuna NC E, y en las que recibieron la HVT + NC E.

DISCUSIÓN

La protección contra La Enfermedad de Marek no fue afectada cuando se aplicó simultánea con la NC E. La seroconversión inducida por la vacuna NC E, no fue afectada por la vacuna de Marek.

ALTERNATIVAS DE PRODUCCIÓN ORGÁNICA 3: SUSTITUCIÓN DE LOS ANTIBIÓTICOS PROMOTORES DEL CRECIMIENTO POR UN EXTRACTO DE AJO EN POLLOS DE ENGORDA

ORGANIC PRODUCTION ALTERNATIVES 3: REPLACING ANTIBIOTIC GROWTH PROMOTERS WITH A GARLIC EXTRACT IN BROILERS

R. S. Gómez^A, M. L. Angeles, R. E. Ramírez, A. I. J. A. Bravo, y R. V. González

^ACentro Nacional de Investigación Disciplinaria en Fisiología y Mejoramiento Animal – INIFAP
gomez.sergio@inifap.gob.mx

^BUniversidad Autónoma de Querétaro

SUMMARY

The productivity of individually-housed chickens fed increasing amounts of garlic extract (EA) was evaluated in two experiments. Experiment 3 evaluated the productivity, nutrient ileal digestibility, and blood variables. Chickens were housed in floor pens from 1 to 46 days of age. Coccidiostats and antibiotics were withdrawn from all diets from days 8 to 46. EA inclusion resulted in decreased ($P<0.01$) feed intake and weight gain, but increased ($P<0.01$) feed efficiency. The addition of 0.015% EA resulted in increased ($P<0.05$) nutrient ileal digestibility. Packed cell volume, hemoglobin concentrations, and leukocyte counts were higher in EA-free females as well as in males fed 0.030% EA. Conclusion: in antibiotic-free diets, the inclusion of EA reduced growth while mortality rates tended to be increased.

INTRODUCCIÓN

Actualmente en la industria avícola una nueva generación de productos ha acaparado la atención como promotores del crecimiento. Estos productos incluyen los extractos naturales de plantas, dentro de los cuales se encuentra el ajo que contiene varios componentes que han demostrado tener efectos benéficos sobre la salud y ya se usaba por las culturas ancestrales. La alicina y otros organosulfurados que contiene el ajo son conocidos por sus propiedades antibióticas y antioxidantes. En algunos trabajos se han demostrado la equipolencia antibiótica del ajo sobre una gran variedad de bacterias intestinales como: *E. coli*, *Shigella*, *Vibrio*, *Yersina*, *Listeria*, *Salmonella* y *Campylobacter*. Actualmente, una gran cantidad de investigadores se han enfocado a estudiar y dilucidar los mecanismos a través de los cuales el ajo puede reducir los problemas cardiopulmonares y problemas asociados como la hipertensión (1). Dado lo anterior, es probable que el ajo también pudiera ayudar a reducir otro de los problemas comunes en la avicultura

mexicana, el Síndrome ascítico, que se caracteriza por una falla de oxigenación (hipoxia) en pollos de rápido crecimiento y que es agravado por una hipertensión en la arteria pulmonar y finalmente se produce la muerte por una falla cardíaca derecha. Por lo que el presente trabajo tuvo el objetivo de evaluar la productividad, digestibilidad, peso de algunos órganos, variables hematológicas y estatus antioxidante en pollos alimentados con diferentes dosis de un extracto de ajo.

MATERIALES Y MÉTODOS

Experimento 1. Se usaron 60 pollos machos Ross B300 de 29 a 49 días de edad. Los pollos fueron alojados en jaulas individuales y asignados en un diseño completamente al azar a 6 niveles crecientes de un extracto de ajo (AJO): 0, 0.010, 0.020, 0.030, 0.040 y 0.050%. Se ofreció un alimento de crecimiento a libre acceso (Cuadro 1). Los pollos fueron pesados al principio y final del experimento y el consumo de alimento se registró diariamente. Como anticoccidiano y antibiótico se usaron monensina al 20% a una dosis de 500 g/ton y flavomicina al 8% a razón de 50 g/ton, respectivamente.

Experimento 2. Se usaron 80 pollos machos Ross B300 de 29 a 49 días de edad. Los pollos fueron alojados en jaulas individuales y asignados en un diseño completamente al azar a 2 tratamientos: 0 y 0.020% de un extracto de AJO. Se ofreció un alimento de crecimiento a libre acceso (Cuadro 1). Como anticoccidiano y antibiótico se usaron monensina al 20% a una dosis de 500 g/ton y flavomicina al 8% a razón de 50 g/ton, respectivamente. Los pollos fueron pesados al principio y final del experimento y el consumo de alimento se registró diariamente. Al final, todos los pollos fueron sacrificados y se obtuvo y pesó el corazón, hígado y bazo.

Experimento 3. Se usaron 480 pollos (mitad machos y mitad hembras) Ross B300 desde 1 día hasta los 46 días de edad. Los pollos fueron alojados en

corrales en piso, 40 por corral (20 machos y 20 hembras) y asignados en un diseño completamente al azar a 3 niveles crecientes de un extracto de AJO: 0, 0.015 y 0.030%. Para favorecer la presencia de ascitis, durante la primera semana los pollos se mantuvieron a una temperatura de 25°C; y durante la segunda y tercera semanas, las temperaturas se mantuvieron en 32 y 30°C, respectivamente. También para incrementar la incidencia de ascitis, se ofrecieron alimentos de preiniciación (primeros 8 días), iniciación (del día 9 al 21 de vida) y crecimiento (resto de la engorda) altos en energía, esto es, de 3100, 3200 y 3300 Kcal de EM/kg en cada una de las fases mencionadas (Cuadro 1) y el alimento fue proporcionado a libre acceso. Solamente en el alimento preiniciador se incluyó el coccidiostato y antibiótico (Nicarbazina: 125 g/ton y flavomicina, 50 g/ton) y fueron retirados de los alimentos de iniciación y crecimiento, esto con el fin de desproteger a los pollos del ataque de microorganismos patógenos. Durante la última semana del experimento se seleccionaron 8 pollos por tratamiento y fueron sacrificados para determinar la digestibilidad ileal de nutrientes con el uso de óxido de cromo como marcador interno. Al final del experimento se sacrificaron 2 hembras y 2 machos por corral. Se tomó una muestra de sangre directamente del corazón en tubos con EDTA para analizar variables hematológicas. También se obtuvieron y se pesaron la pechuga, corazón, hígado, intestino delgado y páncreas y se determinó la concentración de glutatión peroxidasa y TBARs.

Los resultados fueron sometidos a análisis de varianza usando los procedimientos de GLM del SAS, para cada uno de los modelos descritos. En el Experimento 1 la unidad experimental fue la jaula y se tuvieron 10 repeticiones por tratamiento. En el Experimento 2, la unidad experimental fue la jaula y se tuvieron 40 repeticiones por tratamiento. En el Experimento 3, para analizar la productividad, la unidad experimental fue el corral y se tuvieron 4 repeticiones por tratamiento. Para analizar la digestibilidad, variables hematológicas y peso de los órganos la unidad experimental fue cada pollo y se tuvieron 8 repeticiones por tratamiento.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Experimento 1. Ninguna de las variables productivas resultó diferente por efecto de la inclusión de cantidades crecientes de un extracto de ajo en la dieta ($P>0.05$). En este experimento se observó una gran mortalidad en pollos alimentados con un nivel mayor al 0.40% de extracto de ajo en la dieta. Estos efectos también se habían observado en otros animales. Por lo que, en los siguientes experimentos se

incluyeron niveles iguales o menores a 0.030% del extracto de ajo.

Experimento 2. El consumo de alimento y la ganancia de peso fueron similares entre tratamientos, pero la eficiencia alimenticia fue mayor con AJO ($P<0.05$). El peso relativo de los órganos fue similar entre tratamientos ($P>0.05$).

Experimento 3. En el período de 1 a 21 días, el consumo de alimento y eficiencia alimenticia fueron similares entre tratamientos. La ganancia de peso se redujo linealmente en proporción inversa al incremento en la concentración de AJO en la dieta ($P<0.01$). En el período total de engorda (1 a 46 días), el consumo de alimento fue menor con el nivel mayor de AJO (Efecto cuadrático, $P<0.01$). La ganancia de peso se redujo linealmente en proporción inversa al incremento en la concentración de AJO ($P<0.01$). La eficiencia alimenticia fue mayor con el nivel mayor de AJO (Efecto cuadrático, $P<0.01$). La mortalidad total fue similar entre tratamientos. La digestibilidad ileal de materia seca, nitrógeno y energía fue mayor ($P<0.05$) con un nivel de AJO de 0.015%; mientras que la digestibilidad de estos nutrientes fue similar entre el nivel 0 y de 0.030 de AJO. El peso relativo de la pechuga ($P<0.05$) y páncreas ($P<0.01$) fueron mayores en las hembras. El hematocrito, hemoglobina y leucocitos fueron mayores en las hembras que consumieron la dieta sin AJO y en los machos que consumieron la dieta con 0.030% de AJO. Sin embargo, en la pechuga se observó el efecto opuesto en TBARs ($P<0.05$). En el páncreas TBAR fue mayor ($P<0.01$) con AJO al 0.030% y glutatión peroxidasa en intestino fue menor ($P<0.05$) en el grupo Control que con AJO; sin embargo, en el corazón hubo una tendencia opuesta a la anterior.

En el experimento 2, se observó un efecto positivo del ajo sobre la eficiencia alimenticia y este efecto se observó de nuevo en el experimento 3, con el nivel mayor de ajo. Otro efecto positivo del ajo fue la mayor digestibilidad de nutrientes con el nivel intermedio (0.015%) de ajo en el experimento 3. Desafortunadamente todas estas ventajas fueron diluidas por la reducción lineal en la ganancia de peso y el menor consumo de alimento en los pollos alimentados con ajo. Es decir, los beneficios fueron detectados en algunas variables pero la variable más importante donde se decide si un producto funciona o no es el crecimiento de los animales, y este fue mayor en los pollos sin ajo. Otras mediciones adversas en los pollos con ajo fue que la mortalidad tendió a incrementarse, especialmente en el experimento 3 que fue diseñado para simular condiciones de producción de tipo comercial. Otra desventaja observada es que aunque se ha documentado que el ajo provee beneficios a problemas de tipo cardiovascular, el incremento del hematocrito y hemoglobina en los machos alimentados

con ajo sugieren la presencia de ascitis en estos pollos. Sin embargo, también se observó que el estatus antioxidante fue mejor en los pollos con AJO, en especial, los que fueron suplementados con la dosis mayor, que en el grupo Control.

CONCLUSIONES

En conclusión, se recomienda seguir evaluando más a fondo los efectos del ajo, especialmente con relación a las dosis idóneas, forma de suplementación (extracto, crudo, polvo), momento adecuado y duración de su

inclusión en la dieta, entre otros. Todo esto bajo condiciones similares a las comerciales para tratar de demostrar beneficios ya sea en la salud o en el crecimiento de los pollos y así tener mayores alternativas para sustituir los antibióticos promotores del crecimiento.

REFERENCIAS

1. Banerjee, S.K. y S.K. Maulik. Effect of garlic on cardiovascular disorders: a review. *J. Nutr.* 1:4 (Online version). 2002.

LISINA BIODISPONIBLE DE CUATRO HARINAS DE SUBPRODUCTOS AVICOLAS EN POLLOS DE ENGORDA EN CRECIMIENTO

LYSINE AVAILABILITY IN FOUR POULTRY BYPRODUCT MEALS IN GROWING BROILERS

C. A. Cortes^A, A. C. Lourdes^A, A. C. Martínez^B, R. F. Ramos^C, A. Aburto, y G. E. Avila^A

^ACentro de Enseñanza, Investigación y Extensión en Producción Avícola, FMVZ-UNAM.

^BAjinomoto Biolatina Industria e Comercio Ltda.

^CBachoco S.A de C.V

SUMMARY

The availability of lysine in four Mexican poultry byproduct meals (PBM, or HSA in Spanish) in broilers was studied in two experiments, including 7 treatment groups and 3 repetitions of 10 chickens each. T1: a lysine-deficient diet. T2 and T3: 0.5 and 0.10% L-lysine; T4 and T5: 0.5 and 0.10% lysine from HSA1 or HSA2; T6 and T7: 0.5 and 0.10% lysine from HSA3 or HSA4. Lysine availability was estimated comparing the slopes and multiple linear regressions. Lysine availability values were 97.2%, 95.2%, 95.2% and 97.8% for HSA1, HSA2, HSA3 and HSA4, respectively, considering L-Lysine treatments as 100%. Available lysine results were similar in all 4 HSA samples. Conclusion: all 4 HSAs evaluated had good protein quality.

INTRODUCCIÓN

La harina de subproductos avícolas (HSA), es un ingrediente comunmente empleado en la elaboración de alimentos para mascotas, por su alto contenido de grasa y a que tiene un perfil de composición de nutrientes similar a la de la harina de pescado, se sabe que las condiciones de procesado y el material

empleado en su elaboración, afecta la calidad nutritiva de las fuentes de proteína de origen animal. El exceso de calor en el procesamiento puede afectar la digestibilidad de aminoácidos; pruebas de crecimiento en pollos, se han utilizado para medir la biodisponibilidad de aminoácidos. Con estos antecedentes, el presente estudio se diseñó con la finalidad de conocer la calidad nutritiva de cuatro HSA mexicanas, empleando pollos de engorda en crecimiento.

MATERIAL Y MÉTODOS

Se realizaron 2 experimentos para evaluar 4 HSA producidas por Bachoco, en el Centro de Enseñanza, Investigación y Extensión en Producción Avícola de la FMVZ-UNAM, para cada experimento se emplearon 210 pollitos de la estirpe Ross de 1 a 21 días de edad en el Experimento 1 y de 7 a 21 días de edad en el Experimento 2. Las aves fueron distribuidas en 21 lotes de 10 pollos cada uno (mitad machos y mitad hembras), alojados en pisos de jaulas en batería Petersime con temperatura controlada por termostato. Los pollos se distribuyeron completamente al azar en 7 tratamientos con 3 repeticiones de 10 pollos cada una. Los tratamientos o dietas experimentales fueron de la

siguiente manera para el Experimento 1: 1.-Dieta basal (solamente deficiente en lisina), 2.- Como 1 + 0.05% de L-lisina, 3.- Como 1 + 0.10% de L-lisina,4.- Como 1 + 0.05% de lisina a partir de HSA de Culiacán, 5.- Como 1 + 0.10% de lisina a partir de HSA de Culiacán, 6.- Como 1 + 0.05% de lisina a partir de HSA de Tecamachalco y 7.- Como 1 + 0.10% de lisina a partir de HSA de Tecamachalco. Para el Experimento 2, el diseño empleado fue similar empleando en los tratamientos 4 y 5 HSA de Mérida y en los tratamientos 6 y 7 HSA de San Luis.

Las dietas experimentales consistieron en la suplementación de L-lisina HCl o las HSA de Culiacán, Tecamachalco, Mérida y San Luis como fuente de lisina (a expensas del azúcar) previo análisis de proteína y aminoácidos, a una dieta basal sorgo+pasta de soya+pasta de ajonjolí deficiente solamente en lisina.

La biodisponibilidad de lisina en cada experimento, fue estimada por la técnica de comparación de pendientes y regresión lineal múltiple, utilizando los datos de crecimiento de los pollitos, con el consumo de lisina sintética (curva estandar) y la comparación con los del consumo de lisina de las cuatro HSA.

RESULTADOS

Los resultados en 21 días de experimentación en ambos experimentos (Cuadros 1 y 2) mostraron, que la ganancia de peso y conversión alimenticia mejoraron ($P<0.05$) con la suplementación de lisina sintética y con las HSA como fuente de lisina de manera equivalente. En el Experimento, la ecuación de regresión fue: $Y = 265.074 + 0.04288 X^1 + 0.0417 X^2 + 0.04085 X^3$; en donde X^1 correspondió a la complementación de L-lisina, X^2 a la HSA de Culiacán y X^3 a la HSA de Tecamachalco. Al comparar las pendientes del crecimiento de la HSA de Culiacán y la HSA de Tecamachalco, con la de la L-lisina considerada como 100%, se obtuvieron

biodisponibilidades de la lisina de la HSA de Culiacán de 97.2% y 95.2% para la de Tecamachalco. En el Experimento 2, la ecuación de regresión fue: $Y = 129.131 + 0.06764 X^1 + 0.06437 X^2 + 0.06614 X^3$; en donde X^1 correspondió a la complementación de L-lisina, X^2 a la HSA de Mérida y X^3 a la HSA de San Luis. Al comparar las pendientes del crecimiento de la HSA de Mérida y la HSA de San Luis, con la de la L-lisina considerada como 100%, se obtuvieron biodisponibilidades de la lisina contenida en la HSA de Mérida de 95.2% y para la de San Luis de 97.8%. Las biodisponibilidades entre las HSA evaluadas fueron similares, lo que indica, similitud en el control de calidad de las HSA producidas en diferentes localidades, con condiciones adecuadas de procesamiento y el material empleado para su elaboración muy consistente.

DISCUSIÓN

Los resultados obtenidos de este estudio confirman que los HSA son una excelente fuente de lisina y que el procesamiento utilizado en la producción de estas harinas no afectó la digestibilidad de este aminoácido. Por otro lado, la técnica de la pendiente en dietas sorgo+soya+ajonjolí suplementadas con lisina sintética, para estudiar en pollos la digestibilidad de lisina de las diferentes HSA producidas en diferentes regiones del país resultó una vez más una técnica adecuada para medir la disponibilidad biológica de lisina.

CONCLUSIONES

En base a los resultados obtenidos de lisina biodisponible en este estudio con pollos en crecimiento, se puede concluir que la calidad proteica de las HSA mexicanas evaluadas resultaron ser de buena calidad y son excelente fuente de proteína y aminoácidos para la formulación de alimentos balanceados.

Cuadro 1. Datos promedio obtenidos en pollos de engorda alimentados con diferentes niveles de lisina (Exp. 1 y 2).

| Tratamiento | Ganancia de peso (g) | | Consumo de alimento (g) | | Consumo de lisina (mg) | | Conversión alimenticia | |
|-------------|----------------------|---------|-------------------------|---------|------------------------|---------|------------------------|---------|
| | Exp 1* | Exp.2** | Exp 1* | Exp.2** | Exp 1* | Exp.2** | Exp 1* | Exp.2** |
| 1 | 618c | 366c | 923 | 516c | 8033a | 3612d | 1.49 | 1.41a |
| 2 | 619c | 414b | 940 | 562abc | 8651a | 4217bc | 1.52 | 1.36ab |
| 3 | 676a | 469a | 967 | 619a | 9383ab | 4946a | 1.43 | 1.31b |
| 4 | 637abc | 417b | 986 | 575ab | 9071ab | 4310bc | 1.54 | 1.38ab |
| 5 | 664ab | 423ab | 973 | 596a | 9438ab | 4771a | 1.46 | 1.41a |
| 6 | 613c | 393bc | 921 | 524bc | 8470ab | 3927cd | 1.50 | 1.33b |
| 7 | 633bc | 433ab | 937 | 580b | 9088b | 4637ab | 1.48 | 1.34ab |

*Valores con distinta letra son diferentes ($P<0.05$)

** Valores con distinta letra son diferentes ($P<0.01$)

EFECTO DE LA INCLUSION DE DIFERENTES NIVELES DE GRANOS SECOS DE DESTILERIA CON SOLUBLES (DDGS) EN DIETAS SORGO-SOYA PARA POLLOS DE ENGORDA

THE EFFECT OF DIFFERENT DDGS INCLUSION LEVELS IN BROILER DIETS

C. C. Esparza^A, C. A. Cortés^A, R. M. Ornelas^B, y G. E. Ávila^A

^ACentro de Enseñanza, Investigación y Extensión en Producción Avícola-FMVZ-UNAM

^BMalta Cleyton SA de CV

SUMMARY

This study was performed to evaluate different inclusion levels of dried distillers grains plus solubles (DDGS, or GSDS in Spanish) in sorghum-soybean-based broiler diets. Seven hundred four Ross broilers were allotted to 4 treatment groups with 8 replicates, following a completely-at-random design. T1: basal diet; T2: T1 + 7% DDGS; T3: T1 + 14% DDGS; T4: T1 + 21% DDGS. Results of this 49-day experiment: Weight gain: 2940, 2929, 2860 and 2844 g; feed intake: 5536, 5573, 5719 and 5763 g; feed conversion rate: 1.88, 1.90, 2.00 and 2.03; percent mortality 7.7, 3.5, 6.5 and 7.1%, respectively. No statistical differences were found among treatment groups. The inclusion of up to 21% DDGS did not affect productive parameters. DDGS are a good alternative energy/protein source.

RESUMEN

Con el objeto de evaluar diferentes niveles de inclusión de granos secos de destilería con solubles de maíz (DDGS por sus siglas en inglés), en dietas sorgo-soya para pollos de engorda, se realizó el presente estudio. Se utilizaron 704 pollos de 1 a 49 días de edad de la estirpe Ross x Ross 308, distribuidos en 4 tratamientos con 8 repeticiones de 22 pollos cada una. Se empleó un diseño completamente al azar. Los tratamientos fueron los siguientes: Tratamiento 1. Dieta testigo sorgo-soya, Tratamiento 2. Como 1 + 7% de DDGS, Tratamiento 3. Como 1 + 14% de DDGS y Tratamiento 4. Como 1 + 21% de DDGS. Los resultados obtenidos para ganancia de peso (2940, 2929, 2860 y 2844 g respectivamente), consumo de alimento (5536, 5573, 5719 y 5763 g), conversión alimenticia (1.88, 1.90, 2.00 y 2.03) y porcentaje de mortalidad (7.7, 3.5, 6.5 y 7.1%), fueron estadísticamente similares entre tratamientos. En base a los resultados obtenidos en el presente estudio, se puede inferir que la inclusión de hasta 21% de DDGS, no afecta el comportamiento productivo en pollos y son

una fuente alternativa de energía y proteína en la formulación de dietas para aves.

INTRODUCCIÓN

Los DDGS son un subproducto que proviene de la fermentación de los granos para la obtención de etanol. El maíz, es el grano principal que se utiliza para obtener etanol en Estados Unidos, pero no es el único, también se puede obtener de granos como el trigo, la cebada, el centeno, el sorgo o la combinación de estos dependiendo de los costos y la disponibilidad de los granos en cada región (1).

Los DDGS, se obtienen de los residuos que quedan al fermentar el almidón con levaduras del género *Saccharomyces cerevisiae*. Al obtener el etanol, se generan dos subproductos: los solubles líquidos y los restos de grano. Ambos son mezclados y posteriormente deshidratados para obtener los DDGS (2,3).

El motivo principal por el que se emplean los DDGS en el consumo animal, es por ser una fuente proteica (25.5- 26.6%) y energética, que pueden sustituir cerca del 2.5% de la pasta de soya y 9% del maíz; además de presentar otras características nutritivas como su contenido en fósforo (0.62-0.78%) y lisina (0.64-0.83%), nutrientes importantes en la formulación de dietas para las aves (2,4-6).

Con estos antecedentes, se realizó el presente estudio para evaluar los diferentes porcentajes de inclusión en dietas sorgo-soya para pollo de engorda y su efecto en el comportamiento productivo.

MATERIAL Y MÉTODOS

La presente investigación se realizó en el Centro de Enseñanza, Investigación y Extensión en Producción Avícola (C.E.I.E.P.Av.) de la FMVZ-UNAM. Se utilizaron 704 pollos de un día de edad Ross x Ross, 308 distribuidos en 32 corrales de 22 pollos cada uno. Los tratamientos experimentales, consistieron en el empleo de DDGS en dietas

isocalóricas e isoprotéicas sorgo-soya-DDGS, balanceadas de acuerdo a los requerimientos señalados para la estirpe por Leeson y Summers (2001)(1) como se señala a continuación:

Tratamiento 1.- Dieta testigo sorgo + soya

Tratamiento 2.- Como el tratamiento 1 + 7% de DDGS

Tratamiento 3.- Como el tratamiento 1 + 14% de DDGS

Tratamiento 4.- Como el tratamiento 1 + 21% de DDGS

Las aves, se alojaron en corrales de 1 x 2.2m con piso de cemento y cama de viruta, la alimentación y el agua se proporcionaron *ad libitum* durante todo el experimento.

Se llevaron registros semanales de ganancia de peso, consumo de alimento, conversión alimenticia y porcentaje de mortalidad. Los datos obtenidos de estas variables se les realizó un análisis estadístico utilizando un diseño completamente al azar y un análisis de regresión lineal múltiple.

RESULTADOS

Los resultados obtenidos en 49 días de experimentación para ganancia de peso, consumo de alimento, conversión alimenticia y porcentaje de mortalidad se pueden apreciar en el Cuadro 1. Los resultados obtenidos para las variables mencionadas no fueron diferentes estadísticamente ($P>0.05$) entre tratamientos. Los resultados para los tratamientos 1, 2, 3, y 4 fueron los siguientes respectivamente: Ganancia de peso (2940, 2929, 2860, 2844 g), consumo de alimento (5536, 5573, 5719, 5763 g), conversión alimenticia (1.86, 1.90, 2.00, 2.03), mortalidad (7.7, 3.5, 6.5, 7.1%), fueron muy similares.

DISCUSIÓN

Los resultados obtenidos de las variables antes descritas en 49 días, no indicaron diferencias estadísticas entre tratamientos. Este efecto fue encontrado por algunos investigadores quienes observaron que niveles de hasta 37% de DDGS no afectan el comportamiento productivo de las aves⁸ cuando se emplea este ingrediente como fuente de energía y proteínas.

REFERENCIAS

1. Leeson, S., J.D. Summers. Comercial poultry nutrition. 3rd ed. Guelph, Ontario Canadá: University Books. 2005.
2. Lumpkins, B.S. and A.B. Batal. The bioavailability of lysine and phosphorus in distillers dried grains whit solubles. *Poult Sci.* 84 581-586. 2005.
3. Martínez, A.C. Nutritional evaluation of DDGS for poultry (tesis de doctorado PHD). Urbana-Champaign (Illinois) University of Illinois. 2005.
4. Martinez, A.C., C.M. Parsons, and S.L. Noll. Content and relative bioavailability of phosphorus in distiller dried grains whit soluble in chicks. *Poultry Science* 83:971-976. 2004.
5. Noll, S. DDGS in poultry diets: does it make sense. Midwest Poultry Federation Pre-Show Nutrition Conf; 2004 marzo 16; St. Paul (MN) EUA. 2004.
6. Noll, S., V. Stangeland, G. Speers, and J. Brannon. Distillers grains in poultry diets. 62nd Minnesota Nutrition Conf. and Minnesota Corn Growers Association Technical Symposium; 2001 septiembre 11-12; Bloomington (MN) EUA. 2001.
7. Shurson, G., M. Spieshs, and M. Whitney. The use of maize distiller's dried grain with solubles in pig diets. *Anim Sci* 9. 2004.
8. Waldroup, P.W., Z. Wang, C. Coto, S. Cerrate, and F. Yan. Development of a standardized nutrient matrix for corn Distillers Dried Grains with Solubles. *International Journal of Poultry Science* 6:478-483.2007.

Cuadro 1. Resultados promedio de las variables productivas a los 49 días de experimentación.

| Tratamientos (% de inclusión de DDGS) | Ganancia de peso (g) | Consumo de alimento (g) | Conversión alimenticia (kg/kg) | Mortalidad (%) |
|---------------------------------------|----------------------|-------------------------|--------------------------------|----------------|
| 0% | 2940 | 5536 | 1.8 | 7.7 |
| 7% | 2929 | 5573 | 1.9 | 3.5 |
| 14% | 2860 | 5719 | 2.0 | 6.5 |
| 21% | 2844 | 5763 | 2.0 | 7.1 |

EL EFECTO DEL BUTIRATO DE SODIO EN DIETAS PARA GALLINAS SOBRE EL COMPORTAMIENTO PRODUCTIVO Y CALIDAD DEL HUEVO

THE EFFECT OF SODIUM BUTYRATE IN LAYER DIETS ON EGG PRODUCTION AND QUALITY

H. I. Sánchez^{A*}, H. E. Posadas^A, M.B. Fuente^A, V. J. L. Laparra^B, y G. E. Ávila^A

^ACentro de Enseñanza, Investigación y Extensión en Producción Avícola FMVZ-UNAM.

^BBFI Innovations México

SUMMARY

Only few reports exist worldwide on the use of sodium butyrate in layer diets. Increased egg mass, higher percent production, and improved eggshell quality have been shown when sodium butyrate is fed. The fact that egg production and eggshell quality decline as birds age and as egg production cycle progresses is well known. This study evaluated the productive performance and egg quality of layers fed sodium butyrate. This ten-week experiment showed improved percent lay (86.4b, 92.2a and 89.6a%), egg weight (63.4b, 63.4b and 64.1a g) feed intake (111.4b, 111.9ab and 113.4a g), feed conversion rate (2.09a, 1.95b and 2.03ab), and percent micro-fractures (20.8a, 14.9ab and 12.9b). The benefits of feeding sodium butyrate were confirmed.

RESUMEN

Se reconoce que el butirato, juega un papel importante en el mantenimiento de la mucosa intestinal y que la cantidad producida por fermentación es insuficiente en gallinas viejas, razón por la cual en el presente estudio, se evaluó el comportamiento productivo y la calidad del huevo en gallina de postura, mediante la adición de butirato de sodio (Adimix[®]) en la dieta. Se utilizaron 180 gallinas blancas ligeras de la estirpe Bovans blanca de 63 semanas de edad (45 semanas de producción). Se empleó un diseño completamente al azar con tres tratamientos, cada uno con cinco réplicas de 12 gallinas cada una alojadas en jaulas. A las aves se les proporcionó un fotoperiodo de 16 hrs luz por día. La alimentación y el agua se proporcionaron ad libitum durante todo el experimento. Se llevaron registros durante 10 semanas, de porcentaje de postura, peso promedio de huevo, masa del huevo, consumo de alimento, conversión alimenticia y al ovoscopiado fisuras (microfracturas) en el cascarón del huevo. Los tratamientos o dietas en las aves fueron con base en sorgo + pasta de soya como se señala a continuación. T1.- Dieta testigo; T2.- Dieta testigo +

butirato de sodio 300g /ton y T3.- Dieta testigo + butirato de sodio 500g/ton. A las variables en estudio, se les realizó un análisis de varianza conforme a un diseño completamente al azar con mediciones repetidas en el tiempo. Los resultados obtenidos en 10 semanas de experimentación, mostraron un mejor porcentaje de postura (86.4b, 92.2a y 89.6a%), peso de huevo (63.4b, 63.4b y 64.1a g) consumo de alimento (111.4b, 111.9ab y 113.4a g), conversión alimenticia (2.09a, 1.95b y 2.03ab) y porcentaje de micro-fracturas (20.8a, 14.9ab y 12.9b). Estos resultados confirman el efecto benéfico del butirato demostrado en previos estudios realizados en gallinas ponedoras en el último tercio de su primer ciclo de producción. De la información obtenida en el presente estudio, se puede concluir que el butirato de sodio en dietas para gallinas Bovans de 63 semanas de edad, mejora el comportamiento productivo y la calidad del cascarón.

INTRODUCCION

Los ácidos grasos de cadena corta, acético, propiónico y butírico; son obtenidos de la fermentación colónica de la fibra, las concentraciones de estos, son más altas en el ciego, donde las concentraciones de la microflora son altas, siendo los niveles de pH bajos en esta zona. El ácido butírico es preferido por los enterocitos, su concentración asegura una mayor integridad de la mucosa. El ácido butírico tiene efecto trófico sobre la mucosa intestinal, en el aporte directo de energía aumentando el flujo sanguíneo del colon y ciego, también incrementa las secreciones pancreáticas y de otras hormonas gastrointestinales.

Las pocas investigaciones publicadas a nivel mundial con el butirato de sodio en dietas de gallinas ponedoras, muestran aumento de la masa de huevo, mayor porcentaje de producción y mejora en la calidad del cascarón. Es generalmente aceptado, que la producción de huevo y la calidad del cascarón disminuyen conforme la edad y el ciclo de producción de las gallinas es mayor. La calidad de las células de la

mucosa intestinal y altura de las vellosidades intestinales es menor en el duodeno, debido a esto la digestión y absorción de nutrientes para la formación del huevo y el cascarón pueden ser insuficientes. Se reconoce que el butirato, juega un papel importante en el mantenimiento de la mucosa intestinal y que la cantidad producida por fermentación es insuficiente en gallinas viejas, razón por la cual en el presente estudio, se evaluó el comportamiento productivo y calidad del huevo en gallina de postura, adicionando butirato de sodio (Adimix) empleando dietas para estas aves.

MATERIAL Y METODOS

El experimento se realizó en el Centro de Enseñanza, Investigación y Extensión en Producción Avícola de la FMVZ-UNAM. Se utilizaron 180 gallinas blancas ligeras de la estirpe Bovans blanca de 63 semanas de edad y 45 semanas de producción. Se empleó un diseño completamente al azar con tres tratamientos, cada uno con cinco réplicas con 12 gallinas alojadas en jaulas. A las aves se les proporcionó un fotoperiodo de 16 hrs luz por día. La alimentación y el agua se proporcionaron *ad libitum* durante todo el experimento. Se llevaron registros semanales durante 10 semanas, de porcentaje de postura, peso promedio de huevo, masa del huevo, consumo de alimento, conversión alimenticia y al ovoscopiado fisuras (microfracturas) en el cascarón del huevo. Los tratamientos o dietas en las aves fueron con base en sorgo + pasta de soya como se señala a continuación. Tratamiento 1) Dieta testigo; Tratamiento 2) Dieta testigo + butirato de sodio 300g/ton; Tratamiento 3) Dieta testigo + butirato de sodio 500g/ton.

A las variables en estudio, se les realizó un análisis de varianza conforme a un diseño completamente al azar con mediciones repetidas en el tiempo.

RESULTADOS

Los datos promedio obtenidos (Cuadro 1), muestran mejora en el porcentaje de postura, peso de huevo, consumo de alimento y conversión alimenticia; así como una reducción en el porcentaje de microfracturas en el cascarón del huevo con la adición de butirato de sodio a los niveles estudiados.

DISCUSIÓN

Existen pocas investigaciones publicadas a nivel mundial con el butirato de sodio en dietas de gallinas ponedoras, sin embargo se ha mostrado un aumento de la masa de huevo, mayor porcentaje de producción y

una mejor calidad del cascarón. Es generalmente aceptado, que la producción de huevo y la calidad del cascarón disminuyen conforme la edad y el ciclo de producción de las gallinas es mayor. Estos resultados confirman estudios previos al respecto del efecto benéfico del ácido butírico en gallinas al final de su primer ciclo en producción.

CONCLUSIONES

De la información obtenida se concluye, que el butirato de sodio en gallinas Bovans de 63 semanas de edad mejora el comportamiento productivo y la calidad del cascarón. El empleo de butirato de sodio, a dosis de 300 a 500g/ton en dietas de gallinas viejas mejora la producción y calidad del cascarón.

REFERENCIAS

1. Carlos, López Coello, José Arce Menocal, Ernesto Ávila González Mitos, y Realidades del Sistema. Digestivo y sus Implicaciones sobre la Productividad. Asociación Española de Ciencias Avícolas. Julio de 2006.
2. García, Peris P, Bretón Lesmes I., De La Cuerda Compes C., Cambor Álvarez M. Metabolismo Colónico de la Fibra. Nutr. Hosp. XVII (Sup. 2)11-16. 2002.
3. Murry Jr., A.C., A. Hinton Jr., and R.J. Buhr. Effect of Botanical Probiotic Containing Lactobacilli on Growth Performance and Populations of Bacteria in the Ceca, Cloaca, and Carcass Rinse of Broiler Chickens. International Journal of Poultry Science 5 (4): 344-350. 2006.
4. Quiroz, M.A., J.J. Dibner, C.D. Knight, y R. González-Esquerro. Uso de ácidos orgánicos como alternativa para el control de la enteritis necrótica. Seminario Internacional Novus – Nra, Santiago De Querétaro, México. Abril 8, 2005.
5. Rickel, S.C. Perspectives on the Use of Organic Acids and Short Chain Fatty Acids as Antimicrobials. Poultry Science 82:632-639. 2003.
6. Rodríguez-Palenzuela, García J., y C. Blas. Fibra Soluble y su Aplicación en Nutrición Animal: Enzimas y Prebióticos. XIV Curso de Especialización. Avances en la Nutrición y Alimentación Animal.
7. Van Vugt, P.N.A., P.J.A. Wijtten, H.B. Perdok, and D.J. Langhout. PROVIMAX improves the Technical Performance and Eggshell Quality of Laying Hens. Poult. Nutr. Oct 2001.
8. www. Agqsl.com. España. AGQ Nutrición. Ácidos Grasos Volátiles y sus Precursores, Citado el 16 de mayo del 2007. Disponible desde: http://www.agqsl.com/productos/vfappetite/vfappetite_dosis.htm.

Cuadro 1. Datos promedio de experimentación en gallinas de postura de 63 a 73 semanas de edad, alimentadas con diferentes niveles de butirato.

| Tx | Porcentaje de postura* | Peso del huevo(g)* | Masa de huevo (g)* | Consumo de alimento (g)* | Índice de conversión* | Porcentaje de fisuras* |
|----|------------------------|--------------------|--------------------|--------------------------|-----------------------|------------------------|
| 1 | 86.4 b | 63.4 b | 54.8 b | 111.4 b | 2.09 a | 20.8 a |
| 2 | 92.2 a | 63.4 b | 58.5 a | 111.9 ab | 1.95 b | 14.9 ab |
| 3 | 89.6 a | 64.1 a | 57.4 a | 113.4 a | 2.03 ab | 12.9 b |

*Valores con distinta letra son diferentes ($P<0.05$).

EVALUACIÓN DE DIFERENTES NIVELES DE INCLUSIÓN DE GLUTAMINA EN DIETAS PARA POLLOS DE ENGORDA

EVALUATION OF FEEDING BROILERS WITH DIFFERENT GLUTAMINE LEVELS

I. J. Miguel^A, C. A. Cortes^A, A. C. Martínez^B, y G. E. Avila^A

^ACentro de Enseñanza, Investigación y Extensión en Producción Avícola-FMVZ –UNAM

^BAjinomoto Biolatina S.A.

SUMMARY

The purpose of this experiment was to investigate the effect of different glutamine inclusion levels. The amino acid glutamine is poorly synthesized by stressed growing chickens. A complete random design was used with five treatment groups and six repetitions of 42 1-49-day-old Cobb chickens each. Sorghum-soybean based diets were added with 0, 2, 4, 6 or 8 kg/ton glutamine in the first three weeks of age. Results: The addition of 2 kg glutamine/ton of feed resulted in significant ($P<0.05$) growth difference as compared with all other treatments. Conclusion: the addition of 2 kg glutamine/ton has a growth promoting effect in broilers.

las primeras 3 semanas de edad. Posteriormente, todos los tratamientos recibieron la misma dieta en la etapa de finalización. Los resultados obtenidos en 49 días para ganancia de peso y conversión alimenticia indicaron diferencia ($P<0.05$) entre tratamientos, con un mayor ganancia de peso y mejor conversión alimenticia el tratamiento 2 respecto a los tratamientos 1, 3, 4 y 5. Sin embargo, para consumo de alimento y porcentaje de mortalidad no hubo diferencia ($P<0.05$) entre tratamientos. En base a los resultados obtenidos en el presente estudio se puede concluir, que la adición de 2kg de glutamina/ton durante las primeras 3 semanas de vida, tiene un efecto promotor del crecimiento en pollos de engorda.

RESUMEN

Con la finalidad de investigar el efecto de diferentes niveles de inclusión de glutamina (aminoácido cuya síntesis es deficiente bajo condiciones de estrés), en dietas de iniciación sorgo-soya sobre el comportamiento productivo a 49 días de edad, se realizó el presente experimento. Se utilizaron 1220 pollos Cobb de 1-49 días de edad, los cuales se distribuyeron conforme a un diseño completamente al azar en 5 tratamientos con 6 repeticiones de 40 pollos cada una. Los tratamientos fueron: T1.- dieta testigo sorgo-soya, T2.- como 1+2kg de glutamina/ton, T3 como 1+4kg de glutamina/ton, T4 .- como 1+6kg de glutamina/ton y T5.- como 1+8kg de glutamina/ton en

INTRODUCCIÓN

La glutamina, es un aminoácido considerado condicionalmente esencial en algunas especies bajo estrés, cuya función es la de participar en aspectos metabólicos de enterocitos, linfocitos, macrófagos y fibroblastos (4). En algunas especies con lesiones inflamatorias, la glutamina ayuda al sistema inmune, promoviendo la producción de linfocitos. Algunas investigaciones realizadas en cerdos y pollos, han demostrado que la suplementación a las dietas mejora la ganancia de peso y la conversión alimenticia (2). La glutamina, promueve el crecimiento, ya que mejora la integridad de las microvellosidades intestinales, dando como resultado una mayor digestión y absorción de nutrientes (1,2). Con estos antecedentes, se realizó el

presente trabajo con el objeto de evaluar el efecto de la adición de diferentes niveles de glutamina las primeras 3 semanas de vida en dietas sorgo-soya, para pollos de engorda y su impacto en los parámetros productivos.

MATERIAL Y MÉTODOS

Se utilizaron 1220 pollitos de engorda de un día de edad, de la estirpe Cobb obtenidos de una incubadora comercial. Las aves fueron distribuidas en 30 lotes de 40 pollos cada una (mitad machos y mitad hembras), alojados en una caseta convencional con corrales con piso de cemento y cortinas laterales. Los pollos se distribuyeron completamente al azar en 5 tratamientos, cada uno con 6 repeticiones de 40 aves cada una durante la etapa de iniciación de 0-21 días de edad recibieron glutamina (aminogut) como se describe a continuación:

1. Dieta sorgo- soya
2. Como 1 + 2kg de glutamina/ton
3. Como 1 + 4kg de glutamina/ton
4. Como 1 + 6kg de glutamina/ton
5. Como 1 + 8kg de glutamina/ton

Posteriormente, se ofreció a todos los tratamientos dietas sorgo-soya para finalización de los 22 a los 49 días de edad.

Durante el estudio, se llevaron registros de ganancia de peso, consumo de alimento, conversión alimenticia y porcentaje de mortalidad. Los datos de las variables en estudio, se sometieron a una análisis de varianza conforme un diseño completamente al azar.

RESULTADOS

Los resultados en 1-49 días de experimentación para ganancia de peso, consumo de alimento, conversión alimenticia y mortalidad se encuentran en el Cuadro 3. Los datos obtenidos para ganancia de peso, indicaron que existió diferencia ($P < 0.01$) entre tratamientos; con una mayor ganancia de peso en el tratamiento 2 respecto al tratamiento 1, este último fue similar respecto a los tratamientos 3, 4, 5. Para consumo de alimento, los datos obtenidos no fueron estadísticamente diferentes ($P > 0.05$) entre tratamientos. Sin embargo en conversión alimenticia hubo diferencia ($P < 0.05$) entre los tratamientos, con una mejor conversión alimenticia el tratamiento 2,

respecto al tratamiento 1. Sin existir diferencia de este último con los tratamientos 3, 4 y 5. Por último, los resultados obtenidos del porcentaje de mortalidad general no indicaron diferencias ($P < 0.05$) entre tratamientos.

DISCUSIÓN

Los resultados obtenidos a 49 días de edad, indicaron efecto en ganancia de peso y conversión alimenticia, datos que concuerdan con los obtenidos en pollos alimentados con 1% de glutamina, por Bartell y Batal (2) quienes encontraron una mayor ganancia de peso y una mejor eficiencia alimenticia; así como, mayor concentración de inmunoglobulinas y una mayor longitud de las vellosidades intestinales.

CONCLUSIONES

De acuerdo con los resultados obtenidos y bajo las condiciones experimentales del presente estudio, se puede concluir que la adición de 2kg/ton de glutamina durante los primeros 21 días de edad en dietas sorgo-soya para pollos de engorda, promovió un mayor rendimiento productivo a los 49 días de edad.

REFERENCIAS

1. Bartell, S.M. and A.B. Batal. The Effect of Supplemental Glutamine on Growth Performance, Development of the Gastrointestinal Tract, and Humoral Immune Response of Broilers. Poultry Science 86:1940–1947. 2007.
2. Kitt, S.J., P.S. Miller, A.J. Lewis, and R.L. Fischer. Effects of glutamine on growth performance and small intestine villus height in weanling pigs. Pages 29–32 in Nebraska Swine Rep. Univ. Nebraska, Lincoln. 2002.
3. Peter J. Reeds, Douglas G. Burrin, Barbara Stoll and Farook Jahoor. Glutamate and Glutamine in Metabolism. J. Nutr. 130: 978S–982S, 2000.
4. Yi, G.F., J.A. Carroll, G.L. Allee, A.M. Gaines, D.C. Kendall, J.L. Usry, Y. Toride, and S. Izuru. Effect of glutamine and spray-dried plasma on growth performance, small intestinal morphology, and immune responses of *Escherichia coli* K88+-challenged weaned pigs1, 2. J. Anim. Sci. 83:634–643. 2005.

Cuadro 1. Datos obtenidos de 1-49 días de edad en pollos alimentados con diferentes niveles de glutamina

| Tratamientos | Ganancia de peso (g) | Consumo de alimento (g) | Conversión alimenticia | Mortalidad (%) |
|--------------|----------------------|-------------------------|------------------------|----------------|
| 1 | 3020.8b | 5646.6 | 1.87b | 10.1 |
| 2 | 3310.3a | 5794.5 | 1.75a | 16.1 |
| 3 | 3160.6ab | 5696.6 | 1.80ab | 11.9 |
| 4 | 3149.0ab | 5667.3 | 1.80ab | 8.6 |
| 5 | 3177.0ab | 5697.1 | 1.79ab | 13.8 |

Valores con distinta letra son diferentes ($P < 0.05$)

NEWCASTLE DISEASE (ND) EFFICACY IN BROILERS VACCINATED AT ONE DAY OF AGE WITH THE RECOMBINANT HVT/F(ND):INNOVAX[®]-ND-SB CHALLENGED WITH THE MEXICAN vND VIRUS ISOLATE CHIMALHUACAN

EFICACIA DE LA VACUNA RECOMBINANTE HVT/F(ND)-(INNOVAX-ND-SB) EN POLLOS DE ENGORDA VACUNADOS AL DÍA DE EDAD Y DESAFIADOS CON EL AISLAMIENTO MEXICANO CHIMALHUACÁN DEL VIRUS DE LA ENFERMEDAD DE NEWCASTLE

Ruud G. Hein^A, J. Francesco Rios^B, Alberto Aguilera^B, and Jos Domhof^B

^AIntervet Inc part of Schering Plough Corp. 29160 Intervet Lane P.O.Box 318 Millsboro De 19966 USA

^BIntervet Mexico S.A de CV part of Schering Plough Corp. Paseo de los frailes 22. Santiago Tianguistenco, Edo Mex Mexico

RESUMEN

En este trabajo presentaremos los resultados obtenidos en pollos de engorda con niveles elevados de anticuerpos maternos contra la enfermedad de Newcastle, que fueron divididos en varios grupos, uno de los cuales se vacunó al día de edad por la vía subcutánea (SC) con la vacuna recombinante HVT/F(ND)+SB1(INNOVAX-ND-SB), un segundo grupo fue inmunizado al día de edad con la misma vacuna recombinante por vía subcutánea y con una vacuna a virus activo de la enfermedad de Newcastle por vía ocular y el tercer grupo recibió al día de edad la vacuna a virus activo de la enfermedad de Newcastle por vía ocular y una vacuna inactivada contra la misma enfermedad aplicada por la vía SC, seguida de una segunda vacuna a virus activo de la enfermedad de Newcastle a los 14 días de edad por la vía ocular. Se incluyó también un grupo no vacunado como testigo negativo. Todos los grupos se desafiaron a diferentes edades con el virus mexicano Chimalhuacán de la enfermedad de Newcastle por las vías ocular y/o

intramuscular. Las aves se observaron en busca de signos clínicos y mortalidad. En diferentes días posdesafío se realizó el aislamiento viral a partir de las aves desafiadas por la vía ocular.

ABSTRACT

The vaccine INNOVAX[®]-ND-SB is a Turkey Herpes Virus recombinant rHVT with the ND virus F (fusion protein) gene insert in combination with the Marek's Disease virus (MDV) vaccine SB1. The vaccine is licensed in the USA to be administrated *in ovo* and intended for the control of very virulent (vv) MD and virulent (v) ND.

The vaccine compared with the commercial HVT/SB1 has shown to provide similar protection against MD in vv+ MD shedder trials and excellent protection against the Texas GB vND virus (1,2).

Main characteristics of a rHVT/ND vaccine are the elimination of the vaccination reaction/systemic distress as observed with the live vaccines and the local

reactions/handling/distress with the inactivated ND vaccines.

However with the r HVT/F (ND) vaccines full protection against v ND will only be achieved at 3-4 weeks of age. In case of the risk of an early ND infection, a live ND vaccination at the first week of age should be recommended, preferably at one day of age ocular or by spray depending on the type of ND vaccine used at one day of age a second vaccination with a ND live vaccine may be recommended around 10-12 days of age to ensure the first weeks of age until the recombinant vaccine has conferred full immunity at around four weeks of age.

Most if not all the efficacy studies for ND with the HVT/ND recombinants have been carried out with the vv NDV Texas GB in the US or Herts 33 in Europe.

In a recent study carried out in Mexico, different groups of broilers with very high Mab for ND were vaccinated s.q. at one day of age with the HVT/ND recombinant vaccine with or without the addition of a live ND vaccination(s).

As comparison a group of broilers was vaccinated with live ND vaccines and an inactivated ND vaccine.

A negative control (nonvaccinated) group was included.

At different ages (up to 50 days of age) from each group birds were challenged with the Mexican vvNDV Chimalhuacan and blood samples taken for ND serology. (All the challenge and serology data will be presented.)

The HVT/ND recombinant vaccinated groups provided full protection up to 50 days of age, comparable with the inactivated vaccinated group.

REFERENCES

1. Hein, R.G. and G. Slacum. Efficacy against Very Virulent (vv) Marek's Disease Virus (MDV) of the HVT/ND Recombinant and the Immunity against Virulent (v) New Castle Disease Virus (NDV). Proceedings 56th Western Poultry Disease Conference: 83. 2007.

2. Morgan, R.W. HVT-Vectored Vaccines: Marek's Disease Protection and Insert Efficacy. Proceedings 42nd Natl. Meeting Poultry Health and Processing: 67-72. 2007.

POTENCIA DE VACUNAS COMERCIALES CONTRA LA ENFERMEDAD DE NEWCASTLE

POTENCY OF COMMERCIAL NEWCASTLE DISEASE VACCINES

David Sarfati, Bernardo Lozano, Manuel Gay y Ernesto Soto

Laboratorio AVI-MEX SA de CV. México, www.avimex.com.mx

SUMMARY

Ten-day-old specific-pathogen-free (SPF) birds were immunized using commercial (Avimex[®]) Newcastle disease (ND, or *ENC* in Spanish) vaccines. Birds were intramuscularly challenged 21 days post-vaccination with 0.03 mL inoculum containing 10⁶ chicken embryo infectant doses 50% (CEID, or *DIEP* in Spanish 50/mL) of the M strain (velogenic, neurotropic, VN), Chimalhuacán (velogenic viscerotropic, VV) and Querétaro (VV) strains. All birds were observed for 14 days. Results showed that birds immunized with: a) Newcastle-Influenza vaccine (0.5 mL subcutaneously, SC), b) Oil emulsion Newca-Mex[®] (0.5 mL, SC), c) Oil emulsion, concentrated Newcastle disease vaccine (0.03 mL SC), d) Oil emulsion Newcastle-Hepatitis vaccine (0.5 mL, SC), and e) Live LaSota vaccine (0.03 mL, ocular) showed no clinical signs or mortality after challenge. Mortality in the controls was as follows: 100% birds challenged

with the M strain (mean: 4.3 days); 100% birds challenged with the Chimalhuacán strain (mean: 6.2 days); and 90% birds challenged with the Querétaro strain (mean 7.3 days).

INTRODUCCIÓN

El virus de la enfermedad de Newcastle (VENC) es un paramixovirus aviar serotipo 1 (APMV-1) género Avulavirus, incluido en la lista A de la OIE. Históricamente, el VENC ha provocado infecciones devastadoras en la avicultura, y en muchos países permanece enzootico y como el mayor problema de la avicultura.

Los VENC no presentan variaciones antigénicas mayores de significancia biológica, aunque se han podido demostrar muy pequeñas variaciones en raras ocasiones por pruebas de HI, mismas que no han sido suficientemente diferentes para evitar una protección

completa con las vacunas convencionales. También se han podido detectar diferencias utilizando anticuerpos monoclonales, lo que permitió en su momento agrupar más de 1,500 virus en nueve diferentes grupos, mismos que igualmente fueron protegidos por las vacunas convencionales.

El objetivo de este trabajo fue el de verificar la protección de aves SPF vacunadas con diferentes tipos de vacunas contra el VENC, contra los signos y lesiones producidos por diferentes VENC velogénicos que han sido aislados en México a lo largo de los años.

MATERIALES Y MÉTODOS

Las pruebas fueron realizadas en un periodo de 12 meses en gabinetes de aislamiento, instalados dentro de unidades de aislamiento del Cenid-Microbiología, INIFAP, con sistemas de inyección y extracción de aire de nivel 3 de bioseguridad, como parte de las pruebas de aseguramiento de calidad que se realizan a nuestros biológicos.

Las vacunas probadas incluyeron 10 lotes diferentes de cada vacuna emulsionada comercial y 10 lotes de vacunas activas. Todas las vacunas fueron aplicadas a los 10 días de edad.

En cada ocasión se utilizaron veinte aves SPF por cada grupo para cada una de las 3 cepas de desafío (un total de 21 grupos).

- El primer grupo se mantuvo sin vacuna como grupo control negativo que no fue desafiado.
- El segundo grupo se mantuvo sin vacuna como control positivo que posteriormente fue desafiado.
- El tercer grupo fue con la vacuna Newcastle-Influenza emulsionada de Avimex[®] aplicada a razón de 0.5 mL vía subcutánea (SC).
- El cuarto grupo fue inmunizado con la vacuna Newca-Mex[®] emulsionada de Avimex aplicada a razón de 0.5 mL vía SC.
- El quinto grupo fue inmunizado con la vacuna Newca-Mex Concentrada emulsionada de Avimex aplicada a razón de 0.2 mL vía SC.
- El sexto grupo fue inmunizado con la vacuna Newcastle-Hepatitis emulsionada de Avimex aplicada a razón de 0.5 mL vía SC.
- El séptimo grupo fue inmunizado con la vacuna activa cepa LaSota de Avimex vía ocular a razón de 0.03 mL.

Las cepas de VENC utilizados para desafío fueron la cepa M caracterizada como velogénico neurotrópico (VN), la cepa Chimalhuacán caracterizada como velogénico viscerotrópico (VV), y cepa Querétaro caracterizada como VV. Todos los desafíos fueron realizados 21 días post-vacunación (PV), con 0.2 mL de un inóculo conteniendo $10^{6.0}$

DIEP₅₀/mL vía intramuscular (IM). Las aves fueron observadas durante 14 días y al término de la prueba las sobrevivientes fueron sacrificadas humanitariamente e incineradas.

RESULTADOS

Los resultados obtenidos en los 10 lotes de vacunas probados para cada vacuna fueron similares para cada cepa de desafío.

Los resultados indican que las aves del primer grupo no vacunado y no desafiado (control negativo) permanecieron vivas hasta el término de prueba y sin signología clínica.

Los resultados de las aves en el segundo grupo no vacunado pero desafiado (control positivo), indican que con la cepa M se registró una mortalidad del 100% con un tiempo letal medio (TLM) estimado en 4.3 días; con la cepa Chimalhuacán se presentó una mortalidad del 100% con TLM estimado en 6.2 días, mientras que con la cepa Querétaro la mortalidad fue del 90% de las aves con TLM estimado en 7.3 días. Todas las aves mostraron signología clínica que fue de ligera a muy severa.

Los resultados de las aves en los grupos inmunizados con los 10 lotes de vacunas emulsionadas y con 10 lotes de vacuna activa cepa LaSota permanecieron vivas y sin signología clínica durante todo el periodo de observación post-desafío (PD).

DISCUSIÓN

Los resultados de TLM obtenidos en este estudio son similares a los reportados por otros investigadores mexicanos, quienes han encontrado diferencias en el TLM de las diferentes cepas utilizadas para el desafío. Los resultados de protección al desafío son similares a los reportados por investigadores de diversas partes del mundo, en donde las vacunas convencionales contra el VENC protegen adecuadamente contra el desafío contra diferentes cepas velogénicas de VENC.

CONCLUSIÓN

Con los resultados obtenidos de 10 lotes se concluye que las vacunas inactivadas emulsionadas y las activas cepa Lasota probadas durante un periodo de 12 meses, resultaron con 100% de protección al desafío con tres diferentes cepas de VENC velogénicos.

REFERENCIAS

1. Alexander, D.J. Newcastle disease and other avian paramixoviruses. Rev. Sci. Tech. Off. Int. Epiz., 19 (2): 443-462. 2000.

2. Alexander, DJ. Newcastle disease, other avian paramixoviruses, and Pneumovirus infections. In "Diseases of poultry", 11th ed. Edited by YM Saif. Iowa State Press, 63-87. 2003.

3. Enfermedad de Newcastle. En "Manual de las pruebas de diagnóstico y de las vacunas para los

animales terrestres (mamíferos, aves y abejas). OIE, Organización Mundial de la Salud, Quinta edición, Vol I: 293-306. 2004.

® Marca Registrada de Laboratorio AVI-MEX SA de CV.

EFFECTO DEL USO DE UNA VACUNA RECOMBINANTE HVT/ND+SB-1 EN AVES COMERCIALES EN EL REAISLAMIENTO DE LA CEPA CHIMALHUACÁN DE LA ENFERMEDAD DE NEWCASTLE

THE EFFECT OF USING A HVT/ND+SB-1 RECOMBINANT VACCINE ON THE REISOLATION OF NEWCASTLE DISEASE VIRUS CHIMALHUACAN STRAIN

J. Francisco Ríos Cambre^A, Ruud Hein^B, Verónica Domínguez^A, y Alberto Aguilera^A

^AIntervet México, SA. De CV. part of Schering Plough Corp. Paseo de los frailes 22, Santiago Tianguistenco, Edo, Mex. MÉXICO

^BIntervet, Inc. part of Schering Plough Corp. 29160 Intervet Lane P.O.Box 318 Millsboro De 19966 USA

SUMMARY

A recombinant Marek's Disease (MD) Herpesvirus of Turkey (HVT) expressing the fusion (F) protein of Newcastle Disease (ND) virus was developed. Three groups of broilers with high levels of ND maternal antibodies were used. One group was immunized using a standard program with two live virus vaccine doses, plus one dose of a killed oil-based vaccine. Another group received the recombinant vaccine plus two live virus vaccine doses. One additional group remained unvaccinated as a control. All groups were challenged with Chimalhuacan strain NDV intramuscularly at 30 days of age. Reisolating the challenge strain was attempted, and affected tissues were analyzed histopathologically. Similarly, all birds were observed for the presence of ND clinical signs.

RESUMEN

Se desarrolló una vacuna recombinante con el Herpesvirus de Pavo de la enfermedad de Marek, que expresa la proteína de fusión (F) del virus de la enfermedad de Newcastle. Se formaron tres grupos de pollos de engorda con anticuerpos maternos elevados contra la ENC; el primero fue inmunizado con un calendario estándar con dos dosis de vacuna a virus vivo y una dosis de vacuna inactivada oleosa, otro con vacuna recombinante y dos dosis de vacuna a virus vivo, dejando un tercer grupo sin vacuna. Todos los grupos fueron desafiados con la cepa Chimalhuacán por vía intramuscular a los 30 días de edad. Se intentó el reisolamiento de la cepa de desafío, incluyendo análisis histopatológico de los tejidos afectados. Asimismo todas las aves fueron puestas en observación para monitorear la presencia de signos clínicos atribuibles a la enfermedad de Newcastle.

COMPARATIVE EFFICACY OF SEVERAL VACCINATION PROGRAMS INCLUDING OR NOT INCLUDING RECOMBINANT HVT-ND VACCINE AGAINST CHALLENGE WITH MEXICAN CHIMAHUACAN NDV STRAIN

EFICACIA COMPARATIVA DE VARIOS PROGRAMAS DE VACUNACIÓN, INCLUYENDO O NO A LA VACUNA RECOMBINANTE HVT-ND CONTRA EL DESAFÍO CON LA CEPA MEXICANA CHIMALHUACÁN DEL VIRUS DE LA ENFERMEDAD DE NEWCASTLE

V. Palya^A, Z. Penzes^A, T. Horvath^A, V. Kardi^A, K. Dorsey Moore^B, and Y. Gardin^C

^A Ceva Phylaxia, Budapest, Hungary

^B Biomune Co., Lenexa, KS, USA

^C Ceva Santé Animale, Libourne, France

RESUMEN

Se utilizaron pollos de engorda que se distribuyeron en varios grupos colocados en asilamiento y que recibieron las siguientes vacunas y programas contra la enfermedad de Newcastle: una vacuna recombinante HVT-ND mediante inyección *in ovo*, una vacuna activa atenuada del tipo enterotrópico mediante instilación ocular al día de edad, una combinación de las dos citadas, una vacuna activa atenuada traqueotrópica, mediante instilación ocular al día de edad con o sin revacunación con la misma cepa vacunal, por gota ocular a los 14 días de edad. Se supervisó y registró la respuesta de anticuerpos de todos los grupos usando la prueba de HI además de un *kit* comercial de *ELISA* y se desafiaron a las 3, 4, 5 y 6 semanas de edad mediante gota en el ojo con la cepa virulenta Mexicana "Chimalhuacán" del virus de la enfermedad de Newcastle. También se tomaron muestras de bazo de los grupos inmunizados con la vacuna HVT-ND y se analizaron utilizando pruebas de reacción en cadena con polimerasa (PCR) específicas para el virus herpes del pavo (HVT) con el fin de investigar la presencia de los virus vacunales en las muestras. Los resultados demostraron el interés de una combinación de la vacuna recombinante HVT-ND y vacunas enterotrópicas activas atenuadas para asegurar la protección elevada y duradera.

INTRODUCTION

Vaccination is the primary and most effective strategy in the prevention of epidemics in the poultry industry. Universal vaccination of commercial poultry that can be delivered into the egg would therefore be a major front in the war against NDV. *In ovo* vaccination of 18-day-old embryos has become the usual means of

vaccinating against Marek's disease (MD). Among the MD vaccine viruses, herpesvirus of turkeys (HVT) has been used world wide both as live vaccine and polyvalent vaccine vector expressing foreign antigens.

The continuous outbreaks of fatal Newcastle disease (ND) in commercial poultry flocks in many part of the world demonstrate that current vaccination strategies are not fully efficacious.

To improve this situation new generation of vaccines using recombinant technology have been developed, among which recombinant HVT (rHVT) is considered as the most potent vector for expressing foreign antigens related to vaccine-induced immunity against poultry diseases. The aim of our study was to evaluate and compare the efficacy and immunogenicity of an rHVT-ND vaccine (Vectormune HVT-NDV) and an enterotropic type live apathogenic ND vaccine (CEVAC Vitapest L) alone and in combination against NDV challenge in commercial broilers with maternal antibody to NDV.

MATERIALS AND METHODS

Embryonated eggs of commercial broiler chickens with maternal antibodies to NDV were assigned to two groups at 18 days of embryonation (D0). One group was vaccinated with 3000 pfu/dose in 0.1 mL of rHVT-ND vaccine *in ovo* with manual injection; the other group was not treated. On the day of hatching (D3) the chicks were transported to isolated animal houses and both groups were divided into further two groups: groups 1 and 2 were derived from the *in ovo* vaccinated animals, while groups 3 and 4 originated from the non-treated chicks. After group identification, chicks in groups 2 and 3 were vaccinated with one commercial dose of live ND vaccine

(CEVAC Vitapest L) by eye drop and intranasal method (15-15 µL into each eye and another 15-15 µL into each side of the nostrils). Chicks in group 4 served as non-vaccinated controls. Blood samples were taken at hatch and at 2, 3, 4, 5 and 6 weeks of age (D17, D24, D31, D38 and D45) from each group. 10-10 birds from each group were challenged with the velogenic Mexican Chimalhuacan NDV strain at 3, 4, 5 and 6 weeks of age (D24, D31, D38 and D45). Challenge was performed with a dose of 5.0 log₁₀ ELD₅₀ by the mucosal route (eye drop/intra nasal and palatal method) which caused 100% mortality in SPF chickens by five days post-challenge. Chickens were observed for the presence of clinical signs, with special attention to ND-consistent symptoms, for 14 days post-challenge. The cause of any deaths was investigated using appropriate pathological and virological methods. Level of clinical protection was calculated as the percentage of animals showing no signs of clinical disease attributable to ND.

Presence of rHVT-ND virus was verified by PCR specific for serotype 3 herpesviruses from spleen samples collected at 3 and 6 weeks of age (D24 and D50) from groups 1 and 2 (1).

Both vaccines diluted to dose were back-titrated after vaccination: rHVT-ND was titrated in primary chicken embryo fibroblast cell culture with black-plaque assay (3); and the live ND vaccine was titrated in embryonated SPF eggs using standard methods (2).

The NDV antibody levels of serum samples were determined by HI test against 8 HA units of NDV HB1 strain derived antigen with standard method (2) and by BioChek ELISA. Limit of sero-positivity was defined as 1:8 HI titer. ELISA results were evaluated according to the instructions of the manufacturer (negative: maximum 1:827, negative/positive: 1:828-1:1159, positive: above 1:1159 ELISA titer).

RESULTS

Maternal antibodies. Level of maternally derived antibodies to NDV was low at hatch (1:41 HI titer and 1:2022 ELISA titer).

Back-titration of vaccines. Titer of rHVT-ND vaccine was moderately less (~2000 pfu) than the planned dose (3000 pfu/egg). In case of live ND vaccine, the chicks received the planned dose (5.7 log₁₀ EID₅₀/chick).

Verification of rHVT/ND in the vaccinated groups. rHVT was detected in the rHVT-ND vaccinated groups (group 1, 2) at both 3 and 6 weeks of age. No rHVT was detected in the control group (group 4).

Immune response to vaccination. Results are shown in Figure 1. By HI, only the chicks in group 2 and 3, which received the live ND vaccine alone or in combination with rHVT-ND, elicited measurable

immune response to NDV (average HI titer of 1:8 or higher). The HI titers of chicks vaccinated with the rHVT-ND alone were very similar to the non-vaccinated controls (group 4). The BioChek ELISA titers were negative (according to the positive threshold given by the manufacturer) except in the groups that received the live ND vaccine as well. In these groups, positive limit was reached by 5 to 6 weeks of age. There was no meaningful difference between the titers of the rHVT-ND + live ND, and the live ND alone vaccinated groups. Titers of the rHVT-ND group also increased by 5-6 weeks of age, and nearly reached the positive limit.

Clinical protection. Results are summarized in Table 1. One hundred percent of the control broiler chickens died within six days after each challenge date.

Continuous improvement of the protection was observed in the rHVT-ND vaccinated group (from 20% at three weeks to 80% at 6 weeks of age), however, protection during the tested period never reached 100%. To the contrary, 100% protection was obtained at each challenge date in the group vaccinated with rHVT-ND + live ND, while in the group vaccinated with live ND alone 100% protection was obtained at 3, 4, and 5 weeks of age, after which the protection moderately declined.

DISCUSSION

The rHVT-ND (Vectormune HVT-NDV) + live ND (CEVAC Vitapest L) combined vaccination regimen was superior to any vaccination regimens tested in this trial as it provided full protection against the mucosal challenge with the Chimalhuacan NDV strain performed at weekly intervals between three and six weeks of age. Live ND vaccine applied alone induced similar level of clinical protection, but the duration of immunity was shorter since a decline of clinical protection was observed by six weeks of age. rHVT-ND administered alone without the combination with live ND vaccine provided significantly lower but consistent and continuously improving level of clinical protection (20-80%).

Immune response to NDV that could be measured by HI and ELISA was detected only in the chicks which received live ND vaccine alone or in combination with rHVT-ND, however the duration of humoral immunity was shorter (decline of antibody level by six weeks of age) in the chicks which received only the live ND vaccine. This finding corresponds well with the clinical protection results. The key findings of the present study is that the combination of rHVT-ND and conventional live ND vaccine in an *in ovo*/day old vaccination regime provides an early and lasting full clinical protection against severe challenge with velogenic NDV.

REFERENCES

1. Handberg, K.J., O.L. Nielsen, and P.H. Jørgensen. The use of serotype 1- and serotype 3-specific polymerase chain reaction for the detection of Marek's disease virus in chickens Avian Pathol. 30:243-249. 2001.

2. Newcastle disease. In: OIE Manual of Diagnostic Tests and Vaccines for Terrestrial Animals, 5th ed. pp 270-282. 2004.

3. Silva, R.F., J.G. Calvert, and L.F. Lee. A simple immunoperoxidase plaque assay to detect and quantitate Marek's disease virus plaques Avian Dis. 41:528-34. 1997.

Figure 1. Level of maternal antibodies and immune response measured at 2 - 6 weeks of age by haemagglutination-inhibition method (left) or BioCheck ELISA kit (right). Limits of ELISA negativity and positivity given by the manufacturer's instruction are shown.

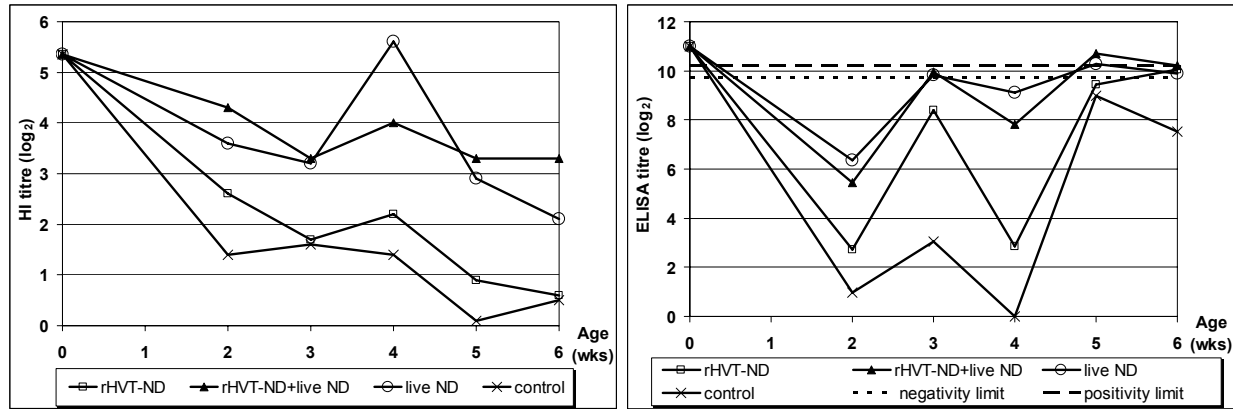


Table 1. Summary of clinical protection achieved by different vaccination regimes against mucosal challenge with NDV Chimalhuacan strain and pre-challenge sero-positivity of challenged chickens.

| Group No. | Vaccination ^A | Clinical protection ^B (sero-positivity ^C) | | | |
|-----------|--------------------------|---|-------------------|-------------------|-------------------|
| | | at 3 weeks of age | at 4 weeks of age | at 5 weeks of age | at 6 weeks of age |
| 1 | rHVT-ND | 20% (0%) | 60% (33%) | 50% (0%) | 80% (70%) |
| 2 | rHVT-ND+ live ND | 100% (80%) | 100% (90%) | 100% (60%) | 100% (80%) |
| 3 | live ND | 100% (70%) | 100% (90%) | 100% (40%) | 80% (30%) |
| 4 | - | 0% (0%) | 0% (0%) | 0% (0%) | 0% (0%) |

^A rHVT-ND was applied *in ovo*, live ND vaccine was administered by eye drop method at day-old.

^B Percentage of animals showing no clinical signs of ND.

^C Percentage of chickens with HI titer reaching at least 1:8.

REVIEW OF FACTORS THAT INFLUENCE SURVIVAL OF AVIAN INFLUENZA VIRUSES AND NEWCASTLE DISEASE VIRUSES IN THE ENVIRONMENT AND DURING COMPOSTING

REVISIÓN DE LOS FACTORES QUE AFECTAN LA SUPERVIVENCIA DE LOS VIRUS DE LA INFLUENZA AVIAR Y DE LA ENFERMEDAD DE NEWCASTLE EN EL MEDIO AMBIENTE Y DURANTE LA ELABORACIÓN DE COMPOSTA

J. L. Spencer, Jiewen Guan, and B.W. Brooks

Canadian Food Inspection Agency, Ottawa Laboratory (Fallowfield), 3851 Fallowfield Road, P.O. Box 11300, Station H, Ottawa, Ontario, Canada, K2H 8P9

RESUMEN

Los virus de la influenza aviar y de la enfermedad de Newcastle tienen envolturas lipídicas y esto afecta su resistencia a los factores químicos y físicos como humedad, temperatura, pH, luz y aereación. En esta presentación consideraremos los factores que influyen la supervivencia de estos virus en el agua bajo condiciones naturales, así como en los cadáveres y otros desechos de las construcciones avícolas después de un brote. Haremos énfasis en el papel que puede tener la actividad microbiana sobre la supervivencia de los virus en el medio ambiente y durante el proceso de fabricación de composta. Asimismo, presentaremos un informe de los estudios realizados sobre la aplicación de la tecnología de la reacción en cadena con polimerasa (PCR) de tiempo real y con los procedimientos convencionales de inoculación de embriones para medir la supervivencia de estos virus en ambas situaciones.

SUMMARY

This review emphasizes factors that influence survival of avian influenza viruses (AIVs) and Newcastle disease viruses (NDVs) in the environment that could be considered when developing practical measures to control and prevent the spread of these diseases. It is known that dry conditions and heat are deleterious to the viruses, whereas moisture combined with cool conditions favour virus survival (9). The influence that microbial activity can play in the killing of viruses is often overlooked and is considered herein as it relates to survival of viruses in water, liquid manure and compost. Another purpose of this review is to point out the potential usefulness of PCR technology for studying the degradation of AIV and NDV during the composting process and for investigating the spread of these viruses in poultry buildings and the external environment (3,4).

Several studies have shown that AIVs survive longer in sterile water than in water and other liquids containing microbes. For example, Stallknecht *et al.* (8) predicted that AIVs could survive in sterile glass-filtered distilled water for 207 days at 17°C and for 102 days at 28°C. These findings are very different from those of Webster *et al.* (10) who reported that an AIV from ducks retained infectivity for only four days at 22°C in non-chlorinated river water. Boyd and Hanson (1) suggested that aeration adversely influenced survival of NDV in water. Based on these observations and the following related to liquid manure, it seems possible that aeration and microbial activity might be important factors in the rapid disappearance of influenza A virus from lake waters that occurs soon after the departure of wild ducks (5).

Under cool winter conditions, AIV was found to survive for at least 105 days in liquid manure (9) and there is a need for practical information on how to eliminate viruses from these wastes. A number of studies show the importance of temperature and oxygen tension on survival of viruses in liquid manure. Derbyshire and Brown (2) reported on survival of a porcine enterovirus in liquid manure during incubation at room temperature and showed that the virus was killed more quickly in preparations that were aerated than in those that were not aerated. Further evidence that microbial activity contributed to the killing process was the observation that virus survival was similar in aerated distilled water, aerated liquid manure that was autoclaved and in the same materials that were not aerated. Lund (6) likewise showed that enteric viruses were killed more quickly in liquid manure under aerobic than under anaerobic conditions. Furthermore, the study showed that this killing occurred more quickly at 20°C than at 5°C.

Composting is an aerobic process and has been shown to be effective in killing AIV and other avian viruses (7). Recent studies by Guan *et al.* (3,4) showed that AIV and NDV were killed soon after temperatures

in compost reached 40°C. Based on virus isolation in embryonated chicken eggs and real time reverse transcriptase PCR (rtRT-PCR) they showed that during composting, the RNA of the viruses was degraded to non-detectable levels soon after the viruses were killed. However, outside of compost the RNA of viruses persisted for a longer period after the viruses had been inactivated. Those results suggested that rtRT-PCR might be used in conjunction with virus isolation to study survival and spread of AIV and NDV in the environment.

REFERENCES

1. Boyd, R.J. and R.P. Hanson. Survival of Newcastle disease virus in nature. *Avian Diseases* 2: 82-93. 1958.
2. Derbyshire, J.B. and E.G. Brown. The inactivation of viruses in cattle and pig slurry by aeration or treatment with calcium hydroxide. *J. Hyg. Camb.* 82: 293-299. 1979.
3. Guan, Jiewen, B.W. Brooks, Maria Chan, C. Grenier, D.C. Wilkie, and J.L. Spencer. Survival of avian influenza virus and Newcastle disease virus during composting based on virus isolation and Real Time RT-PCR methods. In: *Proceedings of the 15th Congress of the World Veterinary Poultry Association*. Pp. 336. Beijing, China. September 12-15. 2007.
4. Guan, Jiewen, Maria Chan, B-L. Ma, C. Grenier, D. Wilkie, J. Pasick, B. Brooks, and L. Spencer. Development of methods for detection and quantification of avian influenza and Newcastle disease viruses in compost by real time RT-PCR and virus isolation. *Poultry Science*, in press. 2008.
5. Hinshaw, V.S. The nature of avian influenza in migratory waterfowl, including interspecies transmission. *Second International Symposium on Avian Influenza*. United States Animal Health Association. Pp. 133-141. 1986.
6. Lund, E. The survival of enteric viruses in aerated and non-aerated cattle and pig slurry. In: *Communicable diseases resulting from storage, handling, transport and landspreading of manures*. Tierärztliche Hochschule, Hanover, West Germany. 4-6 November. Commission of the European Communities, Directorate-General for Agriculture, Coordination of Agricultural Research. Pp. 149-156. 1980.
7. Senne, D.A., B. Panigrahy, and R.L. Morgan. Effect of composting on survival of exotic avian viruses: highly pathogenic avian influenza (HPAI) virus and adenovirus of egg drop syndrome-76. *Avian Diseases* 38: 733-737. 1994.
8. Stallknecht, D.E., S.M. Shane, M.T. Kearney, and P.J. Swank. Persistence of avian influenza viruses in water. *Avian Diseases*: 34: 406-411. 1990.
9. Swayne, D.E. and D.A. Halvorson. Influenza. In: *Diseases of Poultry*. 11th ed. Y.M. Saif, H.J. Barnes, J.R. Glisson, A.M. Fadly, L.R. McDougald, D.E. Swayne, eds. Iowa State University Press, Ames. Pp. 135-160. 2003.
10. Webster, R.G., M. Yakhno, V.S. Hinshaw, W.J. Bean, and K. Gopal Murti. Intestinal influenza: Replication and characterization of influenza viruses in ducks. *Virology* 84: 268-278. 1978.

SINERGIA DEL VIRUS DE LA ENFERMEDAD DE NEWCASTLE LENTOGÉNICO CON EL VIRUS DE INFLUENZA AVIAR DE ALTA PATOGENICIDAD

SYNERGY BETWEEN LENTOGENIC NEWCASTLE DISEASE AND HIGH PATHOGENICITY AVIAN INFLUENZA VIRUSES

Manuel Gay, David Sarfati, Ernesto Soto, y Bernardo Lozano

Laboratorio AVI-MEX SA de CV. México, www.avimex.com.mx

SUMMARY

Both commercial broilers and specific-pathogen-free (SPF) birds were challenged with a H5N2 high pathogenicity avian influenza virus (HPAIV, or VIAAP in Spanish) isolated in Mexico in 1994. Additionally, one SPF group and one commercial broiler group were vaccinated with a live LaSota strain

Newcastle disease vaccine by eye drop at 10 days of age. Twenty five birds of each group were challenged at different ages. One hundred percent (100 %) mortality was observed in the SPF non-vaccinated and the vaccinated groups within 5 days post-challenge (PC). The non-vaccinated commercial birds died between days 5 and 9 PC at different mortality rates,

typically between 50 and 60%. Live Newcastle disease-vaccinated commercial birds died in excess of 85% in all cases. Conclusion: Newcastle disease vaccine virus induced higher mortality in commercial birds challenged with the HPAIV.

INTRODUCCIÓN

La infección viral de una parvada con dos o más virus existente a nivel de campo ha sido reportada en numerosas ocasiones. Es así que en nuestro laboratorio ha sido posible aislar virus de la bronquitis infecciosa (VBI) a parir de muestras de las que se aísla virus de la enfermedad de Newcastle (VENC), inhibiendo a este virus con anticuerpos específicos ó monoclonales contra ENC de la muestra original e inoculando nuevamente embriones de pollo susceptibles. También se ha detectado el aislamiento de virus de la influenza aviar (VIA) de baja patogenicidad (VIABP) subtipo H5N2 de muestras que inicialmente fueron positivas al VENC.

El objetivo de este trabajo fue comprobar que las aves comerciales cuando son vacunadas con VENC lentogénico y luego desafiadas con un virus de influenza aviar de alta patogenicidad (VIAAP) subtipo H5N2, resultan con índice de morbilidad y mortalidad mayor a la del grupo control positivo no vacunado y desafiado, lo cual ya habíamos observado en estudios de potencia realizados con anterioridad tanto en pollos SPF como en pollos de líneas comerciales.

MATERIALES Y MÉTODOS

Las pruebas fueron realizadas en gabinetes de aislamiento, instalados dentro de unidades de aislamiento del Cenid Microbiología, INIFAP, con sistemas de inyección y extracción de aire de nivel 3 de bioseguridad. Se utilizaron grupos de 25 aves ligeras SPF (grupos A), y grupos de 25 pollos de engorda comerciales con anticuerpos maternos hacia el VENC y VIA (grupos B). Ambos grupos nacieron el mismo día y fueron manejados de la misma manera.

Para cada tipo de aves, un primer grupo fue vacunado a los 10 días de edad con una vacuna contra el VENC cepa LaSota (lo que es una práctica común en el campo), por vía ocular con 0.03 ml conteniendo un título de 106.6 DIEP50/ ave, y desafiado 21 días después con VIAAP subtipo H5N2 cepa CPA de 1994, con 107.6 DIEP50/ave en 0.3 ml, vías ocular y narina. Un segundo grupo control positivo fue dejado sin

vacuna pero fue desafiado al mismo tiempo con VIAAP. Un tercer grupo no fue vacunado ni desafiado, siendo un control negativo.

Las aves fueron observadas por un periodo de 14 días post-desafío (PD). Al término del estudio, las aves sobrevivientes fueron sacrificadas humanitariamente e incineradas.

RESULTADOS

Los resultados de las pruebas de desafío con VIAAP realizadas en aves SPF, indican 90% de mortalidad para las aves del grupo que no recibieron cepa LaSota (Grupo A1), mientras que para el grupo vacunado contra la enfermedad de Newcastle con cepa LaSota (Grupo A2) la mortalidad fue del 100%. El grupo control negativo (Grupo A3) no presentó mortalidad ni signología clínica durante el periodo de observación.

Los resultados al desafío con VIAAP realizadas en pollos de engorda comerciales, indican que las aves del grupo sin vacuna (grupo B1) presentaron una mortalidad del 60%, comparativamente a las aves vacunadas con virus activo de la enfermedad de Newcastle cepa LaSota (Grupo B2) que resultaron con mortalidad del 80%. El grupo control negativo (Grupo B3) no presentó mortalidad ni signología clínica durante el periodo de observación.

DISCUSIÓN

El trabajo realizado arrojó resultados similares a los que ya habíamos observado en pruebas anteriores (información no publicada), en los que grupos de aves SPF o comerciales de engorda vacunadas con virus activo LaSota a 10 días de edad, resultan con una mayor mortalidad al desafío con VIAAP que el grupo control positivo no vacunado y desafiado.

El estudio sugiere que la vacuna LaSota ejerce algún efecto, haciendo que las aves inmunizadas muestren una mayor sensibilidad al VIAAP de desafío.

CONCLUSIÓN

Se concluye que el virus vacunal de la enfermedad de Newcastle cepa LaSota aplicado 21 días antes del desafío con VIAAP induce mayor susceptibilidad al desafío en aves SPF y comerciales de engorda.

GROWING CHICKENS “IN AN OVEN”: KEY MANAGEMENT PRACTICES FOR A HOT/DRY CLIMATE

CÓMO PRODUCIR POLLOS "EN UN HORNO": IMPORTANTES PRÁCTICAS DE MANEJO PARA EL CLIMA CÁLIDO Y SECO

Mark A. Dekich

RESUMEN

El modelo para la industria avícola mundial de hoy se desarrolló en el Sureste de Estados Unidos, con el apoyo a la investigación de instituciones que reciben fondos del programa denominado Southern Land Grant, como las Universidades de Georgia, Auburn, la MSU, la Universidad estatal de Carolina del Norte, la Universidad de Arkansas, etc. En este clima cálido y húmedo del sureste estadounidense se inventaron las casetas, los equipos y las prácticas de manejo que luego se adoptaron en el mundo entero, desde los bebederos de niple hasta la ventilación de túnel. El *Gallus domesticus* es derivado del *Gallus bankiva* (o "gallus"), la Gallina Roja de la Selva, del sur de China e India, alrededor de 3,000 años AC. Las raíces fisiológicas del pollo vienen de un ambiente cálido y húmedo.

DISCUSSION

The model for today's poultry industry was developed in the SE United States with supporting developmental research by Southern land grant institutions such as UGA, Auburn, MSU, NCSU, U. of Ark., etc. From this warm, humid climate of the southern US came the housing, equipment, and management practices that have been adopted around the world. From nipple waters to the tunnel ventilation, all were developed in the South of the US.

Gallus domesticus was derived from *Gallus bankiva* (or *gallus*), the Red Jungle Fowl in southern China and India around 3,000 BC. The chicken's physiologic roots are from a warm, humid climate. In the world, many countries with varied environments want their own poultry production internally for many different reasons. Hot/dry climates (desert type terrain) present a unique opportunity to grow and achieve modern day production standards for performance and cost.

There are only four to five choices in genetic stock to choose from and all have similar requirements for maximizing genetic weight gain/feed conversion. Least/best cost production is a common theme for poultry production around the world for a poultry company to stay in business and generate a profit. In

some geographic arenas, government subsidy (i.e. Europe/Middle East) is used to assure good results for the private companies. In the US poultry industry accounting tools such as Agri-Stats is used to measure compatibility, other geographic areas of the world face greater hurdles (i.e. disease, harsh climate, poor infrastructure, irrational government regulation, etc.) for measuring bonafide success and profitability from production cost verses selling price even when subsidized.

Chickens are homoeothermic and produce heat to maintain a relatively constant body temperature. A five pound chicken will produce over 50 BTUs of heat per hour which means it must get rid of over 50 BTUs per hour to maintain constant body temperature. This means that 20,000 five pound chickens in a broiler house produce one million BTUs per hour. Maintaining a constant body temperature is not a problem when air temperature is at least 10-15 degrees less than body temperature. A chicken's body temperature is 106-108°F (41-42°C) and will fluctuate depending on the temperature of its environment.

Increased environmental heat is a problem with poultry production. Chickens can perform reasonably well in high, but constant 100°F (38°C) temperatures. This is not the case in hot/dry climates as the normal day time-night time temperature fluctuations occur and this is much more stressful. When temperature fluctuations occur, chickens need to use more energy to maintain their body temperature. During periods of heat stress the chicken has to make thermo-regulatory adaptations to prevent death from heat exhaustion. The full genetic potential is not achieved.

Body heat is dissipated to the surrounding environment through radiation, conduction, convection, and evaporation. The first three are known as sensible heat loss. These methods are effective when the environmental temperature is below or within the thermal neutral zone of 55-75°F (14-23°C). The chicken loses heat from surfaces such as wattles, shanks, and unfeathered areas under the wings. To maintain body temperature by sensible heat loss, the chicken does not have to alter its normal behavioral patterns, feed intake, or metabolism. When the temperature reaches 77°F (24°C), the method of heat

loss starts changing to evaporative. Body heat loss by the evaporative method requires the bird to use energy by panting. Panting will normally be expected when the ambient temperature is near or above 90°F (30°C). In normal chickens, panting will remove about 540 calories per gram of water lost by the lungs. Normally, blood pH is controlled by the lungs and kidneys along with other buffer systems, which prevent rapid changes in the pH. As the respiratory rate increases in heat stressed chickens, there is a corresponding decrease in the levels of carbon dioxide. Respiratory alkalosis is the result. Heat stress, also, depletes potassium and other minerals in the body, altering the electrolyte balance.

Hot/dry climates are defined as desert type environs as in the Middle East, northern Africa, Mexico, parts of South America (Peru/Chile) and California. Day time temperatures can soar well over 100°F (35°C) and night time temperatures plummet 50-60°F (25-30°C). Relative humidity can be as low as 30% down to 10%.

Factors to consider are for the hatchery, vaccination, nutrition, water, management, and housing requirements.

For the hatchery, set times should be scheduled for night time chick processing. This allows dawn delivery before the heat onset of the day. Chicks should be started on water as soon as possible to avert dehydration. In many of these locals, chicks are given a Marek's disease vaccination and then held 3 hours for a killed Newcastle sub-q injection. Both injections are at the same site. In this situation, *in ovo* vaccination may be warranted so chicks can be immediately vaccinated for Newcastle, live and killed, and shipped to the farm.

On the farm, vaccination reactions can be harsh as to low humidity and aggressive vaccines resulting in mortality peaking at 7-12 days with the peak of the vaccine reaction for respiratory vaccines. To lessen this, humidity should be introduced during the day by misting in the foggers or adding water to bare concrete floors in the house while chicks are in the brooding pens. Expectorant products such as Mentofen or iodine may be added to the water also.

Stocking density should be considered. Reducing the stocking density reduces the number of birds producing heat. Future hot weather, by season, can be anticipated and placement numbers should be planned, taking into account outside temperature, humidity, housing type, and ventilation system. Closed housing should not exceed 7 pounds/square feet (34 kg/m²) and in hot weather drop to 5.5-6 pounds/square foot (26.8-29.3 kg/m²). Open houses should stock 5.2 pounds/square foot (25.4 kg/m²) and in hot weather, 4.2 pounds/square foot (20.5 kg/m²) or less depending on market bird size.

Nutrition formulation is generally corn/soy vegetable diets with appropriate macro and micro ingredients. Increasing nutrient intake during heat stress, by changing formulation, may have a negative affect on livability, but increasing the digestibility of the nutrients and specs for micro ingredients can help. For proteins and amino acids it is thought that nutrient digestibility should be increased rather than nutrient density. Vitamins to increase for heat stress are vitamins E, D, A, C, B2, and nicotinic acid. Micro ingredients should remain in withdrawal diets. Feed restriction is a way of life in very hot climates. Longer times to market are anticipated. Hey, what is time to a chicken? As temperature rises, the chicken has to maintain the balance between heat production and heat loss, and will reduce feed intake. Feed intake is reduced 5% for every 2°F (1°C) rise over 95°F (32°C). Feed consumption is encouraged in the cooler parts of the day. It takes 2-4 hours after the feeding for maximum energy is generated and then dissipated. The feed can be restricted 4-6 hours before unusual heat is anticipated. Feed restriction not only can be used to manage heat loss but also for controlling mortality from disease. Fasting is a good tool and has a calming effect on the flock. To manage such feeding programs chicks must be trained to the automatic feeders from the start of a flock. This is accomplished by setting up control pans to be used heavily thus constantly turning on the feeder and associate the birds with feeder running, it is time to eat a meal. Early growth must be achieved as later growth may be delayed due to heat.

Water and water management are crucial in hot/dry climates. Water is most often, in these areas, a restricted and an expensive commodity. In some areas water is as expensive as the feed. Purchased water must have as high specifications as possible. TDS (total dissolved solids) is a basic value to watch. Start chicks on low TDS water. The WHO rates water over 500 ppm TDS as sewage. Water labs are not always available and water quality can be from bad to worse. Water must be plentiful as to flow for drinking, a 500 foot (153 m) house will need, as a minimum, 2 gallons (7.6 L) per minute. If it has an evaporative cooling system, this can go up to 8-10 gallons (30-38 L) per minute flow. Heat stress causes increased loss of several minerals including potassium, sodium, phosphorus, magnesium, and zinc. Electrolyte therapy daily is used to retain some growth rate and hydration. Water should never be restricted. Manufacturer recommendations on chickens per nipple should be set up by at least 10-20% more nipple space. Water consumption increases by 6% for every 2°F (1°C) rise in temperature from 70°F (20°C). Water consumption can easily triple or even quadruple night to day.

Ventilation systems vary in hot/dry climates. With the low humidity, nozzle systems in open house

types perform well. Fan capacity is needed to move the water mist out. Water pressure should be from 100-200 psi (7-14 kg/cm²) for proper droplet size. Power ventilation systems are powerful tools in hot/dry climates. At the lower humidity levels much less cooling pad is needed. Cooling pad specs say for Georgia can cause tremendous temperature drops in the same systems in a hot/dry climate setting up health issues in the houses. Specs should be altered to not cause wide temperature swings internally in the house.

Housing standards vary widely also. Insulation in the ceilings should be R-value 18 or more. Painting roofs white and providing overlaps for curtain houses to prevent the afternoon sun on the interior shining in is beneficial. Surrounding grounds of housing areas tend to be barren adding to heat build up problems.

Biosecurity systems for hot/dry climates are crucial as these areas tend to have severe endemic diseases. Studies on influenza virus show transmission is best at low humidity. The virus is best transmitted at 20% humidity and not transmitted at 80% humidity from guinea pig lab studies. Where it is hot/dry by day at night it is cold/dry. Barriers for entry to farms are a must. Multiple showers systems are to discourage casual farm entry. Sequestering labor on the farms is a must for the life of the flock. Dry breezes can move Newcastle and influenza virus with dust storms that seasonally occur.

Chicken production can be achieved in hot/dry climates. Expectations, from a performance stand point, must be modified. Livability and production of a healthy product becomes the objective. With proper management and breed selection, calories per pound of meat can be acceptable in a hot/dry climate.

REFERENCES

1. Anderson, K. E. Hot Weather Management of Poultry. North Carolina Cooperative Extension Service.
2. Berry, J.G. Hot Weather Management in the Poultry House. Oklahoma Cooperative Extension Service.
3. Butcher, G.D. Heat Stress Management in Broilers. University of Florida.
4. Cockshott, I. Hot Weather Broiler and Breeder Management. Aviagen.
5. Curtis, L. Key Water Factors for Broiler Production. Auburn University.
6. Kolata, G. Study Shows Why the Flu Likes Winter. The New York Times, December 5, 2007.
7. Mauldin, J.M. Cool Management for Hot Chickens. University of Georgia.
8. Noll, S. Avoiding Heat Stress Mortality in Poultry. University of Minnesota Extension Service.
9. Neospark Corporation. Heat Stress Management in Broilers.

STRUCTURE DEFINES FUNCTION - MANNAN OLIGOSACCHARIDES FOR THE POST-ANTIBIOTIC GROWTH PROMOTER ERA

LA ESTRUCTURA DEFINE LA FUNCIÓN – OLIGOSACÁRIDOS MANANOS PARA LA ERA POSTERIOR A LOS ANTIBIÓTICOS PROMOTORES DEL CRECIMIENTO

C. A. Moran, S. Kwiatkowski, and A. E. Sefton

Alltech Inc., Nicholasville, KY

RESUMEN

Durante mucho tiempo se ha demostrado que los carbohidratos son un componente importante de la dieta, aun cuando tradicionalmente se les ha considerado como moléculas proveedoras de energía y como componentes estructurales. Algunos estudios recientes han demostrado que los carbohidratos indigeribles desempeñan un papel importante en la producción animal y en la salud humana. Más aún, cada vez se reconoce más que este tipo de carbohidratos son más que una fuente de energía para

la microflora del colon, pues tienen un papel vital en el metabolismo celular, la estructura y el funcionamiento de las proteínas, la comunicación intercelular y la inmunidad del huésped. Las propiedades funcionales de los oligosacáridos mananos los hace atractivos para usarlos en las dietas de las aves. Las levaduras contienen glucanos N ligados a una estructura central de Man₁₀₋₁₄GlcNAc₂-Asn, consistentes en 50 a 200 unidades adicionales de manosa con ligaduras α , con una columna vertebral de ligaduras α -1,6 provista o, como dicen los autores "decorada", con cadenas laterales cortas α -1,2 y α -1,3. Estas complejas

estructuras están sumamente influenciadas por los métodos de procesamiento industrial que se utilicen para su producción comercial. Nuestros estudios demuestran que no todos los productos MOS (N. del T.: oligosacáridos mananos) funcionan de manera similar.

SUMMARY

Carbohydrates have long been known to be an important dietary component, although traditionally have been seen as energy yielding molecules and structural components. Recently, studies have demonstrated that non-digestible carbohydrates play an important role in animal production and human health. Moreover, there is a growing recognition that non-digestible carbohydrates are more than an energy source for the colonic microflora but play a vital role in cellular metabolism, protein structure and function, cell-to-cell communication and host immunity. The functional properties of mannanoligosaccharides make them attractive for use in poultry diets.

DISCUSSION

The avian gastrointestinal tract constitutes a complex microbial ecosystem comprised of several hundred different species of bacteria. The hindgut, in particular, is densely populated with in excess of 10^{11} bacteria per gram of contents. These organisms and their metabolic activities are not inert to the avian host and can have positive and negative impacts on health. The balance of this ecosystem is dynamic and may be adversely altered by stress, diet, medication and a host of environmental factors. The maintenance of a community of bacteria that contains a predominance of beneficial species and minimal putrefactive (protein degrading) or potentially pathogenic species is believed to be important for maintaining intestinal health.

A number of dietary supplementation approaches have been proposed with regard to maintaining a eubiotic microbial ecosystem. The first is the oral administration of live, beneficial microbes, also known as probiotics, with the most interest being shown in the lactic acid bacteria and *Bifidobacterium* sp. There are a number of advantages and disadvantages with probiotics, which are beyond the scope of this paper. However, since these aforementioned bacteria are dominant genera present in the hindgut of healthy birds, a second strategy is to increase their numbers by supplying those already present in the intestine with a selective carbon and energy source that provides them with a competitive advantage over other bacteria in the ecosystem. In 1995, Gibson and Roberfroid (1) defined these dietary 'prebiotic' components as *non-digestible food ingredients that beneficially affect the host by*

selectively stimulating the growth and/or activity of one or a limited number of bacteria in the colon that can improve the host health. The third strategy is to supplement specific carbohydrates, which play multiple roles in gut health, such as immunomodulation, an anti-adhesive effect and enhancement of intestinal tissue recovery. The best known and well characterized are composed of polymers of mannose, such as Bio-Mos® (Alltech Inc., Nicholasville, KY).

Proposed mechanisms of prebiotic action to improve avian health. From the definition of Gibson and Roberfroid (1) it can be surmised that any fermentable dietary component that arrives undigested in the colon has the potential to act as a prebiotic. To date, all prebiotics used in animal and poultry feed have been carbohydrates, ranging from small sugar alcohols and disaccharides, to oligosaccharides, and large polysaccharides, all with a variety of sugar compositions and glycosidic linkages. Bifidobacteria are unique in that they use these diverse chemical structures as either an energy or carbon source, as they have an unusual array of glucosidic enzymes not found in the majority of gut bacteria. The exact mechanisms by which such a chemically diverse range of carbohydrates preferentially stimulates one particular genus in a population with many saccharolytic species is unclear. However, the result of providing a selective fermentable carbohydrate to a beneficial microbial population (e.g. *Bifidobacteria* sp.) can have a number of direct and indirect effects on the metabolic activity of the microbial ecosystem including, inhibition of putrefactive and pathogenic organisms; provide colonization resistance; increased production of SCFA and reduce intestinal pH, thereby increasing mineral solubility and improving mineral absorption.

The 'prebiotic' substrates that are currently being investigated as dietary aids in poultry nutrition include the mannanoligosaccharides (MOS) (1,2), fructooligosaccharides (FOS) (4,5), inulin (6) and the newer isomaltoligosaccharides (7). There are many others with potential that need to be considered in the future such as galacto-oligosaccharides, soybean oligosaccharides, xylo-oligosaccharides, palatinose polycondensates, resistant starch, β -oligo-saccharides.

Mannanoligosaccharides. Yeast cell wall mannoproteins are highly glycosylated polypeptides, often 50-95% carbohydrate by weight, that form radially extending fimbriae at the outside of the cell wall (8,9). Many mannoproteins carry N-linked glycans with a core structure of $\text{Man}_{10-14}\text{GlcNAc}_2\text{-Asn}$ structures very similar to mammalian high mannose N-glycan chains. "Outer chains" present on N-glycans consist of 50-200 additional α -linked mannose units, with a long α -1,6-linked backbone decorated with short α -1,2 and α -1,3-linked side chains. These complex

structures determine the cell surface properties (9) which are believed to be the basis of the three primary modes of action of MOS observed in animal and poultry studies; 1) adsorption (agglutination) of pathogenic bacteria containing Type 1 fimbriae; 2) modulation of the host immune response; and 3) enhancement of intestinal morphology (3,10).

The most studied and well understood mode of action of MOS involves the competitive blocking of bacterial lectins. Adhesion of pathogens to the epithelium surface of the gut (colonization) is the first critical stage leading to infection. Mannose-specific lectins (Type 1 fimbriae) on the bacterial surface recognize glycoproteins (rich in mannose) on the host cell surface. The control of bacterial mediated attachment has been proposed as a possible means of reducing enteric infection. Oyoyo and coworkers (11) tested the effect of different sugars on the adherence of *Salmonella typhimurium* to epithelial cells from one-day-old chicks *in vitro* and found that mannose and methyl- α -D-mannoside were the most efficient in inhibiting adherence. They reported that mannose addition decreased the number of adherent bacterial cells to a defined intestinal surface by more than 90% when compared to a control with no carbohydrate added. In three follow-up *in vivo* studies, Oyoyo and coworkers (13) observed a significant protective effect from supplementing mannose (2.5% w/v) in the drinking water of chicks for 10 d; *salmonella*-challenged control chickens were 78, 82 and 93% colonized whereas *salmonella*-challenged mannose treated chickens were only 28, 21 and 43% colonized. In other studies, addition of Bio-Mos at significantly lower dietary inclusion levels (0.4% w/w) to the mannose concentrations (2.5 % w/v) used by Oyoyo and coworkers (11) resulted in the successful reduction of *Salmonella* and *E. coli* in the ceca of young broiler chicks (3). This confirmed earlier *in vitro* studies that indicated differences exist in the ability of different mannose-based sugars to block pathogen attachment (13). Firon and coworkers (13) demonstrated that compounds containing both α -1,3 and α -1,6 branched mannan (as found in the outer cell wall of *S. cerevisiae*) had approximately 37.5 times the binding capacity for *E. coli* as D-mannose. In another interesting study, Fernandez and coworkers (14) demonstrated a reduction in colonization of *Salmonella enterica* serovar enteritidis (PT4) in the ceca of young broiler chicks receiving the cecal contents from hens fed Bio-Mos (2.5% w/w) through the diet. When the chicks diets were supplemented with the same Bio-Mos as given to the hens, an even greater protection was observed, as demonstrated by fewer *salmonella*-positive birds observed, 11/24 (46%) for Bio-Mos treatment compared with those fed mash alone (17/24 (79%). The ability of Bio-Mos to interfere with the

attachment of pathogenic bacteria in the gut raises the possibility that Bio-Mos could also inhibit the binding between bacteria that is required for plasmid transfer via conjugation (15). Lou (16) demonstrated that dietary Bio-Mos supplementation decreased the proportion of specific groups of Gram-negative antibiotic resistant fecal bacteria in swine. Work continues in this area to confirm these earlier findings.

Numerous studies have investigated the effect of Bio-Mos on humoral and cell immunity. While the exact mechanisms have not been completely elaborated, significant evidence has been accumulated to propose Bio-Mos plays a multi-purpose role in immune modulation. Dietary inclusion of Bio-Mos has been shown to affect humoral immunity in turkeys by enhancing plasma IgG and bile IgA antibody levels (17). In another study, with sows receiving Bio-Mos 14 days pre-farrowing and throughout lactation, higher concentrations of colostrum IgG and IgM were observed compared to the untreated sows (18). This increase in colostrum Ig's correlated well with the piglets from supplemented sows being significantly heavier at weaning. Non-specific cellular immunity has also been positively influenced in studies investigating macrophage activity. The stimulation of phagocytosis by Bio-Mos has been demonstrated to be dose dependent *in vitro* (19). This may be due to the presence of a mannose receptor (MR), which is involved in microbe recognition and phagocytosis in the absence of specific opsonization and acts like a true lectin in the lectin phagocytosis of microorganisms (20). MR is expressed on tissue macrophages, dendritic cells (mostly on Langerhans cells), endothelium, and rat microglia. In addition to acting as a scavenger of mannose-containing glycoconjugates on the surface of a wide spectrum of microorganisms such as *E. coli*, *Klebsiella pneumoniae* and *Salmonella*, MR mediates their ingestion by macrophages (21). MR is the main molecule involved in antigen recognition and the binding process in antigen-presenting cells. Therefore, activation of immune cells by yeast-associated mannan may facilitate antigen processing and serve to stimulate the initial stages of the immune response. Recently, there has been some evidence to suggest that Bio-Mos may suppress the pro-inflammatory immune response. Ferket and co-workers (2) induced an acute immune response in turkey poults by intraperitoneal injection of LPS from *Salmonella typhimurium* and measured fever response. Poults fed a diet containing Bio-Mos showed little fever response compared with the control (no additive) group, which experienced an increase of +0.4°C in body temperature. Greater control of the immune response, particularly the fever response, can be beneficial to the host in terms of energy savings, maintaining feed intake and reducing stress. Further studies are necessary to understand the highly complex

and diverse effects the yeast cell wall mannanoligosaccharides have on the immune system of the host.

There is increasing evidence that Bio-Mos modifies the morphology and structure of the intestinal mucosa, although whether this is a direct or indirect (pathogen control) effect remains unclear. Early studies at Oregon State University demonstrated a reduction in crypt depth of turkey poult fed diets containing 0.1 % Bio-Mos through eight weeks of age in three sections of the intestine comprising the distal half of the duodenal loop, Meckel's diverticulum, and at the junction of the jejunum and cecum (22). These changes in crypt depth were correlated to a statistically significant increase in growth rate through eight weeks of age, suggesting an inverse correlation between the parameters measured. Santin and co-workers (23) showed that inclusion of yeast cell wall at 0.2% in broiler diets aided in intestinal development with an increase in villus height during the first seven days of life, and could be positively correlated with an improved body weight gain over the entire production period. Another detailed study evaluated the response of the intestinal mucosa of broiler chickens to Bio-Mos included in sorghum/lupin-based diets at 0.0, 1.0, 3.0 or 5.0g kg⁻¹ diet (24). Supplementation with the highest level of Bio-Mos resulted in longer ($P<0.01$) jejunal villi. The RNA content of the ileal mucosal homogenate was significantly greater ($P<0.05$) in chicks receiving 3.0 and 5.0 g Bio-Mos kg⁻¹ diet than in other groups. The protein/RNA and RNA/DNA ratios in ileal homogenates were significantly ($P<0.01$) influenced by the presence of Bio-Mos in the diet. This was not translated into increased mucosal growth or differences in digestive enzyme activities in the ileum. However, with Bio-Mos inclusion in the diet, there were significantly greater specific activities of maltase ($P<0.01$), leucine aminopeptidase ($P<0.05$) and alkaline phosphatase ($P<0.001$) in the jejunum. Improvements in the intestinal mucosa with dietary supplementation of Bio-Mos have been linked to a reduction in morbidity and mortality attributable to necrotic enteritis (25). The bottom line of these observed changes brought about by mannanoligosaccharides, specifically Bio-Mos, is reflected in comparable growth performance and improved livability to that seen with antibiotic growth promoters in both broilers and turkeys (26,27).

REFERENCES

1. Gibson, G.R., and M.B. Roberfroid. Dietary modulation of the human colonic microbiota: Introducing the concept of prebiotics. *J.Nutr.* 125: 1401-1412. 1995.

2. Ferket, P.R., C.W. Parks, and J.L. Grimes. Benefits of dietary antibiotic and mannanoligosaccharide supplementation for poultry. In *Proceedings of Multi-State Poultry Feeding and Nutrition Conference*, Indianapolis, IN. 2002.

3. Spring, P., C. Wenk, K.A. Dawson, and K.E. Newman. The effects of dietary mannanoligosaccharides on cecal parameters and the concentrations of enteric bacteria in the ceca of *salmonella*-challenged broiler chicks. *Poult. Sci.* 79: 205-211. 2000.

4. Fukata, T., K. Sasai, T. Miyamoto, and E. Baba. Inhibitory effects of competitive exclusion and fructooligosaccharide, singly and in combination, on *salmonella* colonization of chicks. *J. Food Protect.* 62: 229-233. 1999.

5. Waldroup, A.L., J.T. Skinner, R.E. Hierholzer, and P.W. Waldroup. An evaluation of fructooligosaccharide in diets for broiler-chickens and effects on *salmonellae* contamination of carcasses. *Poult. Sci.* 72: 643-650. 1993.

6. Flickinger, E.A., J. Van Loo, and G.C. Fahey. Nutritional responses to the presence of inulin and oligofructose in the diets of domesticated animals: A review. *Critical Reviews In Food Science And Nutrition* 43: 19-60. 2003.

7. Thitaram, S.N. *et al.* Isomaltooligosaccharide increases cecal bifidobacterium population in young broiler chickens. *Poult. Sci.* 84: 998-1003. 2005.

8. Kapteyn, J.C., H. Van Den Ende, and F.M. Klis. The contribution of cell wall proteins to the organization of the yeast cell wall. *Biochimica et Biophysica Acta-General Subjects* 1426: 373-383. 1999.

9. Lipke, P.N., and R. Ovalle. Cell wall architecture in yeast: New structure and new challenges. *J. Bacteriol.* 180: 3735-3740. 1998.

10. Shane, S. Mannan oligosaccharides in poultry nutrition: Mechanisms and benefits. In: *Biotechnology in the Feed Industry. Proceedings of Alltech's 17th Symposium*. Nottingham University Press, Nottingham, United Kingdom. pp 65-77. 2001.

11. Oyofe, B.A., R.E. Droleskey, J.O. Norman, H.H. Mollenhauer, R.L. Ziprin, D.E. Corrier, and J.R. DeLoach. Inhibition by mannose of *in vitro* colonization of chicken small intestine by *salmonella typhimurium*. *Poult. Sci.* 68: 1351-1356. 1989.

12. Oyofe, B.A., J.R. DeLoach, D.E. Corrier, J.O. Norman, R.L. Ziprin, and H.H. Mollenhauer. Prevention of *Salmonella typhimurium* colonization of broilers with d-mannose. *Poult. Sci.* 68: 1357- 1360. 1989.

13. Firon, N., I. Ofek, and N. Sharon. Carbohydrate specificity of the surface lectins of *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, and

Salmonella typhimurium. Carbohydrate Research 120: 235-249. 1983.

14. Fernandez, F., M. Hinton, and B. Van Gils. Evaluation of the effect of mannan-oligosaccharides on the competitive exclusion of *Salmonella enteritidis* colonization in broiler chicks. Avian Pathol. 29: 575-581. 2000.

15. Newman, M. Antibiotic resistance is a reality: Novel techniques for overcoming antibiotic resistance when using new growth promoters. In: Nutritional Biotechnology in the Food and Feed Industries. Proceedings of Alltech's 18th Symposium. Nottingham University Press, Nottingham, United Kingdom. pp 97-106. 2002.

16. Lou, R. Dietary mannan-oligosaccharides as an approach for altering prevalence of antibiotic resistance and distribution of tetracycline resistance determinants. In: Fecal bacteria from swine. M.S. thesis, University of Kentucky, Lexington, KY. 1995.

17. Savage, T.F., P.F. Cotter, and E.I. Zakrzewska. The effect of feeding mannanoligosaccharide on immunoglobulins, plasma IgG and bile IgA, of Wrolsted mw male turkeys. Poult. Sci. 75: 143. 1996.

18. Newman, K.E., and M.C. Newman. Evaluation of mannan oligosaccharide on the microflora and immunoglobulin status of sows and piglet performance. J. Anim. Sci. 79:189. 2001

19. Sisak, F. Stimulation of phagocytosis as assessed by luminol-enhanced chemiluminescence and response to *salmonella* challenge of poultry fed diets containing mannanoligosaccharides. In: Biotechnology in the Feed Industry. Proceedings of Alltech's 10th Symposium, Nottingham University Press, Nottingham, United Kingdom. pp 97-106. 2002.

20. Ofek, I., J. Goldhar, Y. Keisari, and N. Sharon. Nonopsonic phagocytosis of microorganisms. Ann. Rev. Microbiol. 49: 239-276. 1995.

21. Mosser, D. M. Receptors on phagocytic cells involved in microbial recognition. Immunology Series 60: 99-114. 1994.

22. Savage, T.F., E.I. Zakrzewska, and J.R. Andreasen. The effects of feeding mannan oligosaccharide supplemented diets to poult on performance and the morphology of the small intestine. Poult. Sci. 76: 139. 1997.

23. Santin, E., A. Maiorka, M. Macari, M. grecco, J.C. Sanchez, and T.M. Myaska. Performance and intestinal mucosa development of broiler chickens fed diets containing *Saccharomyces cerevisiae* cell wall. J. Appl. Poult. Res. 10: 236-244. 2001.

24. Iji, P.A., K. Khumalo, S. Slippers, and R.M. Gous. Intestinal function and body growth of broiler chickens on diets based on maize dried at different temperatures and supplemented with a microbial enzyme. Reproduction Nutrition Development 43: 77-90. 2003.

25. Hofacre, C.L., T. Beacom, S. Collett, and G. Mathis. Using competitive exclusion, mannan-oligosaccharide and other intestinal products to control necrotic enteritis. J. Appl. Poult. Res. 12: 60-64. 2003.

26. Rosen, G.D. Optimizing the replacement of pronutrient antibiotics in poultry nutrition. In: Biotechnology in the Feed Industry. Proceedings of Alltech's 20th Symposium, Nottingham University Press, Nottingham, United Kingdom. pp 94-101. 2004.

27. Hooge, D.M. Dietary mannan oligosaccharides improve broiler and turkey performance: meta-analysis of pen trials around the world. In: Biotechnology in the Feed Industry. Proceedings of Alltech's 19th International Symposium, Nottingham University Press, Nottingham, United Kingdom. pp 113-124. 2003.

DEFINING ORGANIC TRACE MINERAL REQUIREMENTS FOR POULTRY

DEFINICIÓN DE LOS REQUERIMIENTOS DE MINERALES ORGÁNICOS EN AVES

James L. Pierce

Nutrition Research Coordinator, Alltech, Inc. 3031 Catnip Hill Pike, Nicholasville, KY 40356
jpierce@alltech.com

RESUMEN

La mayoría de los minerales de las plantas y las semillas se encuentra en forma de complejos orgánicos. Esto nos conduce a una pregunta obvia: ¿Por qué

administramos sulfatos, óxidos o carbonatos en el alimento de los animales? la respuesta más común es que utilizamos lo que tenemos disponible y resulta barato. Desgraciadamente, la mayoría de los minerales

traza se administra simplemente para evitar deficiencias. Como resultado, casi todos los requerimientos nutricionales que aparecen en las listas se basan en literatura referente a observaciones realizadas a partir de la década de 1950. La mayor parte de la investigación sobre el impacto ambiental de la producción ganadera y avícola en años recientes se refiere al olor, el nitrógeno y el fósforo. Nosotros realizamos una serie de estudios para evaluar los efectos de fuentes alternativas de minerales traza para la producción avícola sobre el crecimiento de los animales y su excreción de minerales.

ABSTRACT

The majority of minerals in plants and seeds are in an organic complex. This leads to an obvious question: Why do we feed animals sulfates, oxides, or carbonates? The most common response is that we feed what is available and cheap. Unfortunately, most trace minerals are fed to simply avoid deficiencies. As a result, most listed nutrient requirements are based on literature cited from observations made from as far back as the 1950s. The majority of research regarding the environmental impact of livestock and poultry production in recent years has focused on odor, nitrogen, and phosphorus. We conducted a series of studies to evaluate the effects of alternative sources of trace minerals for poultry production on animal growth performance and mineral excretion.

INTRODUCTION

The majority of minerals in plants and seeds are in an organic complex. This leads to an obvious question: Why do we feed animals sulfates, oxides, or carbonates? The most common response is that we feed what is available and cheap. Unfortunately, minerals also fall into the category of “you get what you pay for”. The majority of literature regarding trace mineral supplementation cited in the 1994 Nutrient requirements for poultry (1) was published as much as 70 years ago. The trace mineral requirements for brown egg layers, broilers past three weeks, broiler breeders, and turkeys were all estimated rather than based on empirical data. Birds today have little in common with birds of 50 years ago in terms of growth performance and egg production.

Trace minerals are becoming an environmental concern in some areas. Heavy metals build up in the soil when fed in excess and/or threaten water sources due to runoff. These minerals can pose problems, as they may become toxic to some sensitive fish species (2). Additionally, heavy metals tend to accumulate in the food chain and pose a toxicity problem to sensitive animal species, such as sheep.

The European Union has set maximum allowable trace mineral levels for all livestock and poultry feeds. Feeding minerals with higher bioavailability and feeding to meet the specific requirements of the target animal can substantially reduce the amount of the mineral excreted and thereby the environmental risk when manure is applied to soils. Swine (3) fed diets containing low levels of organic trace minerals had similar performance as those fed inorganic sources, but had a 46% decrease in fecal copper concentrations. Similarly, in broilers low levels of organic minerals did not negatively affect body weight gain or feed efficiency of broilers even when fed at 14% of the inorganic trace mineral level (4). Excreta mineral levels were much reduced.

MATERIALS AND METHODS

Two sets of experiments were conducted one with zinc on with copper. Day-old broiler males were raised in wire floor cages on rations that differed only in that Zn or Mn sulfate were substituted with either Bioplex (Alltech, Inc., Nicholasville, KY) Zn or Mn, respectively. At 21 days of age livers and right tibia were removed to determine the levels of the respective minerals. Data were analyzed by ANOVA for complete block designs. Mean differences were determined using Fisher's least significant difference test at the 5% level. A single-slope broken-line method (5) was used to determine the break point and slope below the break point.

RESULTS AND CONCLUSIONS

The bioavailability of Bioplex Zn is 183% that of zinc sulfate based on weight gain and 157% based on tibia zinc content. The Bioplex Zn requirement is 6.3 mg/kg of Zn in a practical corn soya ration, lower than assumed for zinc sulfate. The bioavailability of Bioplex Mn is 200% of manganese sulfate based on growth rate and 163% based on liver Mn concentration. These new values indicate that the Zn and Mn requirements can be met with much lower supplemental values and thus greatly reduce these minerals in excreta.

REFERENCES

1. National Research Council. Nutrient Requirements of Poultry. 9th Rev. Ed. NAS-NRS, Washington, D.C. 1994.
2. Besser, J.M., Early life-stage toxicity of copper to endangered and surrogate fish species. U.S. Environmental Protection Agency, Washington, D.C. 2001.
3. Pierce, J., J. Driver, J. Harter-Dennis, and D. Henman. Reducing phosphorus and copper excretion

from poultry and swine using phytase and organic minerals. In: Proceedings of the International Symposium (G.B. Havenstein, eds). NC State University, Raleigh, NC. . 2001.

4. Leeson, S. A new look at trace mineral nutrition of poultry: can we reduce environmental burden of poultry manure? In: Nutritional

Biotechnology in the Feed and Food Industries. T.P. Lyons and K.A. Jacques Eds. Nottingham University Press, Nottingham, United Kingdom. 2003.

5. Robbins, K.R. A method, SAS program, and example for fitting the broken line to growth data. Univ. of Tenn. Res. Rep. 86-09. Univ. of Tennessee Agric. Exp. Sta., Knoxville, TN. 1986.

EVALUACIÓN DE LA INCLUSIÓN DE MINERALES TRAZA ORGÁNICOS EN EL ALIMENTO SOBRE LOS PARÁMETROS PRODUCTIVOS, CALIDAD DE PATAS, CALIDAD DE CANAL, RESPUESTA INMUNE Y CALIDAD DE HUESO EN POLLOS DE ENGORDA

EVALUATION OF FEEDING ORGANIC TRACE MINERALS ON THE PRODUCTIVE PARAMETERS, FEED QUALITY, CARCASS TRAITS, IMMUNE RESPONSE, AND BONE STRENGTH IN BROILERS

S. Pophal, D. Suida, L. Oetting, and D. Camacho-Fernández

SUMMARY

Trace minerals are essential for animal feeding. They have been traditionally fed in their inorganic forms, resulting in lower availability than that of organic minerals. This study evaluated the effects of organic trace minerals using 1,500 Ross 308 male broilers allotted to 3 treatment groups with 10 replicates, i.e.: T1, Basal diet + inorganic minerals; T2 = T1 plus Zn chelated with 2-hydroxy-4-methylthiobutanoic acid; T3 = T1 plus Zn, Cu, and Mn chelated with 2-hydroxy-4-methylthiobutanoic acid. The variables evaluated included bone strength, tibial zinc content, foot pad lesions, immune profile, carcass yield, and carcass quality. Organic trace minerals resulted in decreased foot pad lesions, increased antibody production, improved cellular immune response, increased dermatitis, decreased carcass lesions and increased bone strength. Conclusions: Organic trace minerals are more bioavailable than the inorganic forms.

INTRODUCCIÓN

Los minerales traza son esenciales en la alimentación animal. Han sido tradicionalmente adicionados como sales inorgánicas, presentando baja biodisponibilidad con respecto a minerales orgánicos, debido especialmente a sus frecuentes antagonismos con los ingredientes y nutrimentos alimenticios los cuales impiden su absorción. El principal objetivo de suplir minerales traza orgánicos es el de proteger al

metal de los antagonistas presentes en la dieta. Esto permite más alta disponibilidad en el cuerpo resultando en una mejora del sistema inmune y más alta resistencia de hueso, intestino y piel. Este estudio evaluó los efectos de la adición de minerales traza orgánicos, sobre los parámetros productivos, calidad del cojinete plantar, calidad de la canal, respuesta inmune y calidad de hueso en pollos de engorda.

MATERIALES Y MÉTODOS

Un total de 1,500 pollos (ROSS 308) machos de un día de edad fueron colocados aleatoriamente en tres tratamientos, con 10 repeticiones de 50 aves por lote siendo mantenidos por 41 días en producción.

Tratamientos:

T1 Testigo– Dieta Basal con inclusión de premezcla mineral inorgánica, sin suplementación de minerales orgánicos.

T2 – Dieta Basal + Zinc quelatado (40ppm) con ácido 2-hidroxi-4-metilthiobutanoico adicionado a la dieta.

T3 – Dieta Basal + Zn (40ppm), Cu (10ppm), Mn (20ppm) quelatados con ácido 2-hidroxi-4-metilthiobutanoico adicionados a la dieta.

Para T2 y T3, los niveles de metionina fueron ajustados en la dieta final, de acuerdo al aporte que ofrece el material ligante de los minerales.

Variables analizadas:

1. Parámetros productivos: Ganancia de peso, peso corporal, consumo de alimento, conversión alimenticia e índice de producción.

2. Calificación de lesiones en cojinete plantar: Se midió en 5 pollos por lote al día 20, siendo identificados y reevaluados al día 32 de edad. Se otorgaron 4 calificaciones: 0) Cojinete en condiciones perfectas sin lesiones; 1) Ligeras lesiones con cojinete decolorado, zonas ligeramente enrojecidas y dolorosas; 2) Presencia de pequeñas fisuras y de heces en las grietas; 3) Lesión severa, gran cantidad de heces en grietas, cortes profundos, presencia de sangre en las lesiones.

3. Rendimiento y calidad de la canal (dermatitis, celulitis, rasgado) antes y después del sacrificio. Antes del sacrificio: Al día 32 de edad se evaluó la calidad corporal en 5 aves por lote, elegidas por peso promedio +/- 2% siendo identificadas. Se revisó el dorso, pechuga y muslos para observar la presencia de lesiones. Se otorgó la calificación de: Bueno.- Ninguna lesión en las regiones examinadas; Rasguños.- Presencia de lesiones recientes o resueltas; Dermatitis.- Presencia de lesiones inflamatorias epidérmicas, superficiales o profundas generalmente producidas por rasguños. Después del sacrificio: Se evaluó al día 33 de edad, la calificación fue la misma usada antes del sacrificio; se midió en el ave caliente después de salir de la máquina de desplume.

4. Perfil inmune humoral y celular. Respuesta humoral: A los 10 días se vacunaron las aves contra la Infección de la Bolsa de Fabricio (IBF); diez días después, de 5 aves por lote se midieron el título de anticuerpos por ELISA. Respuesta celular: Medición de la reacción inflamatoria contra tuberculina aviar en aves previamente sensibilizadas. A los 10 días de edad, 5 aves por lote fueron inyectadas con 0.5 mL de *M. avium* en el músculo de la pechuga; a los 20 días de edad el grosor de la membrana interdigital de entre el 2º y 3º dedo de la pierna izquierda fue medido con un vernier; se inyectó 0.1 mL de tuberculina aviar en el sitio, después de 24 horas el mismo sitio fue medido calculándose la diferencia entre la 2ª y la 1ª medición.

5. Fortaleza del hueso y nivel de contenido de Zn en tibia: La tibia izquierda de 5 aves por lote se colectó a los días 20 y 41 de edad. Las aves fueron sacrificadas, el hueso removido y se disecó la tibia enviándose al laboratorio para la determinación de Zn por la metodología descrita por el AOAC (1986) y leídas en el espectrofotómetro de absorción atómica. La medición de fortaleza por rompimiento fue determinada a los días 20 y 41 de acuerdo a la metodología adaptada de Crenshaw et al. (1981).

Análisis estadísticos. Todos los datos fueron evaluados usando el paquete estadístico SAS. Algunas variables fueron transformadas en variables continuas a

través del porcentaje de incidencia (calificación de lesiones de cojinete plantar y calidad de canal) o normalizadas usando la transformación logaritmo (títulos de anticuerpos). La diferencia entre tratamientos fue determinada usando la prueba de comparaciones múltiples LSM a un nivel de significancia de $P < 0.05$.

RESULTADOS

1. Calificación de lesiones en cojinete plantar: El uso de los minerales orgánicos utilizados, ayudó a prevenir las quemaduras del cojinete plantar, siendo el efecto más evidente ($P < 0.05$) con la combinación de Zn, Cu y Mn orgánicos (T3) al día 20 de edad. En la segunda evaluación, el uso del mineral orgánico (T2) y la combinación (T3) promovió el mejoramiento significativo de la calidad del cojinete plantar ($P < 0.05$). Las aves que consumieron la dieta Testigo (T1) presentaron la misma incidencia de lesiones (□50%). Las aves del T2 redujeron la incidencia de lesiones tipo 1 en 60% en la 2ª medición y un 8.5% mejoraron la calidad de las patas (calificación 0). El grupo Testigo presentó 57% y 28% más lesiones tipo 2 en la primera evaluación comparados con T2 y T3 respectivamente. Para la segunda evaluación, estos valores fueron 53% y 64% más altos ($P < 0.05$).

2. Rendimiento y calidad de la canal: La presencia de rasguños, dependiendo de su profundidad, tiende a desaparecer después de que la canal pasa a través del chiller, las lesiones de dermatitis también se atenúan, aunque ésta última tiende a ser más visible que los rasguños. La intensidad de estas lesiones se relaciona principalmente con el manejo y densidad en granja. Éstas lesiones causan un valor bajo del producto particularmente cuando las aves son mercadeadas. Si estas lesiones no desaparecen después del chiller, la canal puede ser bajada del andén y ser utilizada para cortes comerciales o para la producción de harina de carne y hueso.

Calidad de la canal previo al sacrificio: Se observó un efecto benéfico ($P < 0.05$) del uso de los minerales orgánicos utilizados, sobre la incidencia de lesiones en la canal. La incidencia de dermatitis fue también reducida especialmente en el T3 con 80% menor incidencia.

Calidad de la canal después del sacrificio: Las aves del T3 presentaron el porcentaje más alto ($P < 0.05$) de aves sin lesiones, representando el 60% mejor canal comparado con el grupo Testigo. Éste tratamiento también presentó el más bajo ($P < 0.05$) índice de dermatitis (32%) comparado con el grupo Testigo (68%).

3. Perfil inmune humoral y celular. Títulos de Anticuerpos: Los resultados muestran que el T3 promovió una mejor respuesta inmune a la vacunación,

observándose más alta producción de anticuerpos contra IBF y más bajo coeficiente de variación dentro de los tratamientos, confirmando la importancia del Zn y Cu sobre la respuesta inmune. El grupo Testigo presentó un CV de 122%, T1 de 118% y T3 de 39%. En términos prácticos, el más bajo CV observado en las aves del T3, indica una alta y uniforme respuesta inmune, que podrá ser determinante ante un desafío de esta enfermedad.

Respuesta inmune celular: Los resultados muestran una alta respuesta tipo celular para las aves del T2 ($P<0.01$). Ésta respuesta es importante cuando consideramos que las aves deben estar listas para reaccionar ante desafíos por invasión de antígenos y estar protegidas contra posibles infecciones en tejidos previamente dañados tales como la epidermis.

4. Fortaleza del hueso y nivel de contenido de Zn en tibia: Al día 20: Las aves donde se aplicó el T2 y T3 presentaron mejores resultados numéricos para fortaleza por rompimiento y contenido de Zn en tibia comparados con el grupo Testigo. Al día 41 las aves que recibieron el T3 presentaron mejores ($P<0.05$) resultados sobre la fortaleza al rompimiento del hueso. Las aves de T2 y T3 presentaron mayor ($P<0.05$) contenido de zinc en tibia al compararse con el grupo Testigo.

5. Parámetros productivos: Los parámetros productivos no son el principal objetivo cuando se administran minerales traza orgánicos a la dieta; aunque es posible observar algunas veces un

incremento en el desempeño, la mayoría de las veces los resultados se visualizan en mejoramiento de la salud general del animal. Al día 20, T2 mejoró ($P<0.05$) la ganancia de peso y al día 32 la conversión alimenticia ($P<0.05$) con respecto al grupo Testigo.

CONCLUSIONES

Los minerales traza quelatados con ácido 2-hidroxi-4-metiltiobutanoico:

1. Disminuyen la incidencia de lesiones del cojinete plantar.
2. Aumentan la producción de títulos de anticuerpos.
3. Promueven una mayor respuesta inmune celular.
4. Reducen la incidencia de dermatitis y el porcentaje de lesiones en la canal.
5. Incrementan la fortaleza del hueso.
6. Tienen mayor biodisponibilidad que los minerales traza inorgánicos; comprobado esto, por la mayor deposición de zinc en el hueso.

REFERENCIAS

1. Crenshaw, T.D., E.R. Peo Jr., A.J. Lewis, B.D. Moser, and D. Olson. Influence of age, sex and calcium and phosphorus levels on the mechanical properties of various bones in swine. *J. Anim. Sci.* Jun; 52(6):1319-29. 1981.

A FIELD COMPARISON OF FARM PRODUCTION PARAMETERS IN BEAK TRIMMED LAYERS VERSUS NON BEAK TRIMMED LAYERS IN NORTHERN CALIFORNIA

COMPARACIÓN DE CAMPO DE LOS PARÁMETROS PRODUCTIVOS EN PONEDORAS SOMETIDAS O NO A RECORTE DEL PICO EN LA REGIÓN NORTE DE CALIFORNIA

S. T. Stoute, M. Bland, and B. R. Charlton

CAHFS Turlock, PO Box 1522, Turlock, CA, 95381

RESUMEN

Se analizaron los datos de producción procedentes de dos granjas grandes de ponedoras con estirpes y estilos de manejo similares. Para ello se seleccionaron aleatoriamente cinco casetas de dos productores de huevo para realizar la comparación entre 2006 y 2007. Las casetas tenían características similares de tamaño, diseño y densidad de población. Se comparó el consumo de alimento, la ganancia de peso, la

mortalidad y la producción de huevo de estas ponedoras entre las 20 y 80 semanas de edad. Dado que se trataba de una investigación de campo es posible que muchas variables hayan influenciado la producción, aunque siempre se tomaron en consideración. El presente estudio se realizó para determinar si se obtenían resultados superiores de producción en las parvadas sometidas a recorte del pico. Bajo condiciones experimentales controladas, los datos de la

investigación generalmente respaldan la hipótesis de que el recorte del pico reduce la mortalidad, el consumo de alimento, el desperdicio y la ganancia de peso, por lo que resultó interesante ver si esta investigación con registros reales de las granjas secundaba dichos datos.

SUMMARY

Production parameters of beak trimmed versus non beak trimmed flocks from two large layer facilities were compared. Each facility utilized similar bird strains and management protocols. Production data from four randomly selected houses was chosen from houses containing between 110,000-150,000 layers and maintained between 2006 and 2007. Data from layers 20-80 weeks of age was collected from each flock for comparison and analysis. Mortality, egg production and feed consumption data variables were compared in each house. The average mortality on beak trimmed flocks was lower than the average mortality in untrimmed flocks. The mortality results are a typical reflection of past published investigations which report a decrease in mortality in beak trimmed birds compared to birds with intact beaks. The flocks with intact beaks had consistently lower Accumulative Hen Housed Eggs/Bird at 80 weeks. Though this result is not typical, there are numerous factors in addition to beak trimming that influence egg production in the field. On average, the beak trimmed flocks consumed more lbs feed/100 birds/week than the untrimmed flocks.

INTRODUCTION

Beak trimming is a poultry husbandry practice that involves the trimming of part of the upper and lower beak. It is usually achieved with infrared technology, an electrocautery device or with a heated blade to cut and cauterize the beak. The procedure is usually performed early in the life of commercial hens to prevent injurious feather pecking, vent pecking, prolapse, and mortality associated with these stressors. Beak trimming has been reported to reduce stress associated with dominance interactions especially in high density cage operations. There are well documented scientific reports that indicate that beak trimming is an effective management tool that reduces excess feed intake and wastage and improves the feed conversion ratio. These factors all contribute to an improvement in productivity and profitability (1,2).

Beak trimming is performed at various ages based on the preferences of farm management. The most common ages for birds to be beak trimmed are day of age, 5-10 days old, 4-6 weeks old, 8-12 weeks old or a touch-up trim on adult birds. The majority of beak

trimming procedures in the United States are done by accredited contract teams. Generally, the older the age that trimming is done, the greater the stress on the bird. This can be manifested as weight loss or lack of weight gain, delay in onset of sexual maturity and a possible reduction in egg numbers.

Despite the documented benefits of the trimming procedure, there are also many concerns primarily related to welfare issues. The major objection to trimming is the perception that it can lead to acute and chronic pain (3). Chronic pain can occur through the formation of neuromas in improperly trimmed beaks. It has also been suggested that trimming of the upper mandible and asymmetry of the upper and lower mandible negatively affects the preening ability of the bird. Data has also suggested that trimming detrimentally affects pellet manipulation in laying hens and under certain circumstances can result in inadvertent feed deprivation (5).

This short retrospective study was undertaken in order to determine if field production data reflects the documented production benefits obtained by beak trimming procedure.

MATERIALS AND METHODS

The beak trimmed and non beak trimmed flocks were from facilities located in Northern California, USA. Each producer rears layers in modern, environmentally controlled houses. Both facilities utilize the Hy-Line W-36 strain of white leghorns. Production data between 20-80 weeks of age was analyzed and compared for 4 randomly selected houses from each producer. Each house has between 110,000-120,000 layers at any one time. The beak trimmed flocks were precision beak trimmed at 7-10 days of age. The stocking density of both facilities is about 64 in² (413 cm²)/bird with cage dimensions of 22 x 24 inches (56 x 61 cm). The beak trimmed birds are fed six times a day for 20 minutes at each feeding while the birds with intact beaks were fed four times daily for 20 minutes duration at each feeding. Birds are usually molted within the 68th and 70th week for beak trimmed and untrimmed flocks respectively. The following data was compared for each house in both trimmed and untrimmed houses:

- Total accumulative mortality between 20-80 week period for each house
- The accumulative hen housed eggs per bird at the end of 80 weeks of age.
- The value of the peak % hen day production and when this peak occurred.
- The average feed consumption (lbs. feed/100 birds/week) in 10 week time frames between 20-69 weeks of age.

Both facilities were also visited at random intervals. Field post mortems were conducted on the daily mortality from each facility in order to determine if there were any obvious trends in terms of specific causes of mortality.

RESULTS AND DISCUSSION

The average mortality of the beak trimmed flocks between 20-80 weeks of age was 3.72% compared to 5.76% in the flocks with intact beaks. The decrease in mortality associated with beak trimming of layers is also documented and observed in the literature (4,6). In spite of this, the post mortem investigations of daily mortality as well as observations from the farm supervisors did not observe any significant level of pecking or cannibalism in the flocks with intact beaks. The possibility of mortality related to disease occurrence in these flocks must not be overlooked. The accumulated hen housed eggs/bird at the end of 80 weeks was lower in the beak trimmed flocks (283.2 eggs) compared to flocks with intact beaks (306 eggs). This is in contrary to past literature investigations that report an increase in egg production in beak trimmed flocks (2). In this investigation, the flocks with intact beaks were probably exposed to less stressors than the beak trimmed flocks. These stressors may include the brighter lighting of the houses and more handling during beak trimming and complex vaccination protocols. The beak trimmed birds consumed an average of 21.57 lbs (9.78 kg) feed/100birds/weeks between 20-69 weeks compared to 20.66 lbs (9.37 kg) feed/100birds/week in the untrimmed birds. The increased feed consumption in the beak trimmed birds may be attributed to the fact that they were fed six times a day compared to a frequency of four times a day in the untrimmed flocks.

The decision to beak trim is multifactorial. This investigation shows that it is possible for layer farms to not utilize this procedure and still have favorable

production with minimum pecking and cannibalism problems. This can be achieved if the farm is able to eliminate or reduce the risk factors for cannibalism. Adjusting frequency of feeding may also be useful to counteract excess feed intake and wastage that can occur when birds are left with intact beaks.

Research has also indicated that pecking behavior once initiated tends to spread in a flock and there is some degree of social transmission of this behavior. On farms that have difficulty controlling such behavior, many times the only reasonable alternative is to adopt beak trimming procedures.

REFERENCES

1. Craig JV, Craig JA, Milliken GA. Beak trimming effects on beak length and feed usage for growth and egg production. *Poult Sci.* Nov; 71(11):1830-41. 1992.
2. Davis GS, Anderson KE, Jones DR. The effects of different beak trimming techniques on plasma corticosterone and performance criteria in Single Comb White Leghorn hens. *Poult Sci.* Oct; 83(10):1624-8. 2004.
3. Glatz PC. Effects of beak trimming and restraint on heart rate, food intake, body weight and egg production in hens. *Br Poult Sci.* Dec; 28(4):601-11. 1987.
4. Guesdon V, Ahmed AM, Mallet S, Faure JM, Nys Y. Effects of beak trimming and cage design on laying hen performance and egg quality. *Br Poult Sci.* Feb; 47(1):1-12. 2006.
5. Prescott NB, Bonser RHC. Beak trimming reduces feeding efficiency of hens. *J. Appl. Poult. Res.* 13:468-471. 2004.
6. Kuo FL, Craig JV, Muir WM. Selection and beak-trimming effects on behavior, cannibalism, and short-term production traits in White Leghorn pullets. *Poult Sci.* May; 70(5):1057-68. 1991.

DEVELOPMENT OF AN INJECTABLE LIVE ATTENUATED VACCINE AGAINST FOWL CHOLERA -VAXSAFE® PM

DESARROLLO DE UNA VACUNA VIVA ATENUADA INYECTABLE CONTRA EL CÓLERA AVIAR: VAXSAFE® PM

Rima Youil^A, Warwick Smith^A, Elizabeth Evans^A, Youssef Abs EL-Osta^A, Clive Jackson^B, Peter Claxton^C, David Tinworth^A, and Peter C. Scott^D

^ABioproperties Pty Ltd, 36 Charter St., Ringwood, Victoria 3134, Australia

^BBiological Technology Transfer Pty Ltd, 2 Victory Ave, Camden, NSW 2570, Australia

^CClaxton Consulting, 31 Bowman Avenue, Camden South, NSW 2570 Australia

^DSchool of Veterinary Science, The University of Melbourne, Princes Highway, Werribee, Victoria 3030 Australia

RESUMEN

Pasteurella multocida (PM) es el agente causal del cólera aviar, enfermedad de los pollos y otras especies de aves como pavos y patos, causante de alta mortalidad y severas pérdidas de producción. Las vacunas que existen actualmente contra esta enfermedad están elaboradas con preparaciones inactivadas (protección homóloga) o bien con las cepas clásicas vivas atenuadas (protección heteróloga), las cuales frecuentemente inducen por sí solas cólera aviar. Bioproperties Pty Ltd, en colaboración con las Universidades de Monash y Melbourne, desarrollaron una novedosa vacuna viva atenuada (Vaxsafe® PM) contra *P. multocida*, que contiene una mutante auxotrófica incapaz de presentar reversión, de la cepa virulenta original (X73, serotipo 1). Extensos estudios *in vivo* han demostrado que esta vacuna es segura y efectiva contra el desafío heterólogo con una cepa del serotipo 4. Vaxsafe PM es una vacuna inyectable para la protección de aves de vida prolongada como (reproductoras y ponedoras) contra el cólera aviar. Actualmente se están realizando estudios con este producto en pavos y patos.

SUMMARY

Bioproperties Pty Ltd in collaboration with the University of Melbourne, Monash University, and the CRC Poultry has developed a novel live attenuated vaccine (Vaxsafe® PM) against *Pasteurella multocida*. A number of studies in chicken have been conducted using Vaxsafe PM to determine its safety profile, efficacy under a heterologous challenge, onset of immunity and the dissemination profile following intra-muscular administration. Genetic stability of the attenuated live vaccine strain was also evaluated. The authors will show that Vaxsafe PM is a safe, effective and genetically stable vaccine capable of inducing

cross-protective immunity in chickens against *P. multocida*.

INTRODUCTION

The causative agent of avian pasteurellosis or fowl cholera (FC) is *Pasteurella multocida* (PM). FC is both an acute and a chronic disease of chickens, turkeys, ducks, geese as well as wild birds. It often occurs as a septicemia and results in high morbidity and mortality (6). In the chronic state, birds can act as a reservoir for *P. multocida* hence facilitating transmission of the disease to susceptible birds.

Economically FC has significant ramifications to the poultry industry. Hence vaccination programs are called upon in an effort to curb the spread of avian pasteurellosis. Current vaccines against FC are based on autogenous killed vaccine preparations, commercial killed vaccines or classically attenuated live vaccines. The autogenous vaccine will only provide homologous protection. The commercial killed vaccines may contain a combination of serovars to allow for some heterologous protection. The attenuated, live vaccines generally provide the broadest level of protection due to limited *in vivo* replication, which induces a cellular immune response that the killed vaccines are incapable of evoking. Nevertheless there are some drawbacks to the use of avirulent live vaccines. For example, the Clemson University (CU) strain has the potential to cause vaccine induced FC (5). Similarly the temperature sensitive derivatives of CU strain, PM#1 and PM#3 have also been shown to cause mortality and outbreaks through reversion to their more virulent form (3, 8).

The fact that live vaccines provide heterologous protection is a significant advantage over killed vaccines, however, careful scrutiny of the attenuation target(s) is required to provide optimal protection

against the potential risk of reversion to virulence. Of the approaches available, mutation/deletion(s) in the shikimate pathway is one such approach that has been the most widely studied. The resultant aromatic amine deletion mutants (*Δaro*) are rendered auxotrophic for essential aromatic amino acids and vitamins. These compounds are scarcely available in host tissue, and in the absence of an external supply, the cells simply die. An *ΔaroA* bacterial strain is therefore highly attenuated and only persists long enough to elicit a specific immune response. This approach has been successfully applied to a wide variety of bacterial pathogens such as *Salmonella* (1) and *Pasteurella multocida* (4). An early study has demonstrated that the *ΔaroA* approach to creating a live attenuated PM vaccine is effective in providing cross protection (7)

Vaxsafe PM, is an auxotrophic and non-reverting mutant of a virulent parent strain (X73, serotype 1) originally isolated from a peracute case of FC in the United States (2). An *aroA* delete mutant was developed at Monash University (4). Subsequently, Bioproperties developed growth media for the sustainability and scale up fermentation of the vaccine strain and technologies for its downstream processing and stabilisation. In its current commercial form, Vaxsafe PM is a freeze-dried formulation that is reconstituted in sterile diluent prior to its administration via intra-muscular (IM) route.

MATERIALS AND METHODS

Safety. Six week-old mixed sex specific pathogen free (SPF) chickens were vaccinated by IM administration with either the maximum commercial dose (1X) or a 10X overdose of Vaxsafe PM. The birds were observed for acute clinical signs of disease, changes in body weight and gross pathology at post-mortem examination over a nine week period.

Efficacy (minimum protective dose). Eleven week-old mixed sex commercial layer birds were vaccinated with one of four different doses of Vaxsafe PM by IM administration. All birds were challenged at four weeks post-vaccination with a virulent strain of PM (PM206, serotype 4).

Onset of immunity. Fourteen week-old mixed sex commercial layer birds were vaccinated with a minimum commercial dose of Vaxsafe PM. Birds were challenged at 1, 2, 3, 4 and 5 weeks post vaccination with PM206 (serotype 4).

Dissemination within the host. Six week-old mixed sex SPF birds were vaccinated with 1X proposed commercial vaccination dose. At 2hr, 6hr, 24hr, 48hr, 7 days and 14 days post vaccination, a subset of birds were subjected to postmortem examination during which swabs were collected from the pharyngeal mucosa, trachea mucosa, cloacal

mucosa, liver, lung, spleen, site of injection (pectoral muscle) and bone marrow. In some cases tissue samples were also collected from the liver, lung, spleen and site of injection. All swabs and samples were screened for the presence of the live vaccine strain. The organisms were recovered onto Horse Blood Agar plates and colonies were confirmed to be Vaxsafe PM by PCR analysis.

Vaccine (genetic) stability. Vaccine strain was cultured *in vitro* for 16 passages. Molecular diagnostics examination at the site of *aroA* deletion was performed using restriction digestion and sequencing.

RESULTS AND DISCUSSION

Safety in SPF birds

- Vaxsafe PM is intended for use in chickens as young as six weeks of age. Regulatory guidelines require that safety of the vaccine is demonstrated in the most susceptible class of chickens (considered in this case to be the youngest) for which it is intended. Furthermore, both MORAG (Australian Veterinary Manual of Requirements and Guidelines) and European Pharmacopoeia require demonstration of the safety of a single dose (1X) and a ten-times (10X) overdose.
- *P. multocida* produces lipopolysaccharide (LPS) which can have endotoxic effects on chickens when administered parenterally.
- Vaxsafe PM demonstrated an acceptable level of safety when given by IM administration to chickens as:
 - Single (1X) maximum commercial dose - Clinical signs did not occur as in the 10X overdose group. However, feed & water intake was reduced for 24 hours.
 - Ten times (10X) overdose – The majority of chickens demonstrated transient clinical signs (consisting of hunched postures and reduced activity) between 2 and 24 hours post-vaccination. This was associated with reduced feed & water intake.

Overall, no systemic pathological lesions were observed followed vaccination. Post mortem examination of the pectoral muscle showed inflammatory lesions around and at the site of injection. The lesions were observed in all chickens soon after vaccination and had resolved by nine weeks post-vaccination. *The acute clinical signs were consistent with transient endotoxic effects of the Vaxsafe PM when administered by IM injection.*

- Efficacy (minimum protective dose).

Table 1. Minimum protective dose of *Vaxsafe*® PM (at one log increments).

| Group | Vaxsafe PM Dose (cfu*) | Mortality Post-Challenge (%) | Protective Index§ (%) |
|-------|------------------------|------------------------------|-----------------------|
| 1 | 10 ^x | 26 | 69 |
| 2 | 10 ^{x+1} | 20 | 77 |
| 3 | 10 ^{x+2} | 0 | 100 |
| 4 | 10 ^{x+3} | 5 | 94 |
| 5 | Nil (controls) | 85 | Not Applicable |

*cfu (colony forming units)

§ PI = [% mortality in unvaccinated group - % mortality in vaccinate group ÷ % mortality in unvaccinated group] x 100

- Table 1 shows that a protective index of 100% was achieved in group 3 using a heterologous challenge strain (PM206) at four weeks post vaccination.
- The requirement of the US monograph (9CFR 113.70) to demonstrate vaccine efficacy is equivalent to a minimum PI of 75%. Based on this, the dosage administered to group 2 birds would provide a minimum protective dose.
- **Onset of immunity**
 - Immunity to challenge following a single administration of the minimum commercial dose was shown to develop one week post-vaccination with gradual decline in PI over five weeks.
 - At the maximum commercial dose, immunity was sustained four to five weeks post-vaccination. Immunity was not monitored post the five week period.
- **Dissemination**
 - Swabs taken from the cloacal mucosa, tracheal mucosa, pharyngeal mucosa and bone marrow did not show evidence of the vaccine strain following its IM administration at any of the time points tested.
 - Swabs and tissue samples collected from the injection site, spleen and liver showed evidence of the vaccine strain at 2 hr, 6 hr, 24 hr and 48 hr post vaccination.
- **Vaccine (genetic) stability**
 - Sixteen consecutive passages of the vaccine strain in culture were examined for any genetic alterations to the *aroA* deletion site.

- Restriction analysis of the *aroA* gene indicated no structural chromosomal changes (i.e. no large DNA sequence insertions, deletions or inversions) from the master seed stage right through to the latest (vaccine level) passage.
- Sequence analysis of the *aroA* gene also did not show any evidence of sequence changes (i.e. no DNA single base pair substitutions, insertions or deletions etc.).

CONCLUSIONS

Extensive *in vivo* studies have demonstrated that this vaccine is both safe and effective against a heterologous challenge. Importantly for live attenuated vaccines, Vaxsafe PM is genetically stable and does not revert to its wild type genotype despite continuous culturing. To fully demonstrate that the *aroA* deletion is a stable modification, *in vivo* serial passaging through chickens will need to be performed. Determination of immunity is an important feature particularly as Vaxsafe PM is an injectable vaccine developed for the protection of long-lived chickens (breeders and layers) against FC. These studies are currently underway. Similarly, safety and efficacy studies of Vaxsafe PM in turkeys and ducks have been proposed.

ACKNOWLEDGMENTS

The authors wish to thank the following people for their invaluable effort in the work presented in this paper: Dr. Greg Underwood, Cheryl Colson, June Daly, Hayley Blacker and the production team at Bioproperties Pty Ltd, Glenorie.

REFERENCES

1. Coloe, P.J., M.R. Alderton, N.L. Gerraty, W. Christopher, and S.C. Smith. Aromatic vitamin dependent salmonella as vaccines in food animals: efficacy and persistence. *Developments in Biological Standardisation*. 84: 263-267. 1995.
2. Heddleston, K.L. and W.J. Hall. Studies on Pasteurellosis II: Comparative efficiency of killed vaccines against Fowl Cholera in chickens. *Avian Diseases* 2: 322-335. 1958.
3. Hofacre, J.R. Glisson, S.H. Kleven, J. Brown, and G.N. Rowland. Evaluation of *Pasteurella multocida* mutants of low virulence. I. Development and pathogenicity. *Avian Diseases* 33:270-4. 1989.
4. Hompchampa, P., R.A. Strugnell, and B. Adler. Cross protective immunity conferred by a marker-free *aroA* mutant of *Pasteurella multocida*. *Vaccine*. 15: 203-208. 1997.
5. Hopkins, B.A. and L.D. Olson. Comparison of live avirulent PM-1 and CU fowl cholera vaccines in turkeys. *Avian Diseases* 41:317-25. 1997.
6. Rhoades, K.R. and R.B. Rimler. *Pasteurella* and *Pasteurellosis*, Ed. C. Adlam and J.M. Rutter, Chapter 5, p95-113. 1989.
7. Scott, P.C., J.F. Markham, and K.G. Whithear. Safety and efficacy of two live *Pasteurella multocida aroA* mutant vaccines in chickens. *Avian Diseases* 43:83-88. 1999.
8. Snipes, K.P, D.C. Hirsh, R.W, Kasten, T.E. Carpenter, D.W. Hird, and R.H. McCapes. Differentiation of field isolates of *Pasteurella multocida* serotype 3,4 from live vaccine strain by genotypic characterization. *Avian Diseases* 34:419-24. 1990.

CASE STUDIES FROM THE POULTRY DIAGNOSTIC LABORATORY

ESTUDIO DE CASOS PRESENTADOS EN EL LABORATORIO DE DIAGNÓSTICO AVÍCOLA

Jose A. Linares

Texas Veterinary Medical Diagnostic Laboratory

RESUMEN

El objetivo es presentar una serie de casos e interactuar con los asistentes en una discusión abierta de las historias clínicas, los diagnósticos diferenciales, los que sea necesario descartar, los hallazgos y su seguimiento. Este formato me impide redactar un documento detallado de todos los casos para sostener una discusión interesante.

SUMMARY

The goal is to present case studies from the Poultry Diagnostic Laboratory in Gonzales, TX. The format will allow interaction with the audience in an open discussion of the histories, differential diagnoses or rule-outs, diagnostic findings, diagnoses and follow-up. This format precludes me from writing at length about the cases in order to keep the discussion interesting.

EFFECTS OF THE IBDV VARIANT STRAIN AL2 IN YOUNG CHICKENS

EFFECTOS DE LA CEPA VARIANTE AL2 DEL VIRUS DE LA INFECCIÓN DE LA BOLSA DE FABRICIO EN POLLOS JÓVENES

J. Effler, C. Breedlove, S. Gulley, F. W. van Ginkel, and H. Toro

Department of Pathobiology, Auburn University College of Veterinary Medicine

RESUMEN

El surgimiento de nuevas cepas variantes del virus de la infección de la bolsa de Fabricio (enfermedad de Gumboro), como la AL2, ha disminuido la efectividad de los programas de vacunación y es responsable de inmunosupresión severa y prolongada. Se caracterizó la patogenicidad de esta cepa AL2 mediante los signos clínicos, estudios histológicos, detección del genoma viral y análisis FACS (clasificación celular activada con fluorescencia). Los resultados de la detección del genoma viral demuestran que la multiplicación del virus en la bolsa de Fabricio es dependiente de la dosis, pero hacia el octavo día todas las concentraciones indujeron niveles detectables del virus en este órgano. Los resultados del índice bursal demostraron que existe una relación entre la concentración del virus y la depleción linfocitaria de la bolsa de Fabricio. El análisis FACS de las células CD4 y CD8 reveló un ligero incremento en estas poblaciones celulares en el bazo de las aves infectadas en comparación con las testigos. Asimismo, se observó un incremento en la población de células productoras de IgM en el bazo de los pollos infectados. Estos aumentos pueden estar asociados con la poderosa respuesta inmune característica de las aves infectadas con el virus de la infección de la bolsa de Fabricio. Esta investigación contó con el patrocinio # 629 de la Asociación Estadounidense del Pollo y el Huevo.

SUMMARY

Emergence of new variant strains of infectious bursal disease virus (IBDV), such as AL2, has decreased the effectiveness of vaccination programs and accounts for severe prolonged immunosuppression. AL2 (AL for Allen Laboratory) variant strain originated from Delaware. Sequence analysis showed a close similarity with the T1 IBDV variant previously described by others. In the present study the pathogenicity of IBDV AL2 was characterized by clinical signs, histology, viral genome detection, and FACS analysis. Viral genome detection results demonstrate that viral replication in the bursa is dependent on dose but by day 8 all concentrations induced detectable levels of virus in the bursa. The bursal index demonstrated a relationship between viral concentration and bursal atrophy. Significant differences ($p < 0.05$) versus uninfected controls were detected on days 5 and 8 post infection. Bursal histomorphometric analysis results were consistent with the results of the bursal index. However, significant differences were detected as early as day 3 post infection. FACS analysis for both CD4 and CD8 revealed a slight increase in these cell populations in the spleen of infected birds compared to controls. IgM cell populations were increased in the spleen of infected birds. These increases may be associated with the strong immune response characteristic of IBDV infected birds.

(Supported by U.S. Poultry & Egg Association Award #629.)

(Full length article will be submitted to *Avian Diseases* for publication.)

INTEREST OF USING AN ANTIGEN ANTIBODY COMPLEX IBD VACCINE IN THE PREVENTION OF IBD

INTERÉS DE USAR UNA VACUNA COMPLEJO ANTÍGENO-ANTICUERPO CONTRA LA INFECCIÓN DE LA BOLSA DE FABRICIO

Y. Gardin^A, V. Palya^B, and R. Soares^A

^ACeva Santé Animale, Libourne, France

^BCeva Phylaxia, Budapest, Hungary

RESUMEN

Se realizaron pruebas de campo de gran envergadura con una novedosa vacuna del tipo complejo antígeno-anticuerpo contra la infección de la bolsa de Fabricio o enfermedad de Gumboro, bajo diferentes condiciones de campo, usando intensos procedimientos de laboratorio, incluyendo serología, histología, reacción en cadena con polimerasa (PCR) polimorfismo de longitud de los fragmentos resultantes de la digestión con enzimas de restricción (RFLP) y secuenciación. Además, se recolectaron cifras referentes a parámetros clínicos, técnicos y económicos. Con ellos se obtuvo una imagen clara del interés práctico del uso de este tipo de vacuna para mejorar el control de la citada enfermedad.

INTRODUCTION

It is well known and established that proper vaccination is the only way to prevent infectious bursal disease (IBD). However, for almost half of a century, successful use of IBD vaccines under field conditions has proven to be difficult to achieve regularly and vaccination failures have been and are still often observed or detected.

The main reasons that explain this situation are: 1) the presence of variable levels of maternally derived antibodies (MDA) at the time of vaccination; and 2) the difficulties to properly deliver the vaccine to chickens, whatever the mass vaccination technique used (drinking water, spray or eye drop).

When still present at moderate or even low levels, MDA strongly interfere with live attenuated IBD vaccines and totally prevent or delay the “take” of it. This is particularly true with IBD vaccines of the intermediate type that are very susceptible to MDA and poorly spreading from vaccinated chicks to contacts. The optimal solution to overcome this issue is to run ELISA serological testing on serum samples from day old chicks to predict the best time to vaccinate, but this is time and money consuming, and in practical, very seldom done.

Despite a lot of efforts spent to teach the farmers and technicians on how to correctly apply IBD vaccines to chickens, many mistakes are made. The use of laboratory tools to detect tangible signs of vaccine virus replication has revealed as much as 30 to 50% of not immunized flocks in some organizations.

This is why the possibility, at the level of hatchery, to automatically or semi-automatically apply an IBD vaccine, which is not susceptible to MDA, has always been viewed as “the” ideal solution to really solve IBD vaccination problems. The recent commercial launch of two new types of IBD vaccines, Antigen Antibody Complex (AAC) and recombinant, has now made this dream come true. This paper will exclusively talk about experience, acquired by the authors, with one AAC type of IBD vaccine (Cevac Transmune IBD).

THE ANTIGEN ANTIBODY COMPLEX (AAC) TYPE OF IBD VACCINE

What is it? An AAC vaccine, sometimes also referred to as Immune Complex Vaccine, is a combination of a live virus suspension (the antigen fraction), similar to the one made to produce classical live attenuated vaccines, with a serum (the antibody fraction) containing corresponding homologous specific antibodies. The antigen fraction is produced in SPF embryonated eggs and the antibody fraction in SPF chickens. Then the two fractions are mixed in very well defined proportions. In the particular case of Cevac Transmune, the vaccine virus is the Winterfield 2512 strain. The final product is lyophilized.

Since antibodies prevent immediate viral multiplication in embryonated eggs or tissue culture, the final product, cannot be titrated using classical techniques. Hence, the potency testing of the vaccine, as requested by European Registration authorities, is conducted in SPF chicks kept in individual isolators. Vaccine take and replication of vaccine virus is evidenced by active antibody response. Additional routine testing for potency also includes vaccination of

commercial broilers and assessment of virus replication in the bursa.

How does the complex work in the laboratory?

This is not very well known. It is believed that after *in ovo* or subcutaneous injection, the immune complexes are captured by follicular dendritic cells mostly in the spleen. Antibodies of the complexes are catabolized along with MDA, and vaccine virus is progressively and regularly released in the blood stream. As long as MDA concentration remains high, vaccine virus is neutralized. But after MDA have reached low level, vaccine virus can reach the bursa and replicate. Under research conditions, immunological in-situ hybridization of the virus is used to evidence this.

For both individuals and flocks, replication timing depends on MDA level at day old. Replication starts earlier if MDA level is low than if MDA level is high. In SPF chicks, replication starts at around 8 to 9 days post-vaccination, while it usually starts at around 3 to 4 weeks in commercial broilers. The AAC vaccine actually adapts to the level of MDA present in each chicken, offering a real "a la carte" vaccination.

The vaccine has been tested in broilers provided with variable types and levels of passive immunity and to date, replication has always been observed.

How does the vaccine work in the field? The vaccine has been tested through many field trials conducted in different conditions of challenge, including very large trials in countries affected with the very virulent type of IBD virus. In all situations, the vaccine demonstrated very good efficacy and excellent safety. In field trials conducted in Brazil in about 20 million chicks (at around 1200 flocks) vaccinated with AAC vaccine versus similar numbers vaccinated with regular programmes, the overall percentage of clinical IBD breaks, was of 0,2% in AAC vaccinated flocks. In the vast majority of the cases, performance improved when compared to the controls, and only in a few circumstances, no positive difference was found.

The use of laboratory tools (histology, serology, RT-PCR, RFLP, sequencing) to monitor vaccine take revealed an incredible homogeneity of the results. In almost all vaccinated flocks, replication of the vaccine virus was evidenced between 21 and 28 days, while very variable results, including many failures, were observed in the controls.

THE INTEREST OF USING AN AAC IBD VACCINE

The main advantages associated with AAC IBD vaccine are the capacity to actually breakthrough MDA, hence the difficulties of timing vaccination, and the possibility to be given by automatic (*in-ovo*) or semi-automatic (sub-cutaneous) injection in the hatchery. The vaccine actually adapts to the MDA level, which means that heterogeneity of MDA levels between flocks and within flocks, is no longer an issue, and ELISA testing no longer necessary to time vaccination. Immunization process always occurs at the right time.

Practical consequence of this is that with this type of vaccine, IBD vaccination is made much simpler and more effective for the producers: one shot, one age, one vaccine.

Extensive testing of AAC IBD vaccine in the fields made clear that the vaccine systematically and reliably works in all vaccinated flocks (figure 1), contrary to what is commonly observed with farm vaccination using classical attenuated vaccines. This actually opens the door to a real control of the disease.

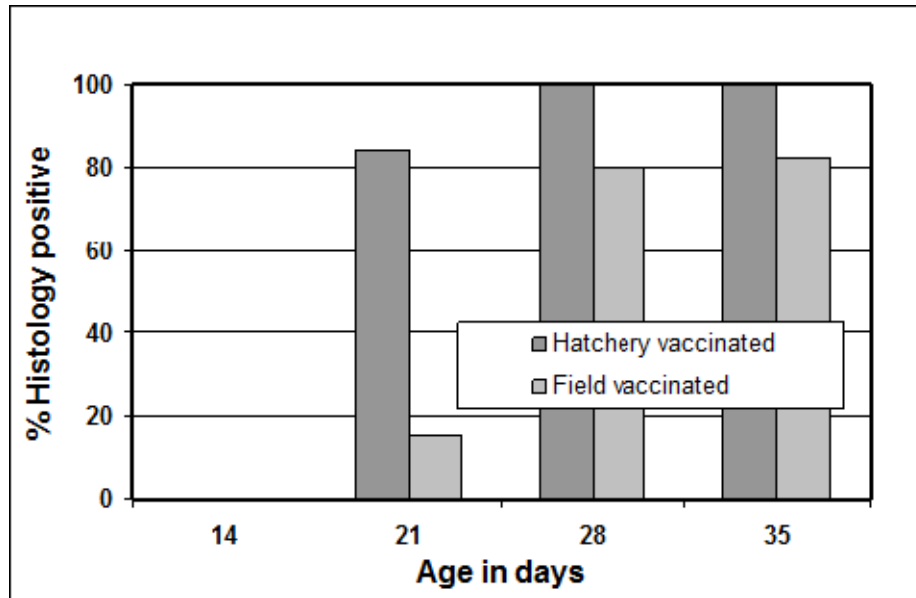
From laboratory as well as field trials, it was also made clear that protection is obtained against different IBD field viruses including classical virulent, sub-clinical as well as very virulent virus.

Another advantage associated with this AAC vaccine is the possibility to check the replication of the vaccine virus and the induction of an immune response at defined times, using simple (histology and serology) or more sophisticated (RT-PCR with RFLP or sequencing) testing methods. A simple and affordable testing procedure can easily be implemented that allows for a real global monitoring of the protection.

REFERENCES

1. Balaguer J.L., Romeo F., Cepero R., Lara C., Martino A., Rubio J.M., Gardin Y., Warin S., Palya V., Comte S. Empleo de una nueva vacuna de tipo complejo inmune frente a la enfermedad de Gumboro : resultados de campo. In proceedings XLIV Symposium científico de Avicultura AECA-WPSA, Valencia, Spain. October 24-26, 2007.
2. Gardin Y., Palya V., Sesti L., Alva B., Warin S., Comte S. Hallazgos recientes de la enfermedad de Gumboro : los lotes mal vacunados no están protegidos! (Latest findings on Gumboro disease: not vaccinated flocks are not protected). In proceedings XX Congresso Latinoamericano de avicultura (XX Latin American Poultry Congress), Porto Alegre, Brazil. September 25-28, 2007.

Figure 1. Summary of histological examination results from flocks vaccinated either “in-ovo” in the hatchery with the AAC IBD vaccine (19 flocks) or in the field (drinking water at 17 days of age) with a classical Intermediate Plus type IBD vaccine (20 flocks). Presence of lesions in the bursa indicated replication of the vaccine virus later confirmed by RT-PCR and sequencing. Five bursae were collected weekly from each flock. A flock was considered “histology positive” if at least one bursa showed typical lesions of IBDV replication.



REVERSE GENETICS OF INFECTIOUS BURSAL DISEASE VIRUS AS DIAGNOSTIC TOOL

LA GENÉTICA INVERSA DEL VIRUS DE LA INFECCIÓN DE LA BOLSA DE FABRICIO COMO HERRAMIENTA DIAGNÓSTICA

Alan Icard, Holly Sellers, and Egbert Mundt

Poultry Diagnostic and Research Center, University of Georgia, Athens, GA

RESUMEN

Actualmente se utilizan vacunas tanto comerciales como autógenas contra la infección de la bolsa de Fabricio. Se ha observado que durante el último tercio del período de desarrollo, los pollos presentan un incremento en la incidencia clínica de enfermedades respiratorias. Además, la respuesta inmunológica a las vacunas determinada mediante ELISA resultó baja. Este hallazgo sugiere que tal vez estén desempeñando un papel los virus causantes de inmunosupresión. Para investigar la antigenicidad de las cepas de campo que están circulando actualmente del virus de la infección la bolsa de Fabricio, se utilizó la genética inversa como herramienta diagnóstica. Se investigó la antigenicidad de las cepas de campo

usando plásmidos recombinantes mediante inmunofluorescencia con un panel de anticuerpos monoclonales (mAb), que caracterizan los subtipos antigénicos del citado virus, bajo un patrón específico. El 50% de los fragmentos construidos analizados dio como resultado un patrón de reacción específico para el subtipo E/Del. Por el contrario, ninguno de los fragmentos construidos restantes presentó capacidad de reacción con ninguno de los anticuerpos monoclonales utilizados, indicando que están circulando en el campo cepas del virus de un subtipo antigénico desconocido.

ABSTRACT

Currently, commercial as well as autogenous vaccines are used to control IBDV in the field. It has been observed that during the last third of the rearing period, chickens exhibited an increase in clinical respiratory disease. However, the immunological response to vaccinations was low as measured by ELISA. This finding suggests that viruses causing immunosuppression might play a role. To investigate the antigenicity of currently circulating IBDV field strains the reverse genetics approach was used as a diagnostic tool. The antigenicity of the field strains was evaluated by expression of the recombinant plasmids by immunofluorescence using a panel of monoclonal antibodies (mAb). The specific reactivity patterns are used to characterize the antigenic subtypes of IBDV. 30% of the analyzed constructs resulted in a reaction pattern specific for the E/Del subtype. In contrast the remaining constructs resulted in no reactivity with any of the mAbs used. This indicates that IBDV strains with an unknown antigenic subtype are circulating in the field.

INTRODUCTION

The characterization of IBDV field isolates started with its discovery in 1962 by Cosgrove (1). In the beginning, the IBDV isolates were mostly distinguished by their pathogenicity in the chicken model. Antigenic variation among IBDV strains isolated in the USA has been reported for over twenty years (4,7,9). So far the variant strains seem to be restricted to North America. However, recent reports suggest (3) that similar variant strains have arisen in Europe too. This suggested has been confirmed by the antigenic characterization of a variant strain isolated in Belgium (5). Variant strains are able to infect and cause disease in chickens with high levels of maternal antibodies against the older classical serotype 1 IBDV strains (7), which results in substantial economic losses. Cross neutralization assays show a restricted ability of sera from chickens vaccinated with classical IBDV to neutralize variant IBDV (2). Snyder *et al.* (8,10) established a panel of monoclonal antibodies (mAb; e.g. mAb 10, 57, R63, B69) for differentiation between several subtypes of IBDV variant strains (e.g. GLS and E/Del) and classical strains (e.g. D78). GLS and E/Del represent two different subtypes within the variant strains. Vakharia *et al.* (11) analyzed the amino acid sequences of several variant strains (e.g. GLS, E/Del) and classical strains (e.g. D78, PBG98). Based on the mAb reactivity pattern using the above described mAbs and a newly established mAb 67, specific amino acids possibly involved in the formation of virus-neutralizing epitopes were identified. The

established mAb were used to differentiate classical from variant IBDV strains and are used for analysis of IBDV field isolates in an antigen capture (AC)-ELISA as described previously (12).

Currently, commercial as well as autogenous IBDV vaccines are used in the poultry industry to control IBDV. It has been observed that during the last third of the rearing period, chickens exhibited an increase in clinical respiratory disease. However, the immunological response to vaccinations was comparable low as measured by ELISA. This finding suggests that viruses causing immunosuppression might play a role. To investigate the antigenicity of currently circulating IBDV field strains the reverse genetics approach was used as a diagnostic tool.

RESULTS AND DISCUSSION

For the establishment of this system, a full length cDNA copy of segment A and B of IBDV strains D78 (pD78A, pD78B) has been cloned based on the vaccine strain D78 as previously described (6). For the analysis of field strains an additional restriction enzyme cleavage site (*Spe* I) has been introduced by PCR-based site-directed mutagenesis. The resulting plasmid (pD78A-*Spe*I) was used for the subsequent experiments. The analysis of the fields isolates focused on the analysis of the nucleotide and the appropriate deduced amino acid sequence of the variable region of VP2. To this end, homogenates of bursal sample from chickens submitted from the field were homogenized and the RNA was extracted. The nucleotide sequence between nucleotide 201 and 1181 was amplified using appropriate oligonucleotides by a one-step RT-PCR. The obtained cDNA fragment was blunt-end cloned into the plasmid pCR2.1 using the Topo TA cloning Kit (Invitrogen). The cloned PCR fragment was sequenced. For a subsequent cloning procedure, the recombinant pCR 2.1 plasmid was cleaved with *Rsr* II/*Spe* I and the obtained DNA fragment encompassing the above mentioned VP2 region was ligated into the appropriately cleaved pD78A-*Spe* I. The presence of the appropriate insert was confirmed by sequencing. For analysis of antigenic properties of the region encoding the variable part of VP2, the recombinant plasmid was linearized with *Bsr* GI. In parallel pD78B was linearized with *Pst* I. Both linearized plasmids were used for transcription by T7 RNA polymerase and the obtained RNA was used for transfection of QM7 cells as described previously by Mundt and Vakharia (6). 24 after transfection the cells were fixed and processed for indirect immunofluorescence using monoclonal antibodies 57, 63, 67 and B69 (8,10,11). These monoclonal antibodies were kindly provided by Dr. Mebatsion and R. Hein (Intervet, Millboro, USA).

In the initial experiments, the possibility of transferring antigenic properties (here binding of monoclonal antibodies) by subcloning a cDNA fragment encompassing the coding region from nt 201-1181 of segment A was investigated. To this end, appropriate cDNA fragments of the E/Del subtype strain 8903 and GLS-05 (Intervet, Millsboro, USA) were amplified by RT-PCR cloned into pCR2.1. After sequence analysis the appropriate cDNA fragment was subcloned into pD78A-SpeI using restriction enzymes *Rsr* II/*Spe* I. The presence of the cDNA fragment was confirmed by sequencing. After co-transfection of the obtained cRNA with cRNA of segment B, immunofluorescence was performed. The results showed clearly that the reactivity pattern for the chimeric cRNA D78-8903 (57-, 63+, 67+, 69-) and D78-GLS05 (57+, 63-, 67-, 69-) following transfection, using the above described mAb, was identical to the appropriate wild type viruses. These results indicated that with the transfer of an appropriate cDNA fragment into pD78-Spe I the antigenicity of the wild type virus was also transferred. This also showed that the reverse genetics system can be used for the analysis of the antigenicity of virus samples without isolation of the virus.

Using this approach, field samples were investigated for their antigenicity. From each field sample three plasmids (p1, p2, p3) containing the appropriate cDNA fragment were sequenced. The amino acid sequence of the fragment was obtained by *in silico* translation. A data base was established using both the nucleotide and amino acid sequences. Plasmids containing amino acid sequences that differed from previously characterized IBVD strains were selected for further analysis by subcloning the appropriate cDNA fragment into pD78-SpeI to obtain a chimeric segment A. After appropriate transfection experiments, immunofluorescence was performed. The mAb reactivity patterns of the new chimeras were added to the data base now consisting of nucleotide sequence, amino acid sequence and the mAb reactivity pattern. A total of 19 field samples were analyzed. This resulted in 57 different nucleotide sequences and 46 different amino acid sequences (due to identical amino acid sequences based on the degenerate genetic code). Only those plasmids which encoded different amino acid sequences were used for transfection experiments.

Phylogenetic analysis of the nucleotide sequences showed that 16 nucleotide sequences belonged to the branch of the E/Del subtype, whereas the remaining sequences formed a separate branch which was not related to classical or GLS subtypes of IBVD. Phylogenetic analysis of the amino acid sequences showed that 14 amino acid sequences were within the branch of E/Del amino acid sequence and were identical with the nucleotide sequences. Transfection

experiments were performed with 46 plasmids and the immunofluorescence using the panel of monoclonal antibodies was performed. No reactivity pattern specific for classical IBVD was observed since no reactivity with a combination of 63 +/69+ was observed. 11 reactivity patterns resulted in a combination of 63+/67+ and two reactivity patterns each with either 63+ or 67+. In addition two reactivity patterns showed reactivity with 57 indicating a GLS subtype strain. Interestingly, the remaining immunofluorescences (39) showed no reactivity with any of the mAbs. To confirm that each transfection was successful, the presence of VP1 fluorescence was confirmed (only becomes visible if viral replication occurs, E. Mundt, unpublished data). The data indicated that E/Del subtype strains, as indicated by the presence of the epitope 67, are present in the field. Furthermore, GLS subtype strains (57+) are circulating but to a lesser extent. Of greatest interest is the majority of the isolates did not react with any of the mAbs. This finding suggests that probably a new antigenic subtype(s) is (are) circulating in the field with an unknown antigenic make up. The results of further analysis of the data were surprising after the mAb panel pattern was compared to the phylogenetic tree. Nucleotide sequences which were clearly E/Del subtype related showed no reactivity with mAbs 63 and/ or 67. In turn, nucleotide sequences which were clearly separated from the E/Del subtype showed an E/Del subtype mAb panel pattern (bootstrap value >84, 1000 replica). This indicated that the comparison of nucleotide sequences and/or homology searches are not reliable tools for subtyping IBVD viruses. Further analysis of virus isolates is necessary to include virus isolation and subsequent characterization of these isolates *in vivo* to determine the biological properties.

REFERENCES

1. Cosgrove, A.S. An apparently new disease of chickens - avian nephrosis. *Avian Dis.* 6: 385-389. 1962.
2. Ismail, N.M., Y.M. Saif, W.L. Wigle, G.B. Havenstein, and C. Jackson. Infectious bursal disease virus variant from commercial leghorn pullets. *Avian Dis.* 34: 141-145. 1990.
3. Jackwood, D.J., K.C. Cookson, S.E. Sommer-Wagner, H. Le Galludec, and J.J. de Wit. Molecular characteristics of infectious bursal disease viruses from asymptomatic broiler flocks in Europe. *Avian Dis.* 50: 532-536. 2006.
4. Jackwood, D.H., and Y.M. Saif. Antigenic diversity of infectious bursal disease viruses. *Avian Dis.* 31: 766-770. 1987.
5. Letzel, T., F. Coulibaly, F.A. Rey, B. Delmas, E. Jagt, A.A.M.W. van Loon, and E. Mundt.

Molecular and structural bases for the antigenicity of VP2 of infectious bursal disease virus. *J. Virol.* 81:12827-12835. 2007.

6. Mundt E., and V. N. Vakharia. Synthetic transcripts of double-stranded Birnavirus genome are infectious. *PNAS USA* 93: 11131-11136. 1996.

7. Rosenberger, J.K., S.S. Cloud, J. Gelb, E. Odor, and S.E. Dohms. Sentinel Birds survey of Delmarva broiler flocks. *Proceedings of the 20th National Meeting on Poultry Health and Condemnation, Ocean City, Md.*, 94-101. 1985.

8. 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. 1988a.

9. Snyder, D.B., D.P. Lana, A.P. Savage, F.S. Yancey, S.A. Mengel, and W.W. Marquardt. Differentiation of infectious bursal disease viruses

directly from infected tissues with neutralizing monoclonal antibodies: evidence of a major antigenic shift in recent field isolates. *Avian Dis.* 32: 535-539. 1988b.

10. Snyder, D.B., V.N. Vakharia, and P.K. Savage. Naturally occurring-neutralizing monoclonal antibody escape variants define the epidemiology of infectious bursal disease viruses in the United States. *Arch Virol.* 127: 89-101. 1992.

11. Vakharia, V.N., J. He, B. Ahamed, and D.B. Snyder. Molecular basis of antigenic variation in infectious bursal disease virus. *Virus Res.* 31: 265-272. 1994.

12. Van der Marel, P., D. Snyder, and D. Lütticken. Antigenic characterization of IBDV field isolates by their reactivity with a panel of monoclonal antibodies. *Deutsche Tierärztliche Wochenschrift* 97: 81-83. 1990.

PARÁMETROS DE OPTIMIZACIÓN PARA LOS PROCESOS DE VACUNACIÓN EN ASPERSIÓN Y EN EL AGUA DE BEBIDA

OPTIMUM PARAMETERS FOR BOTH SPRAY AND DRINKING WATER VACCINATION PROCESSES

José Luis Nuño^A y Jesús Cabriales^B

^AUnima Bioseguridad Integral

^BBoehringer Ingelheim Vetmedica

SUMMARY

Mass vaccination is a major tool for simple, efficient immunization of farm birds. The efficacy of these processes depends significantly on proper vaccination conditions including staff and water physicochemical characteristics. This paper summarizes a three year company technical/scientific experience to optimize vaccination operations by the drinking water and spray routes of administration, providing production managers with practical tools to improve vaccination efficiency.

DISCUSIÓN

La avicultura moderna demanda sistemas de vacunación que sean fáciles de aplicar, eficientes, rápidos y seguros, que cumplan el objetivo de proteger las parvadas contra las enfermedades que se desean inmunizar. El concepto de sistema de vacunación masivo está orientado a aumentar la ganancia del productor avícola mediante el ahorro en los costos de

vacunación relacionados con la mano de obra y el aumento de la productividad de la granja por la disminución en el estrés provocado por el manejo de las aves.

El concepto de sistemas de vacunación masiva engloba los sistemas de vacunación en el agua de bebida y la vacunación por aspersión los cuales pueden ser utilizados para inmunizar a las parvadas contra enfermedades del sistema respiratorio superior e inmune, incluyendo Newcastle, bronquitis infecciosa y Gumboro. Los sistemas de vacunación masiva evitan el manejo excesivo de las aves y por lo tanto ayuda al productor a optimizar sus procesos y mejorar sus utilidades. Los procesos de vacunación masiva bien realizados proveen al productor avícola de un método eficiente de vacunación, sin embargo es necesario conocer los factores críticos que influyen sobre la eficiencia del proceso, con el objetivo de optimizarlos para obtener los mejores resultados de éstos.

1) Calidad del agua de bebida. Las características fisicoquímicas del agua son

fundamentales para obtener una alta eficiencia en los procesos de vacunación. Si el agua en la que se habrá de realizar la vacunación no cuenta con la calidad mínima requerida, la viabilidad de la vacuna se verá puesta en riesgo. En el proceso de vacunación en el agua de bebida, tres son los principales factores fisicoquímicos del agua que afectan el proceso de vacunación en aspersión.

- *Contenido de sanitizantes en el agua:* en la mayoría de las aplicaciones de consumo de agua potable, el uso de un producto que controle el nivel de carga microbiológica del agua es fundamental para mantener su calidad. Dentro de los productos que generalmente se utilizan para este fin podemos encontrar el cloro, yodo y agentes oxidantes como el ozono. Sin embargo para los procesos de vacunación, la presencia de este tipo de productos es uno de los principales riesgos, ya que inactivará rápidamente la vacuna al entrar en contacto con el agua en la que se disuelve. Para un proceso de vacunación la presencia de sanitizante, incluso en trazas, es inaceptable. En diferentes estudios se han encontrado trazas de cloro incluso en el agua purificada y embotellada para consumo humano que en ocasiones erróneamente se cree totalmente adecuada para un proceso de vacunación.
- *Nivel de dureza en el agua:* la presencia de calcio y magnesio, en su forma de carbonato, son fenómenos naturales en las fuentes de agua tanto naturales como artificiales. La presencia de carbonato de calcio y de magnesio modifica la capacidad del agua de solubilizar un sustrato, provoca depósitos minerales en tuberías, bebederos y boquillas de aspersión, y modifica también el potencial eléctrico de la solución. En el primer caso, un contenido alto de dureza puede, además de provocar depósitos minerales en tuberías y bebederos, disminuir la solubilidad de la vacuna en el agua. En el segundo caso, los daños que puede generar la deposición de minerales en las boquillas de una máquina de aspersión puede modificar significativamente el tamaño de la gota y por lo tanto el perfil de vacunación realizado. En el tercer caso, un contenido alto de dureza podría provocar una modificación de la estructura terciaria del virus vacunal en solución, provocando la disminución de la capacidad inmunogénica

del virus e incluso inactivarlo. El nivel de dureza del agua depende en gran medida de las características del suelo y por lo tanto de la región. En estudios realizados (Figura 1) hemos encontrado que los niveles de dureza promedio se encuentran en rangos superiores a 100 ppm, y por lo tanto inadecuados para un proceso de vacunación, e incluso en algunas regiones del país puede llegar hasta 600 ppm. En el caso del agua purificada (Figura 3), hemos encontrado que el nivel de dureza es aún suficientemente alto para no ser considerada totalmente adecuada para su uso sin un control adecuado del nivel de dureza.

- *pH del agua:* la presencia de un nivel de pH alcalino o ácido puede dañar la viabilidad de la vacuna, ya que los iones ácidos o alcalinos provocarán la modificación de la estructura del virus o incluso su ruptura. Generalmente se espera que el pH más adecuado para un proceso de vacunación debe estar entre 7.2 y 7.4. Niveles de pH inferiores a 6 o superiores a 8 ponen en alto riesgo la estabilidad de la vacuna e incluso hacen efecto sinérgico con el nivel de dureza y la presencia de iones de cloro. Al igual que el nivel de dureza en el agua el pH es un factor determinado por las características del suelo donde se obtiene el agua, pero al mismo tiempo se ve afectado por cualquier proceso intermedio al que sea sometido. De esta forma, el agua obtenida de fuentes de agua donde los sustratos tengan altos niveles de mineralización el pH será marcadamente alcalino. Sin embargo los procesos posteriores de purificación pueden hacer variar el pH hasta un rango ácido. A través de estudios realizados a las características fisicoquímicos del agua de diversas regiones (Figura 1) hemos encontrado que en general el pH del agua de todas las regiones del país es inadecuado para la vacunación. En el caso del agua purificada, el pH es generalmente superior al recomendado e incluso en el caso del agua destilada (Figura 3), se ha encontrado que generalmente el pH puede llegar a caer incluso hasta un pH de 5.5, el cual incrementa significativamente el riesgo de daño a la estabilidad del virus.

Figura 1. Condiciones del agua encontradas en diferentes regiones avícolas del país.

| Estado | Ciudad | pH | Dureza | Cloro |
|------------------|-----------------|-----|---------|---------|
| Michoacán | Uruapan | 8.6 | 340 ppm | 2.0 ppm |
| Veracruz | Córdoba | 9.2 | 480 ppm | 1.0 ppm |
| Puebla | Tehuacán | 8.9 | 440 ppm | 1.0 ppm |
| Nuevo León | Monterrey | 8.8 | 320 ppm | 1.0 ppm |
| Coahuila | Saltillo | 9.4 | 600 ppm | 2.5 ppm |
| Nayarit | Tepic | 8.7 | 280 ppm | 1.5 ppm |
| Jalisco | Tepatitlán | 6.3 | 280 ppm | 0.0 ppm |
| San Luis Potosí | San Luis Potosí | 8.8 | 230 ppm | 1.0 ppm |
| Jalisco | Guadalajara | 8.1 | 210 ppm | 0.5 ppm |
| Querétaro | Querétaro | 8.6 | 240 ppm | 1.5 ppm |
| Colima | Colima | 6.4 | 220 ppm | 0.0 ppm |
| Jalisco | Acatic | 7.6 | 200 ppm | 1.5 ppm |
| Puebla | Tecamachalco | 8.7 | 320 ppm | 0.5 ppm |
| Estado de México | Jilotepec | 6.5 | 150 ppm | 0.0 ppm |

Figura 2. Condiciones del agua encontradas por el origen de la fuente.

| Fuente | pH | Dureza | Cloro | Coliformes |
|------------------|-----------|---------------|-----------|----------------|
| Agua municipal | 6.5 - 8.5 | 500 ppm | 1.5 ppm | 2 UFC/mL |
| Agua purificada | 6.5 - 8.5 | 200 ppm | 0.1 ppm | 0 UFC/mL |
| Agua destilada | 5.5 - 6.0 | 0 ppm | 0 ppm | 0 UFC/mL |
| Diluyente Ocular | 7.0 | 0 ppm | 0 ppm | 0 UFC/mL |
| Agua en granja | 6.0 - 9.2 | 150 - 800 ppm | 0 - 3 ppm | 0 - 100 UFC/mL |

2) Tamaño de gota. El proceso de vacunación en aspersión óptimo provee al productor avícola un método eficiente de vacunación masiva donde las variables climáticas no tienen ninguna interferencia como ocurre en la vacunación por el agua de bebida. Uno de los tópicos más citados como críticos en el proceso de vacunación en aspersión, pero al mismo tiempo menos estudiados, es el del tamaño de gota generado por los equipos de aspersión, que junto con la calidad del agua son los dos factores más importantes en la eficiencia del proceso.

Los sistemas de aspersión, dependiendo de su naturaleza, pueden producir rangos de gotas bastante amplios que van desde los 50 µm a los 250 µm. Un tamaño de gota grande, de entre 150 µm y 250 µm se depositará generalmente sobre las plumas del ave, lo que provocará que el ave se acicale y por lo tanto la vacuna entrará por vía digestiva. Un tamaño de gota en el rango de 30 µm a 100 µm, considerado un tamaño de gota fino, tenderá a mantenerse en suspensión en el aire y por lo tanto será respirado, junto con la vacuna, por las aves. Finalmente, un tamaño de gota en el rango de 100 µm a 150 µm se considera un tamaño de gota medio, y presenta características mixtas de los anteriores tamaños.

Por lo general, las gotas mayores a éste rango tenderán a depositarse más rápidamente, mientras que las gotas más pequeñas tenderán a evaporarse debido a

la gran área superficial a la que están sometidas. Estos dos fenómenos pueden provocar una pérdida importante de la vacuna. Un spray muy fino permitirá una entrada mucho más profunda en el tracto respiratorio del ave, permitiendo una respuesta inmunogénica más intensa que puede incluso llegar a una reacción postvacunal muy severa que dañe la productividad de la explotación.

Análisis del tamaño de gota. Un aerosol es una dispersión de un líquido en un gas, que incluye la dinámica de la formación de gotas. El tamaño y la densidad del número de gotas comprenden un espectro que va desde nieblas dispersas hasta gotas de gran tamaño. Usualmente son formadas por un dispositivo atomizador que funciona a altas velocidades. La elección del tipo de aspersor y su funcionamiento depende completamente de la aplicación que se le dará.

El mecanismo más simple para la creación de una corriente de spray es la desintegración de un jet laminar que fluye a través de un orificio circular. Se ha encontrado que la formación de las gotas se ve directamente afectado por la tensión superficial del líquido, las fuerzas inerciales y la viscosidad del fluido. A bajas velocidades del gas acarreador se forman gotas de mayor tamaño, mientras que a velocidades muy altas se forman partículas que llegan a alcanzar apenas pocos micrómetros de diámetro.

Debido a que los tamaños de gota entregados por un aspersor no son iguales, es importante conocer como se distribuyen estos tamaños a fin de determinar cual es el tamaño más probable a obtener. En el caso de la vacunación en aspersión, este aspecto resulta de vital importancia ya que si no se tiene la seguridad del rango de tamaño con el cual se vacuna puede correrse el peligro de aumentar la severidad de las reacciones postvacunales, en el caso de usar un tamaño de gota menor al ideal, o de que la dosificación sea deficiente, en el caso de usar una gota de mayor tamaño al máximo recomendado para cada vía de aplicación.

El tamaño de la gota en el sistema depende de diversas variables, como la viscosidad de la solución vacunal, la tensión superficial de la misma, la velocidad del flujo de aire y la velocidad del flujo de agua. Considerando que siempre se preparará la solución de la misma manera, la viscosidad y la tensión superficial de esta serán constantes bajo condiciones normales de operación. De esta forma, las únicas variables que afectan el tamaño de partícula son la velocidad de flujos de aire y agua.

Pueden utilizarse técnicas tradicionales de estadística para analizar éste caso, y en la mayoría de los casos se utilizan curvas de tipo gaussianas. Por lo general se utiliza un diámetro medio para caracterizar al sistema, y para encontrarlo pueden utilizarse varios criterios, además del de la probabilidad gaussiana:

1. Media aritmética: promedio simple basado en los diámetros de todas las partículas individuales en la muestra:

$$D_L = \frac{\sum N_s \times D_s}{\sum N_s}$$

2. Volumen medio: diámetro de la partícula cuyo volumen multiplicado por el número total de

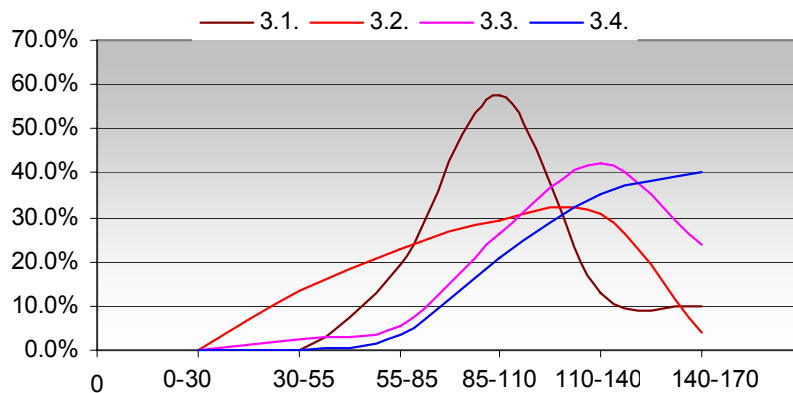
partículas iguala el volumen total de la muestra:

$$D_V = \left[\frac{\sum N_s \times D_s^3}{\sum N_s} \right]^{\frac{1}{3}}$$

Se han publicado muchas técnicas para la medición del tamaño de gota en aspersores. Sin embargo ninguno de los métodos puede definirse como completamente satisfactorio. Se considera que el método óptimo no debe interferir con el patrón de formación del spray, que permita una rápida toma de muestras, que permita un rápido conteo de muestras y que tenga un buen grado de discriminación con respecto a todo el rango muestreado. La mayoría de éstas técnicas están basadas en fenómenos ópticos, como la difracción de la luz, absorción y los métodos de holografía por láser.

Sin embargo, éstas técnicas son realizadas a nivel laboratorio por lo que no representan la realidad del proceso de vacunación en la granja. Para el fin de medir el tamaño de partícula real que se aplica en las aves se desarrolló un proceso nuevo, utilizando una combinación de captura de gotas en papel hidrosensible, microfotografía y análisis de imágenes por métodos vectoriales, ya que este método resulta apropiado para realizarse directamente en campo, obteniendo los resultados necesarios para la evaluación en minutos. Los datos obtenidos se analizan estadísticamente y se obtienen las respectivas distribuciones de porcentaje de gotas para cada rango de diámetro (Figura 3).

Figura 3. Ejemplo de análisis estadístico de tamaños de gota.



4) Aditivos para el proceso de vacunación. Con el objetivo de mejorar la eficiencia de los procesos de vacunación en la granja, principalmente la estabilidad de la vacuna durante el proceso de vacunación, una gran variedad de aditivos han sido recomendados. Sin embargo, a través de la experiencia se ha demostrado que algunas funciones que se les atribuyen no generan un beneficio tangible y en algunos casos pueden provocar problemas relacionados. Entre los principales aditivos tenemos los siguientes:

- *Estabilizadores de vacuna basados en leche o derivados:* Productos formulados con leche o alguno de sus derivados, generalmente recomendados como neutralizadores de cloro y estabilizadores para los procesos de vacunación. La capacidad neutralizadora efectiva de cloro de estos productos es baja y generalmente cercana a 3 ppm. Una de las principales desventajas del uso de este tipo de productos es su dificultad para ser diluidos, lo que puede provocar taponamientos por grumos de válvulas y bebederos, así como de las boquillas de los equipos de aspersión. También debido a que la leche es un sustrato altamente nutritivo para las bacterias, puede estimular la formación de biopelículas de organismos patógenos en los sistemas de transporte de agua en la granja, lo que daña la salud de las aves en producción. De la misma forma, por su naturaleza, el calcio contenido en el producto puede incrementar significativamente el nivel de dureza del agua y por lo tanto la posibilidad de formación de depósitos minerales insolubles que pueden bloquear tuberías y bebederos y dañar seriamente los equipos de vacunación en aspersión.
- *Estabilizadores de vacuna de naturaleza química:* Productos formulados generalmente para neutralizar el nivel del cloro en el agua utilizada para los procesos de vacunación. Este tipo de productos son muy adecuados para la aplicación, debido a su alta solubilidad y su incapacidad de estimular el crecimiento bacteriano. Sin embargo debe tomarse en cuenta que es necesario también controlar las condiciones de pH y nivel de dureza en el agua, que son tan importantes como la presencia de cloro. Deberá buscarse un producto, o productos, que sean capaces de estabilizar estas tres variables. Es importante hacer notar que en el caso de los productos que tienen efecto efervescente, deberá siempre medirse el pH final de la solución, ya que el efecto efervescente puede acidificar la solución más allá de un nivel adecuado y por

lo tanto poner en riesgo la estabilidad de la vacuna.

- *Colorantes:* el uso de un colorante, generalmente color azul FD&C número 1, es una herramienta muy útil para medir la eficiencia del proceso de vacunación en la granja. El colorante le permitirá al vacunador observar la extensión y el número de aves vacunadas, tanto es los procesos de vacunación en el agua de bebida y en los procesos de vacunación en aspersión. Al utilizar un colorante deberá asegurarse que éste sea grado alimenticio, ya que de lo contrario éste podría contener trazas de metales pesados que progresivamente pueden acumularse en carne, huevo y subproductos del ave. Igualmente, en el caso del uso de un colorante con características efervescentes, deberá siempre medirse el pH final de la solución para evitar una acidificación significativa de la solución. Por lo tanto deberá considerarse minuciosamente la elección de aditivos a utilizar, ya que su uso tendrá un efecto directo sobre la eficiencia del proceso de vacunación.

6) Condiciones de manejo. Hemos encontrado que algunas condiciones de manejo pueden afectar la eficiencia global del proceso de vacunación, por lo que deberán considerarse como factores a controlar:

- *Salud de la parvada:* Como en el caso de cualquier sistema de vacunación, al vacunar a un animal enfermo podemos exacerbar su enfermedad o bien la vacuna no tendrá el efecto esperado, por lo que la parvada debe ser una clínicamente sana.
- *Medicación:* generalmente es preventiva, encausada a minimizar la presencia de patógenos tales como *Mycoplasma synoviae* (Ms), *Mycoplasma gallisepticum* (Mg) o problemas como Infección del Saco Vitelino (ISV); se debe encontrar una manera adecuada de controlar éstos ya que pueden interferir con la vacuna o causar reacciones postvacunales muy severas al utilizar la técnica de vacunación en aspersión.
- *Limpieza y desinfección:* Una buena limpieza y desinfección de las granjas disminuye la carga o la densidad microbiana ambiental, mejora las condiciones de la caseta y por ende disminuye el riesgo de las aves frente a agentes patógenos. En el caso de la vacunación en el agua de bebida deberá tenerse un especial cuidado en la limpieza de los sistemas de transporte de agua, válvulas o bebederos, ya que la acumulación de

biopelículas o sedimentos afectarán negativamente la eficiencia de la vacuna.

- *Manejo e Instalaciones:* Contar con el número de bebederos y comederos suficientes. La buena ventilación, cambios bruscos de la temperatura durante el día y la noche, así como la humedad relativa y la cama mantendrán confortables a las aves, habrá menor estrés y la respuesta a la vacunación será mejor.
- *Eliminación de Desechos:* Realizar buenas prácticas de eliminación de desechos mantiene alejada la fauna silvestre como ratas, perros, gatos etc. que en la mayoría de los casos son vectores de éstas enfermedades.
- *Control de Plagas:* Los insectos, ácaros moscas, etc., así como roedores son transmisores de enfermedades a las parvadas y al hombre, por lo que es adecuado llevar un programa de control de plagas.
- *Cadena fría:* Dado que el virus se suministra como virus vivo, deben tomarse las medidas necesarias para asegurar su viabilidad. El almacenamiento del producto desde su elaboración hasta el momento de la aplicación a una temperatura que comprenda los 2-6°C. Nunca se deberá congelar ningún tipo de producto. No es necesario refrigerar el diluyente, pero es recomendable atemperarlo antes de reconstituir la vacuna para evitar un choque térmico severo.
- *Almacén:* El lugar de almacenamiento es un área específica con las dimensiones y temperatura adecuadas, que proteja la vacuna de los rayos solares. El refrigerador cuenta con las mismas características, permite ordenar las vacunas de acuerdo a registros y evita la manipulación innecesaria de productos.
- *Registros:* La elaboración de registros para todos los insumos es una práctica rutinaria para la empresa, en el caso de los biológicos es necesario anotar el nombre de la vacuna, fecha de ingreso, número de lote, fecha de caducidad, número de dosis por vial, granja en que se utiliza y comentarios. La elaboración de registros permite realizar una mejor

evaluación de resultados y desempeño de las aves en relación a los productos utilizados.

- *Previo a la Reconstitución de Vacunas:* El lugar de la reconstitución debe ser higiénico y el personal altamente capacitado. En condiciones normales de campo es poco probable realizar una práctica 100% adecuada. La creación de conciencia y capacitación al personal sobre la importancia del buen manejo de los biológicos y sus repercusiones, es indispensable. Es necesario revisar el estado físico de la pastilla, cuando se encuentran variaciones dentro de un mismo lote de vacunas es indicativo de un mal manejo de las vacunas durante su recorrido desde el almacén hasta la granja.
- *Procedimientos de vacunación:* Al utilizar la técnica de vacunación en aspersión es recomendable cerrar las cortinas y reducir o suspender la ventilación mientras se esté vacunando. Es preferible vacunar a horas tempranas del día y se deberá mantener una distancia entre la boquilla y las aves de al menos un metro. Es preferible evitar el uso de gotas grandes, se deberá tratar de agrupar las aves a los lados de la caseta para mejorar la uniformidad en vacunaciones de alta densidad.

CONCLUSIONES

Los métodos de vacunación masiva, la vacunación en el agua de bebida y la vacunación en aspersión, son herramientas muy útiles para la producción avícola moderna, ya que proveen de procesos flexibles y económicos para mantener un alto nivel de protección en las parvadas a un bajo costo, lo que permite optimizar los costos de la explotación y aumentar las utilidades. Sin embargo, es importante recalcar que estos procesos son multifactoriales, por lo que sus eficiencias se ven afectadas por varias condiciones que es necesario entender y para poder controlar.

EFFECTS OF CHICKEN ANEMIA VIRUS AND INFECTIOUS BURSAL DISEASE VIRUS IN COMMERCIAL CHICKENS

EFFECTOS DE LOS VIRUS DE LA ANEMIA DEL POLLO Y DE LA INFECCIÓN DE LA BOLSA DE FABRICIO

H. Toro, V. L. van Santen, F. W. van Ginkel, F. J. Hoerr, and C. Breedlove

Department of Pathobiology, 264 Greene Hall, Auburn University, AL 36849, USA

RESUMEN

Evaluamos los efectos de la infección dual con los virus de la anemia del pollo y de la enfermedad de Gumboro [estándar (APHIS) y variante (AL2)] en pollos con niveles elevados de anticuerpos maternos específicos contra ambos patógenos. La ganancia de peso de los pollos que recibieron la infección dual se afectó significativamente. El virus de la anemia persistió a niveles marginales en el timo de todos los grupos de ponedoras infectadas con él, hasta los 30 días de edad. El día 39, las aves inoculadas con el virus de la anemia infecciosa solo y los que se infectaron con éste más el virus APHIS fueron positivos a genomas del virus de la anemia en el timo. Los índices de la bolsa de Fabricio se afectaron tanto con la cepa variante como con la cepa estándar. Las ponedoras infectadas con la combinación CAV+AL2 presentaron los niveles más altos de genomas del virus de la anemia y las bolsas de Fabricio más afectadas durante la primera mitad del período experimental. La combinación CAV+APHIS indujo atrofia de la bolsa de Fabricio a los 25 días de edad y seroconversión al virus de la enfermedad de Gumboro. Los pollos de engorda no se afectaron significativamente con la inoculación de estos virus. Se contó con el apoyo del donativo # 629 de la Asociación Estadounidense del Pollo y el Huevo.

SUMMARY

We reported previously that commercial broilers frequently show thymus and/or bursal atrophy, likely associated with chicken anemia virus (CAV) and infectious bursal disease virus (IBDV), between days 20 and 40 of age. We evaluated the effects of experimental dual infection with CAV and IBDV in layer or broiler chickens from commercial sources with high levels of specific maternal antibodies against both pathogens. The outcomes of three different situations were evaluated in the following trials: 1) Layer chickens with maternal immunity were challenged once with CAV intramuscularly at 3 days of age and with either an IBDV standard strain (APHIS) or a

variant strain (AL2) orally at 7 days of age. Additional chicken groups were inoculated with each virus alone or were uninfected controls. 2) Broiler chickens with maternal immunity were vaccinated *in ovo* with an IBDV standard vaccine or inoculated orally with the AL2 strain at day 7 after hatch and inoculated with CAV intramuscularly at three days of age. 3) Broiler chickens with maternal immunity were vaccinated *in ovo* with a standard IBDV vaccine strain and challenged twice with both CAV and the AL2 strain, on days 3 and 14 of age via the oral route. Hematocrits, bursal indices, and body weights were recorded and analyzed through day 39 of age. In addition, birds were sampled multiple times for viral genome quantitation, histomorphometry and serology.

All layer chickens that were subjected to dual infection with CAV and IBDV had high levels of antibodies against both pathogens prior to challenge. In spite of maternal immunity, mean hematocrits of all chicken groups inoculated with CAV (CAV, CAV+AL2, CAV+APHIS) were lower ($P>0.05$) than uninfected chickens. The weight gain was significantly reduced ($P<0.05$) in CAV+AL2 infected chickens. IBDV APHIS alone or in combination with CAV did not affect the weight gain. However, on day 25 of age and concomitantly with maternal antibody decay, the bursae of APHIS-infected birds began to atrophy. These birds also seroconverted against IBDV 10 days later. CAV persisted at low levels in the chickens throughout the experimental period and resumed replication towards the end of the experimental period in CAV and CAV+APHIS infected chickens.

The weight gain of all virus-infected broilers in trials 2 and 3 was not affected significantly. In trial 2 a significant depletion of thymic lymphocytes ($P<0.05$) was detected in broilers that were vaccinated with IBDV *in ovo* and inoculated with CAV. The bursa of these birds was not affected as measured both by bursal index and bursal histomorphometry. Chickens became seronegative for both IBDV and CAV around day 15 of age and remained seronegative throughout the experimental period. Broilers of trial 3 inoculated with IBDV in combination with CAV showed reduced

bursal indices ($P<0.05$). Both IBDV only and IBDV+CAV inoculated broilers seroconverted against IBDV after day 30 of age. Collectively, our results indicate that exposure to CAV and IBDV likely influences the immune status and/or production performance of commercial chickens in spite of

maternal immunity or vaccination against these avian pathogens.

(Full length article has been submitted for publication to *Avian Diseases*.)

Supported by U.S. Poultry & Egg Association Award #629.

WHY COMMERCIAL POULTRY PRODUCTION SHOULD BE INTERESTED IN COCCIDIOSIS

¿POR QUÉ LA AVICULTURA COMERCIAL SE DEBE INTERESAR EN LA COCCIDIOSIS?

Steve H. Fitz-Coy

Schering-Plough, Salisbury, MD 21801

RESUMEN

Las coccidias dañan los tejidos del huésped y, como secuela, pierden peso, presentan mala utilización del alimento, pigmentación deficiente y mortalidad. Las coccidias están presentes casi en todas las casetas comerciales y representan una amenaza para la salud de los animales. Estos prolíficos microorganismos son resistentes a varias condiciones ambientales, pero son susceptibles a la desecación. Durante las diversas etapas de su desarrollo destruyen los tejidos del huésped y el daño es directamente proporcional al número de coccidias y a la especie de *Eimeria* que se haya ingerido. El monitoreo de la coccidiosis es esencial para lograr un buen control, manteniendo así a las aves en buenas condiciones de salud y con buena productividad. Si el control es adecuado la carga parasitaria será baja y la destrucción celular será mínima. El monitoreo de la coccidiosis en la avicultura comercial se logra mediante varios métodos, como la realización rutinaria de necropsias, las pruebas de sensibilidad a los anticoccidianos, los conteos de oocistas, la evaluación de las heces y el índice de producción. Cada método tiene pros y contras, pero la combinación de varios de ellos y su aplicación de manera siempre igual generarán datos útiles y confiables.

SUMMARY

Coccidia are present in almost all commercial poultry houses, and pose a threat to the health of the animals. Coccidia damage host tissue and the sequel is weight loss, impaired feed utilization, poor pigmentation and or mortality. These prolific

organisms are resistant to several environmental conditions, but susceptible to desiccation. Host tissue is destroyed during the development of various stages and the damage is directly related to the number of coccidia and species of *Eimeria* ingested. Monitoring coccidiosis is essential in achieving control, thus maintaining good bird health and productivity. Good control facilitate low parasite burden resulting in minimal cells destroyed. Monitoring coccidiosis in commercial poultry is achieved via several methods: routine necropsy, anticoccidial sensitivity tests, oocysts counts, evaluation of fecal droppings and production index. Each method has positives and negatives, but a combination of methods and consistency in the methods chosen will provide useful and reliable data.

INTRODUCTION

Coccidiosis is a disease of worldwide importance to commercial poultry operations. During the parasite development in the host, there are several asexual multiplications followed by a sexual union forming a zygote. These replications cause tremendous destruction to the host tissue, which may impair food intake, digestion and absorption, and even mortality. Controlling coccidiosis is keeping a low parasite burden by having a low intake of coccidia and having a low replication rate which result in minimal cells destruction and over time immunity will be developed. Secondly, managing anticoccidial drug resistance requires long-term plans which may require the incorporation of multiple anticoccidial compounds in conjunction with live effective biologics in a program. Extensive use, overuse or abuse of anticoccidial drugs

have lead to the development of drug tolerant or even drug resistant coccidia. Using rotation as a single pronged approach against drug tolerance and or resistance is futile, thus a multi-pronged approach might be more effective. Rotation of products and or shuttling the products in and out, routine necropsy sessions, regularly testing drug responsiveness (anticoccidial sensitivity test – AST) and regular oocysts counts from litter or droppings are more meaningful to manage coccidiosis.

Observations reported here are from necropsy sessions and periodic anticoccidial sensitivity test (AST) over time from complexes in three different states.

Complex A: Necropsy data over several years showed that the prevalence of *E. acervulina*, *E. maxima* and *E. tenella* based on microscopic evaluations were 33%, 45% and 9%, respectively. During the early years, *E. acervulina* was more prevalent than *E. maxima*. With the use of specific anticoccidials over the summer months, the prevalence of *E. maxima* increased and remained fairly high. There was a tendency for a downward trend in the prevalence during the winter months. This appeared to be associated with the use of specific anticoccidial. The AST data were in agreement with the findings from the necropsy data.

Complex B: Necropsy data over several years period showed the prevalence of *E. acervulina*, *E. maxima* and *E. tenella* based on microscopic evaluations were 19%, 47% and 4%, respectively. The level of *E. maxima* stayed high. But there were periods

of relatively good control using specific anticoccidial programs. Ionophores were used as products of choice for control during the summer months. Following specific necropsy sessions, projections were made as to the current programs' effectiveness or that program's usefulness in the near future. The AST data supported the findings from the necropsy data.

Complex C: Necropsy data over several years period showed the prevalence of *E. acervulina*, *E. maxima* and *E. tenella* based on microscopic evaluations were 25%, 41% and 5%, respectively. The levels of *E. maxima* and *E. acervulina* bounced back and forth during the early periods. However, the prevalence of *E. maxima* remained high for the past couple of years. But there were periods of relatively good control with specific programs. Specific ionophores were routinely used as products of choice for coccidia control. Following specific necropsy sessions, projections were made about the effectiveness of the current coccidia control program and also projected what the future might be with that program. The AST data supported the findings from the necropsy data.

On several occasions when the current necropsy data were compared to the previous, predictions were made based on the change in the trend. Clinical outbreaks of coccidiosis due to *E. maxima* occurred before the next or subsequent necropsy session. AST data also provide reasonable information, this allow projection to be made about potential product usefulness in a prospective program.

THE SIGNIFICANCE OF OBSERVED PATTERNS OF SUBCLINICAL *EIMERIA* SPP. CHALLENGE ON BROILER PERFORMANCE

SIGNIFICADO DE LOS PATRONES OBSERVADOS CON COCCIDIOSIS SUBCLÍNICA SOBRE EL RENDIMIENTO DEL POLLO DE ENGORDA

Linnea Newman^A, Greg Mathis^B, R. G. Teeter^C, Matilde Alfonso^A, and Charles Broussard^A

^ASchering-Plough Animal Health, Summit, NJ

^BSouthern Poultry Research, Athens, GA

^CDepartment of Animal Science, Oklahoma State University, Stillwater, OK

linnea.newman@spcorp.com

RESUMEN

Se determinó el patrón del desafío subclínico con *Eimeria* spp. (especies de este género, edad de las aves y severidad del desafío) en varias granjas y bajo diferentes condiciones de manejo. Las variables

incluyeron: a) crianza en cama limpia; b) crianza en cama limpia y paso a cama caliente; c) uso de cama caliente durante todo el ciclo; d) elevada densidad de población; e) densidad baja; f) crianza en caseta completa; y g) crianza sólo en una parte de la nave. Se

realizaron conteos de oocistos en secuencia y necropsias a diferentes edades para medir y definir el desafío coccidiano. Siempre que fue posible, estos datos se compararon con la información de crecimiento de pollos criados en casetas con básculas integradas. Parece que los modelos descritos por Teeter *et al.* (Universidad Estatal de Oklahoma, EE.UU.) son capaces de predecir el impacto de la coccidiosis subclínica cuando se presenta durante los últimos días de la engorda. El significado del impacto de la coccidiosis subclínica tardía sobre el rendimiento requiere el análisis de estrategias alternativas de manejo de esta enfermedad, incluyendo modificaciones zootécnicas en la crianza, inclusión de anticoccidianos en el alimento hasta el sacrificio o el uso de vacunas vivas para inducir la inmunidad temprana.

SUMMARY

Coccidiosis control with in-feed anticoccidial medications is no longer complete “control” as it was 25 years ago when many of today’s products were introduced. Sometimes we still see temporary complete control, as with the re-introduction of Coyden® (clopidol) to the US market in 2005 (Figure 1). But most coccidiosis control in broilers is now dependent upon *immunity*: either natural immunity, moderated by anticoccidial drugs or immunity developed through vaccination. The successful development of immunity is moderated by *management style*: clean vs. reused litter, stocking density and house management conditions all impact when and how immunity develops.

Control is successful: we rarely see clinical coccidiosis breaks. However, the broiler industry is performance-driven, and it is based upon broiler genetics that result in a non-linear growth curve. The development of immunity to coccidiosis requires exposure to multiple life cycles of *Eimeria* spp. This necessary exposure causes an adverse impact on weight gain and feed conversion. But the impact will be a different magnitude depending upon where it occurs on the non-linear growth curve.

Research by R.G. Teeter *et al.* (presented at this conference in a poster) has demonstrated the impact of low-level (subclinical) coccidiosis challenge at different points along the growth curve. Broilers housed in calorimetry chambers provided statistically significant data demonstrating a progressively worse impact of subclinical coccidiosis challenge with age on weight and feed efficiency. In other words, late challenge with subclinical coccidiosis hurt weight and feed efficiency the most. Earlier challenge allowed some time for recovery, with less effect on weight or feed efficiency. (Figures 2 and 3).

Dr. Teeter’s work is important because many of our current coccidiosis control programs shift the immunity building process to the last two weeks of a broiler’s life – when the most significant weight is to be gained and the greatest amount of feed will be consumed, and when there is the greatest potential for performance loss.

Surprisingly, cleaning out houses works *against* the immunity building process, causing an even greater impact late in the life of a broiler. Clean litter prevents a gradual development of immunity with early exposure to coccidia. Instead, coccidial populations explode after 28 days, with higher peaks and greater potential impact on the weight gain of the broiler. Actual oocyst counts from clean litter (Canada) demonstrate the pattern of *Eimeria* spp. oocyst shedding in houses that are full-house brood, started on clean litter with mandatory two-week (or greater) down time (Figure 4). One farm from Ontario collected oocysts and daily weights from the same broiler flock. The impact of the late subclinical challenge is seen as the weight diverges from the Ross 308 published breed standard (Figure 5). This is a real-world example of the model developed by Teeter *et al.* in Figure 2.

Half-house brooding on reused litter produced different patterns based upon density and litter use. Higher density (<0.80 ft²/bird)(<0.07 m²/bird) on heavily reused litter from the Delmarva Peninsula produced an early oocyst peak at 19 days, regardless of whether the program was Maxiban® (Nicarb-narasin) or salinomycin (Figure 6). Low density (1.0 ft²/bird) (0.09 m²/bird) from half-house brooding on reused litter after two flock cycles produced a later pattern similar to the clean houses (Figure 7).

Vaccination also demonstrates some variability in the development of immunity, but the pattern is consistently earlier than natural immunity programs using anticoccidials. Flocks started in half-house on reused litter peak at 19 days (Figure 8), while those started in the full house on clean litter show a delayed peak at 25 days (Figure 9).

Poultry companies that wish to maximize the genetic performance potential of broilers should analyze their coccidiosis control programs with respect to when immunity is completed on their growth curve, and the consistency of that timing over the full production year. Some programs (such as the half house brooding program on heavily reused Delmarva litter) appear to produce very consistent results. Other programs vary by season and by anticoccidial choices. Broiler house management and coccidiosis control programs should work together to induce earlier immunity to maximize broiler performance.

Figure 1
Clopidol 2007
Fecal oocyst counts by age
True coccidiosis “control”

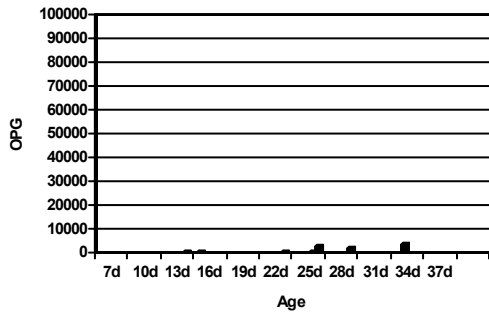


Figure 2
Mild Coccidiosis Lesion Scores (1 or 2) vs.
Weight with Challenge at Different Ages
(from Teeter *et al.* 2008)
Later Challenge = More Dramatic Effect

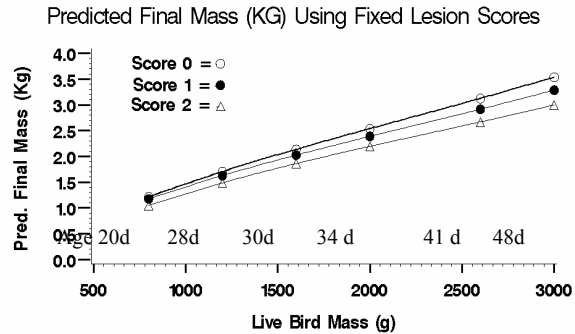


Figure 3
Mild Coccidiosis Lesion Scores (1 or 2) vs.
Feed Efficiency with Challenge at Different
Ages (from Teeter *et al.* 2008)
Later Challenge = More Dramatic Effect

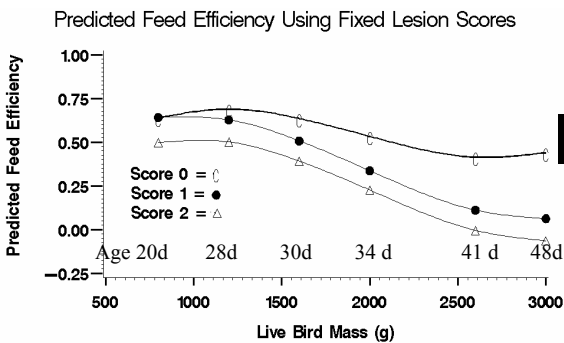


Figure 4
Canada clean litter
BC and Ontario 2006-07 (various anticoccidials)
Development of Immunity: 30 – 35 days

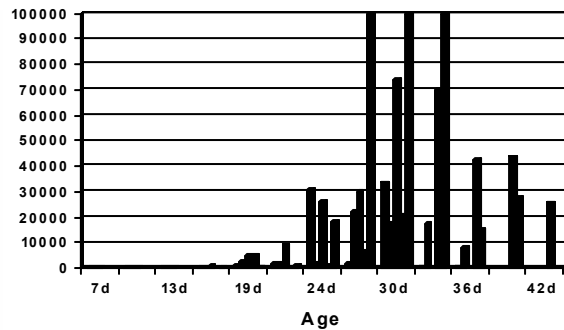


Figure 5
Clean litter oocyst counts vs. actual growth curve
(Compared with Ross 308 male 2007 standard)

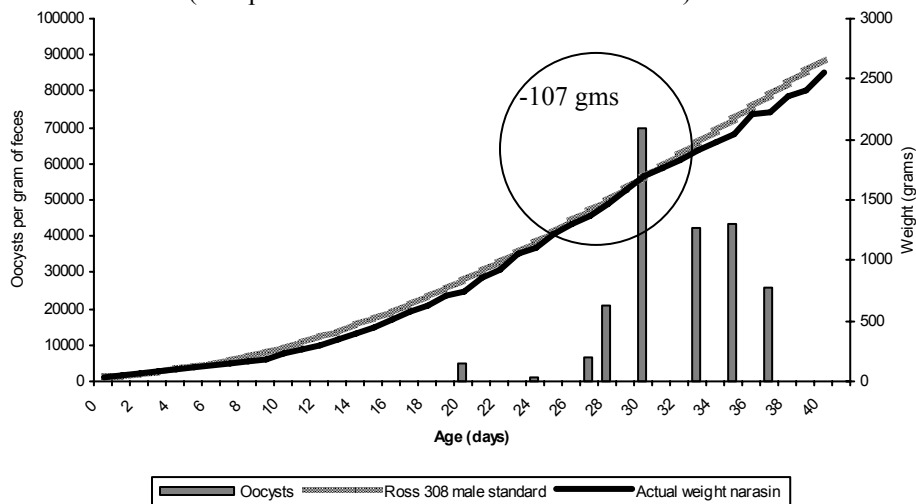


Figure 6
Half house brood, heavily reused litter
Density $0.80\text{ft}^2/\text{bird}$

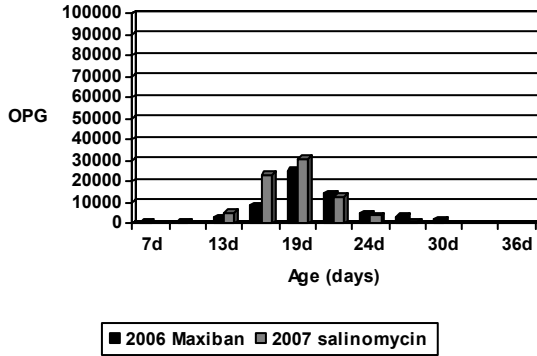


Figure 7
Half house brood, litter reused two flocks
Density $1.0\text{ft}^2/\text{bird}$

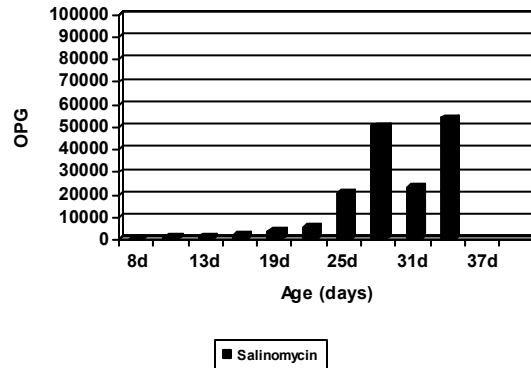


Figure 8
Half house brood, reused litter, Coccivac®-B
density $0.8\text{ft}^2/\text{bird}$

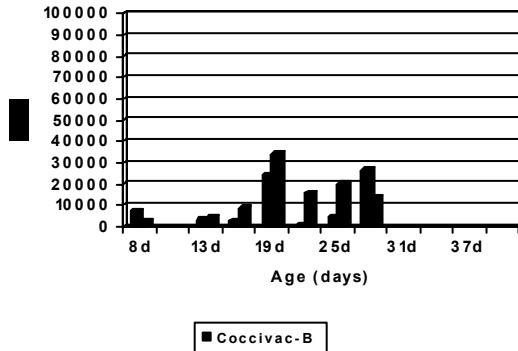
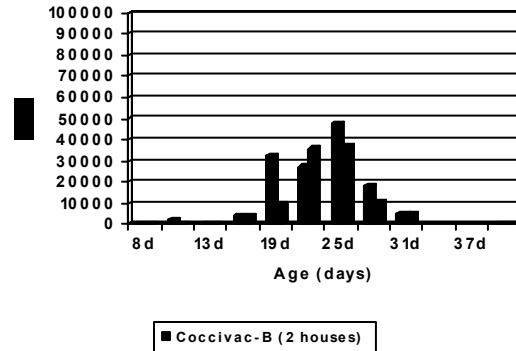


Figure 9
Full house brood, clean litter Coccivac®-B
Density $0.8\text{ft}^2/\text{bird}$



THE SIGNIFICANCE OF COCCIDIA OOCYST SHEDDING PATTERN IN COMMERCIAL TURKEYS

SIGNIFICADO DEL PATRÓN DE DISEMINACIÓN DE OOQUISTES DE COCCIDIAS EN PAVOS COMERCIALES

John Radu^A, Greg Mathis^B, and Linnea Newman^A

^ASchering-Plough Animal Health, Summit, NJ email: john.radu@spcorp.com
Phone: 843-215-0166, Fax: 843-215-5571 E-mail: john.radu@spcorp.com

^BSouthern Poultry Research, Athens, GA

RESUMEN

Resulta difícil evaluar el control de la coccidiosis en pavos, aunque puede tener un impacto significativo sobre la uniformidad y el rendimiento de las parvadas.

La industria meleagrica cuenta con muy pocas opciones de anticoccidianos, forzando a los productores a emplear los productos durante períodos más prolongados de lo deseable para evitar la pérdida

de sensibilidad de las cepas de campo. El patrón de diseminación de ooquistes de *Eimeria* spp. en las casetas de pavos es un método de evaluar el control, aunque sólo se le ha examinado en raras ocasiones. Se determinaron los patrones de diseminación de ooquistes en varias granjas, bajo diversas condiciones de manejo y ante distintos programas anticoccidianos. Las variables fueron el uso de cama limpia en los gallineros de crianza y cama caliente en las casetas de crecimiento, el uso de programas con anticoccidianos en la ración y programas de vacunación contra la coccidiosis. Se utilizó el conteo de ooquistes en secuencia, por edades, para medir y definir el desafío de coccidiosis. Siempre que fue posible, estos datos compararon diferentes programas de control de coccidiosis usados en las mismas operaciones de pavos. Los conteos nos ayudan a evaluar la eficacia de los programas existentes.

INTRODUCTION

Coccidiosis in turkeys has not been recognized as a major disease of importance, yet the impairment in performance is underestimated or ignored, despite the fact that coccidiosis in turkeys was first described in US more than 100 years ago. Seven species of *Eimeria* are described as parasites for turkeys, but four are generally considered important (*E. adenoids*, *E. gallopavonis*, *E. meleagritidis* and *E. dispersa*). There is also a general belief that there are no pathognomonic gross lesions or poor clinical signs of coccidiosis in turkeys. It is possible that these parasites may be misdiagnosed because of the lack of clinical signs. Fitz-Coy in 1990 found the most common species were *E. meleagrididis*, *E. adenoids*, and *E. dispersa*, and *E. gallopavonis* was the least prevalent. His observation is that lesions do occur, but they are recognizable only for a few hours and are easily missed when examining birds in the field.

Despite the widespread use of anticoccidial drugs, the parasites that cause coccidiosis are present on most turkey farms (3). Usually the numbers of organisms (measured by the presence of oocysts in the litter) are insufficient to cause clinical disease. Nonetheless, even in the absence of signs of coccidiosis in a flock, the number of parasites may be sufficient to cause subclinical coccidiosis.

In fact, it is *necessary* to have some subclinical coccidiosis in turkey flocks to help induce immunity. Anticoccidial programs are insufficient to provide protection through the long life of a commercial turkey. Therefore, *immunity* is the main method for coccidiosis control. The anticoccidial drugs are simply to moderate the level and timing of the infection. Unfortunately, if the moderation is not sufficient, flocks can suffer from too much coccidial intestinal damage which can lead to

a loss in performance or provide an opportunity for secondary intestinal disease.

Since the number of drug anticoccidials is limited in turkeys (only two ionophores approved in US), it forces the producers to use these products for longer period of times, leading to a potential loss of sensitivity of the field isolates.

Lately, the use of vaccination for the control of coccidiosis became more common in turkeys.

The principle of immunization is to expose the poults to a suspension of live oocysts at an early age so the birds are able to develop solid immunity to coccidiosis prior to being moved to the grower/finisher barn where more coccidiosis challenge occurs.

All poults must receive adequate oocysts of each of pathogenic species to initiate coccidial cycling. The poults develop complete immunity after two or three coccidial life cycles. Once immunity has developed, the litter oocyst levels drop dramatically. When poults are transferred to the grow out facilities at six weeks of age, few oocysts are shed to carry over to the next poult flock or to the grow out barn.

The pattern of coccidia (*Eimeria* spp.) oocyst shedding in turkey barns is one method to evaluate control, but it has rarely been examined. Oocyst shedding was measured by oocyst counts per gram of feces, collected sequentially through the first 13 weeks of life for several commercial turkey flocks.

Chemical anticoccidials. Clinacox is the newest chemical available to the turkey industry. It has been used for the past five years with good success. But the consequence of using a chemical is too *much* control. The immunity develops late in the life of the turkey flock – about day 50. (Figure 1). There may also be a sudden increase in coccidiosis challenge when flocks are moved from clean brooder barns to reused litter in the grower/finisher barn because the control of coccidiosis was *too* good in the brooder barn to initiate immunity.

Ionophore anticoccidials. Monensin was the ionophore in use when the barns in Figure 2 were sampled. Oocyst counts grew quite high in comparison to the chemical anticoccidial houses. Immunity developed much earlier, however, by day 35. Immunity did not appear to be complete to *E. meleagritidis*; however, *E. meleagritidis* shedding seemed to occur during the later sampling period from 8 to 12 weeks of age, perhaps indicating that it was less able to compete with the other species, and only cycled enough to develop immunity after those species declined.

Vaccination. Vaccination with Coccivac[®]-T produced a similar pattern to the ionophores, but one week earlier (Figure 3). Immunity developed by day 28, and the oocyst counts were not as high as some of the ionophore counts. The immunity to *E.*

meleagrimitis appeared to be more complete: there was no late cycling in the 8 to 12 week window.

CONCLUSION

Different coccidiosis control programs produce markedly different coccidiosis immunity patterns in commercial turkey flocks. Earlier immunity development may enhance performance because the growth curve of a commercial turkey is non-linear. Most of the weight is gained and most of the feed is consumed after the first four weeks. If immunity is already complete, coccidiosis will not interfere with growth.

REFERENCES

1. Jeffers, T.K. and E.J. Bentley. Monensin sensitivity of recent field isolates of turkey coccidia. *Poultry Science* 59: 1722-1730. 1990.
2. Fitz-Coy, S.F. Proceedings - 55th Western Poultry Disease Conference page 80-81. 2006.
3. Chapman, H.D. and E. Saleh. Effects of different concentrations of Monensin and Monensin Withdrawal upon the control of coccidiosis in the turkey, *Poultry Science* 78:50-56. 1999.
4. Chapman, H.D. and T. Rathinam. Sensitivity of field isolates of *Eimeria* to Monensin in the turkey *Avian Diseases* 51:954-957. 2007.
5. Mathis, F. Toxicity and Acquisition of immunity to coccidian in turkeys medicated with anticoccidials, *J. Appl. Poultry Res.* 2:239-244. 1993.
6. Wellenreiter, H.R., Watkins, L.K., Trites, D.J., and Poe, D.K. Performance Effects of extended feeding of Monensin to *Eimeria* challenged tom turkeys, *J. Appl. Poultry Res.* 9:156-161. 2000.

Figure 1
Chemical Anticoccidial
Immunity: 50 days

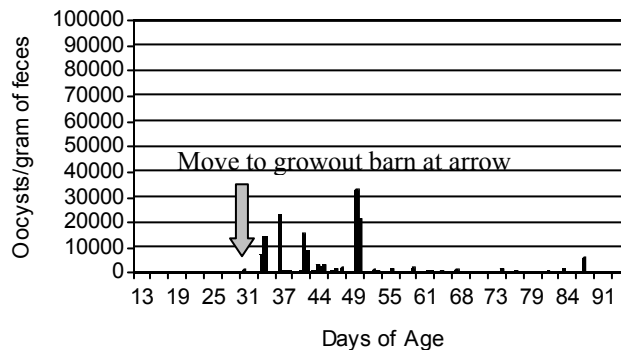


Figure 2
Ionophore Anticoccidial
Immunity: 35 days

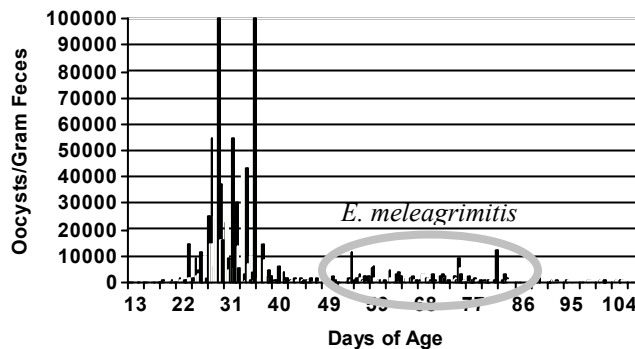
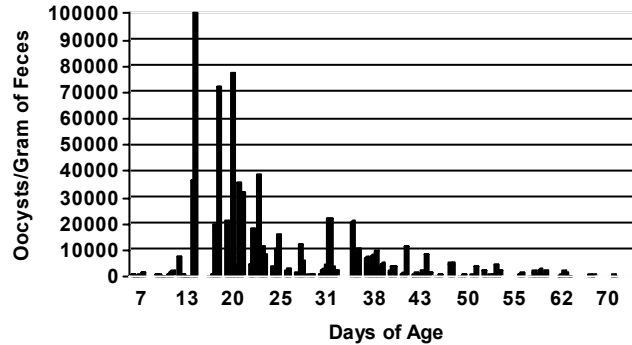


Figure 3
Coccivac-T Vaccine
Immunity: 28 days



PRACTICAL ASPECTS OF LONG TERM COCCIDIOSIS CONTROL MANAGEMENT IN COMMERCIAL BROILERS

ASPECTOS PRÁCTICOS DEL CONTROL PROLONGADO DE LA COCCIDIOSIS EN EL POLLO DE ENGORDA COMERCIAL

M. Alfonso, C. Broussard, M. Finklin, S. FitzCoy, L. Newman, and J. Radu

Schering-Plough Animal Health, Summit, NJ 07901 USA

RESUMEN

Las estrategias actuales para el control de la coccidiosis en el pollo de engorda bajo condiciones comerciales y durante todo el año dependen de: 1) uso continuo de anticoccidianos en la ración, 2) rotación entre estos productos y la vacunación contra la coccidiosis durante ciertos períodos del año, ó 3) uso continuo de la vacunación contra la coccidiosis. En el presente estudio se evaluaron los niveles de infección coccidiana en pollos de engorda bajo diferentes programas de control de esta parasitosis. Resumiremos aquí la severidad, la prevalencia y el tiempo de presentación de las lesiones en las aves. Se examinaron pollos de engorda de diferentes operaciones comerciales de toda la Unión Americana, desde los 14 días hasta la edad de mercado, realizando necropsias en busca de lesiones coccidianas. Se aplicó una calificación de lesiones utilizando el método de Johnson y Reid. Además, se examinaron al microscopio raspados de mucosa procedente de la región media del intestino para calificar la presencia de ooquistes de *Eimeria maxima*. Se encontraron diferencias marcadas en el tiempo de presentación de las lesiones coccidianas, así como en la consistencia de la prevalencia y la severidad de dichas lesiones, entre los diferentes programas de control de la coccidiosis.

SUMMARY

Current strategies for coccidiosis control in commercial broilers throughout the year depend on 1) continuous use of anticoccidial drugs in the feed, 2) rotation between these drugs and coccidiosis vaccination during certain periods of the year, or 3) continuous use of coccidiosis vaccination. This study evaluates the coccidia infection levels in broilers under different coccidiosis control programs, and summarizes the prevalence, severity, and time of occurrence of lesions in the birds. Broilers from different commercial operations across the United States (U.S.) ranging from 14 days of age to market age were examined for coccidial lesions during necropsy. Gross lesions were scored using the Johnson and Reid method. Mucosal scrapings from the midintestine were examined microscopically to score the presence of *Eimeria maxima* oocysts. Major differences in time of occurrence of coccidial lesions as well as in consistency of prevalence and severity of those lesions were found between different coccidiosis control programs.

INTRODUCTION

Current strategies for coccidiosis control in commercial broilers throughout the year depend on 1) continuous use of anticoccidial drugs in the feed, 2) rotation between these drugs and coccidiosis vaccination during certain periods of the year, or 3) continuous use of coccidiosis vaccination. Different and complementary ways to monitor the efficacy of these coccidiosis control programs include: assessment of coccidial shedding by litter oocysts counts, scoring coccidial lesions in different parts of the intestine by gross and microscopic examination, and tracking overall bird performance (body weight, feed conversion, daily gain, etc.). Although there is evidence that there are limitations to the use of lesion scores alone in assessing flock performance or the efficacy of an anticoccidial program (1), it is a tool widely used in the field to monitor coccidiosis in commercial broiler operations because it allows comparisons over time and between different coccidiosis control programs when done consistently.

Lesion scoring reported in the mid 80's showed highest lesion scores occurring at about 4 weeks of age when using ionophores as anticoccidials (3). At the same time, field data from the southern U.S. showed similar results (2). However, coccidiosis vaccination was not as common in the mid 80s as it is nowadays; neither were the use of built-up litter and short downtimes between broiler flocks. All these are major factors influencing the coccidial challenge that broilers suffer. More information on how coccidia behave in these current scenarios is needed. This study evaluates the coccidia infection levels in broilers under different coccidiosis control programs, and summarizes the prevalence, severity, and time of occurrence of lesions in the birds.

MATERIAL AND METHODS

Broilers from different commercial operations across the U.S. ranging from 14 days of age to market age were examined for coccidial lesions during necropsy. Gross lesions were scored using the Johnson and Reid method (4). Mucosal scrapings from the midintestine were examined microscopically to score the presence of *Eimeria maxima* oocysts.

RESULTS

The lesion patterns for different coccidiosis control programs are described:

1. **Continuous use of different anticoccidial drugs in the feed.** Prevalence and severity of lesions vary widely depending on the drugs used and its usage time. The timing of lesions ranges from 3 to 9 weeks for both *Eimeria acervulina* and *Eimeria maxima* (micro). Gross lesions due to *Eimeria tenella* are rarely seen.

2. **Rotation between anticoccidial drugs and coccidiosis vaccination.** Prevalence and severity of lesions tend to decrease the longer vaccination is used. Mild *E. acervulina* gross lesions (score +1, +2) occur in <20% of the birds at 2-3 weeks of age. Microscopic counts of *E. maxima* (<20 oocysts per field) peak at about 4 weeks of age and are seen in 20-60% of the birds. *E. tenella* gross lesions are rarely seen. Gross and microscopic lesions markedly decrease after 5 weeks of age indicating development of immunity.

3. **Continuous use of coccidiosis vaccination.** Lesions are similar to what has been described above. A more consistent (prevalence and severity) and earlier lesion pattern is observed when compared to anticoccidial drugs programs.

REFERENCES

1. Conway, D. P. and M. E. McKenzie. Poultry Coccidiosis. Diagnostic and Testing Procedures. Third Edition. 2007.
2. Dietzel, A.D. Field survey of coccidial lesions in broiler flocks of the south central United States. Proceedings of the American Association of Avian Pathologists, AVMA Congress, Chicago, IL. Athens, GA: American Association of Avian Pathologists. 1986.
3. Froyman, R., J. Derijcke, and M. Verlinden. Het georganiseerd coccidioseonderzoek bij slachtkuiens: de landelijke resultaten van 1986. Provinciale Laboratoria van West-Vlaanderen, Oost-Vlaanderen en Antwerpen. 1987.
4. Johnson, J. K. and W. M. Reid. Anticoccidial drugs: lesion scoring techniques in battery and floorpen experiments with chickens. Exp. Parasitol 28: 30-36. 1970.

EVALUACIÓN DEL COMPORTAMIENTO PRODUCTIVO DE DOS PROGRAMAS ANTICOCCIDIALES COMERCIALES EN EL CONTROL DE LA COCCIDIOSIS AVIAR EN UNA PARVADA DE POLLOS DE ENGORDA

EVALUATION OF THE PRODUCTIVE PERFORMANCE OF TWO COMMERCIAL ANTICOCCIDIAL PROGRAMS IN THE CONTROL OF COCCIDIOSIS IN A BROILER FLOCK

Daniel Mendoza Avitia, Daniel Marrufo Villa, Gerardo Castilla Aguilar, y Nancy Christy Santiago

Laboratorio de Biología, Tehuacan Puebla.

SUMMARY

Productive performance was evaluated in 40,000 broilers divided in two groups and subjected to two different anticoccidial programs: Group A, sulfa drugs; Group B, avian immunoglobulin concentrates. Birds were randomly weighed at six weeks of age and the body weights of males and females were recorded separately. Each group was fed the coccidiostat, observing the dose rates and specifications recommended for each product, throughout the production cycle. Even though the birds in both groups did not show coccidiosis clinical signs, the laboratory reported *Eimeria acervulina* as the coccidia with the highest incidence. Statistically-significant differences ($P<0.05$) were only found in the body weights of group B males (84 g more). We concluded that feeding coccidiosis-specific immunoglobulins results in increased male weight gains.

RESUMEN

Se evaluó el comportamiento productivo de 40,000 pollos de engorda con dos programas anticoccidiales divididos en dos grupos, uno con sulfas (Grupo A) y otro con concentrados de inmunoglobulinas aviar (Grupo B). Las aves se pesaron aleatoriamente a las seis semanas de edad, tomando los datos de hembras y machos por separado. A cada grupo se le administro vía alimento el coccidiostato de acuerdo a dosis y especificaciones recomendadas de cada producto durante todo el ciclo de producción. De acuerdo a los resultados de laboratorio *Eimeria acervulina* fue la de mayor incidencia, aunque las aves no presentaron sinología clínica de coccidiosis aviar en ambos tratamientos. Los resultados demostraron diferencia significativa ($p<0.05$) únicamente en los machos siendo mayores los del Grupo B, quienes obtuvieron 84 gr. mas de peso. Concluimos que con la aplicación de inmunoglobulinas específicas contra

coccidiosis aviar en el alimento existe una mayor ganancia de peso en machos.

INTRODUCCIÓN

La coccidiosis aviar es una compleja enfermedad parasitaria, causada por protozoarios del genero *Eimeria* sp. Su importancia se deriva de las fuertes pérdidas económicas que acarrea por mortalidad y por bajas en la productividad de las aves que sobreviven a la infección; así como por los fuertes gastos que implica la rutinaria medicación profiláctica del alimento.

Las drogas anticoccidianas disponibles actualmente han sido de gran utilidad para el control de la enfermedad, sin embargo tienen la desventaja de acompañarse de ciertos efectos secundarios indeseables. Por otra parte el parásito desarrolla diferentes grados de resistencia a estos fármacos, por lo que son comunes las infecciones subclínicas y clínicas con el paso del tiempo. Otra estrategia implementada es el uso de vacunas atenuadas que requieren necesariamente producir cierto grado de daño al epitelio intestinal para ejercer su efecto, y con las que no es fácil obtener un grado homogéneo de inmunidad. Sin embargo, con la utilización de estos programas de alguna manera se siguen presentando la manifestación clínica, por lo que es requerido un tratamiento adicional o complementario, ante el surgimiento de estos brotes que pueden presentarse de forma aislada.

MATERIAL Y MÉTODOS

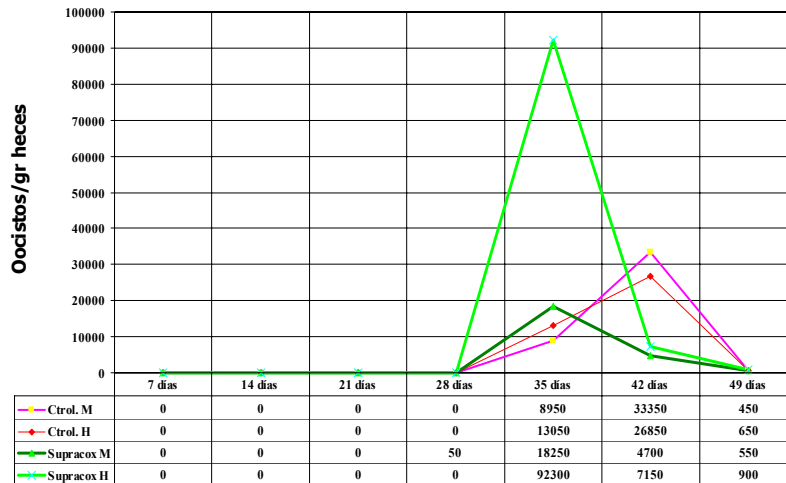
En la evaluación fueron utilizados un total de 40,000 pollos de engorda divididos en dos Grupos (A y B) de 10,000 hembras y 10,000 machos cada uno, provenientes de una incubadora comercial. En cada grupo se aplico un programa anticoccidiano los cuales quedaron conformados de la siguiente manera: Grupo

A a base de sulfas (dosis de 0.500 Kg/ton) y el Grupo B con concentrados de inmunoglobulinas (Etapa Inicio 2 Kg/ton, y Finalizador 3 Kg/ton). El tipo de alimento administrado fue pellet, manejando 2 etapas de alimentación: inicio y finalizador, de acuerdo con la formulación de la empresa. Las granjas donde se llevó a cabo la evaluación son casetas de ambiente natural, están equipadas con comederos de bote y bebederos de campana, piso de cemento y cama de paja de trigo. Las aves recibieron el mismo manejo médico y zootécnico. Se llevó a cabo el conteo de oocistos, así como el registro semanalmente de pesos, conversión de alimento y mortalidad, para conocer la diferencia del

comportamiento de estos índices productivos entre los dos programas anticoccidiales.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

En base a los resultados obtenidos solo existe un conteo de oocistos alto durante la 5a. semana en el Grupo B Hembra con la cual se asocia a una reducción en la ganancia de peso, sin embargo para la séptima semana se vuelve a tener una recuperación en la ganancia de peso, no existiendo a nivel de campo signología de la enfermedad. En el siguiente cuadro se ilustran los resultados en forma gráfica:



De acuerdo a los resultados de los análisis estadísticos de peso, en las Hembras solamente existe una diferencia significativa a favor del Grupo B en la semana 3 y 4, en lo que respecta a la fase final semana 5, 6 y 7 no existe diferencia significativa en ambos grupos, a pesar de que en la séptima semana se tiene un peso a favor del Grupo B de 77.5g; Esta caída se

asocia a un incremento en el conteo de oocistos. En lo que respecta al macho se tiene una diferencia significativa en la semana 2 a favor del Grupo A y para la fase final durante las semanas 4 y la última semana (6) para el Grupo B, como se aprecia en la siguiente gráfica.

| EDAD | PESO | |
|------|----------|----------|
| | Grupo A | Grupo B |
| 0.1 | 43.0 | 42.0 |
| 1 | 136.6 A | 135.6 A |
| 2 | 298.6 A | 284.6 A |
| 3 | 527.4 A | 557.3 B |
| 4 | 856.5 A | 907.0 B |
| 5 | 1192.0 A | 1191.0 A |
| 6 | 1666.0 A | 1665.0 A |
| 7 | 2090.0 A | 2167.5 A |

| EDAD | PESO | |
|------|----------|----------|
| | Grupo A | Grupo B |
| 0.1 | 44.0 | 42.0 |
| 1 | 136.6 A | 130.9 A |
| 2 | 310.1 B | 286.6 A |
| 3 | 568.9 A | 538.8 A |
| 4 | 865.0 A | 990.5 B |
| 5 | 1390.0 A | 1353.0 A |
| 6 | 1907.0 A | 1991.0 B |

En cuanto a la conversión alimento, en Hembras existe una diferencia de 220 grs. a favor del Grupo B,

en el Macho solo existió una diferencia mínima de 15 grs. a favor del Grupo A.

| HEMBRA | | |
|--------|------------|---------|
| EDAD | CONVERSIÓN | |
| | Grupo A | Grupo B |
| 1 | 1.537 | 1.549 |
| 2 | 1.664 | 1.641 |
| 3 | 1.676 | 1.532 |
| 4 | 1.717 | 1.673 |
| 5 | 1.809 | 1.872 |
| 6 | 1.911 | 1.915 |
| 7 | 2.135 | 1.915 |

| MACHO | | |
|-------|------------|---------|
| EDAD | CONVERSIÓN | |
| | Grupo A | Grupo B |
| 1 | 1.537 | 1.604 |
| 2 | 1.603 | 1.734 |
| 3 | 1.499 | 1.670 |
| 4 | 1.703 | 1.580 |
| 5 | 1.610 | 1.777 |
| 6 | 1.738 | 1.753 |

Respecto a la mortalidad existe una diferencia a favor tanto de la Hembra como del Macho del Grupo

A, siendo del 0.10% en la Hembra y del 0.72% para el Macho.

| MORTALIDAD | | | | |
|------------|---------|------|---------|------|
| EDAD | GRUPO A | | GRUPO B | |
| | H | M | H | M |
| 1 | 0.66 | 0.71 | 0.60 | 0.58 |
| 2 | 0.48 | 0.45 | 0.54 | 0.77 |
| 3 | 0.49 | 0.66 | 0.49 | 0.40 |
| 4 | 0.58 | 1.13 | 0.46 | 0.75 |
| 5 | 1.32 | 0.68 | 1.30 | 1.01 |
| 6 | 0.95 | 1.45 | 1.46 | 2.17 |
| 7 | 1.97 | | 2.07 | |

DISCUSIÓN

Con el uso del anticoccidiano a base de inmunoglobulinas se obtuvo una mejor ganancia de peso dado a que este producto no causa lesiones a nivel intestinal, por lo que existe una mejor absorción de nutrientes proporcionados en la dieta. Resultados similares obtenidos con trabajos realizados en United State Departament Of Agricultura (USDA) por la Dra. Hyun S. Lillehoj en el año 2006 donde reporto mayor ganancia de peso proporcionando un anticoccidiano a base de inmunoglobulinas sin presentar sinología de coccidia.

CONCLUSIONES

En base a los resultados obtenidos se concluye que el uso de anticoccidianos a base de inmunoglobulinas resulta tener un mejor comportamiento en peso corporal comparado con un anticoccidiano a base de sulfas, siendo el macho el que represento una diferencia significativa estadística. Siendo esta una alternativa de control de la coccidiosis aviar.

REFERENCIAS

1. Conway, D.P. and E.M. McKenzie. Poultry coccidiosis, diagnostic and test procedures. Second

edition, Pfizer International Inc. New York (NY), 1991.

2. Fayer, R. and W.M. Reid. Control of coccidiosis. The biology of the coccidian. Ed. Long P.L. University Park Press, Baltimore, Maryland 1982.

3. Hein, H.E. *Eimeria acervulina*, *E. brunetti* and *E. maxima*: Pathogenic effects of single or mixed infections whit low dosis of oocysts in chickens. Exp Parasitol 1976.

4. Hong, Y. and H. Lillehoj. Veterinary Immunology and Immunopathology 114: 259-272. 2006.

5. Lillehoj, S. Hyun. United State Departament Of Agricultura. XX Congreso latinoamericano, Brasil, 2007.

6. Long , P.L. and W.M. Reid. A guide for diagnosis of coccidiosis in chickens. Research report 404, University of Georgia, College of Agriculture Experiment Station, Athens, Ga. USA 1982.

7. Mathieu, H. Strategies for Coccidiosis Control. Poultry International 43-52. 1999.

8. Moreno, D.R. Determinación del grado de patogenicidad de algunas cepas aisladas en pollos de México. Vet Méx 1980.

9. Moreno, D.R. Guía para la interpretación de la cantidad de coccidias por gramo de heces frescas usando anticoccidianos en el alimento y signos clínicos esperados en las aves. Memorias de la IV Jornada Médico Avícola. Departamento de Producción Animal

Aves y División de Educación Continua; FMVZ. UNAM. México (DF) 1993.

10. Reid, W.M. "History of avian medicine in the United States". Control of coccidiosis. Avian Disease 1990.

11. Reid, W.M., P.L. Long, and L.R. McDougald. Coccidiosis in Diseases of Poultry ninth edition. Calnek BW. Iowa State University Press, Ames, Iowa 1991.

12. Rose, M.E. The influence of age of host on infection with *Eimeria tenella*. Jour Parasitol 1967.

COMPARISON OF FIVE COMMERCIAL KITS FOR THE HIGH THROUGHPUT MOLECULAR DIAGNOSTIC OF AVIAN RNA VIRUSES

COMPARACIÓN DE CINCO "KITS" COMERCIALES PARA EL MANEJO DE GRANDES VOLÚMENES DE MUESTRAS EN EL DIAGNÓSTICO MOLECULAR DE VIRUS AVIARES DEL TIPO ARN

Hayet Abbassi

University of Minnesota: Department of Animal Science, 1364 Eckles Avenue, St. Paul, MN 55108

RESUMEN

El propósito del presente estudio fue comparar 5 estuches o "kits" comerciales procedentes de tres empresas diferentes para la detección de virus aviares ARN en grandes volúmenes de muestras, mediante la reacción en cadena con polimerasa y transcriptasa inversa (RT-PCR) ya sea de tiempo real o de punto final. Los principales criterios para esta comparación fueron la sensibilidad de la detección y la flexibilidad de uso en diferentes plataformas, además de la posibilidad de manipulación para mejorar la prueba. También se tomó en cuenta la duración y el precio de los kits que presentaron rendimientos similares. Para esta comparación utilizamos un metapneumovirus aviar. Dos de los 5 kits mostraron rendimiento significativamente más bajo que los otros tres y también tuvieron menos flexibilidad y su formulación no nos permitió la posibilidad de adaptarlos a diferentes plataformas. Los otros tres kits, elaborados por dos empresas diferentes, mostraron rendimientos similares. Uno de estos tres resultó sobresaliente en todos los criterios antes mencionados.

SUMMARY

The purpose of this study was to compare five commercial kits from three different companies for the high throughput detection of avian RNA viruses by one step RT-PCR, either in real time or "end point." Three of the kits were designed for one step real time quantitative RT-PCR (qRT-PCR) and the other two for one-step RT-PCR. A fluorescent dye (Buffer A or Rox) was added to the one step RT-PCR kits in order to

apply them for real time qRT-PCR and end point assays as shown in Table 1. The main criteria for this comparison were the sensitivity of detection, the flexibility in terms of use in different platforms and, the possibility of manipulation for test improvement. The duration and cost were also taken into consideration for the kits that had similar performances. Ten fold serial dilutions of Colorado and MN1a strains of avian Metapneumovirus (aMPV) were used for this comparison. The main conditions of the newly developed molecular diagnostic TaqMan[®] RT-PCR assay for avian Metapneumovirus (1) were used with very slight modifications related to the manufacture requirements of each kit (Table 1). Two out of the five kits (Kit 2 and 3) showed significant lower performances compared to the remaining three. The two kits also showed less flexibility and their formulation did not allow the possibility of adapting these kits to different platforms. The three remaining kits 1, 4 and 5, belonging to two different companies A and C, showed comparable performances. Only one kit (Kit 5 company C) out of these three was outstanding for all the criteria mentioned above, especially when the free Rox dye was used at lower concentration than required by the manufacturer. Our study showed clear correlation between the dye concentration in the reaction mix and the sensitivity of the assay. Consequently, the common practice among many companies to prepare most of the RT-PCR reagents together including the dye into one ready to use mix could potentially lead to several disadvantages such as loss of flexibility to be used with various platforms and

could circumvent the possibility of troubleshooting when needed.

(The full-length article will be published in *J. Vet. Diagn. Invest.*)

REFERENCES

1. Abbassi, H., K. Rossow, A.F. Zeigler and K.S. Faaberg. Molecular diagnostic of avian Metapneumovirus (aMPV). 56th Western Poultry Disease Conference and ACPV Symposium, 26-29. March 2007.

Table 1. Commercial one step RT-PCR kits used for the molecular diagnostic of aMPV.

| Companies | Kits | Dye required | Cycling steps | Enzyme activation | |
|-----------|------|----------------|---------------|-------------------|--------|
| A | 1 | 1 step RT-PCR | BufferA/Rox | 3 step reaction | 15 min |
| | 2 | 1 step qRT-PCR | No | 2 step reaction | |
| B | 3 | 1 step qRT-PCR | No | 2 step reaction | 10 min |
| C | 4 | 1 step RT-PCR | BufferA/Rox | 3 step reaction | 2 min |
| | 5 | 1 step qRT-PCR | No | 2 step reaction | |

REPORTE DE DOS CASOS EN REPRODUCTORAS PESADAS ASOCIADOS A LARINGOTRAQUEITIS INFECCIOSA EN MÉXICO

INFECTIOUS LARYNGOTRACHEITIS IN BROILER BREEDERS IN MEXICO: TWO CASE REPORTS

G. J. V. Ruiz^A y J. J. A. Escamilla^A

^ALaboratorio Cordobés de Diagnóstico Pecuario

SUMMARY

Two laryngotracheitis (LT) cases (September 2006 and August 2007) in 26-, 81- and 86-week-old broiler breeders are reported. Birds showed conjunctivitis, dyspnea, rales, and cyanotic combs. Gross lesions included tracheal mucosa congestion, blood and mucus exudate with caseous plugs in the tracheal lumen in the most advanced cases. Histopathologically, the presence of syncytia and eosinophilic intranuclear inclusions in the larynx, trachea and lung were reported. The first case was confirmed by histopathology. In addition, the second case was also confirmed by virus isolation in chicken embryo chorioallantoic membranes showing typical LT lesions, as confirmed by histopathology revealing the presence of syncytia and intranuclear inclusions in the CAM.

RESUMEN

La laringotraqueitis infecciosa (LTI) es una enfermedad respiratoria aguda altamente contagiosa de las aves de corral, causada por un Gallid herpesvirus 1 perteneciente a la familia Alphaherpesviridae. La enfermedad tiene desde una presentación leve hasta una severa (1).

En la presentación leve se ha observado traqueitis mucoide, sinusitis, conjuntivitis, decaimiento general y baja mortalidad, lo que contrasta con las formas severas, donde hay signos de depresión respiratoria, disnea, ataque de tos, descarga nasal, expectoración de moco sanguinolento y alta mortalidad (1,5).

También se han reportado casos de una LTI silenciosa, en la que los signos observados incluyen, traqueitis leve, senos inflamados, inflamación periorbital, sin signología respiratoria, sin aumento de la mortalidad y una respuesta serológica mínima (3,4,5).

Descripción de los casos. En la zona donde se presentaron los casos, no había antecedentes de presentación de casos de LTI, por lo menos en los últimos 15 años, por lo que en esta zona no se incluía LTI en los calendarios de vacunación, en consecuencia las dos empresas donde se presentaron los casos, no vacunaban contra LTI.

Primer caso. Este se presentó a finales del mes de septiembre del año 2006, cuando fueron remitidas al Laboratorio Cordobés de Diagnóstico Pecuario, muestras de tráquea, pulmón, bazo e hígado, de aves reproductoras pesadas, de estirpe Ross de 26 semanas de edad, que mostraron: disnea, estornudo, inflamación periorbital, conjuntivitis, lesiones tumorales, baja mortalidad (0.01%), una difusión lenta y una baja de postura del 5%. A la revisión de los órganos fijados en formol había exudado mucosanguinolento en el lumen de algunas tráqueas. El estudio histopatológico reveló un linfoma en dos cortes de hígado, compatible con enfermedad de Marek y en un corte de seis de tráqueas, la presencia de sincitios y cuerpos de inclusión intranucleares compatibles con LTI. A principios del mes de octubre remitieron nuevamente laringes, tráqueas y pulmón en formol al 10%, para su examen histopatológico de aves reproductoras de 36 semanas, ya que el problema se había extendido a otras casetas. A la revisión macroscópica de las muestras había la presencia de grandes tapones caseosos en el lumen de laringes y tráqueas, el examen histopatológico reveló nuevamente la presencia de sincitios y de cuerpos de inclusión intranucleares eosinofílicos. Además en uno de dos cortes de pulmón se observó en la luz y epitelio de un bronquio, la presencia de sincitios y cuerpos de inclusión intranucleares eosinofílicos. La granja afectada estaba constituida de 13 casetas con 6000 aves cada una. El problema se inició a los 10 días después de cargar un camión con gallina de desecho, de un comprador ajeno a la empresa. El brote comenzó en la caseta 1 y posteriormente se difundió lentamente a las casetas, 9, 5, 10, 2 y 3. El problema se controló vacunando en cada una de las casetas afectadas, dos días seguidos al agua de bebida con vacuna de LT en cultivo celular. Además se administraron antibióticos de amplio espectro cada 12 horas durante 10 días (enrofloxacin 10 mg/kg. de peso vivo) y 300 g oxitetraciclina + 500 ml de ácidos orgánicos en 20 L de agua, asperjados por cinco días.

Comentario. En este primer caso, desde el punto de vista clínico se puede deducir que se comportó como un brote de LT de baja virulencia, ya que en ningún momento hubo expectoraciones sanguinolentas (aunque si se observó sangre en el lumen de algunas tráqueas al principio del brote), ni tampoco la mortalidad fue alta, lo que coincide con lo mencionado por Lynne, 2007 y Bagust *et al*, 2003 en brotes de baja virulencia.

Segundo caso. Este se presentó a finales de agosto del año 2007 en reproductoras pelechadas, estirpe Cobb. Esta compañía, adquirió machos de dos empresas. Uno de los lotes de machos llegó con problemas de bajo peso, mal emplume y de menor tamaño. Tres semanas después de su llegada a la granja, comenzó el problema respiratorio consistente en un ligero catarro. Seis días más tarde el médico responsable de la operación envió muestras al laboratorio

El día 29 de agosto fueron remitidas al Laboratorio Cordobés de Diagnóstico Pecuario, muestras de tráqueas y laringes en formol al 10%, procedentes de aves reproductoras de 85 semanas que mostraron disnea, estertores, baja en la producción de huevo y postración, así como tapones de exudado caseoso en el lumen y con un 2% de mortalidad semanal. La granja estaba constituida por cuatro casetas y el problema comenzó en la caseta 1 que tenía aproximadamente 4,200 aves. El examen histopatológico reveló la presencia de sincitios y cuerpos de inclusión intranucleares eosinofílicos en el lumen de la tráquea y laringe. El día 09 de septiembre el problema se había extendido a la caseta 2 donde había 3,200 aves y el brote comenzaba. En esta ocasión se remitieron aves que mostraban conjuntivitis, ligera inflamación periorbital, disnea, crestas cianóticas y estertores. A la necropsia se observaron tráqueas con marcada congestión de la mucosa, exudado mucoso y/o tapones caseosos en el lumen traqueal. También hubo una baja de postura del 10 % y la mortalidad había aumentado a 10 aves por día. El examen histopatológico nuevamente mostró la presencia de abundantes sincitios y cuerpos de inclusión intranucleares tanto en el exudado presente en el lumen y epitelio de la tráquea, no así en párpados. El examen de aislamiento viral fue positivo al virus de LTI, donde se observaron lesiones redondeadas blanquecinas que sobresalían en las membranas corioalantoideas de huevos embrionados, inoculados a los diez días de edad. El diagnóstico del aislamiento fue confirmado a través del examen histopatológico, donde se observó la presencia de sincitios y cuerpos de inclusión intranucleares eosinofílicos compatibles con LTI en la membrana corioalantoidea con lesiones macroscópicas.

En esta empresa se tomó la decisión de aplicar la vacuna de embrión de pollo por vía ocular y un tratamiento con tres antibióticos diferentes más expectorante durante 15 días: Los primeros cinco días enrofloxacin 10 mg/kg. de peso vivo, después cinco días con tianfenicol 20 mg/kg. de peso por cinco días y finalmente cinco días con fosfomicina 20mg/kg. de peso, completando de esta manera los quince días de tratamiento, durante los cuáles también se suministró mucosol en dosis de un sobre/1000 L de agua, que es un expectorante y mucolítico.

Durante el tratamiento se decidió hacer una selección y eliminación de aves de desecho, lo que ayudó a que el problema cediera (En total fue un 30% de aves seleccionadas y desechadas). El Médico de la empresa comentó que el problema estuvo brincando de caseta en caseta, para volver a comenzar otra vez en la caseta inicial.

Comentario. En este segundo caso, el introducir aves portadoras asintomáticas (machos adquiridos de otra empresa) dentro de una parvada altamente susceptible, fue la causa del brote. La mortalidad fue del 5% y lo que hizo más severo el problema fue el 35% de aves que tuvieron que ser desechadas porque nunca se recuperaron, pero que sin embargo, ayudaron a que este problema cediera. Por otro lado cuando la vacuna fue aplicada ya habían transcurrido 15 días del brote y la infección estaba en varias fases en la parvada afectada, es por eso que la vacuna no dio el resultado esperado. Sin embargo, la forma como se comportó la infección indica que se trató de un brote de baja virulencia.

REFERENCIAS

1. Bagust, T.J., and J.S. Guy. Laryngotracheitis. In: Diseases of poultry, 11th ed. Y. M. Saif, H.J. Barnes, A.M. Fadly, J.R. Glisson, L.R. McDougald and D. E. Swayne, eds Iowa State University Press, Ames, IA. pp. 121-134. 2003.
2. Lynne, L.G. First recorded break of infectious laryngotracheitis in Louisiana. Proc. 56th West. Poult. Dis. Conf. p.84. 2007.
3. Sellers, H.S., M. García, J.R. Glisson, T.P. Brown, J.S. Sander, and J.S. Guy. Mild infections laryngotracheitis in broilers in the Southeast. Avian Dis. 48:430-436. 2004.
4. Timurkaan, N., F. Yilmaz, H. Bulut, H. Özer. and Y. Bolat. Pathological and Immunohistochemical in broilers inoculated with a low virulent strain of infectious laryngotracheitis virus. J. Vet. Sci. 4:175-180. 2003.
5. Zavala, G. Control de la Laringotraqueitis Infecciosa. Memorias XVIII Curso Avimex de Salud y Productividad. pp. 9-14. 2006.

VLT IN GEORGIA 2006-2007

LARINGOTRAQUEÍTIS EN GEORGIA, EE.UU.: 2006-2007

Louise Dufour-Zavala

Georgia Poultry Laboratory Network

RESUMEN

Los casos de laringotraqueítis vacunal en Georgia, EE.UU. afectaron de manera importante a la industria avícola en diversas regiones del estado durante 2006 y 2007, tanto por el número de casos durante el brote como por la cantidad de fallas vacunales. Este brote se caracterizó por una serie de factores únicos y se aplicó rigurosamente un programa de control en la industria.

SUMMARY

Georgia uses vaccination to control LT in breeders in layers. All available vaccines can be used: chicken embryo origin (CEO), tissue culture origin (TCO), Pox recombinant (REC-Pox) and HVT recombinant (REC-HVT). Occasionally, from year to year, broilers are exposed to vaccine strains (CEO), and the vaccine strains pass through susceptible birds causing disease. Vaccinal Laryngotracheitis (VLT) is

very contagious and tends to spread effectively, albeit slowly, between broiler farms. However, the number of cases in an outbreak usually stays low. During 2006, a VLT outbreak in broilers prompted the implementation of an industry control program. Several factors were interesting about this outbreak.

The virus was typical of a CEO vaccine virus. There were many vaccine reaction and performance problems associated with the use of the CEO vaccine within our vaccination zones. Several cases of MG occurred during the same time period, with occasional broiler MG cases being clinically very similar to VLT in broilers case, confirming the importance of a quick and accurate diagnosis. The Georgia poultry industry continues to work very closely together through an advisory committee for the maintenance of poultry health. The industry control programs include enhanced biosecurity, zone vaccination, and litter management and are based on sound communications, notifications, mapping, and decision making involving all stakeholders.

UN NUEVO SINDROME EN AVES APARENTEMENTE CAUSADO POR UN NOVEL POXVIRUS

A NEW SYNDROME IN POULTRY APARENTLY CAUSED BY A NOVEL POXVIRUS

Mateo Delamer

Av. Alvarez Thomas 3078 – 5° “A”, (1431) Buenos Aires, Argentina
Tel.: (54) 3327-452505/06, labdelamer@cotelcam.com.ar

SUMMARY

A new syndrome has been detected in Argentina in intensive poultry production. It affects layers, breeders, and broilers, causing retarded growth; sub-standard egg production; lesions in the respiratory, digestive, reproductive, urinary, and locomotive systems; increased mortality; and culling. An apparently new poxvirus has been consistently isolated from necrotic lesions in the mouth, nose passages, infraorbital sinuses, conjunctival mucosa, eyelids, trachea, lungs, air sacs, duodenum, liver, kidneys, cecal tonsils, prolapsed cloacae, ovaries, oviducts, tendons and tendinous membranes, and spongiform tissues of the sternal bursae and foot pad. This virus could be the etiologic agent of this new avian disease. So far the origin of this virus is unknown. There is a disturbing possibility it could be an agent capable of vertical transmission.

RESUMEN

Durante los dos últimos años en Argentina se ha observado un nuevo y complejo síndrome en aves de producción intensiva. En gallinas de postura está caracterizado por una gran desuniformidad y atraso en el desarrollo corporal durante la crianza seguido por baja producción de huevos, disminución de su tamaño y pérdida de la calidad y pigmentación de la cáscara. En pollos de carne se observan trastornos respiratorios, renales y locomotrices con incrementos en la mortandad y los descartes. La característica más destacada de este síndrome es su cronicidad, lo que abre muchas preguntas sobre su patogenia y respuesta inmunológica. Un aparente novel poxvirus se ha aislado de manera consistente inoculando huevos embrionados de gallina con tejidos de todos los tramos del aparato respiratorio, digestivo y reproductor de aves afectadas. El virus produce necrosis en la membrana corioalantoidea con hiperplasia epitelial y cuerpos de inclusión acidófilos intracitoplasmáticos. Se tomó como prototipo un aislado de ovario y oviducto con el que se ha logrado reproducir el síndrome en gallinas ponedoras de huevos marrones. El origen de este virus es aún desconocido. Como la infección se ha

detectado en aves de todas las líneas de producción de carne o huevos y se sospecha la posibilidad de la transmisión vertical de la misma.

Durante los dos últimos años en Argentina estamos investigando en aves de producción intensiva un nuevo síndrome de naturaleza muy crónica y manifestaciones paradójicas.

Al comienzo estudiamos muchos eventos patológicos aparentemente no conectados entre sí y sin ninguna explicación lógica ni científica, pero finalmente creemos haber empezado a resolver el enigma.

Las observaciones principales son:

1. En crianza de ponedoras. Entre las 7 y 12 semanas de vida pueden aparecer rales respiratorios, ojos lacrimosos, traqueítis con mucus muy espeso, mal emplume, uratos alrededor de la cloaca, gran desuniformidad y peso promedio 10% bajo el Standard. Se deben descartar pollas con muy bajo desarrollo corporal.

2. Ponedoras en producción. Alcanzan picos de producción de solo el 85% de postura diaria, decayendo rápidamente luego, en ocasiones hasta el 60% cuando deberían superar largamente el 90%. El peso promedio de las aves suele mantenerse un 10% debajo del Standard durante todo el ciclo de postura. En ocasiones los huevos marrones pueden aparecer pálidos o casi blancos, en otras mas chicos que lo esperado y otras veces sin ninguna anomalía visible. El consumo de alimento es normal. Por el bajo peso observado en las gallinas se les ha suministrado alimentos con altos niveles de energía sin obtener ninguna respuesta. Un cálculo del balance entre la energía consumida y el menor uso de energía en producción de huevos supondría el desarrollo de gallinas obesas, pero esto no ocurre. Todas las causas tóxicas, parasitarias e infecciosas conocidas hasta el presente han sido cuidadosamente estudiadas y descartadas. El alimento de al menos 10 molinos ha sido involucrado, sospechado y descartado porque los mismos molinos proveen a granjas que producen normalmente. El síndrome tiende a ser más severo en aves criadas a piso que en aquellas criadas en jaulas. Las ponedoras de huevos marrones son las afectadas mas severamente, las blancas semilivianas están en una

situación intermedia y las gallinas blancas livianas, las Leghorn puras parecen ser parcialmente resistentes.

3. Reproductores pesados y parrilleros. Pueden aparecer síntomas respiratorios, digestivos y renales. Gran cantidad de uratos se observan bajo la cloaca y en las plumas de la región abdominal. En los parrilleros se produce un brusco incremento de la mortandad entre la 5^{ta} y 7^a semana, con muchas aves con trastornos locomotrices. En ocasiones aparecen cuadros severos de nefritis y nefrosis.

ETIOLOGÍA SOSPECHADA

Un virus similar al de la viruela aviar ha sido aislado consistentemente de los siguientes órganos y tejidos de aves afectadas con el síndrome: lesiones necróticas en la boca, senos infraorbitarios, conjuntiva ocular, párpados, tráquea, pulmones, sacos aéreos, hígados, riñones, tonsilas cecales, cloaca, ovario, oviducto, tendones y vainas tendinosas en casos de artritis tibiotalariana, almohadillas plantares inflamadas y de lesiones necróticas plantares.

Los aislamientos virales fueron realizados inoculando embriones de pollo de 7 a 9 días en la cavidad alantoidea amniótica en los que produce edema y muerte y de 10 a 12 días en la membrana corioalantoidea en la que produce edema y necrosis similar al de los poxvirus. Histológicamente se observa proliferación epitelial e hipertrofia celular con presencia de cuerpos de inclusión intracelulares eosinófilos.

EXPERIMENTOS CON AVES VIVAS

Por las severas lesiones renales observadas, en principio se sospechó que este síndrome era causado por alguna cepa variante del virus de bronquitis

infecciosa (VBI) con tropismo renal. En consecuencia, se colocaron 80 gallitos marrones de cuatro meses, serológicamente negativos para VBI en ocho granjas afectadas por este síndrome. Los centinelas fueron mantenidos en contacto con las gallinas, uno por jaula, por periodos de 5 a 10 días y luego sacrificados para extraerles las tráqueas y las tonsilas cecales. Las tráqueas mostraron diferentes grados de reacciones inflamatorias, a veces con mucus muy espeso, en tanto que las tonsilas cecales aparecían aumentadas 2 a 3 veces y con focos hemorrágicos. Mediante la inoculación de embriones se aisló el “poxoide” en 5 de las 8 granjas estudiadas. Luego de tres pasajes ciegos para aislamiento de VBI, todas las muestras procesadas fueron negativas. En otro experimento, 20 gallinas marrones de 60 semanas con una historia de producción normal fueron descargadas por vía endovenosa con un “poxoide” aislado de ovario y oviducto de gallinas de 40 semanas que estaban produciendo 30% debajo del Standard. Este lote experimentó una brusca caída en la producción de huevos, con pérdida del color de la cáscara a partir de la segunda semana post-descarga, recuperándose gradualmente a partir de la 5^{ta} semana. Se están realizando nuevos estudios con aves vivas así como intentando la caracterización definitiva del virus aislado.

Hasta el presente, el origen de este virus es desconocido. Prácticamente todas las líneas genéticas de parrilleros y de ponedoras se han visto afectadas. Granjas con muy estrictas medidas de bioseguridad también han sido afectadas. Una posibilidad particularmente inquietante es la de que como el virus ha sido consistentemente aislado de ovario y de oviducto, pueda tener la condición de ser transmitido verticalmente.

GENOTYPING OF CANADIAN ISOLATES OF FOWL ADENOVIRUSES

GENOTIPIFICACIÓN DE AISLAMIENTOS CANADIENSES DE ADENOVIRUS AVIARES

Davor Ojkic^A, Emily Martin^A, Janet Swinton^A, Jean-Pierre Vaillancourt^B, Martine Boulianne^B, and Susantha Gomis^C

^AAnimal Health Laboratory, University of Guelph, Box 3612, Guelph, Ontario, Canada, N1H 6R8

^BFaculté de Médecine Vétérinaire, Université de Montréal, CP 5000, 3200 rue Sicotte, Saint-Hyacinthe, Québec, Canada, J2S 7C6

^CDepartment of Veterinary Pathology, Western College of Veterinary Medicine, University of Saskatchewan, Saskatoon, Saskatchewan, Canada, S7N 5B4

RESUMEN

Se examinaron 573 muestras clínicas con adenovirus aviare (FAdV) para investigar su asociación con problemas clínicos. Las muestras fueron obtenidas entre 2000 y 2006, en 7 provincias de Canadá. Se determinó que 487 muestras estaban relacionadas con la hepatitis con cuerpos de inclusión (IBH por sus siglas en inglés), pero no así las otras 86. Se continuó analizando a los virus aislados a partir de 287 muestras, sometiéndolas a la secuenciación de la región hipervariable del asa número uno del gen del hexón (N del T: que en inglés denominan "hexon gene loop 1". Se encontró que 246 adenovirus aviare analizados procedían de casos de hepatitis con cuerpos de inclusión confirmados mediante histopatología, aislamiento viral a partir de hígado, o ambos. Con base en este análisis de secuenciación los adenovirus aviare asociados con brotes de hepatitis con cuerpos de inclusión se relacionaron genéticamente con la cepa FAdV02 (9 aislamientos), la FAdV08a (100 aislamientos) y la FAdV11 (98 aislamientos). Se encontraron 39 virus que presentaron el mayor nivel de identidad con la cepa FAdV07, x11a, pero se requieren más investigaciones para conocer las propiedades genéticas e inmunogénicas de esta cepa.

SUMMARY

In recent years the number of cases submitted to the Animal Health Laboratory at the University of Guelph involving outbreaks of inclusion body hepatitis in chickens has been increasing. Five hundred seventy-three clinical submissions with fowl adenovirus (FAdV) involvement were examined to investigate the

association of different types of FAdVs with clinical problems related to FAdV infection. Samples originated from seven Canadian provinces and were received from 2000 to 2006. Four hundred eighty-seven submissions were related to inclusion body hepatitis (IBH), while 86 were not IBH related. Viruses isolated from 287 samples were genotyped by hexon gene loop 1 sequencing. Twenty-seven genotyped FAdVs were from Alberta, 20 from British Columbia, 16 from Manitoba, one from Nova Scotia, 82 from Ontario, 64 from Quebec and 77 from Saskatchewan. Two hundred forty-six genotyped FAdVs were from IBH cases, confirmed by liver histopathology, FAdV isolation from the liver, or both. Based on hexon gene loop 1 sequencing analysis FAdVs associated with IBH outbreaks were genetically related to FAdV02 (9 isolates, 99.4%), FAdV08a (100 isolates, 99.4-100%) and FAdV11 (98 isolates, 99.4-100%). Thirty-nine viruses were 93.7-94.3% identical to FAdV07 strain x11a, but the genetic and immunogenic properties of this strain will require further investigation. In IBH cases co-infection rates for infectious bursal disease virus (IBDV), infectious bronchitis virus (IBV), reoviruses and Newcastle disease virus (NDV) were 3.47%, 1.04%, 6.25% and 0.69%, respectively. Forty-one genotyped FAdVs were from "non-IBH" cases. Viruses isolated from non-IBH cases consisted of 22 FAdV01, 15 FAdV11, 2 FAdV08a and one each of FAdV02 and FAdV04 viruses. Co-infection rates in non-IBH submissions were 50.00% for IBDV, 40.70% for IBV, 27.91% for reoviruses and 1.16% for NDV.

(The full-length manuscript has been accepted for publication in *Avian Pathology*.)

DETECTION, ISOLATION AND CHARACTERIZATION OF TURKEY-ORIGIN ROTAVIRUSES PRESENT IN COMMERCIAL FLOCKS IN THE UNITED STATES

DETECCIÓN, AISLAMIENTO Y CARACTERIZACIÓN DE ROTAVIRUS ORIGINADOS EN PAVOS Y PRESENTES EN PARVADAS COMERCIALES DE ESTADOS UNIDOS

J. Michael Day, Erica Spackman, Mary J. Pantin-Jackwood, and Laszlo Zsak

USDA/ARS, Southeast Poultry Research Laboratory, 934 College Station Road, Athens, GA 30605

RESUMEN

Los síndromes entéricos avícolas tales como el complejo de enteritis del pavipollo (PEC) están ampliamente difundidos en la Unión Americana. El análisis del contenido intestinal de las parvadas con signos entéricos con frecuencia revela infecciones con numerosos virus sospechosos. La compleja naturaleza de estas infecciones hace que resulte difícil el diagnóstico de laboratorio y el manejo de las parvadas afectadas en el campo. Recientemente, las muestras de intestinos de pavos recibidas de diferentes regiones de Estados Unidos han resultado positivas a las pruebas de reacción en cadena con polimerasa y transcriptasa inversa (RT-PCR) a rotavirus, astrovirus y reovirus aviares. Algunos tipos de astrovirus aviares son ubíquos en los pavos comerciales, mientras que los reovirus originarios del pavo no parecen desempeñar papeles importantes en síndromes tales como el PEC. En este estudio presentamos un análisis filogenético de los rotavirus detectados en las parvadas meleagrícolas comerciales y correlacionamos estos hallazgos con descripciones de signos entéricos recibidas del campo. Continuamos realizando el aislamiento de rotavirus a partir de muestras de pavos de campo y, seguramente, esto será de utilidad para determinar su papel en los síndromes entéricos.

SUMMARY

Poultry enteric syndromes such as poult enteritis complex (PEC) and poult enteritis mortality syndrome (PEMS) in young turkeys, and runting-stunting syndrome (RSS) in broiler chickens, are recurring, continuous problems for poultry producers in the United States. Analysis of intestinal contents from flocks showing signs of enteric disease often reveals infections with numerous suspect viruses, and the specific etiologies of these syndromes remain elusive. The complex nature of these infections makes laboratory diagnosis and field management of affected flocks difficult. Recent regional and national enteric virus surveys of commercial turkey and chicken flocks

has revealed the ongoing presence of avian reoviruses, rotaviruses and astroviruses in birds showing signs of enteric disease and in otherwise healthy birds; the viruses are often detected in combination. The turkey astroviruses, particularly turkey astrovirus type 2, appear to be ubiquitous in U.S. flocks, where they may affect the performance of commercial turkeys (3,5). Several turkey-origin reoviruses have recently been isolated and described at the molecular level and in pathogenesis studies, but they do not appear to be the sole causative agent in syndromes such as PEC and PEMS (1,2,4,6,7). This study focuses on the turkey origin rotaviruses, and presents a phylogenetic analysis of rotaviruses detected in commercial turkey flocks, and relates these findings to descriptions of enteric signs submitted from the field. Successful isolation of turkey origin rotaviruses from field samples continues, and should prove useful in determining their role in poultry enteric syndromes.

During the summer and early fall of 2007, in cooperation with poultry industry and animal health representatives, we received numerous intestinal samples collected from commercial turkey flocks in the Midwestern United States. Five complete intestinal tracts were collected from each flock and were shipped on the day of collection on wet ice via overnight carrier to the Southeast Poultry Research Laboratory in Athens, Georgia. Field observations of each flock were included with each shipment. Intestinal contents from each flock were pooled and processed into 10% homogenates in sterile PBS upon receipt, and total RNA or nucleic acid was extracted from each pooled sample. Total RNA from each pooled sample was tested via RT-PCR for the presence of turkey-origin avian rotavirus, reovirus and astrovirus RNA and via real-time RT-PCR for the presence of turkey coronavirus RNA. Based upon requests from the field, selected samples were tested via PCR for the presence of fowl adenovirus (FAV) or hemorrhagic enteritis virus (HEV) DNA. Most of the gastrointestinal tracts were collected from flocks showing signs of enteric disease, but several shipments included gastrointestinal

tracts collected from flocks that were performing normally and that had no signs of enteric disease. The sampled flocks ranged in age from 2 days old to 33 days old. The African green monkey kidney cell line MA-104 was used to isolate turkey-origin rotavirus directly from the original 10% intestinal homogenates.

Of 46 pooled samples processed and tested, 45 samples tested positive for the presence of astrovirus, 30 tested positive for the presence of rotavirus, and 10 for the presence of reovirus. No turkey coronavirus, HEV, or FAV nucleic acid was detected in any sample. Rotavirus RNA was detected in flocks exhibiting enteric signs (pasty vents, watery intestines, huddling, increased mortality), as well as in several flocks described as “normal” in the field. All rotavirus-positive flocks except for one (n=29) were also positive for astrovirus; eight flocks tested positive for rotavirus, reovirus, and astrovirus.

Based upon a phylogenetic analysis of the rotavirus NSP4 enterotoxin gene, the turkey-origin rotaviruses detected in these Midwestern samples are distinct from chicken-origin rotaviruses previously detected in broiler flocks in the Southeastern United States, with similarities at the nucleotide level ranging from approximately 70 to 79%. Further, these Midwestern turkey-origin rotaviruses are distinct from rotaviruses previously detected in turkey flocks in the Southeast, with nucleotide similarities ranging from approximately 86 to 93%.

Two samples, one originally from a flock with enteric signs and one from a flock described as normal, were selected for rotavirus isolation using the MA-104 cell line. Following passage in MA-104 cell culture, rotavirus genomic RNA was detected in the cell culture supernatant via RT-PCR and could be isolated at sufficient quantities to allow analysis via electropherotype in agarose gels. The electropherotypes of the two isolates were similar. Further, the astrovirus also present in the original intestinal sample

could no longer be detected via RT-PCR in cell culture supernatants. The ability to isolate turkey-origin rotaviruses from complex environmental samples will prove useful in downstream pathogenesis studies and during the continuing molecular characterization of rotavirus genes and genome segments.

REFERENCES

1. Day, J., M. Pantin-Jackwood, and E. Spackman. Sequence and phylogenetic analysis of the S1 genome segment of turkey-origin reoviruses. *Virus Genes* 35:235-242. 2007.
2. Kapczynski, D. R., H.S. Sellers, V. Simmons, and S. Schultz-Cherry. Sequence analysis of the S3 gene from a turkey reovirus. *Virus Genes* 25:95-100. 2002.
3. Pantin-Jackwood, M., E. Spackman, and P. Woolcock. Phylogenetic Analysis of Turkey Astroviruses Reveals Evidence of Recombination. *Virus Genes* 32:187-192. 2006.
4. Pantin-Jackwood, M.J., E. Spackman, and J.M. Day. Pathology and virus tissue distribution of Turkey origin reoviruses in experimentally infected Turkey poult. *Vet Pathol* 44:185-195. 2007.
5. Pantin-Jackwood, M.J., E. Spackman, and P.R. Woolcock. Molecular characterization and typing of chicken and turkey astroviruses circulating in the United States: implications for diagnostics. *Avian Dis* 50:397-404. 2006.
6. Sellers, H.S., E.G. Linnemann, L. Pereira, and D.R. Kapczynski. Phylogenetic analysis of the sigma 2 protein gene of turkey reoviruses. *Avian Dis* 48:651-657. 2004.
7. Spackman, E., M. Pantin-Jackwood, J. Day, and H. Sellers. The pathogenesis of turkey origin reoviruses in turkeys and chickens. *Avian Pathology* 34:291-296. 2005.

IT'S COCCI, BUT WHAT SPECIES?

OK, ES COCCIDIA, PERO ¿QUÉ ESPECIE?

Steve H. Fitz-Coy

Schering-Plough, Salisbury, MD 21801

RESUMEN

Las coccidias son protozoarios parásitos que invaden los intestinos y los ciegos de las aves comerciales. Las aves de todas las edades son susceptibles a una o más especies de coccidias, cada

una de las cuales tiene comportamiento característico en lo que se refiere a su fecundidad, la región del intestino que parasitan, la profundidad del desarrollo del parásito en la mucosa y la magnitud de los estadios endógenos. La patogenicidad se ve influenciada por

estas características. *Eimeria praecox* tiene fecundidad relativamente alta, pero invade la mucosa con muy poca profundidad y produce estadios endógenos relativamente pequeños. *E. tenella* es relativamente fecunda, invade las capas más profundas de la mucosa y produce etapas endógenas grandes. *E. necatrix* realmente produce muy pocos oocistos, invade profundamente la mucosa y tiene estadios endógenos relativamente grandes. En el pavo, *E. meleagritidis* es relativamente fecunda, invade a la mucosa con profundidad moderada y tiene numerosos estadios endógenos pequeños. Debido a estas características, *E. praecox* es apatógena, *E. tenella* y *E. necatrix* son muy patógenas para el pollo, mientras que *E. meleagritidis* lo es también para el pavo.

SUMMARY

Coccidia are protozoan parasites which invade the intestines and ceca of commercial poultry. Birds of all ages are susceptible to one or more species of coccidia. Each *Eimeria* species has characteristic behaviors, such as fecundity, region of intestine parasitized, depth of parasite development in the mucosa and the size of the endogenous stages. Pathogenicity is influenced by these characteristics. *Eimeria praecox* has a relatively high fecundity, shallow invader of the mucosa and produces relatively small endogenous stages. *E. tenella* is relatively fecund, deep invader of the mucosa and produce large endogenous stages. Whereas, *E. necatrix* is a poor oocysts producer, deep invader, but has relatively large endogenous stages. *E. meleagritidis* of the turkey is relatively fecund, moderately deep invader, but numerous small endogenous stages. Because of these traits, *E. praecox* is non-pathogenic, *E. tenella* and *E. necatrix* highly pathogenic to chickens and *E. meleagritidis* highly pathogenic to turkeys.

INTRODUCTION

Coccidia are protozoan parasites of the genus *Eimeria*. Coccidiosis is an expensive disease to the poultry industry. Millions of dollars are spent annually for prophylactic and therapeutic control. The losses due to poor productivity might not be properly accounted for. Nine species of *Eimeria* have been named that parasitize the intestines of chickens and seven for the turkey. The species that affect chickens include *E. tenella*, *E. maxima*, *E. mitis*, *E. acervulina*, *E. praecox*, *E. necatrix*, *E. brunette*, and *E. hagani* and *E. mivati*. The species of turkeys are *E. adenoides*, *E. meleagritidis*, *E. meleagris*, *E. dispersa*, *E. gallopavonis*, *E. subrotunda*, and *E. innocua*. Due to pathogenicity and responsiveness to anticoccidial

drugs, it is important to have identification of the species.

Tyzzler (1928) suggested eight criteria important in differentiating and identifying new species of chicken *Eimeria*. Other methods used for coccidia identification are enzyme electrophoresis (Shirley, 1975 and 1979) and polymerase chain reaction (PCR), (Schnitzler *et al.*, 1998 and 1999).

The presence of coccidia does not necessarily signify a disease; pathogenicity and pathology of coccidia depend on the species. Pathology and pathogenicity are also influenced by the amount of oocysts ingested, the host sensitivity to the coccidia species, and the host environment. The different stages of the parasites develop above or below the host cell nuclei and the maturation of these stages end in destruction of tissues. Those species of coccidia that invade deep host tissue tend to be more pathogenic than the shallow invaders. The species of chicken coccidia that develop deep in the tissue are *E. tenella*, *E. necatrix*, *E. brunette*, *E. maxima*, and *E. mivati*. These species develop closer to the vascular beds in the lamina propria; the mature parasitic stages damage blood vessels, resulting in bleeding into the intestinal lumen. The species of coccidia of the turkey that produce blood or flecks of blood in the droppings are *E. adenoides*, *E. gallopavonis* and *E. meleagritidis*. The deep invading species are also associated with mortality. The species of turkey coccidia do not produce the mega gamonts as seen with *E. maxima* of the chicken, but compensate for the lack of mega stages by producing large numbers of gamonts. *E. acervulina*, *E. mitis* and *E. hagani* of the chicken and *E. meleagridis* of the turkey are less pathogenic, causing morbidity but no mortality in their respective hosts. *E. praecox* of the chicken is generally considered non-pathogenic. Since the naming and description of the turkey coccidia, *E. innocua* and *E. subrotunda*, there has been relatively little with these species. Coccidia species that have a longer pre-patent period tend to be more pathogenic than those with the shorter periods. The time it takes for the first appearance of oocysts in the feces of experimentally-infected hosts is one aid in differentiating non-precocious species of *Eimeria*. *E. praecox* has the shortest pre-patent period, 84 hr, pi. and *E. necatrix* 138 hr, pi.

Someone skilled at the art can use oocyst size and shape unsporulated and sporulated oocysts to make a reasonable presumptive diagnosis. Multiple species of coccidia make this methodology a bit more challenging. The oocysts of *E. mitis* are almost round and the oocysts of *E. maxima* are large and have a tint of color. The turkey coccidia have shapes ranging from ellipsoidal to broadly ovoid, to subspherical (*E. adenoides*, *E. dispersa* and *E. meleagritidis*, respectively).

DISCUSSION

Morphology of the various stages was one of the eight criteria Tyzzer (9) suggested for differentiating species of chicken *Eimeria*. Shirley (8) utilized the electrophoresis technique to differentiate the species chicken *Eimeria*; this method had its limitations - interpretation of analysis. The use of PCR has become a tool in the speciation process; but not all the species of the chicken or turkey coccidia might be able to be diagnosed via this process.

The oocyst size and shape for the chicken coccidia *E. praecox* make it challenging for the less trained diagnostician to separate this species from *E. tenella*, *E. necatrix*, *E. hagani* and even *E. brunetti*. What makes *E. praecox* enormously confusing is that it is fairly fecund, but non-pathogenic. Care should be taken to differentiate *E. praecox* from the more pathogenic species. With the turkey species, there may be considerable confusion between *E. adenoides*, *E. gallopavonis* and even *E. meleagridis*. These three species parasitize the same region of the host intestines (ileum, ceca and rectum). *E. meleagrimitis* and *E. dispersa* have different oocyst morphology, *E. meleagrimitis* is ovoid and *E. dispersa* is broadly oval. These two species however, parasitize the same region of the small intestine.

Levine's (1938) description of *E. hagani* was brief, but those findings were confirmed by Edgar (1959) and Oluleye (7). *E. mitis* is more often confused with *E. mivati*. *E. mivati* is actually the smallest of all the species of chicken *Eimeria*. The oocysts of *E. mitis* are subspherical whereas, *E. mivati* oocysts are broadly ovoid. *E. mitis* parasitize primarily the lower small intestine whereas, *E. mivati* is primarily in the upper small intestine, but will parasitize the entire small intestine. Tyzzer's (1929) description of *E. acervulina* invaded epithelial cells of the upper third of the small intestine, but that it rarely infected the lower tract including ceca. Some have reported that this species causes mortality, but my experience I have not experienced *E. acervulina* causing mortality. Tyzzer (1929) described *Eimeria mitis* as a parasite of the

anterior small intestine, yet he acknowledged that it infected the lower tract. But, work done at Auburn University found the greatest infection posterior to the ysd, with limited infection in the duodenum (3). A fourth generation schizont was revealed, and this species produce no mortality (3).

REFERENCIAS

1. Edgar, S.A. Species identification of coccidian affecting poultry. Proceedings of the Bear Mountain Conference (Oct.), American Cyanamid. 1958.
2. _____ and C.T. Seibold. A new coccidium of chickens, *Eimeria mivati* sp. N. (Protozoa: Eimeriidae) with details of its life history. Journal of Parasitology 50: 193-204. 1964
3. Fitz-Coy, S.H. The life history, pathogenicity, pathology, immunogenic properties, ultrastructure and control of two isolates of *Eimeris mitis*, Tyzzer, 1929, Ph.D. Dissertation, Auburn University, Alabama. 1982.
4. Johnson, W.T. Directors Biennial Report. 1928-1930. Oregon Agricultural College Experiment Station. 1930.
5. _____. Coccidiosis of chicken with special reference to species. Oregon State College Bulletin 358:1-33. 1938.
6. Levine, P.P. Studies on *Eimeria hagani* n. sp. (Protozoa: Eimeriidae). A new coccidium of the chicken. Cornell Veterinarian 28: 263-266. 1967a.
7. Oluleye, O.B. The life history and pathogenicity of a chicken coccidium *Eimeria hagani*, Levine, 1938. Ph.D. Dissertation, Auburn University, Alabama, 66 pp. 1982.
8. Shirley, W.M. Enzyme variations in *Eimeria* species of the chicken. Parasitology 71: 369-376. 1975.
9. Tyzzer, E.E. Methods for isolating and differentiating species of *Eimeria* occurring in gallinaceous birds. Society Proceedings of Journal of Parasitology 15-16: 148-149. 1928.
10. _____. Coccidiosis in gallinaceous birds. The American Journal of Hygiene 10: 1-115. 1929.

DESAFÍOS A LOS QUE SE ENFRENTAN LAS PARVADAS VACUNADAS CONTRA COCCIDIOSIS

CHALLENGES FACED BY COCCIDIOSIS-VACCINATED FLOCKS

M. E. Rubio, A. Morales, R. Cervantes, D. Dueñas, J. González, y L. Castro

SUMMARY

For many years, the control of coccidiosis in Mexico was based on feeding anticoccidial drugs, aided by efforts to improve productive parameters, decrease mortality, and obtain the skin pigmentation, so highly appreciated by domestic consumers. Using ionophore/nicarbazin dual programs up to the mid 90s yielded excellent results. Nevertheless, the presence of hard-to-treat, recurrent outbreaks pushed for more frequent product rotations, resulting in increased popularity of coccidiosis vaccines aimed to seeding the farms with drug-sensitive strains as well as generating immunity. In recent years, flock performance is being improved by factors such as vaccine management, vaccine route of administration, hatchery vaccination process, in-house chicken management, fasting challenges, weather, and immunosuppressors such as viruses and aflatoxins.

INTRODUCCIÓN

Durante muchos años en México, el control de la coccidiosis aviar se basó única y exclusivamente con el uso de coccidiostatos en el alimento, enfocando los esfuerzos no solo en reducir mortalidad o mantener ganancias y conversiones alimenticias proyectadas, sino también en mantener la pigmentación adecuada tan importante en nuestro mercado nacional. El uso de ionóforos en las dietas brindaron un excelente resultado durante la década de los años 80, posteriormente tuvieron que combinarse en programas duales principalmente con nicarbazina; sin embargo, a finales de los 90s y principios de este siglo, las rotaciones de coccidiostatos se hicieron cada vez más constantes y se observaron conjuntamente brotes recurrentes sin respuesta positiva a tratamientos. Lo anterior ha provocado que el uso de vacunas contra coccidiosis se haya incrementado con el objetivo principal de repoblar granjas con cepas sensibles a los coccidiostatos y generar inmunidad. También durante los últimos 5 años, se ha venido observando la presencia de factores que de alguna u otra manera se involucran en el resultado de la respuesta correcta de la vacuna, condiciones como: vía de aplicación, calidad de la vacuna, manejo de esta, tratamientos, clima, factores inmunosupresores, manejos en las granjas, etc.

juegan un papel muy importante para lograr el mejor desempeño de las parvadas vacunadas.

OBJETIVO

El objetivo del presente trabajo, es dar a conocer cómo los factores siguientes: manejo de vacuna, vía de aplicación, proceso de vacunación en incubadora, manejo de pollitos en casetas; así como los desafíos por ayuno, clima e inmunosupresores como virus y aflatoxinas, tienen un efecto en el desarrollo de inmunidad, cambios en la sensibilidad de eimerias, así como en el comportamiento productivo y en la pigmentación de parvadas vacunadas.

DISCUSIÓN

Manejo de vacuna. Las vacunas disponibles en el mercado, en su mayoría están constituidas de eimerias vivas virulentas o atenuadas lo cual requiere mantener la cadena fría de distribución para asegurar la vida de los oocistos. En ocasiones al microscopio los oocistos pueden observarse completos y esporulados; sin embargo, esto no significa que estén viables, las fallas en el manejo de la vacuna puede provocar daños irreversibles a la parte infectante de las coccidias y por consiguiente un inadecuado desarrollo de la inmunidad en aves vacunadas. Por lo anterior es importante cerciorarse que la vacuna que estemos usando nos asegure la presencia de oocistos esporulados viables.

Vía de aplicación. La técnica más comúnmente utilizada es la aspersión de vacuna al día de edad aplicándose generalmente en la planta incubadora (1). La vacuna debe diluirse de acuerdo a las recomendaciones de cada fabricante y debe acompañarse del colorante especificado por este. El uso del colorante tiene básicamente dos funciones: 1) Captar la atención de los pollitos, quienes por curiosidad al momento de acicalarse ingerirán los oocistos que se encuentren en el plumón y 2) Valorar el adecuado suministro de la vacuna mediante la coloración del plumón y/o punta de la lengua.

El acicalamiento es una importante condición que debe permitirse en los pollitos minutos después de la aspersión de la vacuna en la planta incubadora; para la adecuada realización de esta actividad es importante brindar luz a las aves, estimular mediante operarios

dicho acicalamiento ya que si esto no se lleva a cabo eficazmente, las aves, una vez que se encuentren a oscuras en las cajas de transporte se echaran, manteniéndose en reposo hasta el momento de ser descargadas en granja.

Un aspecto importante a considerar, es establecer un programa de revisión y mantenimiento de las espreas de los equipos de vacunación, ya que en ocasiones llegamos a apreciar una coloración desuniforme en el plumón de los pollitos por una inadecuada aspersión, esto posiblemente reflejará en el campo una incompleta implantación de los oocistos vacunales y por ende una insuficiente fijación de inmunidad. Una incorrecta vacunación producirá en aves de 16 a 21 días, desuniformidad de parvada, palidez variable y ganancia de peso también variable. El grado de coloración aplicado, es solo un indicativo de la aplicación de la vacuna ya que como sabemos el ingerir los oocistos por la vía oral asegurará la correcta vacunación.

Vacunación en Incubadora. A pesar de que el método más recomendado para la aplicación de vacunas contra coccidias es la aspersión dentro de la planta incubadora, en algunas ocasiones los productores llegan a vacunar a sus pollitos al momento de la recepción en granja, administrando la vacuna mediante aspersión en el alimento; con esta técnica se obtiene una buena implantación de la vacuna de acuerdo al índice de lesiones (SL) encontrado en las parvadas evaluadas; no obstante, al comparar el desarrollo productivo de parvadas vacunadas en granja con parvadas vacunadas en incubadoras, estas últimas reportaron significativamente ($P \leq 0.05$) mejores resultados productivos en lo referente a ganancia de peso y pigmentación (Cuadro 1).

Manejo de los pollitos/pollos en casetas. Además de todos los manejos dados al inicio de la crianza para el adecuado desarrollo de parvadas vacunadas, es recomendable procurar que al momento de dar espacio, parte de la cama de la sala de crianza se vaya distribuyendo en las zonas de ampliación junto con cama nueva, el principal objetivo de esto es conseguir la adecuada implantación de la vacuna mediante la reingestión de los oocistos vacunales. La reingestión de oocistos esporulados o no, es importante ya que estos pueden esporular posteriormente a una reingestión, después de haber pasado por el intestino del pollo sin dañarlo (4).

No debemos perder de vista que para lograr un adecuado desarrollo de la inmunidad contra coccidias se deben cumplir al menos tres esquizogonias, por lo cual la reinfección durante los primeros 21 días de vida de los pollos mediante la reingestión de los oocistos vacunales debe lograrse. Se dio seguimiento semanal a 10 parvadas vacunadas evaluando la cantidad de oocistos por gramo de heces (OPGH), encontrando la

presencia de estos a partir de los 16-18 días de edad y alcanzando su pico de eliminación entre los días 18 y 25 para el caso de *E. acervulina* y de 25 a 32 para *E. maxima* y *E. tenella*, bajando a casi cero en las semanas siguientes.

Parvadas donde el aumento de espacio se realizó utilizando únicamente cama nueva, presentaron problemas de coccidiasis y en ocasiones hasta coccidiosis principalmente debida a *E. tenella* y requirieron de un tratamiento con coccidicidas en el agua de bebida. La curva de eliminación de oocistos en estas parvadas se mantuvo en niveles significativos hasta los 42 días de edad. Finalmente en este punto debemos cuidar la calidad de la cama a lo largo del ciclo productivo ya que también juega un papel importante, en camas muy húmedas es más difícil la esporulación de los oocistos, estos oocistos deben ser reingeridos para iniciar una infección y desarrollar así la respuesta inmune (3).

Clima. El clima en México juega un papel importante ya que más del 90% de nuestras casetas son de ambiente natural. El uso de vacuna durante la época de sequía reportó menor cantidad de OPGH en el monitoreo semanal y las parvadas alcanzaron sus expectativas de producción tanto en conversión alimenticia (CA) como en pigmentación.

Durante la época de lluvia y mayor humedad del medio ambiente los parámetros productivos no se vieron afectados a pesar de encontrarse mayor cantidad de OPGH; no obstante, en ocasiones fue necesario utilizar tratamientos orales por dos días con coccidicidas solubles.

Interrelaciones con consumo de alimento. Nuestras experiencias de campo nos indican que cuando las aves vacunadas contra coccidias, son sometidas a una disminución severa en su ingesta diaria de alimento, como la restricción para el control del síndrome ascítico o fallas en el suministro del mismo, las aves son más susceptibles para presentar un aumento en el IL y OPGH particularmente antes de los 21 días de edad, esto debido a que es la etapa donde se están realizando las esquizogonias necesarias para lograr la inmunidad (2). Esto se produce porque las aves sacian su hambre aumentando la pica de cama y por tanto ingieren mayor cantidad de oocistos, los cuales pueden ser vacunales o de campo. Este proceso puede ser modulado si tratamos a las aves con el uso de coccidicidas o implementamos en nuestra producción el establecimiento de un programa biodual, que consiste en vacunar a los pollos al primer día de edad y administrar en la fase correspondiente de alimento, un coccidiostato ionóforo a dosis menores que las normales.

Inmunosupresores. Ninguna vacuna contra coccidia puede inducir inmunidad adecuada en pollos con el sistema inmunológico dañado cualquiera que sea

la causa. Bajo los sistemas de producción estándar, es común que las aves se expongan a una serie de factores que pueden afectar el sistema inmune, existe una amplia variabilidad en los niveles de daño que se puede provocar, en ocasiones se puede influir de manera directa sobre el sistema inmunológico o bien se puede tener un efecto secundario como consecuencia del estrés provocado a las aves durante su manejo en la engorda. Es ampliamente reconocido que agentes virales como la infección de la bolsa de Fabricio (IBD) y anemia infecciosa (CAV) afectan directamente al sistema inmunológico, otros como el virus de la enfermedad de Newcastle (ND), el virus de laringotraqueitis (ILT), los reovirus y las micotoxinas pueden provocar daños al sistema inmune de manera no tan directa como los anteriores; sin embargo todos provocan inmunodepresión. Por otra parte, no debemos perder de vista que condiciones como calor excesivo, así como una disminución severa en la ingesta diaria de alimento también afectan notoriamente el desarrollo de la inmunidad en parvadas vacunadas contra coccidias.

Dentro de la parvadas vacunadas y monitoreadas semanalmente encontramos casos donde se presentaron procesos infecciosos como la ND e IBD, así como alteraciones en el suministro diario de alimento, en estos casos pudimos observar claramente que el SL fue incrementándose desde los 21 días de manera continua hasta los 35 días de edad, obteniendo un SL promedio a los 35 días de 0.5 para parvadas afectadas por IBF, 0.7 afectadas con ND y de 1.0 para aquellas con fallas en el suministro de alimento, mientras que en las parvadas no afectadas a esta misma edad el SL fue de 0.1, con una curva de evolución que inicio a los 21 días, llegando a su máximo a los 28 y reduciéndose a los 35 días. Por otra parte en la evaluación OPGH en estas mismas parvadas, la ND desencadenó una eliminación muy alta de hasta 800,000 OPGH a los 21 días, manteniéndola en 60,000 a los 42 días; mientras que en la parvada sin problemas infecciosos, la eliminación de estos fue de 14,700 OPGH a los 21 días

edad disminuyendo a 6,750 OPGH al día 35 de la engorda, posterior a esta fecha solo las muestras de las aves sin problemas infecciosos fueron negativas a la presencia de oocistos.

El comportamiento productivo de las parvadas evaluadas fue adecuado, todas llegaron a los pesos esperados en el tiempo definido por cada una de las empresas productoras de pollo, de igual forma la pigmentación de piel no se vio afectada por el uso de vacuna, debido a que el monitoreo constante de estas nos permitió percatarnos a tiempo de los problemas que estaban afectando cuando fue el caso y aplicar las medidas correctivas a tiempo. Otro punto importante a considerar es, que cuando por diversas circunstancias se presentó la necesidad de administrar algún tratamiento, las aves respondieron de manera rápida y adecuada al mismo, situación que en tiempos anteriores al uso de la vacuna en sus instalaciones no fue siempre positiva.

REFERENCIAS

1. Crouch, C.F., S.J. Andrews, R.G. Ward, and M.J. Francis. Protective efficacy of a live attenuated anti-coccidial vaccine administered to 1-day-old chickens. *Avian Pathology*, 32 (3): 295-302. 2003.
2. Jeurissen S.H.M., E.M. Janseb, A.N. Vermeulenb, and L. Verveldec. *Eimeria tenella* infections in chickens: aspects of host-parasite: interaction. *Veterinary Immunology and Immunopathology*, 54: 231:238. 1996.
3. Williams, R.B. and L. Gobbi. Comparison of an attenuated anticoccidial vaccine and an anticoccidial drug programme in commercial broiler chickens in Italy. *Avian Pathology*. 31: 253–265. 2002.
4. Williams, R.B. Epidemiological aspects of the use of live anticoccidial vaccines for chickens. *International Journal of Parasitology*. 29(7): 1089-1098. 1998.

Cuadro 1. Índice de lesiones encontrados en parvadas vacunadas contra coccidia vía aspersión en planta incubadora y mediante aspersión en alimento a la recepción del pollito, con peso promedio y pigmentación lograda a la venta.

| Vía | SL | | | 51 días | |
|--------------------|-------------------|-------------------|-------------------|---------------------------|---------------------------|
| | 21días | 28 días | 35días | Peso (±DS) | *Amarillo (±DS) |
| Planta Incubadora | 0.09 ^a | 0.04 ^a | 0 ^a | 2.662 ^a (0.31) | 26.28 ^a (4.41) |
| Alimento en granja | 0.06 ^a | 0.16 ^a | 0.06 ^a | 2.573 ^b (0.31) | 24.69 ^b (5.50) |

Diferentes literales entre renglones denotan significancia estadística ($P \leq 0.05$) ANOVA-Tukey (Statistix)

*Evaluada con el colorímetro de reflectancia Minolta CR 400

EFFICACY OF A LIVE COCCIDIOSIS VACCINE CONTAINING ATTENUATED STRAINS OF *EIMERIA MAXIMA*, *E. ACERVULINA*, AND *E. TENELLA* ADMINISTERED BY SPRAY TO ONE-DAY-OLD SPF CHICKENS

EFICACIA DE UNA VACUNA VIVA CONTRA LA COCCIDIOSIS QUE CONTIENE CEPAS ATENUADAS DE *EIMERIA MAXIMA*

Julio Cruz-Coy^A, Nikki Pritchard^A, Greg Hanes^B, Daniel Hamby^B, and Robert Smith^A

^AMerial Limited, 1168 Airport Parkway, Gainesville, GA 30501

^BMerial Select, Inc., 1168 Airport Parkway, Gainesville, GA 30501

RESUMEN

El propósito del presente estudio fue demostrar la eficacia de una vacuna viva contra la coccidiosis que contiene cepas atenuadas de *E. maxima*, *E. acervulina* y *E. tenella*, para administración por aspersión, usando un gabinete de aspersión y pollos libres de patógenos específicos (SPF) de un día de edad. A los 28 días después de la vacunación, estas aves se desafiaron con aislamientos de campo patógenos de *E. maxima*, *E. acervulina* y *E. tenella*. Seis días después, estos animales más los testigos no vacunados y desafiados se sacrificaron y se les practicó la necropsia para buscar lesiones características de coccidiosis, de acuerdo con las especies involucradas. Los resultados indicaron que esta vacuna fue eficaz contra los aislamientos patógenos de campo de estas 3 especies de *Eimeria*, con un porcentaje de protección, evaluado mediante calificación de las lesiones características de cada cepa, del orden del 80 al 98%.

ABSTRACT

The purpose of the study was to demonstrate the efficacy of a live coccidiosis vaccine containing attenuated strains of *Eimeria maxima*, *E. acervulina*, and *E. tenella*, administered by spray using an automated spray cabinet, to one-day-old SPF chickens. Twenty-eight days after the vaccination the SPF birds were challenged with pathogenic field isolates of *E. maxima*, *E. acervulina*, and *E. tenella*. Six-days post-challenge the challenged birds, including non-vaccinated challenged control birds, were necropsied and checked for characteristic coccidiosis lesions according to the species involved.

Results indicated that the coccidiosis vaccine was efficacious against the pathogenic field isolates of *E. maxima*, *E. acervulina*, and *E. tenella*. Percentage protection according to the coccidiosis strain lesion scores had a range of 80-98% as follows: *E. maxima* 80%; *E. acervulina* 87%; and *E. tenella* 97.7%. The non-vaccinated, challenged control birds developed severe lesions associated with *Eimeria* infection (80-100% incidence).

(The full-length article will be published in *Avian Diseases*.)

CALORIMETRY APPLICATIONS QUANTIFY THE VARIABLE COST OF SUBCLINICAL COCCIDIOSIS (“COCCIDIASIS”) AT VARIOUS POINTS IN THE BROILER GROWTH CURVE

APLICACIONES DE LA CALORIMETRÍA PARA CUANTIFICAR EL COSTO VARIABLE DE LA COCCIDIOSIS SUBCLÍNICA (“COCCIDIASIS”) EN DIFERENTES PUNTOS DE LA CURVA DE CRECIMIENTO DEL POLLO DE ENGORDA

R. G. Teeter^{*A}, A. Beker^A, C. Brown^A, C. Broussard^B, S. Fitz-Coy^B, J. Radu^B, and L. Newman^B

^ADepartment of Animal Science, Oklahoma State University, Stillwater, OK, USA

^BSchering-Plough Animal Health, Summit, NJ. email: teeterbob1@hotmail.com

*Phone: 405-880-1170, Fax: 405-744-7390, E-mail: teeterbob1@hotmail.com

RESUMEN

La coccidiosis subclínica o coccidiasis del pollo de engorda es una consecuencia esperada de la protección incompleta que dan los ionóforos en el alimento o que también resultan de períodos prolongados de administración del alimento de retiro no medicado. Se aplicaron los principios de la calorimetría a las aves mantenidas en cámaras metabólicas para cuantificar el impacto del desafío coccidiano de bajo nivel sobre los costos metabólicos y digestivos a lo largo de la curva típica de crecimiento del pollo de engorda. Se realizó el desafío con una dosis oral de solución salina estéril o con una mezcla de oocistos de tres especies de *Eimeria*, a diferentes edades del pollo, representando diferentes puntos a lo largo de la curva de crecimiento no lineal. Los costos metabólicos del desafío coccidiano incluyeron supresión del apetito, elevación de la producción de calor de mantenimiento, aumento del contenido de calorías en las excretas y disminución de la ganancia de peso, la eficiencia alimenticia y la energía neta de la ración. Aun cuando el desafío de bajo nivel indujo un costo mensurable a cualquier edad, el costo de la infección subclínica aumentó progresivamente al avanzar la curva de crecimiento del pollo. El desafío subclínico tardío tuvo efectos nocivos significativamente mayores sobre el rendimiento que el observado con desafíos más tempranos.

ABSTRACT

Experiments were conducted to quantify coccidiosis consequence in broilers. Five 6 - day regions spaced throughout a 48 day growth curve were examined. Challenge consisted of an oral dose of sterile saline or a mixture of three *Eimeria* species administered as oocysts at 14, 21, 28, 35, and 42 days.

Variables examined, six days post challenge, included gross and microscopic lesion scores, live weight gain and gain composition, FE, and heat production (Kcal/h). Lesion scores for coccidiosis non-challenged (CNC) birds did not differ from zero ($P>0.10$) throughout the testing period. Coccidiosis challenged (CC) scores were inversely correlated ($P<0.01$) with live weight, weight gain, FE, energy consumption and retained energy. Modeling of energetic data necessitated lesion score inclusion to improve accuracy for CC birds. Lesion score was positively correlated with maintenance energy cost and excreta energy loss. In some cases CC birds were observed eating less and producing similar to greater amounts of heat suggesting that the metabolic effects of coccidiosis have marked metabolic impact. Results indicate that coccidiosis consequence in growing broilers is age dependent with deleterious impact being more pronounced in immunologically naïve birds late in the growth curve. Although low-level challenge induced measurable cost at any age, the cost of subclinical infection increased with progression along the broiler growth curve.

INTRODUCTION

Numerous nonnutritive factors have been documented to impact bird performance. For example, managerial issues as ventilation, stocking density, lighting program, and feed processing (3) have received considerable study for calorific impact upon broiler production. In contrast, though coccidiosis is well known to adversely impact production, its calorific costs are largely not quantified. Indeed, as coccidiosis is generally considered to increase feed passage, raise body temperature, increase blood loss and reduce various performance criteria its quantification upon energy balance is warranted.

MATERIALS AND METHODS

Experiments using 1,200 Cobb X Cobb broilers were conducted to quantify coccidiosis impact upon bird energy balance. Five 6 - day regions, spaced throughout a 48 day growth curve, were examined. General bird management in floor pens and metabolic chambers as well as dietary ration specifications have been previously described (1,3). Challenge consisted of an oral dose of sterile saline or a mixture of three *Eimeria* species as *E. maxima*, *E. acervulina*, and *E. tenella* initially at 20,000; 50,000; and 30,000 oocysts per bird and increasing to 55,000; 105,000; and 50,000 oocysts per bird, respectively at 42 days to mimic production environments. Challenges were administered at 14, 21, 28, 35, and 42 days. Variables examined six days post challenge included gross and microscopic lesion scores live weight, FE, (upper small intestine: USI; mid small intestine: MSI; ceca: C), and microscopic lesion scores (*E. maxima*, *E. tenella*, and *E. acervulina*) with scores as 0=none and 4=high. Bird heat production (Kcal/h) was measured continuously by indirect calorimetry and body composition via x-ray analysis. Modeling for maintenance energy, retained energy, accretion energy and predicted ME consumption has been described (2): Accurate prediction of ME_n consumption was used to judge general model adequacy. Variables used in model selection were examined in forward stepwise regression (5). Factors were added to the regression model until three conditions were met: 1) adding factors to the model did not result in a substantial (R² improvement >2 %) increase in the model R²; 2) factors in the model were significant ($P \leq 0.1$); and 3) the resulting model matched known properties of the independent variables.

RESULTS AND DISCUSSION

Study results are displayed in Table 1 for three of the five evaluation intervals. As the 21 and 35 day data were generally intermediate to the 14, 28 and 42 day results, they were not shown to conserve writing space, but were used in all modeling. Bird live weights and FCR for CNC and CC birds housed in the floor pens and metabolic chambers were similar to reported observations with CC adversely impacting performance. Modeling initially used maintenance as well as protein and fat gain to estimate observed ME_n consumption with classical approaches (2). In this case, ME_n consumption was accurately predicted to within 4% for CNC birds while the CC error exceeded 25%. Stepwise regression procedures indicated that bird heat production, microscopic and gross lesion scores as well as various live weight and metabolic weight interactions were needed to improve model predictive

ability to within 5% of observed ME_n consumption for CC birds. The marked deviation of observed and classically predicted ME_n consumption for CC birds indicates that other calorific components must be considered.

Heat production is the summation of maintenance and accretion metabolic inefficiency. As bird heat production and protein and lipid gain were continuously monitored during the metabolic phase of the study, it is possible to estimate actual maintenance energy cost of all treatments (3). Table 1 data indicate that bird maintenance cost increases with bird size, classically so for CNC birds, while the cost for CC birds also increases linearly with lesion score. If CC birds exhibited higher body weights, then elevated maintenance would be expected. But, as discussed, the live weight and FCR of CC birds was reduced ($P < 0.01$). Indeed, the elevated maintenance cost occurred with less energy consumed and lower body weight ($P < 0.01$).

Once maintenance costs are known, calorie loss in excreta may be estimated by difference. If assumptions used during ration formulation were appropriate, and bird energy balance accurately determined, then added excreta calories should be zero. In this study, CNC birds were within 95% of complete energy accounting throughout the growth curve. This deviation averaged 12% on day 20 and exceeded 26% for the lesion score two birds at 48 days. Whether the adverse excreta response represents blood or feed loss is moot, as the calorific cost must be paid.

The combination of lowered energy consumption coupled with elevated maintenance cost and excreta energy loss, makes the coccidiosis challenge critical to avoid. If some coccidiosis challenge is going to occur, the data strongly suggest that early exposure will have less overall consequence to energy utilization. Bird daily retained energy fell to 0 for lesion score 2 birds at 48 days in contrast to the 100 Kcal at 20 days despite the lesion score 2 birds consuming 300 and 482 Kcal of energy, respectively. Birds with subclinical CC (0.5 lesions score) had 18 less Kcal retained energy at 20 days in contrast to 114 less Kcal at 48 days. Indeed, consequences for CC were directionally similar for low and high lesion score birds. Feed efficiency responses paralleled energy responses with CC consequences becoming more profound late in the growth curve.

REFERENCES

1. Belay, T. and R. G. Teeter. Virginiamycin effects on performance and salable carcass of broilers. J. Appl. Poult. Res. 3:111-116. 1994.
2. Brown, C. 2007. Evaluation of coccivac-B[®] and sacox 60[®] for control of 3 strains of *Eimeria* in broilers. MS. diss., Oklahoma State University, 2007.

3. McKinney, L.J. and R.G. Teeter. Predicting effective caloric value of nonnutritive factors: I. Pellet quality and II. Prediction of consequential formulation dead zones. *Poult. Sci.* 83:1165-1174. 2004.

4. National Research Council. *Nutrient Requirements of Poultry*. 9th rev. ed. Natl. Acad. Press. Washington, DC. 1994.

5. Neter, J., W. Wasserman, and M.H. Kutner. Building the regression model. Pages 433-483. In *Applied Linear Statistical Models*. Richard D. Irwin, Inc. Homewood, IL. 1990.

Table 1. Coccidiosis mediated lesion score effects upon production and energetic criteria at standardized weights¹.

| Variable ADG | Lesion Score ² | | | | |
|--|---------------------------|------|------|------|-------|
| | 0 | 0.5 | 1 | 1.5 | 2 |
| (Age, days) Initial Live Wt. (g) | | | | | |
| 14-20, 904 | 76.5 | 70.2 | 60.6 | 48.7 | 40.7 |
| 28-34 2096 | 92.6 | 72.2 | 54.3 | 38.2 | 27.3 |
| 42-48 3398 | 97.3 | 61.0 | 32.7 | 10.0 | -7.0 |
| Maintenance Cost (Kcal/Day) | | | | | |
| (Age, days) Initial Live Wt. (g) | | | | | |
| 14-20, 904 | 124 | 148 | 151 | 154 | 281 |
| 28-34 2096 | 187 | 215 | 218 | 222 | 308 |
| 42-48 3398 | 281 | 311 | 308 | 264 | 315 |
| ME _n Consumption/Day (Kcal) | | | | | |
| (Age, days) Initial Live Wt. (g) | | | | | |
| 14-20, 904 | 386 | 364 | 342 | 318 | 300 |
| 28-34 2096 | 562 | 516 | 477 | 444 | 420 |
| 42-48 3398 | 701 | 628 | 570 | 522 | 482 |
| Added Excreta (Kcal/Day) | | | | | |
| (Age, days) Initial Live Wt. (g) | | | | | |
| 14-20, 904 | 16 | 5 | 22 | 37 | 35 |
| 28-34 2096 | 24 | 30 | 57 | 81 | 86 |
| 42-48 3398 | 38 | 57 | 94 | 122 | 130 |
| Retained Energy (Kcal/Day) | | | | | |
| (Age, days) Initial Live Wt. (g) | | | | | |
| 14-20, 904 | 188 | 170 | 149 | 121 | 100 |
| 28-34 2096 | 274 | 210 | 162 | 119 | 87 |
| 42-48 3398 | 305 | 191 | 110 | 49 | -0.9 |
| Gain/Feed | | | | | |
| (Age, days) Initial Live Wt. (g) | | | | | |
| 14-20, 904 | 0.64 | - | 0.60 | - | 0.38 |
| 28-34 2096 | 0.54 | - | 0.37 | - | -0.04 |
| 42-48 3398 | 0.43 | - | 0.10 | - | -0.49 |

¹Values created using predictive models ($R^2 > .95$) and standardized initial weights.

²Mixed lesion scores were utilized for all variables except Gain/Feed, where homogenous arrays of 0, 1, 2, 3 and 4 were applied.

EFFECTO DE LA HARINA DE *ASPERGILLUS* SPP., O UN COMPLEJO ENZIMÁTICO (AMILASA, XILANASA Y PROTEASA) SOBRE LA MICROBIOTA INTESTINAL DE POLLOS DE ENGORDA DESAFIADOS CON *EIMERIA* SPP.

THE EFFECT OF *ASPERGILLUS* SPP. MEAL (*HA*) OR AN ENZYME COMPLEX (*CE*, AMYLASE, XYLANASE, PROTEASE) ON THE INTESTINAL MICROBIOTA OF BROILERS CHALLENGED WITH *EIMERIA* SPP.

Marco A. Juárez-Estrada^A y Gerardo M. Nava-Morales^A

^ADepartamento de Producción Animal: Aves FMVZ-UNAM, Avenida Universidad 3000, Ciudad Universitaria, Del. Coyoacán. México D.F. CP. 04510

SUMMARY

Four 25-broiler groups with one replicate were used. T1 = negative control (basal diet, 60% wheat); T2 = 0.2 % HA; T3 = 0.1% CE; T4 = challenged only. In day 13 groups 2, 3 and 4 were challenged orally in the crop with *Eimeria acervulina* (5×10^4), *E. maxima* (2×10^3) and *E. tenella* (2×10^4)/mL/bird. On days 20 and 26, the most probable numbers of coliforms, molds/yeasts, non coliform enterobacteria, and clostridial organisms were detected. On day 20 of age, T2 showed increased bacterial proliferation, but on day 26 a large amount of *Clostridium* spp. was detected in T3. *HA* promotes beneficial bacteria. Despite of increased intestinal damage, gut physiological functions were not severely affected.

RESUMEN

La coccidiosis es causada por un protozoo intracelular perteneciente a diferentes especies del género *Eimeria* (1). La enfermedad se previene eficazmente con la inclusión de drogas anticoccidianas en la dieta. Sin embargo, se ha observado que pueden ocurrir problemas de coccidiosis clínica y subclínica en condiciones ambientales nocivas, por ejemplo: cama húmeda, altas temperaturas, sobrepoblación, cantidades inadecuadas de anticoccidiano y otros errores de manejo (1,2). La enteritis necrótica (EN) es una enfermedad enterotoxémica causada por *Clostridium perfringens* de los tipos A y C (3). Su patogénesis se caracteriza por la proliferación de *C. perfringens* en las vellosidades intestinales del duodeno, yeyuno e íleon. La producción de toxinas α y β conducen al desarrollo de lesiones necróticas en la pared del intestino, así como a un aumento de la mortalidad (3). *C. perfringens* es un colonizador habitual del tracto intestinal, se menciona que llega a ser parte de hasta el 30% de la

microbiota que normalmente se encuentra en el tracto digestivo de las aves sanas (3).

Algunos factores que predisponen a la presentación de EN descritos en la literatura son la utilización de dietas ricas en Polisacáridos no amiláceos viscosos y solubles (PNAV), como los que contienen el trigo, la cebada y la avena (4,5). La EN puede prevenirse eficazmente si se impide la proliferación de *C. perfringens* y al mismo tiempo se logra mantener la integridad de la mucosa intestinal (6,7). La coccidiosis puede llegar a afectar ésta integridad intestinal debido a las lesiones que produce (8,9,10,11). En este caso, una rápida recuperación es crítica para prevenir infecciones secundarias que de acuerdo a la literatura son las causales más importantes de bajo rendimiento en las aves domésticas (9,12). Los coccidiostatos del tipo ionóforo tienen un efecto antibacteriano importante especialmente contra bacterias Gram-positivas (como *Clostridium perfringens*), además poseen un efecto de promoción del crecimiento en las aves domésticas, siempre y cuando haya ausencia de los parásitos del tipo *Eimeria* spp., este efecto posiblemente se debe a la reducción de la carga bacteriana (13). El efecto antibacteriano de los coccidiostatos de tipo ionóforo es de sobremanera importante si en el alimento no se están utilizando aditivos antibacterianos (13). Ante la posible e inminente futura revocación del uso de los anticoccidianos de tipo antibiótico-ionóforo del alimento bajo la presión de las legislaturas de varios países incluyendo la WHO, debe considerarse la sustitución de estos productos en su efecto anticoccidiano y anticlostridial, por métodos alternativos que sean por lo menos igual o más efectivos que los ionóforos actualmente empleados (14).

Algunas estrategias incluyen la utilización de probióticos, los cuales son microorganismos vivos que

proporcionan un efecto benéfico para el huésped. Otra estrategia es el empleo de prebióticos, algunos otros componentes son los ácidos grasos omega-3, ácidos grasos poli insaturados y enzimas específicas (Fitasa, amilasas, xilanasas, proteasas) (14,15,16,17,18).

Entre los beneficios más importantes se encuentra la regulación de la función gastrointestinal, la modificación de la microbiota nativa intestinal (MNI), la modificación en la actividad inmunológica intestinal, la modulación de la motilidad y la proliferación celular de la mucosa intestinal, además de la regulación de la función endocrina del tracto intestinal (17,18,19, 20,21). Aún requiere ser estudiado con profundidad el papel de los prebióticos, probióticos y simbióticos en la nutrición animal, con la finalidad de entender el balance que existe entre la MNI y el bienestar del huésped; además de considerar como participa ésta en el metabolismo del consumidor bajo condiciones normales o bien bajo el contexto de dietas que inducen estrés por el origen de sus componentes (40-60% de trigo) o bien ante la presencia de desafíos constantes con coccidias de campo (3).

MATERIAL Y MÉTODOS

Animales de experimentación. Se emplearon 200 pollitos de engorda mixtos Ross x Ross de un día de edad, provenientes de una incubadora comercial, aleatoriamente se alojaron en una batería eléctrica (Petersime®), ubicada en el interior de una unidad de aislamiento del Departamento de Producción Animal: Aves de la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia de la U.N.A.M., se mantuvieron en condiciones de manejo y bienestar de acuerdo a la NOM-069-ZOO-1999.

Aislamiento de coccidias patógenas. El inóculo parasitario de desafío empleado para cada ave estuvo compuesto de *Eimeria acervulina* (5×10^4), *E. maxima* (2×10^3) y *E. tenella* (2×10^4) /mL. Este aislamiento produce únicamente signos de leve a moderados de la enfermedad, sin embargo, es suficiente para reproducir las condiciones de campo de tipo subclínico de ésta enfermedad semejantes a las que se encuentran expuestas las aves comerciales que se mantienen durante el periodo de crianza bajo un desafío constante de oocistos de *Eimeria* spp.

Aditivos alimenticios. El prebiótico se incluyó al 0.2% en la dieta base, es harina de *Aspergillus* spp (Fermacto®), la cual es un producto de la fermentación primaria de una cepa no tóxica de éste hongo. Contiene aproximadamente 12% de proteína y 45% de fibra, la cual es de origen micelial no vegetal. El complejo enzimático (Avizyme 1500®) se utilizó al 0.1% de inclusión total en la dieta base, se encuentra integrado por diferentes tipos de enzimas como son la amilasa, la pectinasa, la xilanasas y la proteasa.

Diseño experimental. Cuatro grupos de 25 aves cada uno (con 2 réplicas para contabilizar un total de 200 aves) se alimentaron con una dieta base isocalórica e isoproteica que contenía una alta inclusión de trigo (60%). El grupo 1 fue el grupo testigo negativo, no se desafío con las coccidias patógenas. El grupo 2 adicional a la dieta contenía 0.2% de harina de *Aspergillus* spp. (Fermacto®). El grupo 3 adicional a la dieta base se agregó 0.1% de complejo enzimático (Avizyme 1500®). El grupo 4 se consideró como grupo testigo positivo, no recibió ningún tipo de suplemento y únicamente se desafío con las coccidias patógenas. Los grupos 2, 3 y 4 fueron desafiados *per os* al día 13 de edad, la fecha seleccionada para el desafío corresponde al punto de ascenso en la campana de desafío coccidiano de los pollos de engorda criados en condiciones comerciales en México (2). En la misma fecha el grupo 1 recibió *per os* solo solución tampón inocua (PBS estéril).

Aislamiento y cuantificación del número más probable (NMP) de unidades formadoras de colonia de microorganismo intestinales anaerobios. Para la cuantificación del número más probable (NMP) de microbiota intestinal anaerobia, a partir de cinco aves por grupo que recibieron la eutanasia (22), al día 20 y 26 de edad respectivamente, se obtuvo 1 gramo de contenido intestinal a partir de tracto digestivo y sacos ciegos, el cual fue diluido en 9 mL de solución amortiguada de fosfatos reducida en una cámara de anaerobiosis. Se realizaron diluciones décuples seriadas y se cultivó en placas de agar *Reinforced Clostridium Medium Enriquecido*, medio de cultivo formulado para cultivar microorganismos anaerobios. Las placas de agar fueron incubadas 72 horas a 37°C bajo condiciones de anaerobiosis.^a Los medios de cultivo fueron examinados y las diferentes colonias de distintos tipos fueron cuantificadas, el total de unidades formadoras de colonia por gramo (UFC/g) de ileon se reporta como media \pm desviación estándar (3,23,24).

Aislamiento y cuantificación del NMP de unidades formadoras de colonia de microorganismos intestinales aerobios. Para determinar el NMP de microbiota intestinal aerobia, 1 g de contenido intestinal fue diluido en caldo tioglicolato (Bioxon México, Oaxaca; México) se realizaron diluciones décuples seriadas y se cultivó en medios específicos para cada género bacteriano. Para el aislamiento de enterobacterias coliformes se utilizó agar McConkey (Acumedia, Baltimore; USA). Para el aislamiento de enterobacterias no coliformes se empleó agar Tergitol 7 (Difco, Detroit; USA) y para el aislamiento de *Clostridium* spp se utilizó agar SPS (Difco, Detroit; USA). Para el aislamiento y cuantificación de hongos y levaduras se utilizó agar Sabouraud Dextrosa (Difco, Detroit; USA). Las placas de agar fueron incubadas 24 horas a 37°C en

aerobiosis. Los medios de cultivo fueron examinados y las diferentes colonias de distintos tipos fueron cuantificadas, el total de unidades formadoras de colonia por gramo (UFC/g) de íleon se reporta como media \pm desviación estándar (23,25).

Análisis estadístico. Se efectuó un ANDEVA. Previo al análisis de varianza el NMP de microbiota intestinal identificada se transformó logarítmicamente con base 10. Las diferencias entre los tratamientos se identificaron con la prueba de comparación de medias de Tukey con una significancia estadística de $P < 0.05$ (26).

RESULTADOS

El NMP de enterobacterias coliformes (1×10^5 UFC/g) en íleon al día 20 de edad fue mayor y diferente ($P < 0.05$) en el grupo de harina de *Aspergillus* spp., con relación a los grupos testigos (positivo y negativo). El grupo del complejo enzimático no presentó diferencias respecto a ninguno de los grupos (Tabla 1). El NMP de hongos y levaduras (1×10^5 UFC/g) en íleon al día 20 de edad fue mayor ($P < 0.05$) en el grupo suplementado con harina de *Aspergillus* spp., con relación al grupo testigo positivo el cual no difirió con ninguno de los otros dos grupos (Tabla 1). El NMP de enterobacterias no coliformes (1×10^5 UFC/g) en íleon al día 20 de edad fue mayor ($P < 0.05$) en el grupo de harina de *Aspergillus* spp., con relación al resto de los grupos (Tabla 1). El grupo con harina de *Aspergillus* spp., fue numéricamente el de mayor NMP de *Clostridium* spp., sin embargo, no difirió con respecto al resto de los grupos (Tabla 1).

A los 26 días de edad, únicamente se observó una mayor cantidad de *Clostridium* spp., (1×10^5 UFC/g) en el grupo del complejo enzimático, NMP que fue diferente ($P < 0.05$) con relación al NMP del grupo de *Aspergillus* spp., y el NMP del grupo testigo positivo (Tabla 1).

DISCUSIÓN

En el presente trabajo el emplear la harina de *Aspergillus* spp., en el alimento de pollos de engorda que se encontraban bajo condiciones de estrés, (dieta con 60% de trigo y coccidias patógenas) explica junto con los resultados observados por Nava *et al.* (27), el desarrollo de microbiota intestinal aerobia y anaerobia benéfica, lo cual posiblemente de acuerdo con los resultados obtenidos en el presente estudio impidió un incremento de microorganismos patógenos del tipo de los *Clostridium* spp., en el intestino de las aves, o bien de enterobacterias no coliformes como ya lo ha descrito anteriormente Kimura *et al.* (28), al estudiar el comportamiento de la microbiota intestinal después de un desafío con coccidias patógenas. El incremento

sustancial de enterobacterias coliformes y hongos en el grupo suplementado con harina de *Aspergillus* spp., fue diferente con relación a los grupos testigo positivo y negativo. Aún cuando la cantidad de *Enterobacterias* fue mayor al resto de los grupos, la cantidad de *Clostridium* spp., no lo fue.

Lo significativo de éste hallazgo fue que la harina de *Aspergillus* spp., actúa como un agente catalizador del crecimiento bacteriano benéfico (*Lactobacillus* spp., *Bifidobacterium* spp., y posiblemente otras bacterias no conocidas y no aisladas) aún cuando las aves se encuentran bajo un escenario de desafío con coccidias patógenas y una gran cantidad de PNAv proporcionados por la dieta con alta inclusión de trigo. Estas condiciones permitieron que a los 26 días de edad en el grupo suplementado con el complejo enzimático se favoreciera un incremento en UFC de *Clostridium* spp., situación diferente a la presentada por el grupo que recibió la harina de *Aspergillus* spp., lo cual muestra que el complejo enzimático en presencia de una alta cantidad de PNAv y un desafío moderado con coccidias patógenas, de alguna manera favorece una alta proliferación de *Clostridium* spp., esta situación se observó aún cuando el grupo testigo positivo que recibió la misma dieta base con un alto contenido de PNAv y que recibió además el desafío con las coccidias patógenas no presentó la misma cantidad de UFC de *Clostridium* spp., observada en el grupo del complejo enzimático.

Adams *et al.* (10,11), reportaron que la asociación entre *Clostridium* spp., y *Eimeria acervulina* tiene un efecto sinérgico negativo sobre la digestión, especialmente después de los 2 a 11 días que se efectúa la inoculación de ambos, sin embargo, en el presente estudio, el grupo testigo positivo que correspondería genéricamente al grupo de Adams *et al.*, (10,11) fue diferente al grupo del complejo enzimático, el cual presentó los parámetros más bajos de todos los presentados por el resto de los grupos.

Lo que permite dilucidar este hecho, es que de alguna manera el complejo enzimático degrada a los PNAv generando nutrientes y energía, lo cual de alguna otra forma favorece también una alta proliferación (13 días postinoculación) de *Clostridium* spp., aún cuando la cantidad de coccidias empleadas para el desafío en el presente estudio fue moderada. Esta observación difiere de lo observado por Kimura *et al.* (28), ya que estos investigadores al trabajar con pollos desafiados con coccidia reportaron que el pico máximo de proliferación de *Clostridium* spp., fue 7 días post-inoculación. Mientras que las *Enterobacterias* mostraron un incremento moderado pero persistente, indicando que los niveles de una gran variedad de bacterias encontradas en condiciones normales (*Lactobacilos*, *bifidobacterium*, e incluso enterobacterias y clostridios), retornaron a su nivel

normal hasta los diez días post-inoculación, sin embargo, reportan que el disturbio bacteriano se presentó aún a los 17 días post-inoculación. Por lo que este último hallazgo puede explicar de cierta manera el incremento en el número de *Clostridium* spp., observado en el presente estudio. Algunos hallazgos experimentales efectuados por Jansson *et al.* (29), y Elwinger y Tegglöf (30), indican que la suplementación con enzimas diseñadas para degradar los PNAv reducen el riesgo de enteritis necrótica. Sin embargo, los resultados publicados por Ridell y Kong (31), indican que no pudieron determinar ningún tipo de acción preventiva contra la enteritis necrótica en dietas con contenido de trigo cuando se agregaron enzimas del tipo pentosanasas. Los resultados de Ridell y Kong (31), concuerdan con lo observado en el presente estudio y contradicen la probable disminución de enteritis necrótica indicada por Jansson *et al.* (29), y Elwinger y Tegglöf (30). De igual forma Kaldhusdal y Skjerve (5) mostraron que la suplementación con beta-glucanasas en dietas que incluían trigo, cebada y avena, no ejercieron ningún efecto protector contra la enteritis necrótica en un brote severo en aves de Noruega, concluyen que la suplementación con este tipo de enzimas no tiene ningún valor preventivo sobre las causas primarias que ocasionan la enteritis necrótica. Esta conclusión se respalda y confirma con los resultados obtenidos y analizados en el presente estudio.

Si bien algunos autores como Annison y Choct (32) determinaron que el trigo posee pentosanos los que manifiestan un fuerte efecto antinutritivo (los PNAv forman una capa mucilaginosa a nivel del lumen intestinal lo cual impide una buena permeabilidad e interacción de los nutrientes entre el glucocalix y las microvelocidades intestinales) y que posee una relación directa con el tipo de microbiota que existe, bajo este panorama y el propuesto por Ridell y Kong (31), el grupo testigo positivo desafiado con coccidias debió haber mostrado una cantidad incrementada de *Clostridium* spp., sin embargo, éste incremento exacerbado únicamente se observó en el grupo suplementado con el complejo enzimático.

El complejo enzimático al actuar sobre sus sustratos en el trigo libera entre varios productos principalmente complejos de carbohidratos, los cuales posiblemente pueden ser fácilmente aprovechados por *Clostridium* spp. Por ejemplo, Ridell y Kong (31) mostraron que al infectar con *Clostridium* spp., un grupo alimentado con una dieta con base en maíz no mostró ningún incremento significativo de mortalidad atribuida a enteritis necrótica, la mortalidad se presentó hasta el momento en que se le proporcionó a uno de los grupos experimentales alimentados con la misma dieta con base a maíz una fuente adicional de glucosa.

Algunos autores como Choct *et al.* (33), y Schneitz *et al.* (34), han observado que el uso de sustancias que funcionan como promotores de crecimiento y que regulan la microbiota nativa intestinal como es el caso de los antibióticos, los probióticos y posiblemente también con base a los resultados observados en el presente estudio, el uso de un prebiótico (0.2% de HA), pueden estar mostrando un efecto positivo que posiblemente se encuentra relacionado con la eliminación de microorganismos anaerobios fermentativos que producen principalmente ácido butírico en el intestino (especialmente *Clostridium* spp.). Aunque actualmente el bosquejo general de las condiciones requeridas para que se presente un cuadro de enteritis necrótica no se encuentran completamente esclarecidas, es altamente factible que cuando existe un cambio en las condiciones microambientales del intestino, el número de UFC de *Clostridium* spp., puede incrementarse exacerbadamente, lo cual puede conducir a una gran producción de toxina- α por parte de *C. perfringens* y consecuentemente ocasionar enteritis necrótica (33,34).

El efecto benéfico de mantener la ecología intestinal saludable debido a la administración de harina de *Aspergillus* spp., y su rápida recuperación post-infección con las coccidias, de acuerdo con las observaciones efectuadas por Kimura *et al.* (28), en el presente estudio se reflejaron en la mayor ganancia de peso corporal al día 26 de edad en el grupo suplementado con harina de *Aspergillus* spp., contrariamente a lo observado en el grupo suplementado con el complejo enzimático, el cual presentó el peso más bajo en esta fecha, incluso menor con relación al peso observado en los dos grupos testigos.

Las observaciones de autores como Kimura *et al.* (28) coinciden con otros investigadores acerca del probable antagonismo existente entre lactobacilos y enterobacterias. Éstas observaciones explican en parte porque en el presente estudio el grupo que recibió la harina de *Aspergillus* spp., y fue desafiado con *E. tenella* presentó menos efectos detrimentales sobre la integridad de la mucosa intestinal situación contraria a la del grupo que recibió el complejo enzimático, el cual al presentar el desbalance bacteriano durante más de diez días (periodo de 13 días post-inoculación) con una probable falta de recuperación en su población bacteriana de tipo láctica y de la microbiota nativa intestinal benéfica en general, mostró un efecto poco favorable en la ganancia de peso reportada ya anteriormente en otros estudios. Posiblemente el efecto conjunto del prebiótico (harina de *Aspergillus* spp.) y la microbiota nativa intestinal benéfica inducida por acción del mismo en el tracto digestivo, ejercieron dos efectos en la mucosa intestinal después del desafío, uno protector y otro regenerativo, reflejándose con una

mayor ganancia de peso en el grupo suplementado con harina de *Aspergillus* spp., y desafiado, esto en un periodo corto de tan solo 13 días después de la infección. El efecto detrimental observado en las aves con microbiota convencional del presente estudio cuando se desafían con *E. tenella* y a diferencia de las aves gnotobióticas inoculadas con la misma cantidad de oocistos de *E. tenella* en el estudio efectuado por Baba *et al.* (35), se atribuye posiblemente a la acción de las bacterias; sin embargo, a diferencia del presente estudio Baba *et al.* (35), no evaluaron la presencia específica de *Clostridium* spp., lo cual indica que si bien los efectos detrimentales observados en un desafío con coccidias son debidos a la interacción de diversos géneros de bacterias, en el presente estudio se pudieron deber a la presencia adicional específica de una gran cantidad de *Clostridium* spp., como la observada en el grupo suplementado con el complejo enzimático. Lo que no se puede saber acertadamente con base a los resultados obtenidos en el presente estudio, es porque el complejo enzimático indujo una alta proliferación de *Clostridium* spp. Se ha documentado ampliamente ya la importancia del rápido establecimiento de una microbiota nativa intestinal madura, lo cual gracias a la administración de prebióticos éste proceso se puede acelerar y excluir el desarrollo de bacterias patógenas en el tracto gastrointestinal (36). La microbiota coloniza prácticamente todo el tracto digestivo de las aves y puede encontrarse en concentraciones que oscilan entre 1×10^9 y 1×10^{11} bacterias por gramo de contenido en íleon y saco ciego respectivamente(36). Concentraciones de microorganismos tan extraordinarias, tienen una actividad metabólica alta que se ha estudiado poco. Sin embargo, influye no sólo en la viabilidad de los sustratos para su huésped, sino también en su salud y rápido crecimiento. Por lo tanto, la nutrición como disciplina científica debe de considerar al ave y su microbiota como un sistema de interacción dinámica, ya que ambos se desarrollan en una perfecta relación biológica y dependen de los ingredientes y densidad de nutrientes que en ellos se encuentran. Las últimas investigaciones en nutrición animal sugieren que en el futuro los componentes nutricionales de las dietas deben considerar el impacto que dichos ingredientes tengan en la distribución y desarrollo de las especies bacterianas. Se concluye que el tipo de ingredientes con que se formulan las dietas afecta la microbiota y ésta tiene un impacto específico sobre la nutrición y salud de las aves.

^aBBL® Gas Pak® Anaerobic System Envelopes; Becton Dickinson, Cockesville, MD 21030 USA

REFERENCIAS

1. Long, P.L., B.J. Millard, L.P. Joyner, and C.C. Norton. A guide to laboratory techniques used in the study and diagnosis of avian coccidiosis. *Folia Vet Latina* 6: 200-217. 1976.
2. 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.
3. Ficken, M.D. and D.P. Wages. Necrotic Enteritis. In: Calnek BW, editor. *Diseases of Poultry*. 10th ed. Ames (Iowa) USA: Iowa State University Press, 261-264. 1997.
4. Bedford, M.R. Interaction between ingested feed and the digestive system in poultry. *J Appl Poultry Res* 5: 86-95. 1996.
5. Kaldhusdal, M. and E. Skjerve. Association between cereal contents in the diet and incidence of necrotic enteritis in broiler chickens in Norway. *Prev Vet Med* 28: 1-16. 1996.
6. Collins, M.D. and G.R. Gibson. Probiotics, prebiotics, and symbiotics: approaches for modulating the microbial ecology of the gut. *Am J Clin Nutr* 69: 1052-1057. 1999.
7. Arakawa, A. and O. Ohe. Reduction of *Clostridium perfringens* by feed additives in the ceca of chickens infected with *Eimeria tenella*. *Poult Sci* 54: 1000-1007. 1975.
8. Kimura, W., F. Mimura, S. Nishida, A. Kobayashi, and T. Mitsuoka. Studies on the relationship between intestinal flora and cecal coccidiosis in chickens. *Poult Sci* 55: 1375-1383. 1976.
9. Qin, Z.R., T. Fukata, E. Baba, and A. Arakawa. Effect of lactose and *Lactobacillus acidophilus* on the colonization of *Salmonella enteritidis* in chicks concurrently infected with *Eimeria tenella*. *Avian Dis* 39: 548-553. 1995.
10. Adams, C., H.A. Vahl, and A. Veldman. Interaction between nutrition and *Eimeria acervulina* infection in broiler chickens: development of an experimental infection model. *Br J Nutr* 75: 867-873. 1996.
11. Adams, C., H.A. Vahl, and A. Veldman. Interaction between nutrition and *Eimeria acervulina* infection in broiler chickens: diet compositions that improve fat digestion during *Eimeria acervulina* infection. *Br J Nutr* 75: 875-880. 1996.
12. Macfarlane, G.T. and J.H. Cummings. Probiotics and prebiotics: can regulate the activities of intestinal bacteria benefic health? *British Med J* 318: 999-1003. 1999.
13. Wallach, M. and L. Waldensted. Immunity and the effects of removing coccidiostats from poultry feed. *World Poultry Special*: 12-15. 1999.

14. Bruce, G., E.J. Schiffrin, R. Reniero, B. Mollet, A. Pfeifer, and J. Neeser. The development of functional foods: lessons from the gut. *Trends Biotechnol* 17(12): 492-499. 1999.
15. Walker, W.A. and L.C. Duffy. Diet and bacterial colonization: Role of probiotics and prebiotics. *J Nutr Biochem*. 9(12):668-675. 1998.
16. Macfarlane, G.T. and J.H. Cummings. Probiotics and prebiotics: can regulating the activities of intestinal bacteria benefit health?. *BMJ*. 318:999-1003. 1999.
17. Roberfroid, M.B. Concepts and strategy of functional food science: the European perspective. *Am J Clin Nutr*. 71(suppl):1660s-1664s. 2000.
18. Roberfroid, M.B. Concepts in functional foods: The case of inulin and oligofructose. *J Nutr*. 129:1398s-1401s. 1999.
19. Yolken, R.H., C. Ojeh, I.A. Khatri, U. Sajjan, and J.F. Forstner. Intestinal mucins inhibit rotavirus replication in an oligosaccharide-dependent manner. *Jour Inf Dis*. 169(5):1002-1006. 1994.
20. McIntosh, G.H. Probiotics and colon cancer prevention. *Asia Pacific J Clin Nutr*. 5:48-52. 1996.
21. Tannock, G.W. Probiotics: a critical review. Ed. Horizon Scientific Press, England. 1999.
22. Andrews, E.J., B.T. Bennet, C.J. Derrell, K.A. Houpt, P.J. Pascoe, G.W. Robinson, J.R. Boyce. 1993 Report of the AVMA panel on euthanasia. *JAVMA* 202: 229-249. 1993.
23. Koransky, J.R., S.D. Allen, and V.R. Dowell. Use of ethanol for selective isolation of sporeforming microorganisms. *Appl Environ Microbiol* 35:762-765. 1978;
24. Roediger, W. Role of anaerobic bacteria in the metabolic welfare of the colonic mucosa in man. *Gut*. 21:793-798. 1980.
25. Callaway, T.R., R.C. Anderson, T.J. Anderson, T.L. Poole, K.M. Bischoff, L.F. Kubena, and D.J. Nisbet. *Escherichia coli* O157:H7 becomes resistant to sodium chlorate in pure culture, but not in mixed culture or *in vivo*. *J Appl Microbiol*. 91: 427-434. 2001.
26. Luginbuck, R.C. and S.D. Schlotzhaver. SAS/STAT guide for personal computers. 6th edi. USA: SAS Institute Cary, NC, 555-573. 1987.
27. Nava, M.G., N. Ledesma, E. Morales, M.A. Juárez, G. Pérez, and D.S. Carrillo, *et al*. Efecto de la administración de harina de *Aspergillus* sp, fitasa bacteriana y ambos productos en la dieta de pollos de engorda I. Memorias de la XXVI Convención anual ANECA; 2001 abril 25-28; Acapulco (Guerrero) México. México (DF): ANECA, AC, 201-204. 2001.
28. Kimura, W., F. Mimura, S. Nishida, A. Kobayashi, and T. Mitsuoka. Studies on the relationship between intestinal flora and cecal coccidiosis in chickens. *Poult Sci*55: 1375-1383. 1976.
29. Jansson, L., K. Elwinger, B. Engström, O. Fossum, and B. Teglöf. Test of the efficacy of virginiamycin and dietary enzyme supplementation against necrotic enteritis (NE) disease in broilers. Proceedings of VIII European Poultry Conference, Barcelona, Spain. 556-559. 1990.
30. Elwinger, K. and B. Teglöf. Performance of broiler chickens as influenced by a dietary enzyme complex with and without antibiotic supplementation. *Arch Gefluegelkd* 55: 69-73. 1991.
31. Ridell, C. and X.M. Kong. The influence of diet on necrotic enteritis in broiler chickens. *Avian Dis* 36: 499-503. 1992.
32. Annison, G. and M. Choct. Anti-nutritive activities of cereal non-starch polysaccharides in broiler diets and strategies minimizing their effects. *Worlds Poult Sci J* 47: 232-242. 1991.
33. Choct, M., R.J. Hughes, J. Wang, M.R. Bedford, A.J. Morgan, and Annison. Increased small intestinal fermentation is partly responsible for the anti-nutritive activity of non-starch polysaccharides in chickens. *Br. Poult. Sci*. 37:609-621. 1996.
34. Schneitz, C., T. Kiiskinen, V. Toivonen, and M. Näsi. Effect of Broilact® on the physicochemical conditions and nutrient digestibility in the gastrointestinal tract of broilers. *Poultry Science* 77:426-432. 1998.
35. Baba, E., T. Fukata, and A. Arakawa. Establishment and persistence of *Salmonella typhimurium* infection stimulated by *Eimeria tenella* in chickens. *Res Vet Sci* 33: 95-98. 1982.
36. Nava, M.G., E.M.A. Juárez, G.R. Merino, M.N. Ledesma, and I.G. Téllez. Prebióticos, probióticos y simbióticos en la ecología intestinal de las aves domésticas. Memorias de las VIII Jornadas Médico Avícolas. 2002 febrero 20-22; Ciudad Universitaria (DF). México (DF): División de Educación Continua y Departamento de Producción Animal:Aves. FMVZ- UNAM., 174-178. 2002.

Tabla 1. Efecto de la administración dietética de harina de *Aspergillus* spp., o complejo enzimático en pollos de engorda sobre el conteo celular (UFC/g contenido de ileon) de enterobacterias coliformes, hongos-levaduras, enterobacterias no coliformes y *Clostridium* spp., al día 20 y 26 de edad.*

| 20 Días de edad | | | | |
|-------------------------------|------------------------------------|--|---|--|
| Grupo | Coliformes (1x10 ⁵) | Hongos-Levaduras (1x10 ⁵) | Enterobacterias (1x10 ⁵) | <i>Clostridium</i> spp (1x10 ⁵) |
| Testigo negativo | 35.2 ± 38.8 ^b | 82.4 ± 144.2 ^{ab} | 44.8 ± 63.1 ^b | 80.5 ± 26.6 ^a |
| H. de <i>Aspergillus</i> spp. | 848.8 ± 1109.4 ^a | 675.2 ± 876.7 ^a | 692.8 ± 901.2 ^a | 114.0 ± 91.8 ^a |
| Complejo enzimático | 124.0 ± 216.8 ^{ab} | 112.0 ± 173.4 ^{ab} | 70.0 ± 123.8 ^b | 65.5 ± 40.8 ^a |
| Testigo positivo | 24.0 ± 24.1 ^b | 16.8 ± 13.75 ^b | 10.8 ± 8.67 ^b | 90.6 ± 103.3 ^a |
| 26 Días de edad | | | | |
| Grupo | Coliformes (1x10 ⁵) | Hongos- Levaduras (1x10 ⁵) | Enterobacterias (1x10 ⁵) | <i>Clostridium</i> spp (1x10 ⁵) |
| Testigo negativo | 28.0 ± 62.6 ^a | 32.0 ± 60.9 ^a | 32.4 ± 60.7 ^a | 3,780.0 ± 4847.4 ^{ab} |
| H. de <i>Aspergillus</i> spp. | 84.0 ± 187.8 ^a | 272.0 ± 597.0 ^a | 236.0 ± 494.4 ^a | 2,595.0 ± 4420.7 ^b |
| Complejo enzimático | 76.0 ± 147.9 ^a | 140.0 ± 246.17 ^a | 232.0 ± 422.0 ^a | 8,890.0 ± 4111.5 ^a |
| Testigo positivo | 24.0 ± 53.6 ^a | 64.0 ± 143.1 ^a | 28.0 ± 62.6 ^a | 320.0 ± 364.7 ^b |

*Unidades Formadoras de Colonia (UFC) por gramo. Medias en la misma columna con diferente literal son significativamente diferentes ($P < 0.05$).

EVALUACIÓN DE LEUCOCITOS SANGUÍNEOS, PH INTESTINAL Y GRADO DE LESIONES EN POLLOS DE ENGORDA SUPLEMENTADOS CON UN COMPLEJO ENZIMÁTICO O HARINA DE *ASPERGILLUS* SPP Y DESAFIADOS CON *EIMERIA* SPP.

EVALUATION OF BLOOD LEUKOCYTES, INTESTINAL PH AND LESION SCORES OF BROILERS FED EITHER AN ENZYME COMPLEX (CE) OR *ASPERGILLUS* SPP. MEAL (HA) AND CHALLENGED WITH *EIMERIA* SPP.

Marco A. Juárez-Estrada^A y Gerardo M. Nava-Morales^A

^ADepartamento de Producción Animal: Aves FMVZ-UNAM, Avenida Universidad 3000, Ciudad Universitaria, Del. Coyoacán. México D.F. CP. 04510

SUMMARY

Four 25-broiler groups with one replicate were used. T1 = basal diet alone (60% wheat); T2 = 0.2% HA; T3 = 0.1% CE; and T4 = challenge alone. On day 13, treatment groups 2, 3 and 4 were challenged with *E. acervulina* (5×10^4), *E. maxima* (2×10^3) and *E. tenella* (2×10^4)/mL/bird. On day 21, intestinal lesions were scored and fecal oocysts were counted. On days 20 and 26 ileal/cecal pH was measured. On day 26 blood cell counts were performed. More alkaline pH levels were detected in groups 3 and 4 than in groups 1 or 3. Group 3 showed leukocyte lysis. Groups 2 and 3 spread more oocysts and had higher lesion scores than group 4. The beneficial intestinal effect of HA was shown.

RESUMEN

La coccidiosis aviar afecta negativamente los parámetros productivos en las parvadas de pollo de engorda, produce retraso en el crecimiento, disminuye la deposición de pigmento en la piel, deteriora la conversión alimenticia y ocasiona baja uniformidad en las parvadas a la finalización con pérdidas económicas graves (1). Si bien las condiciones que conducen al desarrollo de enteritis necrótica (EN) no se encuentran aún bien explicadas, se ha observado que las enfermedades entéricas primarias, como la disbacteriosis y la coccidiosis predisponen a la EN (2). Algunos otros factores que predisponen a EN son la utilización de dietas ricas en polisacáridos no amiláceos viscosos y solubles (PNAv), como los que contienen el trigo, la cebada y la avena (3,4). La EN puede prevenirse eficazmente si se impide la proliferación de *C. perfringens* y al mismo tiempo se conserva la integridad de la mucosa intestinal (2,5). La coccidiosis puede llegar a afectar ésta integridad

debido a las lesiones que produce (6,7,8,9). Actualmente el uso de ionóforos poliésteres en el alimento de las aves domésticas es la medida más efectiva para el control de coccidias y clostridios durante la crianza. A pesar de todas sus ventajas actualmente existe una creciente presión legislativa internacional de origen Europeo que tiene la finalidad de lograr la prohibición absoluta de su empleo en el alimento. Es necesario investigar nuevas alternativas. Un problema práctico ha sido combinar el uso de probióticos en el alimento con la aplicación de tratamientos antibióticos o desinfectantes contra *Salmonella* spp o *Escherichia coli*. Por lo cual una alternativa actual es la utilización de prebióticos como la lactosa o los fructo-oligosacáridos (7,10,11,12, 13,14). Para que un ingrediente alimenticio pueda ser clasificado como prebiótico, debe cumplir con algunos requisitos básicos, como el no ser hidrolizado, digerido o absorbido por el tracto intestinal del hospedador, debe constituir un sustrato selectivo para el desarrollo de una o varias bacterias benéficas habitantes del tracto intestinal, estimulando su proliferación y metabolismo, además debe promover la actividad de la microbiota intestinal benéfica, debe ser benéfico para la salud del huésped en todo momento (13,15,16).

La harina de *Aspergillus* spp (HA), usualmente se ha empleado como promotor de crecimiento. Éste compuesto inocuo proporciona el sustrato para la proliferación de bacterias del tipo de los *Lactobacillus* spp y *Bifidobacterium* spp, en el tubo gastrointestinal de animales monogástricos, su acción es de tipo prebiótico (2,13,17,18,19,20).

Se ha descrito que la utilización de ingredientes con un alto contenido de PNAv aumenta la susceptibilidad de las aves a enfermedades intestinales como la coccidiosis o la EN (4,6,9). Los complejos

enzimáticos están compuestos por diferentes tipos de enzimas exógenas (arabinoxilanasas, β -glucanasas, α -amilasas, etc.) las cuales degradan sustratos específicos que las aves no pueden hacer por ellas mismas de forma efectiva (21,22). Los PNAv posiblemente modifican la morfología, composición y fisiología de la mucosa intestinal, lo cual posiblemente se puede evitar mediante la adición de enzimas exógenas como las amilasas, gluconasas, pentosanasas, xilanasas y proteasas (17,21,22,23). El incremento de bacterias del género *Clostridium* spp., en el intestino se encuentra correlacionado aparentemente negativamente con la ganancia de peso; aún no se encuentra esclarecido si algún método de sustitución del efecto antibacteriano y de promoción de crecimiento ejercido por los ionóforos va a ser compensado satisfactoriamente con estas nuevas metodologías.

MATERIAL Y MÉTODOS

Animales de experimentación. Se utilizaron 200 pollitos de engorda mixtos Ross x Ross de un día de edad, provenientes de una incubadora comercial, se alojaron aleatoriamente en una batería eléctrica (Petersime®), ubicada en una unidad de aislamiento del Departamento de Producción Animal: Aves de la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia de la U.N.A.M., se mantuvieron en condiciones de manejo y bienestar de acuerdo a la NOM-069-ZOO-1999.

Aislamiento de coccidias patógenas. El inóculo de desafío empleado en cada ave estuvo compuesto de *Eimeria acervulina* (5×10^4), *E. maxima* (2×10^3) y *E. tenella* (2×10^4) /mL. Este aislamiento produce signos clínicos de leve a moderados, además evita el efecto de saturación intestinal (*Crowed effect*), sin embargo, es suficiente para reproducir las condiciones de campo de tipo subclínico de ésta enfermedad.

Aditivos alimenticios. El prebiótico se incluyó al 0.2% en la dieta base, el producto consistió de harina de *Aspergillus* spp (Fermacto®), la cual es un producto de la fermentación primaria de una cepa no tóxica de éste hongo. Contiene aproximadamente 12% de proteína y 45% de fibra, la cual es de origen micelial no vegetal. El complejo enzimático (Avizyme 1500®) se utilizó al 0.1% de inclusión total en la dieta base, se encuentra integrado por diferentes tipos de enzimas (amilasa, xilanasas, pectinasa y proteasa).

Diseño experimental. Cuatro grupos de 25 aves cada uno (con 2 réplicas para contabilizar un total de 200 aves) se alimentaron con una dieta base isocalórica e isoproteica que contenía alta inclusión de trigo (60%). El grupo uno fue considerado como el grupo testigo negativo, ya que no se desafío con el inóculo de coccidias patógenas. El grupo dos adicional a la dieta base contenía 0.2% de harina de *Aspergillus* spp. (Fermacto®). El grupo tres contenía adicional a la dieta

base un 0.1% de complejo enzimático (Avizyme®), las dietas se balancearon para ser isocalóricas e isoproteicas de acuerdo a Leeson y Summers (2005), sustituyendo el volumen desplazado en forma de sorgo. El grupo cuatro se consideró como el grupo testigo positivo, ya que no recibió ningún tipo de suplemento y únicamente se desafío con las coccidias patógenas. Los grupos 2, 3 y 4 fueron desafiados *per os* al día 13 de edad con el inóculo parasitario ya descrito, la fecha seleccionada para el desafío corresponde al punto de ascenso en la campana de desafío coccidiano de los pollos de engorda criados en condiciones comerciales (1,24,25). El grupo uno en la misma fecha solo recibió *per os* solución tampón inocua (PBS estéril).

Calificación de lesiones y cuantificación de oocistos. Al día 20 de edad, veinticinco aves de cada grupo fueron sacrificadas humanitariamente (26), las lesiones por coccidia en intestino fueron calificadas de acuerdo con la escala de Jhonson y Reid (25). Los oocistos presentes en las heces recolectadas, a partir de cada réplica durante el transcurso de 24 horas, se cuantificaron de acuerdo con lo descrito por Long *et al.* (24).

Medición del pH de contenido intestinal. Al día 20 y 26 de edad, 10 aves por grupo se utilizaron para determinar el pH de íleon y saco ciego. Después de la dislocación cervical de las aves, la lectura del pH del contenido intestinal se efectuó insertando un electrodo de cristal^a dentro del saco ciego e íleon para que tuviera contacto directo con el contenido intestinal. Las lecturas se efectuaron alternadamente entre grupos y se requirió al menos de un minuto por muestra. Entre lectura y lectura, el electrodo fue lavado con agua destilada y se recalibró con buffer neutro (27).

Conteo de células sanguíneas. Con la finalidad de cuantificar el porcentaje de linfocitos, heterófilos, monocitos, eosinófilos, basófilos, lisis de leucocitos y leucocitos totales, al día 26 de edad se obtuvieron muestras sanguíneas a partir de cinco aves por grupo (empleando la vena radial se obtuvo 1 mL de sangre con 10% de E.D.T.A.). Las células sanguíneas fueron analizadas de acuerdo con lo descrito por Zinkl (28).

Análisis estadístico. Se efectuó análisis estadístico por medio de ANDEVA. Las variables analizadas fueron calificación de lesiones, oocistos en heces, pH y cantidad de células sanguíneas. Las diferencias entre los tratamientos se analizaron con la prueba de Tukey a una significancia estadística para alfa de $P < 0.05$ (29).

RESULTADOS

El pH del íleon al día 20 de edad en el grupo testigo positivo fue mayor y diferente ($P < 0.05$) con relación al grupo del complejo enzimático y del testigo negativo. El grupo suplementado con harina de

Aspergillus spp., fue únicamente diferente ($P<0.05$) con relación al grupo testigo negativo. El pH de los sacos ciegos al día 20 de edad y el pH del íleon al día 26 de edad no mostraron diferencias estadísticas entre los grupos (Tabla 1). El pH de los sacos ciegos al día 26 de edad fue menor en el grupo suplementado con el complejo enzimático mostrando diferencia estadística ($P<0.05$) con relación al resto de los grupos (Tabla 1).

Al día 26 de edad no hubo diferencia en el número total de leucocitos entre cada uno de los cuatro grupos evaluados, observándose únicamente una tendencia de mayor cantidad en el grupo del complejo enzimático y una de menor cantidad en el grupo testigo positivo (Tabla 1). El porcentaje de linfocitos en el grupo suplementado con harina de *Aspergillus* spp., fue mayor ($P<0.05$) con relación al grupo del complejo enzimático, el cual no difirió respecto a los grupos testigos (Tabla 1). El porcentaje de heterófilos fue mayor ($P<0.05$) en el grupo del complejo enzimático con relación al grupo de harina de *Aspergillus* spp., y respecto al grupo testigo positivo. Sin embargo, no fue diferente con relación al grupo testigo negativo, el cual a su vez no difirió del testigo positivo, y tampoco fue diferente al grupo de la harina de *Aspergillus* spp., (Tabla 1). El porcentaje de monocitos fue mayor ($P<0.05$) en el grupo del complejo enzimático con relación al grupo de harina de *Aspergillus* spp., y respecto al grupo testigo negativo. Sin embargo, no fue diferente con relación al grupo testigo positivo, el cual a su vez no difirió con ninguno de los otros dos grupos (Tabla 1). No se observaron diferencias estadísticas en el porcentaje de eosinófilos o basófilos entre cualquiera de los grupos analizados (Tabla 1). El porcentaje de lisis leucocitaria fue mayor ($P<0.05$) en el grupo del complejo enzimático, esto con relación al resto de los grupos, observándose únicamente una tendencia de menor lisis en el grupo testigo negativo (Tabla 1).

Las lesiones por *E. acervulina* de acuerdo a la escala de Johnson y Reid fueron mayores en el grupo suplementado con la harina de *Aspergillus* spp., las cuales fueron diferentes ($p<0.05$) con relación a los grupos testigos. El grupo suplementado con el complejo enzimático no difirió respecto al grupo de harina de *Aspergillus* spp., o el grupo testigo positivo. El grupo testigo negativo no presentó lesiones y fue diferente ($p<0.05$) al resto de los grupos (Tabla 1). Las lesiones por *E. maxima* fueron mayores ($p<0.05$) en el grupo con harina de *Aspergillus* spp., y el del complejo enzimático respecto a los grupos testigos. El testigo positivo fue mayor al negativo ($p<0.05$) (Tabla 1). Las lesiones por *E. tenella* fueron mayores y diferentes ($p<0.05$) en el grupo con harina de *Aspergillus* spp., con relación a los grupos testigos y al grupo del complejo enzimático. Éste último junto con el grupo testigo positivo fueron diferentes ($p<0.05$) a su vez respecto al grupo testigo negativo (Tabla 1). Se

observó un mayor número de oocistos totales eliminados al día 21 con diferencia estadística ($p<0.05$) en los grupos suplementados con harina de *Aspergillus* spp., y complejo enzimático con relación al grupo testigo positivo. Los tres grupos a su vez fueron diferentes ($p<0.05$) con relación al grupo testigo negativo (Tabla 1).

DISCUSIÓN

Las condiciones de estrés nutrimental producidas a nivel del sistema gastrointestinal de las aves por el empleo de un alimento alto en PNAV's (Trigo), ausencia de APC y presencia de un desafío moderado con coccidias patógenas ha sido asociado en la literatura especializada con problemas intestinales (enteritis necrótica) principalmente por la pérdida del equilibrio en la ecología intestinal. Este tipo de problemas se han relacionado también a los cambios de pH en el lumen intestinal, a la proliferación de microbiota patógena y al daño de la estructura en la mucosa intestinal, específicamente la mucosa cecal, de acuerdo con lo reportado por Ficken y Wages (30), Arakawa *et al.* (31), Bradley *et al.* (32), Kogut *et al.* (33), y Baba *et al.* (34). Algunos autores como Bradley y Radhakrishnan (32), Clark *et al.* (35,36), Visco *et al.* (37,38), Baba *et al.* (34), y Wallach y Waldensted (39) han observado que las aves convencionales sin protección inmune inducida por un desafío previo con coccidias, ante un desafío moderado con oocistos de *E. tenella* altamente patógena presentan mortalidad, mientras que aves axénicas es decir sin bacterias en el tracto digestivo, a pesar de lo aparatoso que pueden observarse las hemorragias ocasionadas por un desafío similar con oocistos de *E. tenella* altamente patógena, no llegan a presentar mortalidad.

En el presente estudio la observación efectuada a partir de los grupos desafiados puso de manifiesto la importante interacción que existe entre la microbiota del saco ciego de las aves domésticas y los efectos detrimentales ocasionados por un desafío moderado con 40,000 oocistos de *E. tenella* por ave; además del grado de protección que induce la harina de *Aspergillus* spp., que aunque no se pudo verificar a los siete días post-infección si se pudo constatar dos semanas después.

Es posible que la harina de *Aspergillus* spp., ejerza su mayor efecto los sacos ciegos, sin embargo, es posible que en los sitios anatómicos del tracto digestivo donde se replicaron *E. acervulina* y *E. maxima* estén mostrando una tendencia de recuperación similar a la observada en la mucosa cecal inducida por la harina de *Aspergillus* spp, esto de acuerdo con Grajeda *et al.* (40). La suplementación de harina de *Aspergillus* spp., y del complejo enzimático generó cambios aparentes en las poblaciones de la

microbiota intestinal, estos cambios a su vez posiblemente indujeron una alteración en la producción de ácidos grasos de cadena corta (AGCC¹), lo cual actuó directamente en la luz intestinal modificando el pH. Existen investigaciones que muestran que el pH del saco ciego disminuye con la suplementación de harina de *Aspergillus* spp., a edades tan tempranas como a los diez días de edad, sin embargo, se ha observado que a mayor suplementación de harina de *Aspergillus* spp., este efecto aparentemente se revierte, ya que en estas mismas investigaciones se observó que al día 20 de edad, el pH del saco ciego era mayor que el del grupo testigo negativo, reportando a su vez una menor concentración de AGCC¹, esta misma tendencia se observó al día 30 de edad, sin embargo, los investigadores reportaron una menor diferencia entre los dos grupos (41).

En el presente estudio siete días después del desafío con las coccidias patógenas, no se observó diferencia en los valores de pH entre los grupos, lo cual posiblemente indica que existió una tendencia ajena a la concentración de AGCC¹ que impidió se elevara el pH. Sin embargo, al día 26 de edad si se observa una disminución del pH en los sacos ciegos de las aves suplementadas con el complejo enzimático, lo cual se debió posiblemente a una alteración en el balance de la microbiota con la replicación predominante de un solo tipo de microorganismo posiblemente patógeno (*Clostridium* spp.) o bien proliferó un grupo bacteriano que metabolizó y produjo una mayor cantidad de AGCC¹.

Se ha descrito que en algunas etapas de la replicación de las Eimerias, las lesiones inducidas por la destrucción celular y el *detritus* producido pueden llegar alterar el pH, alcalinizando el medio. Aunque no se descarta la posibilidad de que los niveles de producción de AGCC¹ en este grupo no se hayan alterado. El pH menor del ileon a los 20 días observado en el grupo testigo negativo, difirió completamente con el grupo que únicamente se desafío, lo que indica posiblemente que el desafío con coccidias a esta edad tiene el efecto de elevar el pH en el ileon, lo cual se contrapone a lo observado en saco ciego, donde no hubo diferencia, en el ileon no se replicó ninguna de las coccidias del desafío, por lo cual la diferencia se debe más que al desafío, al hecho de haber incorporado en estos grupos la harina de *Aspergillus* spp., o el complejo enzimático.

La baja concentración de AGCC¹ en los sacos ciegos y la observación de valores de pH elevados pueden estar relacionados con lo reportado por diferentes autores quienes indican que la absorción de AGCC¹ es dependiente de la concentración, funcionando la absorción como un sistema de retroalimentación negativa (16). Se ha mencionado además que el transporte, difusión y absorción de los

AGCC¹ se acompaña de un aumento en la absorción de Na, K y agua, además de la alcalinización de la luz intestinal debida a la acumulación de bicarbonato y PCO₂. Es evidente que hay afectación del conteo celular en el grupo con el complejo enzimático, los cambios que se observan como es el caso de la mayor lisis leucocitaria el aparente aumento de monocitos y heterófilos indican una afectación sistémica que tiene su base en el intestino, cambios que no fueron evidentes en el grupo de la HA. De acuerdo con Yun *et al.* (42), uno de los mecanismos importantes de defensa inespecíficos asociados al tracto intestinal es el grado de maduración de las células de la mucosa intestinal, estas desarrollan una mejor respuesta cuando alcanzan rápidamente la madurez fisiológica. Lo que permite comprender los resultados obtenidos en el presente trabajo en el grupo de la harina de *Aspergillus* spp., con una dieta estresante (60% de trigo), junto con un brote de coccidias controlado y la aparente falla en la recuperación post-infección de la microbiota intestinal del grupo suplementado con el complejo enzimático. Con base en los resultados observados en el presente estudio, la inclusión de prebióticos en las dietas comerciales para pollo de engorda, debe ser considerada básica en la formulación de las raciones actuales, ya que proporcionan un sustrato adecuado para el desarrollo y metabolismo de la microbiota intestinal benéfica y la activación de la fisiología intestinal del pollo neonato.

¹Orion Research ionalizer/501, Orion Research Incorporated, Boston MA 02122.

REFERENCIAS

1. 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.
2. Collins, M.D. and G.R. Gibson. Probiotics, prebiotics, and symbiotics: approaches for modulating the microbial ecology of the gut. *Am J Clin Nutr* 69: 1052-1057. 1999.
3. Bedford, M.R. Interaction between ingested feed and the digestive system in poultry. *J Appl Poultry Res* 5: 86-95. 1996.
4. Kaldhusdal, M. and E. Skjerve. Association between cereal contents in the diet and incidence of necrotic enteritis in broiler chickens in Norway. *Prev Vet Med* 28: 1-16. 1996.
5. Arakawa, A. and O. Ohe. Reduction of *Clostridium perfringens* by feed additives in the ceca of chickens infected with *Eimeria tenella*. *Poult Sci* 54: 1000-1007. 1975.

6. Kimura, W., F. Mimura, S. Nishida, A. Kobayashi, and T. Mitsuoka. Studies on the relationship between intestinal flora and cecal coccidiosis in chickens. *Poult Sci* 55: 1375-1383. 1976.
7. Qin, Z.R., T. Fukata, E. Baba, and A. Arakawa. Effect of lactose and *Lactobacillus acidophilus* on the colonization of *Salmonella enteritidis* in chicks concurrently infected with *Eimeria tenella*. *Avian Dis* 39:548-553. 1995.
8. Adams, C., H.A. Vahl, and A. Veldman. Interaction between nutrition and *Eimeria acervulina* infection in broiler chickens: development of an experimental infection model. *Br J Nutr* 75: 867-873. 1996.
9. Adams, C., H.A. Vahl, and A. Veldman. Interaction between nutrition and *Eimeria acervulina* infection in broiler chickens: diet compositions that improve fat digestion during *Eimeria acervulina* infection. *Br J Nutr* 75:875-880. 1996.
10. Roberfroid, M.B. Functional effects of food components and the gastrointestinal system: chicory fructooligosaccharides. *Nutr Rev.* 54:s38-s42. 1996.
11. Roberfroid, M.B. Concepts in functional foods: The case of inulin and oligofructose. *J Nutr.* 129:1398s-1401s. 1999.
12. Nava, G. Efecto de un producto de exclusión competitiva comercial (Preempt®) sobre la mortalidad y la transmisión horizontal de *Salmonella gallinarum* en pollo de engorda (tesis de licenciatura) México (D.F.): Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia. Universidad Nacional Autónoma de México, 2000.
13. Gibson, G.R. and M.B. Roberfroid. Dietary modulation of the human colonic microflora: introducing the concept of prebiotics. *J Nutr* 125:104-112. 1995.
14. Audisio, M., G. Oliver, and M.C. Apella. Effect of different complex carbon source on growth and bacteriocin synthesis of *Enterococcus faecium*. *Int J Food Microbiol.* 63:235-241. 2001.
15. Macfarlane, G.T. and J.H. Cummings. Probiotics and prebiotics: can regulating the activities of intestinal bacteria benefit health?. *BMJ.* 318:999-1003. 1999.
16. Roberfroid, M.B. Concepts and strategy of functional food science: the European perspective. *Am J Clin Nutr.* 71(suppl):1660s-1664s. 2000.
17. Roberfroid, M.B. Prebiotics and probiotics: are they functional foods?. *Am J Clin Nutr* 2000; 71: 1682-1687.
18. Clydesdale, F. A proposal for the establishment of scientific criteria for health claims for functional foods. *Nutr Rev.* 55:413-422. 1997.
19. Walker, W.A. and L.C. Duffy. Diet and bacterial colonization: Role of probiotics and prebiotics. *J Nutr Biochem.* 9:668-675. 1998.
20. Macfarlane, G.T. and J.H. Cummings. Probiotics and prebiotics: can regulating the activities of intestinal bacteria benefit health?. *BMJ.* 318:999-1003. 1999.
21. Bedford, M.R. Exogenous enzymes for pigs and poultry. *Nutr Res Rev* 11: 91-114. 1998.
22. Bedford, M.R. Exogenous enzymes in monogastric nutrition-their current value and future benefits. *Anim Feed Sci Technol* 86: 1-13. 2000.
23. Dänicke, S., H. Jeroch, W. Böttcher, and O. Simon. Interactions between dietary fat type and enzyme supplementation in broiler diets with high pentosan contents: effects on precaecal and total tract digestibility of fatty acids, metabolizability of gross energy, digesta viscosity of gross energy, digesta viscosity and weights of small intestine. *Anim Feed Sci Technol* 86: 1-13. 24. 2000. Long, P.L., B.J. Millard, L.P. Joyner, and C.C. Norton. A guide to laboratory techniques used in the study and diagnosis of avian coccidiosis. *Folia Vet Latina* 6: 200-217. 1976.
25. Johnson, J. and W.M. Reid. Anticoccidial drugs: lesion scoring technique in battery and floorpen experiment with chickens. *Exp Parasitol* 28: 30-36. 1970.
26. Andrews, E.J., B.T. Bennet, C.J. Derrell, K.A. Houpt, P.J. Pascoe, G.W. Robinson, and J.R. Boyce. 1993 Report of the AVMA panel on euthanasia. *JAVMA* 202: 229-249. 1993.
27. Tellez, G., C.E. Dean, D.E. Corrier, J.R. DeLoach, L. Jaeger, and B.M. Hargis. Effect of dietary lactose on cecal morphology, pH, organic acids, and *Salmonella enteritidis* organ invasion in leghorn chicks. *Poult Sci* 72: 636-642. 1993.
28. Zinkl, J.G. Avian Hematology. In Jain NC, editor. *Shalm's Veterinary Hematology*. 4th ed. Philadelphia. (USA): Lea & Febiger, 256-263. 1986.
29. Luginbuke, R.C. and S.D. Schlotzhaver. SAS/STAT guide for personal computers. 6th edi. USA: SAS Institute Cary, NC, 555-573. 1987.
30. Ficken, M.D. and D.P. Wages. Necrotic Enteritis. In: Calnek BW, editor. *Diseases of Poultry*. 10th ed. Ames (Iowa) USA: Iowa State University Press, 261-264. 1997.
31. Arakawa, A., E. Baba, and T. Fukata. *Eimeria tenella* infection enhances *Salmonella typhimurium* infection in chickens. *Poult Sci* 60: 2203-2209. 1981.
32. Bradley, R.E. and C.V. Radhakrishnan. Coccidiosis in chickens: obligate relationship between *Eimeria tenella* and certain species of ceca microflora in the pathogenesis of the disease. *Avian Dis* 17: 461-476. 1973.
33. Kogut, M., T. Fukata, G.I. Tellez, and M. Hargis. Effect of *Eimeria tenella* infection on resistance to *Salmonella typhimurium* colonization in broiler chicks with anaerobic cecal flora and feed dietary lactose. *Avian Dis* 38:59-64. 1994.

34. Baba, E., T. Fukata, and A. Arakawa. Establishment and persistence of *Salmonella typhimurium* infection stimulated by *Eimeria tenella* in chickens. Res Vet Sci 33: 95-98. 1982.
35. Clark, D.T. and C.K. Smith. *Eimeria tenella* infection in gnotobiotic chickens. J Protozool 8: 10-11. 1961.
36. Clark, D.T., C.K. Smith, and R.B. Dardas. Pathological and immunological changes in gnotobiotic chickens due to *Eimeria tenella*. Poultry Sci 41: 1635-1636. 1962.
37. Visco, R.J. and W.C. Burns. *Eimeria tenella* in bacteria-free and convencionalized chicks. J Parasitol 58: 323-331. 1972.
38. Visco, R.J. and W.C. Burns. *Eimeria tenella* in bacteria-free chicks of relatively susceptible strains. J Parasitol 58: 586-588. 1972.
39. Wallach, M. and L. Waldensted. Immunity and the effects of removing coccidiostats from poultry feed. World Poultry Special: 12-15. 1999.
40. Grajeda, D., R. Merino, M.A. Juárez, G. Nava, N. Ledesma, E. Morales, L. Sutton, M. Silva, J.L. Davalos, and G. Tellez. Effect of *Aspergillus* sp. Meal on duodenum IgA concentration after *Salmonella enteritidis* challenge in fight cockerels. Abstracts from 23rd Annual Meeting (SPSS) 43rd (SCAD) International Poultry Scientific Forum; 2002 January 14-15; Atlanta (Georgia) U.S.A. Atlanta (Georgia): The Southern Poultry Science Society, Southern Conference on Avian Diseases and U.S. Poultry & Egg Association, 35(154). 2002.
41. Nava, M.G., E.M.A. Juárez, G.R. Merino, M.N. Ledesma, and I.G. Téllez. Prebióticos, probióticos y simbióticos en la ecología intestinal de las aves domésticas. Memorias de las VIII Jornadas Médico Avícolas. 2002 febrero 20-22; Ciudad Universitaria (DF). México (DF): División de Educación Continua y Departamento de Producción Animal:Aves. Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia. UNAM., 174-178. 2002.
42. Yun, C.H., H.S. Lillehoj, and E.P. Lillehoj. Intestinal immune responses to coccidiosis. 24: 303-324. 2000.

Tabla 1. Efecto de la administración dietética de harina de *Aspergillus* spp., o complejo enzimático sobre el pH de íleon y sacos ciegos, grado de lesiones, cantidad de ooquistes en heces y conteo celular sanguíneo en pollos de engorda desafiados con coccidias patógenas al día 13 de edad. *

| pH Intestinal Grupo | 20 días de edad | | 26 días de edad | |
|-------------------------------|---------------------------|--------------------------|--------------------------|--------------------------|
| | Íleon | Ciego | Íleon | Ciego |
| Testigo negativo | 6.33 ± 0.64 ^c | 6.12 ± 0.55 ^a | 6.19 ± 0.85 ^a | 6.37 ± 0.53 ^a |
| H. de <i>Aspergillus</i> spp. | 7.06 ± 0.92 ^{ab} | 6.41 ± 0.62 ^a | 6.58 ± 0.69 ^a | 6.87 ± 0.66 ^a |
| Complejo enzimático | 6.50 ± 0.34 ^{bc} | 6.43 ± 0.52 ^a | 6.39 ± 0.70 ^a | 5.78 ± 0.64 ^b |
| Testigo positivo | 7.13 ± 0.60 ^a | 6.29 ± 0.30 ^a | 6.31 ± 0.60 ^a | 6.43 ± 0.48 ^a |

| Grado lesiones y ooquistes. | | | | |
|-------------------------------|---------------------------|--------------------------|--------------------------|---------------------------------------|
| Grupo | <i>E. acervulina</i> | <i>E. maxima</i> | <i>E. tenella</i> | Oocistos en heces(1x10 ⁵) |
| Testigo negativo | 0.0 ± 0.0 ^c | 0.0 ± 0.0 ^c | 0.0 ± 0.0 ^c | 0.0 ± 0.0 ^c |
| H. de <i>Aspergillus</i> spp. | 0.79 ± 0.72 ^a | 0.79 ± 0.65 ^a | 0.95 ± 0.75 ^a | 29.77 ± 10.15 ^a |
| Complejo enzimático | 0.50 ± 0.51 ^{ab} | 0.87 ± 0.53 ^a | 0.45 ± 0.65 ^b | 29.30 ± 8.62 ^a |
| Testigo positivo | 0.45 ± 0.50 ^b | 0.33 ± 0.48 ^b | 0.50 ± 0.72 ^b | 18.35 ± 6.54 ^b |

Conteo Celular Sanguíneo.

| Grupo | Linfocit. (%) | Heterófilos (%) | Monocit. (%) | Eosinóf. (%) | Basófilos (%) | Leucocitos Totales/ μ l* | Lisis Leucocit. (%) |
|-----------------------|---------------------------------|--------------------------------|-------------------------------|------------------------------|------------------------------|-------------------------------|-----------------------------|
| Testigo negativo | 66.83 \pm 5.30 ^{ab} | 31.0 \pm 5.25 ^{ab} | 1.66 \pm 1.63 ^b | 0 \pm 0 ^a | 0.50 \pm 0.83 ^a | 4,841 \pm 1533 ^a | 2.66 \pm 0.8 ^b |
| H. de <i>Aspergi.</i> | 74.80 \pm 13.23 ^a | 14.40 \pm 8.56 ^c | 6.60 \pm 7.40 ^b | 0 \pm 0 ^a | 4.20 \pm 3.27 ^a | 4,980 \pm 3126 ^a | 10.8 \pm 5.7 ^b |
| Compl. Enzim. | 49.25 \pm 26.58 ^b | 32.25 \pm 16.37 ^a | 14.50 \pm 6.95 ^a | 0.52 \pm 0.50 ^a | 3.75 \pm 3.59 ^a | 5,300 \pm 2312 ^a | 27.7 \pm 15 ^a |
| Testigo positivo | 71.16 \pm 16.36 ^{ab} | 18.00 \pm 9.29 ^{bc} | 7.33 \pm 5.20 ^{ab} | 0.33 \pm 0.51 ^a | 3.83 \pm 3.71 ^a | 4,800 \pm 3222 ^a | 9.33 \pm 5.1 ^b |

* Medias en la misma columna con diferente literal son significativamente diferentes ($P < 0.05$).

STRATEGIES TO DEVELOP FOWLPOX VIRUS VECTORED POLYVALENT VACCINES

ESTRATEGIAS PARA EL DESARROLLO DE VACUNAS POLIVALENTES USANDO COMO VECTOR AL VIRUS DE LA VIRUELA AVIAR

Deoki N. Tripathy

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

RESUMEN

El virus de la viruela aviar tiene en su genoma un ADN de gran tamaño, con capacidad para codificar para casi 250 proteínas. Se le ha utilizado con éxito para la expresión de genes selectos procedentes de otros patógenos aviáres y ya existen en el mercado algunas vacunas recombinantes así elaboradas. Para crear una vacuna polivalente recombinante con el virus de la viruela se requieren las regiones no esenciales del genoma viral, además de promotores poderosos. En este sentido, se han determinado las funciones de algunos genes no esenciales. El gen de inclusión tipo A y los genes de la fotoliasa favorecen la supervivencia del virus en el ambiente. El gen de la timidina quinasa y las secuencias del provirus REV presentes en el genoma del virus de la viruela aviar están asociados con la virulencia pero no son esenciales para la multiplicación viral. El homólogo del gen de la hemaglutinina presente en el genoma del virus de la viruela aviar tampoco es esencial para la multiplicación del virus. Hemos identificado y evaluado algunos promotores homólogos del virus de la viruela aviar, siendo posible utilizar estas regiones no esenciales y

los poderosos promotores homólogos para el diseño de vacunas aviáres recombinantes, polivalentes y efectivas.

ABSTRACT

Fowlpox virus has a large size DNA genome with a capacity to encode for nearly 250 proteins. This virus has been used successfully for expression of selected gene(s) from poultry pathogens and such recombinant vaccines are available commercially. In order to create a polyvalent recombinant poxvirus vaccine, non-essential regions in the viral genome and strong promoters are required. In this regard, functions of a few non-essential genes have been determined. A-type inclusion gene and photolyase genes enhance viral survival in the environment. The thymidine kinase gene and REV provirus sequences present in the fowlpox virus genome are associated with virulence but are not essential for viral replication. The hemagglutinin gene homolog present in the fowlpox virus genome is also non-essential for virus multiplication. A few homologous fowlpox virus

promoters have been identified and evaluated. Thus these non-essential regions and strong homologous promoters can be used in designing effective polyvalent recombinant vaccines for poultry.

INTRODUCTION

Both modified live (attenuated) and inactivated vaccines are developed by traditional approach. Live attenuated vaccines are preferred since they provide immunity of a longer duration, and are more easily produced. Such vaccines, however, may pose the threat of reversion to virulence and often need to be maintained at the correct passage level. To attain the balance between maximum immunogenicity and minimum virulence for the host may involve some risk, including the potential for the vaccine virus to revert to a more virulent form under field conditions. In addition, *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 do not apply to inactivated or subunit vaccines, frequent administration is usually required. Moreover, killed vaccines are more expensive than live ones and may require use of adjuvants. In spite of these concerns, immunization with attenuated live or killed vaccines has proved to be highly effective in controlling many diseases in humans and animals. In this regard, the highly competitive poultry industry is dependent upon the most efficient production methods. The poultry industry has made significant progress in production efficiency through innovative management practices, proper nutrition and the regular use of vaccines to reduce disease-related losses. Prevention of diseases by vaccination has been shown to be extremely beneficial, in decreasing not only mortality and morbidity but also the cost of animal production. In addition to providing protection, vaccines also reduce the spread of infection. In recent years poultry production has changed from numerous small farms to relatively few large operations. Because of the intensive nature of production units, contagious diseases can spread rapidly and the economic consequences can be devastating. Currently, a large number of live viral vaccines (e.g. Newcastle disease, infectious laryngotracheitis, fowlpox, infectious bursal disease, avian encephalomyelitis, and infectious bronchitis) as well as several killed vaccines are used by the poultry industry. It is not uncommon for birds to receive several applications of the same or combined vaccines during their lifetime. The use of combined vaccines reduces the cost of production and administration. Despite regular vaccination of poultry to prevent diseases, outbreaks still occur frequently. While the poultry industry has benefited from the regular use of such vaccines, there is need for a new

generation of effective vaccines that are cost effective and require minimal handling of birds during administration and can provide protection against re-emerging pathogens. In order to survive, pathogens often develop strategies either by genetic mutations or by acquiring genes from other pathogens resulting in the emergence of an antigenically different strain against which conventional vaccine may not provide adequate protection. For example in spite of regular vaccination with currently available fowlpox virus vaccines, outbreaks of fowlpox have occurred in previously vaccinated flocks. Molecular characterization of field strains revealed integration of full-length reticulo endotheliosis virus (REV) provirus in the genome of fowlpox virus. REV is associated with immunosuppression and tumor formation. Vaccine strains of fowlpox viruses contain remnants of REV long terminal (LTR) sequences. Deletion of REV provirus nucleotide sequences from the genome of a field strain of fowlpox virus did not impair its immunogenicity although the virus was attenuated when compared to the parent virus (5,6). Similarly, in a natural dual infection by two viruses, i.e. fowlpox virus and a herpesvirus were shown by electron microscopy in which poxvirus in the cytoplasm and herpes virus in the nucleus of a same cell were present, indicating the possibility of exchange of genetic material between two viruses during their replication (11).

Current molecular techniques can uncover the pathways needed by the pathogens to infect the host in order to produce disease. Using these techniques, it is possible to identify and to evaluate the functions of the genes associated with virulence and protection. This information can be used to overcome the limitations of traditional approaches to vaccine development and assist in designing a new generation of effective vaccines. Such vaccines can be developed by incorporating genes that encode for specific protective antigens of various pathogens into the genome of a live avirulent carrier.

The genomes of several viral vectors, including poxviruses, baculoviruses, herpesviruses and adenoviruses, have been manipulated to enable the expression of foreign proteins. Larger viruses, such as avianpox viruses, have an advantage in that they can accommodate a substantial amount of foreign genetic material. Attenuated live fowlpox virus vaccines of chicken embryo or cell culture origin have been used safely by the commercial poultry industry for more than 60 years. Extensive experience with fowlpox virus as a live vaccine, its restricted host range and large size genome, capable of accommodating substantial amounts of foreign DNA, are some of the desirable features for its use as a vector for the expression of genes of poultry pathogens.

FOWLPOX VIRUS-VECTORED VACCINES

The first recombinant fowlpox virus expressing a specific protein from an avian pathogen, avian influenza virus, was generated in the late 1980s. Subsequently, fowlpox virus vaccines expressing antigens of several viruses e.g. Newcastle disease, Marek's disease, infectious laryngotracheitis, and infectious bursal disease viruses were generated. In each instance, immunization of susceptible birds with recombinant virus resulted in the development of specific antibodies and protection against subsequent challenge with the respective pathogen (12). While avianpox viruses induce productive infection in poultry, they produce an abortive infection in mammalian host and express the protein encoded by the inserted gene. In this regard, a canarypox virus vectored vaccine expressing rabies glycoprotein gene is commercially available for vaccination of cats. Similarly, a canarypox recombinant virus vaccine that expresses West Nile virus gene is available for use in horses.

In developing a new generation of vaccines, it is important to consider vaccine efficacy, safety and cost. Currently, three commercial fowlpox virus-vectored vaccines expressing genes either of avian influenza virus, Newcastle disease virus, or infectious laryngotracheitis virus are available. The fowlpox virus-vectored avian influenza vaccine has been used extensively in Mexico with very encouraging results. Fowlpox virus-vectored vaccines can be developed at a reasonable price if genes from multiple pathogens can be incorporated into the virus genome. For this purpose, several non-essential regions in the fowlpox virus genome and strong homologous virus-specific promoters are required for optimal expression of the foreign gene(s). The complete nucleotide sequences of the genomes of fowlpox and canarypox viruses have been determined (1,14). Initially, thymidine kinase (TK) gene was used for insertion of foreign genes in the genome of fowl pox virus. As, this gene is associated with virulence, TK gene deleted virus was less pathogenic than the parent virus. We have determined the functions of a few genes of fowlpox virus. Fowl pox virus persists in dried scabs for prolonged periods. Interestingly, the virus encodes for a novel DNA repair enzyme, CPD-Photolyase (7). This enzyme repairs the ultraviolet (UV) induced pyrimidine dimers, converting them to monomers using photons from white light as a renewable source of energy. A photolyase deficient fowlpox virus was generated. Comparison of the pathogenesis of fowlpox in chickens infected with photolyase-deficient virus did not show significant differences in terms of replication of the virus or formation of lesions. The mutant virus, however, was less stable than the parent virus in the

infected scabs but was as immunogenic as the parent virus. This particular genetic locus can be used for insertion of foreign genes for development of recombinant vaccines (10). In addition to photolyase gene, the A-type inclusion gene and homolog of hemagglutinin gene also appear non-essential for virus replication in cell culture.

In the development of a recombinant virus, homologous strong promoters are required for optimal expression of the foreign gene(s). In this regard, we have identified and evaluated fowlpox virus promoters (8,9). Use of these homologous promoters should allow an optimal expression of foreign proteins by the recombinant fowlpox virus.

Thus availability of non-essential loci described earlier and homologous strong promoters of fowl pox virus could be used in the generation of polyvalent poultry vaccines.

There has been a concern that immunity generated against fowlpox virus after initial vaccination may prevent the subsequent use of same recombinant virus containing gene(s) of different pathogens as an immunizing agent in the same animal. To circumvent this problem, other antigenically distinct avianpox viruses can be considered as vaccine vectors for reimmunization. Although fowl pox and canarypox viruses are being used currently as a vectors other avipoxviruses e.g. quailpox, psittacinepox, sparrowpox, condorpox viruses as well as poxviruses from Hawaiian endangered forest birds (2,3) can also be considered as potential vectors for recombinant vaccine development. Recent studies with avianpox viruses from endangered Hawaiian forest birds show that these viruses are genetically and antigenically different from fowlpox virus (4) and produce only mild localized lesions in chickens.

With available genetic information on fowl pox virus, development of polyvalent recombinant poultry vaccines is possible. In spite of limited genetic information available on other avianpox viruses, their genomes can also be manipulated towards the development of effective poultry vaccines. In this regard, canarypox virus has been used for expression of mammalian genes.

CONCLUSION

Development of a new generation of vectored vaccines for which the basic technology has been established holds great promise. Such vaccines appear to have a great future role in efficient poultry production.

REFERENCES

1. Alonso, C.L., E.R. Tulsan, Z. Lu, L. Zach, G.F. Cultish, and D.L. Rock. The genome of fowlpox virus. *J. Virol.* 74:3815–3831. 2000.
2. Kim, T.J., W.M. Schnitzlein, D. McAloose, A.P. Pessier, and D.N. Tripathy. Characterization of an avianpox virus isolated from an Andean condor (*Vultur gryphus*). *Vet. Microbiol.* 96:237–246. 2003.
3. Kim, T.J. and D.N. Tripathy. Antigenic and Genetic Characterization of an Avian Poxvirus Isolated from an Endangered Hawaiian Goose (*Branta sandvisdcensis*). *Avian Dis.*, 50:15-21 2006.
4. Kim, T.J. and D.N. Tripathy. Evaluation of Pathogenicity of Avianpox Virus Isolates from Endangered Hawaiian Birds in Chickens. *Avian Dis.*, 50:288-291. 2006.
5. Singh P, W.M. Schnitzlein, and D.N. Tripathy. Reticuloendotheliosis virus sequences within the genome of field strains of fowlpox virus display variability. *J. Virol.* 77:5855–5862. 2003.
6. Singh, P., W.M. Schnitzlein, and D.N. Tripathy. Construction and Characterization of a Fowlpox Virus Field Isolate Whose Genome Lacks Reticuloendotheliosis Provirus Nucleotide Sequences. *Avian Dis.*, 49:401–408. 2005.
7. 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.
8. Srinivasan V, W.M. Schnitzlein, and D.N. Tripathy. A consideration of previously uncharacterized fowlpox virus unidirectional and bi-directional promoters for inclusion in homologous recombinant vaccines. *Avian Dis.* 47:286–295. 2003.
9. Srinivasan, V., W.M. Schnitzlein, and D.N. Tripathy. Genetic manipulation of two fowlpox virus late transcriptional regulatory elements influences their ability to direct expression of foreign genes. *Virus Res.*, 116:85-90. 2006.
10. Srinivasan, V. and D.N. Tripathy. The DNA repair enzyme, CPD-Photolyase restores the infectivity of UV-damaged fowlpox virus isolated from infected scabs of chickens. *Vet. Microbiol.* 108:215-223. 2005.
11. Tripathy, D.N., D.M. Sells, and L.E. Hanson. Natural pox and herpes as a dual viral infection in chickens. *Avian Dis.* 19:75-81. 1975.
12. Tripathy, D.N. Fowlpox virus vectored vaccines for control of poultry diseases. In: *Proceedings of the XX World's Poultry Congress, New Delhi, India, September 2–5; Volume II, pp. 497–503. 1996.*
13. Tripathy, D.N., W.M. Reed, and W.M. Pox. In: Saif, Y.M., H.J. Barnes, J.R. Glisson JR, A.M. Fadly, L.R. McDougald and D.E. Swayne editors. *Diseases of Poultry. 11th Edn. Ames (IA): Iowa State University Press, pp. 253–269. 2003.*
14. Tulman, E.R., C.L. Afonso, Z. Lu, L. Zsak, G.F. Kutish, and D.L. Rock. The genome of canarypox virus. *J. Virol.* 78: 353–366. 2004.

BIOSECURITY IN THE LIVE BIRD MARKETING SYSTEMS IN CENTRAL AMERICA AND THE DOMINICAN REPUBLIC

LA BIOSEGURIDAD EN LOS SISTEMAS DE MERCADOS DE AVES VIVAS EN CENTROAMÉRICA

Patrice N. Klein^A, Fidelis N. Hegngi^A, Jose J. Bruzual^B, Cesar A. Sandoval^C,
Mara E. Gonzalez Ortiz^D

^AUSDA APHIS/VS – National Center for Animal Health Programs, Riverdale, MD USA ^BUSDA APHIS/IS – Washington D.C.

^CUSDA APHIS/IS – Panama, C.A.

^DOIRSA – San Salvador, El Salvador, C.A.

RESUMEN

Los servicios especializados (VS e IS) del Departamento de Agricultura de Estados Unidos/Servicio de Inspección de Sanidad Fitopecuaria (USDA/APHIS), en colaboración con el Organismo Internacional Regional de Sanidad Agropecuaria (OIRSA) realizaron una serie de programas de

capacitación y adiestramiento sobre bioseguridad en los Sistemas de Mercados de Aves Vivas (LBMS), en aras de la prevención y el control de la influenza aviar de alta patogenicidad en seis países de Centroamérica y en la República Dominicana, durante 2007. Entre los participantes se encontraban representantes de los Ministerios de Agricultura y Salud Pública, los

municipios locales, la industria avícola y trabajadores de dichos mercados de aves vivas. Se ofrecieron conferencias sobre sus planes de respuesta ante la influenza aviar de alta patogenicidad, la estructura de la industria avícola, los mercados de aves vivas, los principios de la bioseguridad, las guías que actualmente brinda la Oficina Internacional de Epizootias (OIE) en materia de influenza aviar, además de las generalidades del Plan de Prevención y Control de la Influenza Aviar de baja patogenicidad H5/H7 del APHIS. En cada taller se formaron grupos de trabajo para continuar con las discusiones sobre la inspección y la vigilancia necesarias en estos mercados. En marzo de 2008 se realizará otra reunión conjunta con los representantes de estos países, como continuación. Presentaremos los resultados de estas reuniones y sus talleres.

SUMMARY

USDA/APHIS Veterinary Services and International Services, in collaboration with OIRSA, developed and conducted a training workshop program on Biosecurity in the Live Bird Marketing System (LBMS) to address prevention and control of HPAI in six Central American countries and the Dominican Republic (DR) during 2007. This program was tailored to the needs of the Central American and DR countries in which the LBMS is not included in routine surveillance. Participants included representatives from the Ministry of Agriculture, Ministry of Health, Ministry of the Environment, Ministry of Education, Ministry of Work, local veterinarians and animal health technicians, international organizations (FAO, OIE, USAID, IICA, PAHO, OIRSA, other NGOs), officials from local municipalities, the commercial poultry industry, and LBM supervisors, owners, and workers.

Objectives of the training workshop program were to provide a platform for education, exchange of ideas and expertise, open discussion of issues common and unique to each country relative to HPAI disease transmission, prevention, and control in the LBMS, and opportunities for inter-governmental regulatory agencies' coordination and collaboration in the control of the LBMS in regards to avian health and public health. The 3-day program was designed to begin on the first day with appropriate introductions of Ministry officials, international guests, invited speakers, and course participants. This was followed by scientific and technical presentations on avian influenza to include an overview of avian influenza disease characteristics, advances in laboratory diagnostics, sample collection and sample delivery to a reference lab for confirmatory testing. Final presentations were given on each country's national AI Response Plans, the social and economic impacts of their poultry industry, insights on

their commercial poultry production, and the dynamics of their live bird marketing system (location, components, authorities, regulations, etc.).

On the second day of the program the participants were instructed in the principles of biosecurity, current guidance by the World Organization for Animal Health (OIE) on notifiable avian influenza (NAI), and an overview of the APHIS H5/H7 LPAI Prevention and Control Program as an example of a LBMS surveillance program. The participants also had the opportunity to visit a local LBM that was previously selected by the country's agriculture officials and representative of their typical markets.. Program participants were asked to identify and evaluate the market infrastructure and conditions that impact biosecurity, and to identify which regulatory agencies control the LBMS in regards to avian health and public health. They interviewed the market owners and workers, informally inspected the facilities, described avian housing conditions, varieties of avian species in the markets, and whether live birds and/or poultry products were sold to customers. On the third and final day of the meeting, the participants (organized by working groups) had the chance to discuss and present their findings and recommendations

In summary, the common findings for all participating countries noted that not all Ministries of Agriculture supervise the LBMS. Instead, many local municipalities often are responsible for these LBMS but the supervisors of the municipality had little or no certified training. Ministries of Health may regulate these LBMS relative to protecting public health and food safety but had no regulatory authority for animal health or animal movements into or out of the LBMS. Frequently there are no clear regulations or requirements for movements of live birds within a country. There also is no clear definition of the LBMS from a regulatory perspective, and less clear LBMS procedures and protocols including market registrations, inspections, biosecurity, surveillance, and responses to disease events.

Interestingly, conclusions reached in each workshop program in each country echoed that we all are more similar than different in the common problems and concerns that we share about disease transmission in LBMS. We all have common regulatory challenges and resource limitations. In most of the Central American countries the participation of the federal government has been limited in regards to AI surveillance, prevention, and control. Local authorities are highly motivated but resource and training limited in their abilities to effect improvements and changes in the LBMS.

In an effort to further the initial dialogue, communication, and information exchange initiated in each country during our training program, Working

Groups were formed in each country to promote better interagency collaboration on prevention and control of Avian Influenza in the LBMS. Working Groups are comprised of representatives of the Ministries of Agriculture, Health, Environment, Education, Work, local municipalities, and LBMS supervisors. A follow-up meeting is planned in 2008 in which representatives from all 7 countries will attend to discuss, compare,

and evaluate the improvements and progress in their respective plans and goals. One expected outcome is to realize the most common challenges within and between Central American and DR countries on prevention and control of AI (and other avian diseases) in the LBMS towards potential regional efforts to promote improvements in biosecurity.

OPTIONS FOR CONTROL OF LOW PATHOGENICITY NOTIFIABLE AVIAN INFLUENZA (LPNAI)

OPCIONES PARA CONTROLAR LA INFLUENZA AVIAR DE BAJA PATOGENICIDAD, NOTIFICABLE (LPNAI)

Dennis A. Senne and Brundaban Panigrahy

Diagnostic Virology Laboratory, National Veterinary Services Laboratories, Veterinary Services, Animal and Plant Health Inspection Service, U. S. Department of Agriculture, P. O. Box 844, Ames, Iowa 5010

RESUMEN

La detección de virus de influenza aviar H5 y H7 de baja patogenicidad en la avicultura comercial es ahora de notificación obligatoria ante la Oficina Internacional de Epizootias (OIE); sin embargo, dicha institución no exige opciones de control de la enfermedad, cuando es de baja patogenicidad. Aun cuando la despoblación ha sido la opción preferida para erradicar estas infecciones, también se ha utilizado con éxito la vacunación y la comercialización controlada de las aves. En septiembre de 2006, el Departamento de Agricultura de Estados Unidos (*USDA*) aprobó un Programa Nacional de Control de H5 y H7 de Baja Patogenicidad, bajo el cual los estados deben desarrollar un plan de respuesta aprobado por el *USDA*, para tener derecho al 100% de indemnización de las parvadas infectadas. Recientemente han surgido inquietudes sobre la necesidad de despoblar las granjas infectadas con el virus notificable de baja patogenicidad que resulten positivas a anticuerpos pero cuyas aves sean negativas al virus. Se utilizarán los brotes en ponedoras comerciales y pavos productores de carne en Estados Unidos para ilustrar las preocupaciones y los retos de los métodos actuales de control de la influenza aviar notificable de baja patogenicidad.

SUMMARY

Detections of low pathogenicity (LP) H5 and H7 avian influenza (AI) virus infections in poultry are now notifiable to the World Organization for Animal Health

(OIE). However, the OIE does not mandate control options for LP notifiable AI (LPNAI). In September, 2006 the U.S. Department of Agriculture (USDA) approved the Final Rule on a National Low Pathogenicity H5 and H7 Control Program which pays 100% indemnity for infected flocks. Although such a program encourages depopulation as the first choice to eliminate LPNAI infected flocks, other options such as controlled marketing of virus negative birds and vaccination have also been used successfully. Depopulation can be 15 to 50 times more costly than controlled marketing and two to three times more expensive than vaccination. In addition, depopulation carries with it animal welfare, social, and environmental concerns. Control option for LPNAI may be different for broilers, turkeys, layers and breeders. Decisions on methods for control should involve both Federal and State Governments in collaboration with the poultry industry.

Avian influenza in poultry is a preventable disease through the use of good biosecurity practices; when biosecurity fails, it is important to control the spread of disease by quarantine and elimination of infected flocks. Control options for AI are largely driven by export restrictions when LPNAI infections are detected. Consequently, depopulation is often the method of choice. However, in the United States, alternative options to depopulation, such as controlled marketing of virus negative birds, and vaccination, have also been successfully used, at substantially lower costs. This presentation will review recent outbreaks of

LPNAI and the control methods used to achieve successful eradication.

What is notifiable avian influenza? In January, 2006 the OIE revised the Code definitions pertaining to avian influenza (AI) and created Notifiable Avian Influenza (NAI). The OIE defines NAI as any infection in poultry caused by an H5 or H7 subtype virus of low or high pathogenicity as determined by isolation of the virus, detection of specific RNA or detection of specific antibodies that are not due to vaccination (4). Prior to this change, only highly pathogenic AI (HPAI) viruses were notifiable. The change was made to reflect scientific evidence that some LPAI H5 and H7 viruses, after adaptation to poultry, have the potential to mutate to HPAI. Because there is no available scientific evidence to show which LPAI strains have the potential to mutate to HPAI, it seemed prudent to require notification of all LPAI H5 and H7 infections to encourage countries to conduct surveillance and eliminate H5/H7 infections before the virus becomes widely disseminated or has a chance to mutate to HPAI.

Overview of National Low Pathogenicity H5 and H7 Control Program. In anticipation of the change in the OIE code, the USDA developed a National LPAI H5/H7 Control Program in cooperation with State Governments and the poultry industry. Program participation is voluntary and is administered by Official State Agencies with Federal oversight. The Federal oversight and surveillance framework is provided through the administrative structure of the National Poultry Improvement Plan (NPIP), a voluntary, internationally recognized program for the control and eradication of egg transmitted diseases of breeding flocks. Under the Program, participating states are eligible for 100% indemnity for the cost of the destruction and disposal of poultry infected or exposed to H5/H7 LPAI, cleaning and disinfection of premises, conveyances, and materials that came into contact with poultry that were infected with or exposed to H5/H7 LPAI, enhanced surveillance and monitoring, transfer of vaccine, vaccine administration and the destruction of eggs. State eligibility for 100% indemnity also include participating in a diagnostic surveillance program for H5/H7 LPAI and have an initial state response and containment plan for H5/H7 LPAI that is approved by the Animal and Plant Health Inspection Service (APHIS). States that choose not to participate will be eligible for 25% indemnity. Appraisals of poultry must be signed by the owners of the poultry prior to the destruction of poultry, unless the owners, APHIS, and the Cooperating State Agency agree that the poultry may be destroyed immediately. Any disposal of poultry infected with or exposed to H5/H7 LPAI for which compensation is requested must be performed under a compliance agreement between

the claimant, the Cooperating State Agency, and APHIS. Any cleaning and disinfection of premises, conveyances, and materials for which indemnity is requested must be performed under a compliance agreement between the claimant, the Cooperating State Agency, and APHIS.

Surveillance for AI in the U.S. is based on a combination of diagnostic (clinical) and active surveillance carried out at state, local and industry laboratories. Active surveillance generally involves one or more of the following: 1) testing under the NPIP guidelines, 2) pre slaughter testing (100% flock testing as recommended by the National Chicken Council and the National Turkey Federation), or 3) state-wide surveillance based on risk in the state. Under the NPIP, surveillance is designed to achieve 95% confidence of detection if the incidence is 25% or greater. This is consistent with OIE recommendations for AI surveillance. Details of NPIP surveillance requirements are published in the Federal Register (2).

Control methods used in recent outbreaks of LPNAI in the United States. Since March 2002, eight outbreaks of LPNAI and one outbreak of HPNAI have occurred in commercial poultry in the United States. Six of the outbreaks, including the HPAI H5N2 outbreak in Texas (3), were limited to single premises, and the flocks were depopulated. The Virginia (VA) H7N2 outbreak in 2002 was the largest of the outbreaks and involved 197 premises and 4.7 million birds (1). Depopulation was the primary control method used in VA. The two exceptions to depopulation as the primary means of control were an outbreak of H7N2 in table egg layers in Connecticut (CT) in 2003, where vaccination was used, and an outbreak of H7N9 in Nebraska (NE) meat turkeys in 2007, where controlled marketing was used. The CT outbreak, caused by LPNAI H7N2 virus involved four of seven premises under the same ownership with a total of 3.9 million birds. Successful eradication of the H7N2 virus was accomplished by September 2005, when the last flock of vaccinated birds had completed their laying cycle and was disposed. The NE outbreak, where controlled marketing of virus-free birds was used, involved 145,000 multiage meat turkeys. Additional details of the outbreaks can be found in the Report of the Transmissible Diseases of Poultry and Other Avian Species (5).

Of the three disposal methods – depopulation, controlled marketing, and vaccination, depopulation is, by far, the most expensive. The VA outbreak in 2002 marked the only time, before the development of the National LPAI H5/H7 Control Program in 2006, where Federal funds were used to control an outbreak of LPNAI. The cost of the VA outbreak was \$56 million in Federal expenditures and an estimated total cost of \$150 million to the industry. This represents an

expenditure of approximately \$750,000 per premises. If depopulation had been used for the outbreak of H7N2 in CT layers, the cost of depopulation would have been \$12 million, compared to a cost of \$5 million for vaccination and associated costs such as manure handling, bird disposal and testing etc. – a potential savings of \$7 million. In addition, if depopulation was to be used, the company would have gone out of business.

Since the new OIE reporting requirements became effective, three outbreaks of LPNAI have occurred; all three involved meat turkeys: one each in West Virginia (WV), Nebraska (NE), and Virginia (VA). The WV outbreak occurred in April 2007 and involved a single flock of 25,600 turkeys. Pre-slaughter testing resulted in detection of antibodies to the H5N2 subtype of AIV. Additional specimens collected from the flock were positive for H5 specific RNA by real-time reverse transcription-polymerase chain reaction (rRT-PCR), but no virus was isolated in embryonated chicken eggs. Sequencing of the RNA from the clinical specimen showed the cleavage site of the hemagglutinin (H) gene to be consistent with that of LP H5 virus. The premise was depopulated, and birds were composted on-site. Surveillance of surrounding flocks showed no additional positive flocks. The outbreak of LPNAI in NE occurred in June 2007 and involved a multi-age turkey operation of 145,000 birds. Antibodies to H7N9 subtype AIV were initially detected in serum samples collected at slaughter. Subsequent testing of swabs from younger birds on the premises showed presence of AI-specific RNA by rRT-PCR; the H7N9 subtype AIV was subsequently isolated from younger birds in the farm and was characterized as LPNAI. The flock was disposed by controlled marketing after the flock tested negative for virus. Additional surveillance in surrounding flocks did not detect spread of the virus. The third outbreak of LPNAI occurred in a flock of 54,000 turkeys in VA in July, 2007. Initially, H5N1 specific antibodies were detected in pre-slaughter serum samples. Subsequent testing showed H5 RNA in clinical specimens by rRT-PCR; no H5N1 virus was isolated. However, the H5N1 virus was isolated from a third collection of specimens at time of depopulation and was characterized as LP H5 AI virus. Surveillance of surrounding premises did not detect additional infections. Costs for depopulation, cleaning and disinfection (C&D) and enhanced surveillance of the WV and VA outbreaks were

approximately \$2 million and \$1 million, respectively. Cost for C&D and enhanced surveillance for the NE outbreak was approximately \$45,000.

CONCLUSION

In order to decide the appropriate control options for LPNAI, there are several factors to keep in mind: 1) the potential impact on trade, 2) AI is a preventable disease, and 3) one shoe does not fit all when it comes to control options, especially for different segments of the industry. Trade is usually the over riding factor that drives actions for a quick resolution. Although depopulation is most commonly used, other options should be exercised when possible to avoid concerns about animal welfare, social concerns, and impact on the environment. Good biosecurity can prevent the introduction of AI virus into a farm and good biosecurity can prevent the spread of infection between farms. Since one size does not fit all, careful consideration of all options should be exercised before implementing a control program. The decision should be made with input from State, Federal and Industry representatives.

REFERENCES

1. Akey, B. L., 2003. Low-pathogenicity H7N2 avian influenza outbreak in Virginia during 2002. *Avian Dis.* 47(3 Suppl):1099-103.
2. Federal Register. 2006. Low pathogenic avian influenza: voluntary control program and payment of indemnity; final rule. 9 CFR Vol. 71, No. 186:56302-56333. http://www.aphis.usda.gov/animal_health/animal_dis_spec/poultry/downloads/lpai_interim_final_rule.pdf.
3. Lee, C. W., D. E. Swayne, J. A. Linares, **D. A. Senne**, and D. L. Suarez. 2005. H5N2 avian influenza outbreak in Texas in 2004: the first highly pathogenic strain in the United States in 20 years? *J. Virol.* 79(17):11412-21.
4. OIE. 2007. Avian Influenza. Terrestrial Animal Health Code. Article 2.7.12.1. http://www.oie.int/eng/normes/ncode/en_chapitre_2.7.12.htm. OIE Paris, France.
5. United States Animal Health Association annual meeting proceedings. 2002-2006. USAHA, St. Joseph, MO 64508. <http://www.usaha.org/meetings/proceedings.shtml>.

EFFECTIVIDAD DE UNA VACUNA ACTIVA RECOMBINANTE CONTRA LA INFLUENZA AVIAR EN VECTOR NEWCASTLE PREVENIR LA EXCRECIÓN DEL VIRUS DE INFLUENZA AVIAR DE BAJA PATOGENICIDAD

THE EFFECTIVENESS OF A LIVE, RECOMBINANT NEWCASTLE DISEASE VIRUS- VECTORED AVIAN INFLUENZA VACCINE IN THE PREVENTION OF THE REISOLATION AND SPREAD OF A LOW PATHOGENICITY AVIAN INFLUENZA VIRUS

Bernardo Lozano, Manuel Gay, David Sarfati, y Ernesto Soto

Laboratorio AVI-MEX SA de CV. México, www.avimex.com.mx

SUMMARY

Specific-pathogen-free (SPF) birds were eye drop vaccinated using a novel, live, recombinant H5 avian influenza on a Newcastle disease virus vector vaccine. Birds were challenged 21 days later with a H5N2 low pathogenicity avian influenza virus isolated in Mexico in 2005. Challenge was performed by the mucosal route using $10^{7.6}$ chicken embryo infective doses 50% (CEID₅₀, or *DIEP*₅₀ in Spanish) per bird. Results indicate the virus was not re-isolated from the tracheas or cloacae of the vaccinates at three or five days post-challenge (PC) while the virus was re-isolated at the 10^{-5} dilution from the tracheas and cloacae of the controls at three days PC. Re-isolation was also obtained from the same organs at the 10^{-3} dilution five days PC. Conclusion is that the vaccine has the ability of preventing virus replication in the trachea and cloacal viral excretion in SPF birds.

INTRODUCCIÓN

Mediante procedimientos de ingeniería genética se desarrolló una nueva vacuna activa contra el virus de la influenza aviar (VIA), empleando como vector al virus de la enfermedad de Newcastle (VENC) cepa LaSota, al que se le insertó el del gen H5 del VIA (NewH5[®]). Esta nueva vacuna fue constatada previamente por la Secretaría de Agricultura Ganadería Desarrollo Rural Pesca y Alimentación de México (SAGARPA), en donde el reporte señala que la vacuna NewH5 resultó satisfactoria para las Normas Oficiales Mexicanas, al conferir una excelente protección a la mortalidad generada por el virus velogénico viscerotrópico de la enfermedad de Newcastle (VVVENC) cepa Querétaro, así como al virus de influenza aviar de alta patogenicidad (VIAAP) subtipo H5N2.

El objetivo del presente estudio fue demostrar que esta nueva vacuna recombinante posee la capacidad de estimular la respuesta inmune a nivel de la mucosa respiratoria, estableciendo su potencial para prevenir la replicación y excreción del VIA de baja patogenicidad (VIABP).

MATERIALES Y MÉTODOS

Las pruebas fueron realizadas en gabinetes de aislamiento, instalados dentro de unidades de aislamiento del Cenid Microbiología, INIFAP, con sistemas de inyección y extracción de aire de nivel 3 de bioseguridad. Se utilizaron veinte aves SPF por cada grupo. Un primer grupo se mantuvo sin vacuna como grupo control positivo que posteriormente fue desafiado. Un segundo grupo se vacunó por vía ocular con NewH5 a los 10 días de edad. Un tercer grupo fue utilizado como control negativo sin vacuna y sin desafío.

El desafío fue realizado 21 días luego de la vacunación (PV), cuando todas las aves tenían 31 días de edad, utilizando un inóculo de VIABP subtipo H5N2 aislado en México en 2005, con $10^{7.6}$ DIEP₅₀/ave, por vía mucosal.

A los tres y cinco días post-desafío (PD), 10 aves de cada grupo fueron sacrificadas humanitariamente y se tomaron por separado muestras de todas las traqueas y de todas las cloacas. Los cadáveres de las aves fueron incineradas. De cada grupo se realizó un homogenizado de las muestras, mismo que fue inoculado en 6 embriones de pollo SPF de 10 días de edad (tráquea y cloaca por separado), en seis diluciones décuples seriadas con SSF de 10^0 hasta 10^{-5} . Los embriones fueron incubados durante 120 horas, descartando aquellos que murieran en las primeras 24 horas. Una reacción positiva fue determinada cuando los embriones presentaron hemoaglutinación positiva.

RESULTADOS

A partir de las muestras del grupo control positivo no vacunado y desafiado, se logró el re-aislamiento del virus de IABP en todas las diluciones (10^0 a 10^{-5}) tanto de tráquea como de cloaca a los tres días PD. A los cinco días PD el VIABP fue también re-aislado de los mismos órganos en 4 diluciones (10^0 a 10^{-3}).

En las aves vacunadas con NewH5 no se re-aisló el VIABP ni de tráquea ni de cloaca en ninguna de las muestras tomadas a los tres y cinco días después de realizar el desafío con VIABP.

El grupo de aves que no fueron vacunadas ni desafiadas permaneció 100% negativo al re-aislamiento viral.

DISCUSIÓN

Los trabajos realizados arrojan resultados similares a los obtenidos por otros investigadores que han utilizado un modelo similar para probar el nivel de excreción viral con VIA.

Las pruebas de re-aislamiento viral realizadas en embriones de pollo SPF, permitieron establecer el potencial de la vacuna NewH5 para evitar la excreción del virus de IABP, lo que corrobora la utilidad de la metodología empleada para medir la capacidad de los biológicos para disminuir o suprimir la replicación y excreción del VIA.

Los resultados indican que la vacuna NewH5 es capaz de evitar la excreción del VIABP en las aves desafiadas, lo que permitirá complementar los programas de vacunación contra la influenza aviar donde se utilizan vacunas emulsionadas que confieren una sólida protección sistémica. El uso conjunto de estas vacunas, tienen el potencial de coadyuvar al control y eventual erradicación del VIA de la avicultura organizada.

CONCLUSIÓN

La vacuna activa recombinante NewH5 es eficaz en evitar la replicación traqueal y la excreción del VIABP subtipo H5N2 en aves SPF.

REFERENCIAS

1. NOM-052-ZOO-1995: Requisitos mínimos para las vacunas empleadas en la prevención y control de la enfermedad de Newcastle. Publicada en el Diario Oficial de la Federación, México. 24 de abril de 1997.
2. NOM-055-ZOO-1995: Requisitos mínimos para la elaboración de vacunas emulsionadas inactivadas contra la influenza aviar subtipo H5N2. Publicada en el Diario Oficial de la Federación, México. 29 de junio de 1998.

® Marca Registrada de Laboratorio AVI-MEX SA de CV.

SISTEMA DIVA CONTRA LA INFLUENZA AVIAR UTILIZANDO UNA VACUNA ACTIVA RECOMBINANTE EN VECTOR NEWCASTLE

A DIVA SYSTEM FOR AVIAN INFLUENZA USING A LIVE RECOMBINANT A NDV-VECTORED VACCINE

Ernesto Soto, Bernardo Lozano, Manuel Gay, y David Sarfati

Laboratorio AVI-MEX SA de CV. México, www.avimex.com.mx

SUMMARY

Specific-pathogen-free (SPF) birds were vaccinated with a novel, live, Newcastle disease virus (NDV)-vectored H5 avian influenza recombinant vaccine, by the eye drop route of administration. Birds were monitored weekly for induced antibodies and comparison with those generated by a commercial oil emulsion vaccine. Hemagglutination inhibition (HI) test results showed that the live recombinant vaccine induced detectable antibody levels up to the 1:30

dilutions during the first four weeks post-vaccination using a homologous antigen, but when a heterologous antigen was used, antibody levels were detected at the 1:8 dilution. Antibody levels obtained with the oil emulsion vaccine reached the 1:128 dilution. ELISA test resulted negative in birds vaccinated with the live recombinant vaccine, while the oil emulsion vaccine yielded ELISA-positive results. Conclusions: Both ELISA and HI with a heterologous antigen can be used as a DIVA (differentiation between infected and

vaccinated animals) test with this novel recombinant vaccine.

INTRODUCCIÓN

La influenza aviar de alta patogenicidad subtipo H5N1 ha afectado en los últimos años primordialmente la región de Asia, siendo que algunos países europeos, africanos y del medio oriente han detectado la presencia de este virus en sus parvadas comerciales.

Las estrategias de cuarentena y eliminación de parvadas infectadas como medida para la erradicación de la IAAP de la avicultura ha sido factible en aquellos países desarrollados en donde se cuenta con la capacidad para mantener una vigilancia epidemiológica permanente y extensa, tal como sucede en algunos países europeos, aunque en algunos casos en esta región se ha optado por la vacunación de parvadas de forma preventiva. En las regiones de Asia y Medio Oriente el VIAAP subtipo H5N1 se ha diseminado y la vacunación ha sido de gran ayuda para disminuir los riesgos epidemiológicos y las pérdidas económicas causadas por los efectos de la infección.

Las vacunas comerciales que mayormente se han empleado en el mundo para la prevención y control de la influenza aviar son las inactivadas y emulsionadas en aceite mineral con virus completo, y en menor grado se han utilizado las vacunas recombinantes en vector viruela. Durante el 2007, Avimex® obtuvo en México el registro de una vacuna activa recombinante contra la influenza aviar en vector virus de Newcastle cepa LaSota denominada NewH5®, la cual además de proteger a las aves contra la signología clínica y la mortalidad causadas por el desafío con VVENC y el VIAAP subtipo H5, ha demostrado ser una excelente herramienta para evitar la replicación traqueal y excreción cloacal del VIABP. Esta vacuna que posee la hemoaglutinina del VIA subtipo H5 puede ser un complemento a los programas de vacunación con vacunas emulsionadas o recombinantes en vector viruela aviar.

El objetivo de este trabajo fue el de comparar diferentes técnicas serológicas para la detección de los anticuerpos circulantes contra la IA inducidos en aves vacunadas con NewH5, con la idea de determinar la posibilidad de utilizar alguna de estas técnicas como método diferencial de aves que han sufrido la exposición a virus completos de la IA, ya sea vacunal con vacunas emulsionadas o por la infección de campo (Método DIVA).

MATERIALES Y MÉTODOS

Las pruebas fueron realizadas en gabinetes de aislamiento con nivel 3 de bioseguridad, instalados dentro de unidades de aislamiento del Cenid

Microbiología, INIFAP. Se utilizaron 100 aves SPF por cada grupo en prueba.

En un primer grupo las aves se vacunaron con NewH5 por vía ocular a los 10 días de edad. En un segundo grupo las aves quedaron sin vacuna como control negativo. En un tercer grupo las aves fueron inmunizadas con una vacuna comercial inactivada y emulsionada elaborada con la cepa A/Chicken/232/CPA/1994 subtipo H5N2 a los 10 días de edad como control positivo.

Semanalmente, el 100% de las aves de los diferentes grupos fueron sangradas para detectar los anticuerpos circulantes.

Las pruebas de laboratorio utilizadas fueron la inhibición de la hemoaglutinación (HI) realizada de acuerdo a los lineamientos e interpretación sugeridos por la OIE utilizando 2 diferentes antígenos: antígeno de 1994 (heterólogo a la vacuna recombinante pero homólogo a la vacuna emulsionada) y antígeno de 2005 (homólogo a la vacuna recombinante pero heterólogo a la vacuna emulsionada), y la prueba de ELISA utilizando 2 Kits comerciales (A y B).

RESULTADOS

Las pruebas de HI resultaron diferentes con cada antígeno probado para los grupos vacunados.

Utilizando el antígeno de 1994, los resultados de las pruebas de HI indican que NewH5 induce niveles de anticuerpos menores a la dilución 1:16, considerados como negativos según los criterios de campaña oficial y de la OIE; para la vacuna emulsionada elaborada con antígeno homólogo a la prueba de HI los niveles de anticuerpos llegaron en su mayoría entre las diluciones 1:128 y 1:256; para el grupo control sin vacuna, los resultados permanecieron negativos, con niveles máximos de 1:8 en sueros dispersos en los diferentes muestreos.

Utilizando el antígeno 2005, los resultados de las pruebas de HI indican que NewH5 induce niveles de anticuerpos detectables hasta la dilución 1:32 durante las 4 primeras semanas PV; para la vacuna emulsionada (antígeno heterólogo) los niveles de anticuerpos fueron menores, entre las diluciones 1:32 y 1:64; para el grupo control sin vacuna los resultados permanecieron negativos en niveles máximos de 1:8 en sueros dispersos en los diferentes muestreos.

Las pruebas de ELISA resultaron similares entre sí en todos los grupos utilizando los dos Kits comerciales.

Las aves vacunadas con NewH5 resultaron negativas con ambos Kits comerciales en todos los muestreos, mientras que para la vacuna emulsionada las pruebas resultaron positivas luego de la vacunación, obteniéndose el 100% de positividad a partir de la

cuarta semana PV. El grupo control no vacunado resultó negativo en todas las pruebas.

DISCUSIÓN

Los resultados obtenidos en las pruebas de HI utilizando antígenos homólogos y heterólogos son similares a los obtenidos por diversos investigadores, en donde se ha reportado que entre mayor sea la distancia genética de 2 virus de influenza aviar, mayor será la dificultad para ser detectado si no se utiliza el antígeno homólogo en esta prueba.

Algunas muestras provenientes de las aves SPF del grupo control sin vacunas presentaron resultados de inhibición de la hemoaglutinación en diluciones menores a 1:16 (punto de corte de la prueba), lo que se interpreta como resultado negativo, y demuestra cierta inespecificidad de la prueba con cualquiera de los dos antígenos utilizados en este experimento.

Los resultados obtenidos en las pruebas de ELISA indican que ambos Kits comerciales tienen una

respuesta similar, detectando adecuadamente a las aves que recibieron la vacuna emulsionada elaborada con virus completo, y no detectando anticuerpos cuando las aves se vacunaron con la vacuna recombinante que solamente utiliza el gen HA o aquellas que no fueron inmunizadas.

CONCLUSIÓN

Se concluye que las pruebas de HI con antígeno heterólogo y de ELISA potencialmente pueden ser utilizadas como pruebas DIVA de esta nueva vacuna activa recombinante, y que la prueba de HI con antígeno heterólogo puede ser utilizada como prueba DIVA con vacunas emulsionadas con antígeno completo.

® Marca Registrada de Laboratorio AVI-MEX SA de CV.

RESPUESTA INMUNE – DURACION- EN DOS DIFERENTES TIPOS DE AVES, USANDO VACUNA INACTIVADA DE INFLUENZA AVIAR (H5N2) ESTANDARIZADA

DURATION OF IMMUNITY IN TWO BIRD TYPES USING A KILLED, STANDARDIZED H5N2 AVIAN INFLUENZA VACCINE

A. García, R. Salamanca, S. González, y E. Gallegos

Laboratorios Avilab, Porcicultores 80 Tepatitlan, Jalisco, México C.P. 47600

SUMMARY

Avian influenza (AI) is of worldwide concern due to the possible risk of a pandemic. AI can be controlled using tools such as vaccination and its resulting immune response in birds. A killed H5N2 vaccine was used in commercial layers and broilers. The vaccine was standardized by single immune radial diffusion (SIRD) in terms of hemagglutination (HA) per dose. Antibody levels peaked (GM: 1,114) at seven weeks post-vaccination in layers and at 17 weeks (GM: 320) in broilers. No antibodies were detected at 38 weeks post-vaccination in either layers or broilers. Knowing when the immune response starts and declines is important for disease control. This research showed an extremely higher immune response in layers than in broilers and this can be associated with stress situation (production system, immune status, etc.).

RESUMEN

Enfermedad de influenza aviar es de preocupación mundial, debido al riesgo de posible pandemia. Una herramienta para el control es a través del uso de vacuna y su respuesta inmune en aves. Se usó vacuna inactivada (H5N2) estandarizada (Simple Immune Difusión Radial) en términos de HA por dosis, para vacunar aves postura comercial y pollo engorda. En aves de postura el peak de anticuerpos se alcanzó a siete semanas (sem). Post-vacuna (1114 M.G) y a las 17 sem. En pollo de engorda. (669 M.G). No se detectaron anticuerpos a 38 sem. Post – vacunación en ambos tipos de aves. Para controlar la enfermedad es importante conocer cuando inicia la respuesta inmune y cuando desaparece. En esta investigación se observó que aves de postura tienen tremenda respuesta inmune comparada con el pollo, lo cual puede ser debido a situación de estrés (sistemas de producción, status inmunológico etc.).

INTRODUCCIÓN

A través del tiempo el virus de influenza aviar, ha demostrado ser una amenaza constante para humanos y animales., debido a que ellos mutan con mucha frecuencia y tienen constante movimiento genético, como los vistos en Asia con el subtipo H5N1 o H7N7 en Holanda, Bélgica y Alemania o H7N1 en Italia y H5N2 en USA. La OIE considera a los subtipos H5 y H7 del virus de Influenza como los más peligrosos para la avicultura comercial. En Mayo de 1994 el virus de Influenza aviar fue reportado, desde esa fecha el gobierno y la industria aviar han realizado diferentes medidas para controlar y erradicar la enfermedad; una de ellas es la vacunación. En 1995 el gobierno Mexicano autorizó el uso de vacuna inactivada, proporcionando la semilla maestra (A/Chicken/México/232/94) (H5N2) a los laboratorios productores. A pesar de que millones de aves han sido vacunadas, el virus de baja patogenicidad continúa circulando en algunas poblaciones avícolas. El objetivo de este estudio fue conocer la duración de la respuesta inmune en dos diferentes tipos de aves.

MATERIAL AND MÉTODOS

Aves. 60 pollos de engorda línea Ross y 60 aves Hy-Line W-36, fueron utilizados en este experimento. Las aves estaban seronegativas al virus de IA al momento de la vacunación. Las aves fueron criadas en el bioterio del laboratorio

Las aves ligeras recibieron la vacuna comercial a la edad de seis semanas, y el pollo de engorda a los 14 días.

Todos los pollos, incluidas las aves centinelas fueron sangrados en un inicio a intervalo de dos semanas y en etapa final a intervalo de cuatro semanas. Ninguna ave mostró signos respiratorios ni antes ni después de ser sangradas.

Vacuna comercial. Esta contenía dos antígenos inactivados, uno fue Newcastle (la sota) e Influenza con la cepa oficial (A/Chicken/México/232/94) (H5N2), el biológico contenía aceite mineral como adyuvante.

La vacuna fue estandarizada en términos de hemaglutinina por dosis, mediante la técnica de simple inmunodifusión radial.

Prueba HI. La técnica se desarrolló de acuerdo a lo establecido en la norma oficial para Influenza y manual de diagnóstico proporcionado por CPA.

DISCUSIÓN

Para controlar la enfermedad de influenza aviar es importante conocer el inicio en la respuesta inmune y cuando finaliza.

A pesar de que millones de aves han sido vacunadas con Influenza, el virus de baja patogenicidad se sigue moviendo en algunas zonas avícolas, esto debería asociarse a los siguientes aspectos:

1. Aves que tienen contacto a edad temprana con el virus, algunas veces el virus ha infectado aves de dos semanas de edad.

2. El virus de Influenza está constantemente afectando áreas avícolas, de esta forma la cantidad de virus que existe en el medio ambiente es grande.

3. La presencia de anticuerpos maternos en la progenie es muy importante. Existen reproductoras que son vacunadas para Influenza, así que la progenie tiene anticuerpos humorales. Hemos observado que el catabolismo de los anticuerpos finaliza alrededor del catorce día de edad. Sin importar que título tiene la progenie al día de edad.

Los anticuerpos maternos bloquean en parte la respuesta inmune en las aves, que son estimuladas con antígeno inactivado, en este caso el nivel de anticuerpos circulantes medido por la técnica HI, será menor en comparación a las aves que son vacunadas con un nivel muy bajo de anticuerpos maternos.

La respuesta inmune en las aves será apropiada si la vacuna se aplica a la edad de 10 días en aves con anticuerpos maternos, esto ya lo hemos demostrado.

4. El calendario de vacunación es otro importante aspecto, hemos demostrado, que la respuesta inmune es significativamente afectada cuando aplicamos dos dosis de vacuna, con un intervalo mínimo entre las dos dosis de vacuna, en vez de una sola dosis aplicada cuando los anticuerpos maternos casi han desaparecido. Esto posiblemente se deba a que los anticuerpos que fueron generados por la primera vacuna, se unirán a una cantidad importante de virus de la segunda vacuna, esto conlleva a una respuesta inmune discreta, en comparación a la de aves que han sido vacunadas una sola vez.

El resultado encontrado en este estudio podría ser diferente al de otros investigadores, debido a que sus estudios los realicen en otras regiones y en diferentes parvadas avícolas, además en la respuesta inmune, existen factores importantes como: línea genética en estudio, sexo de las aves muestreadas, tipo de ave (pollo engorda, ave postura comercial), estatus inmunológico de la parvada, supresión inmune de la parvada debida a enfermedades, desordenes nutricionales o micotoxinas, nivel de estrés, tipo de instalaciones, proceso de vacunación, cantidad de aves monitoreadas, calidad del suero en estudio, desarrollo de la prueba HI (Los resultados serían diferentes entre laboratorios), cantidad de hemaglutinina por dosis de vacuna, un porcentaje de aves (0-14%) no responderán al estímulo antigénico, esto se considera

normal, esto lo llamaríamos simplemente como idiosincrasia del sistema inmune.

En esta investigación se observó que aves de postura tienen tremenda respuesta inmune comparada con el pollo, lo cual puede ser debido a situación de estrés (sistemas de producción, status inmunológico etc.).

REFERENCIAS

1. García, F.A. Evaluación de seis diferentes vacunas de Influenza aviar H5N2. Memorias evento AVECAO. Tepatlán, México. 2000.
2. García F.A., H. Johnson, D.K. Srivastava, D.A. Jayawardene, D.R. Wehr and R.G. Webster. Efficacy of inactivated H5N2 Influenza Vaccines Against Lethal A/Chicken/Querétaro/19/95 Infection. *Avian Dis.* 42: 248-256, 1998.

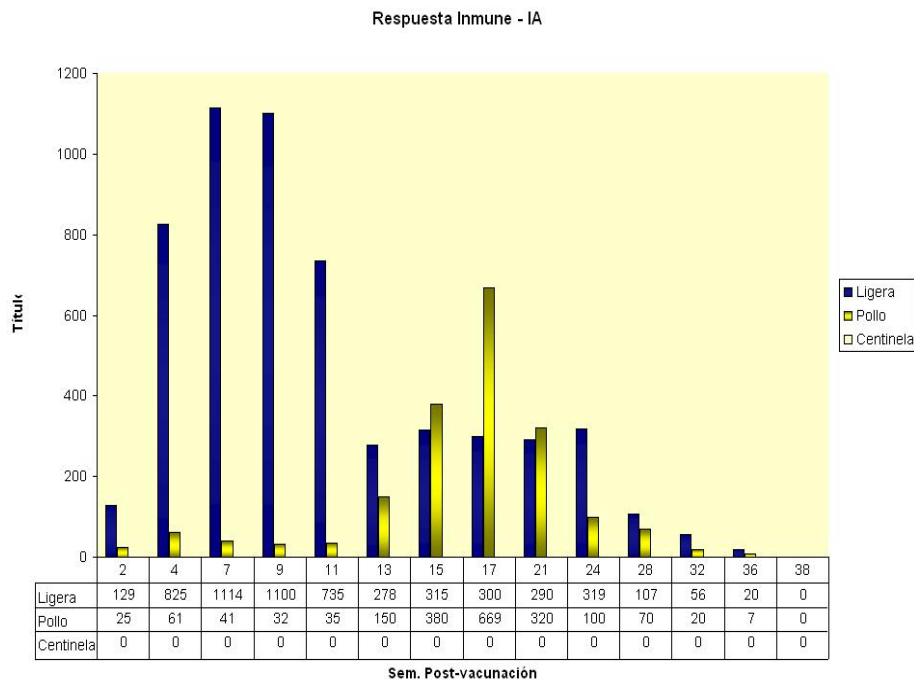
3. Halvorson, D.A. The control of mildly pathogenic avian influenza: a role for inactivated vaccine. *Avian Pathol.* 31, 5–12, 2000.

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.

5. Villarreal, C.C and C.E. Rivera. An update on avian influenza in Mexico. In: Proceedings of the 5th International Symposium on Avian Influenza. Georgia Center for Continuing Education, The University of Georgia, Athens, Georgia, USA, in press. 2002.

6. Webster, R.G. and E.J. Walker. Influenza. *American Scientist.* March-April 2003.

Table 1. Respuesta inmune en dos diferentes tipos de aves inmunizadas con vacuna estandarizada de Influenza aviar.



MYCOTOXIN IMPACT ON GASTROINTESTINAL FUNCTION: USE OF THE SEQUESTERING PROPERTIES OF *SACCHAROMYCES CEREVISIAE* CELL WALL GLUCANS TO ALLEVIATE THE RISK

IMPACTO DE LAS MICOTOXINAS SOBRE LA FUNCIÓN GASTROINTESTINAL: USO DE LAS PROPIEDADES SECUESTRANTES DE LOS GLUCANOS DE LA PARED CELULAR DE *SACCHAROMYCES CEREVISIAE* PARA CONTRARRESTAR ESTE RIESGO

Alexandros Yiannikouris and C. Moran

Alltech Inc., Alltech Biotechnology Center, 3031 Catnip Hill Pike, Nicholasville, KY, USA

RESUMEN

El propósito del presente estudio fue comprender los aspectos químicos fundamentales de la interacción que existe entre los componentes de la pared celular de las levaduras y las micotoxinas para aclarar el proceso de secuestro involucrado en la eliminación de las toxinas. Se investigaron *in vitro* los mecanismos químicos involucrados en la actividad secuestrante de los componentes de la pared celular de *Saccharomyces cerevisiae* por la aflatoxina B1 (AFB1), el desoxinivalenol (DON), la zearalenona (ZEA), la patulina (PAT) y la ocratoxina A (OTA). La interacción cinética basada en la capacidad general y la tasa estandarizada de afinidad se midieron utilizando el modelo de Hill. Los resultados mostraron una gran eficacia de los β -D-glucanos, que están compuestos por cadenas lineales de (1 \rightarrow 3)- β -D-glucanos ramificados con cadenas laterales (1 \rightarrow 6)- β -D-glucano, para AFB1, ZEA, DON y PAT.

INTRODUCTION

Mycotoxins are secondary metabolites secreted by moulds, predominantly belonging to the three genera *Aspergillus*, *Penicillium* and *Fusarium*. They are produced in cereal grains as well as forages before, during and after harvest, in various environmental conditions. After ingestion, mycotoxins could both affect the intestinal mucosa and the microflora of the digestive tract and moreover impair the gastrointestinal function. The gastrointestinal absorption that controls toxin entry into the blood compartment and their distribution throughout the organism occurs according to three processes: 1) a simple diffusion of polar compounds in the liquid phase, 2) a diffusion in the lipid phase of non-ionic compounds, and 3) an active transport. Due to the diversity of their toxic effects and

their synergic properties, mycotoxins are considered as risky to animals.

Several natural strategies for controlling the impact of mycotoxins were proposed. Yeast cell wall was characterized as an efficient organic sequestering agent that decreases the toxicological properties of mycotoxins by limiting the entry of mycotoxins into the animal organism. This study aimed at understanding the fundamental chemistry of the interaction between yeast cell wall components and mycotoxins to clarify the sequestering process involved in toxin clearance.

METHODS

The chemical mechanisms involved in the sequestering activity of *Saccharomyces cerevisiae* cell wall components towards aflatoxin B1 (AFB1), deoxynivalenol (DON), zearalenone (ZEA), patulin (PAT) and ochratoxin A (OTA) were investigated *in vitro*. The interaction kinetic based on overall capacity and standardized affinity rate was measured using Hill's model. The comparison of several sources of yeast cell wall differing in their relative glucan/mannan/chitin content was carried out.

DISCUSSION

Results proved a strong efficacy of β -D-glucans, which are composed of linear chains of (1 \rightarrow 3)- β -D-glucans branched with (1 \rightarrow 6)- β -D-glucan side chains, for AFB1, ZEA, DON and PAT. Complementary work showed a significant efficacy for sequestering T-2 toxin, as well as endophytes associated toxins.

The chemical interaction was approached using molecular mechanics investigation to evaluate the impact of the sequestrants 3D-structure. Together with complementary NMR, X-ray structural data analysis,

molecular modeling assessed the overall stability of the modeled molecules in all their most stable possible conformations and allowed to evaluate the statistical probability of existence of each structure. Furthermore, the site-specific docking of a mycotoxin into the sequestrant was investigated so that translations, rotations, and up and down positioning were carefully explored. We demonstrated the importance of single and/or triple helix organized structure of β -D-glucans. It was concluded that the defining chemical interactions involved weak chemical linkages such as hydrogen and van der Waals bonds occurring between β -D-glucans and the hydroxyl and cyclic groups of mycotoxins. Several *in silico* models proposed a realistic view of mycotoxin molecules caged inside the helix-shaped β -(1,3)-D-glucans, which were firmly stabilized by β -(1,6)-D-glucan branched side chains

due to high geometric similarities between mycotoxins and the active site on β -D-glucans.

Basic science in biochemistry applied to animal nutrition completes in a meaningful way our understanding on the beneficial role of *Saccharomyces cerevisiae* cell wall at limiting the gastrointestinal absorption of mycotoxin and related toxicology. The plasticity of the structure of β -D-glucans exhibiting diverse stereochemistry was undoubtedly responsible for the affinity on a large range of mycotoxins. Affinity rates varied widely between toxins due to their structural and physico-chemical disparities. Nevertheless, we concluded that β -D-glucans may have strong affinities for mycotoxins exhibiting “aflatoxin-like”, “deoxynivalenol-like” or “zearalenone-like” structures.

INOCUIDAD DE LOS ADSORBENTES DE MICOTOXINAS

THE SAFETY OF MYCOTOXIN BINDERS

B. Juan Carlos Medina, Leticia Durán, Robertina Zúñiga, Mariana Altamirano, Rubén Pérez, y José Antonio Fierro

NUTEK S.A. de C.V. 7 Norte 416, Tehuacán, Pue. 75700, México

SUMMARY

The most convenient way of managing mycotoxin contamination-associated economic losses is the inclusion of adsorbents to balanced feeds. Mycotoxin binders or adsorbents must be free of potentially noxious chemicals such as dioxins and heavy metals. In addition, mycotoxin binders must be free of microbial contaminants and they should have no affinity for nutrients, pigments, or minerals. This paper evaluates both inorganic adsorbents and organic aluminosilicates. Specifications and levels detected in both *in vitro* and *in vivo* assays are also reported. This presentation concludes that not all products sold in Mexico are innocuous.

RESUMEN

La forma más práctica de enfrentar las pérdidas económicas asociadas con la contaminación con micotoxinas es la inclusión de adsorbentes en los alimentos balanceados para animales. Es necesario que estos adsorbentes se encuentren libres de compuestos o elementos químicos que puedan causar problemas en una explotación pecuaria, como por ejemplo dioxinas y metales pesados. Además deben estar libres de contaminación microbiológica y que no tengan afinidad por nutrientes, pigmentos y minerales. Este

trabajo se enfoca a presentar evaluaciones tanto de aluminosilicatos y adsorbentes inorgánicos como organoaluminosilicatos, reportando especificaciones y los niveles detectados tanto en ensayos *in vitro* como *in vivo*. El principal problema es la contaminación con arsénico.

INTRODUCCIÓN

Las diferentes estrategias para la reducción de los efectos tóxicos de las micotoxinas es un campo de la investigación científica actual. A la fecha, se cuentan con cuatro tipos de productos: aluminosilicatos (filosilicatos y tectosilicatos), mezclas de compuestos orgánicos con aluminosilicatos, polímeros de origen vegetal y los organoaluminosilicatos (formados por la combinación química de determinados compuestos orgánicos enlazados a aluminosilicatos).

Los aluminosilicatos han demostrado su efectividad en la disminución de la toxicidad de las aflatoxinas, en diferentes especies de animales sometidos a explotación pecuaria. Los primeros reportes se remontan a finales de los años 80 del siglo pasado. Phillips *et al.* 1988.

Los organoaluminosilicatos (compuestos orgánicos enlazados a aluminosilicatos) han demostrado su efectividad contra diferentes

micotoxinas, como ocratoxina A, zearalenona y algunos tricotecenos. Fierro *et al.* 2006.

La evaluación de los adsorbentes de micotoxinas contempla las etapas siguientes:

I. Estudio del proceso termodinámico de adsorción (ensayo *in vitro*, isotermas de adsorción).

II. Inocuidad: cuantificación de la concentración de metales pesados, dioxinas/furanos considerando como referencia los niveles permitidos en las recomendaciones de la JECFA/WHO (ensayos *in vitro*).

III. Efectividad en diferentes especies animales (ensayos *in vivo*).

IV. Seguridad e inocuidad. Interacción insignificante con vitaminas, aditivos, micro nutrientes y elementos traza (ensayos *in vivo*).

La FDA considera inocuos a determinados aluminosilicatos utilizados como antiapelmazantes, siempre y cuando se incluyan en dosis inferiores a 25 kg/t, AFFCO, 2007.

MATERIAL Y MÉTODOS

En este trabajo se presentará información de los resultados obtenidos con productos nacionales y extranjeros que se comercializan en México. En especial el trabajo se enfoca a la cuantificación de metales pesados (ensayos realizados por absorción atómica) y la cuantificación microbiológica, en 61 muestras, analizadas durante los años 2006 y 2007. Además se presentará información sobre el resto de los parámetros de evaluación de adsorbentes de micotoxinas.

RESULTADOS

Para verificar la inocuidad y efectividad de los adsorbentes de micotoxinas en animales se realizan ensayos *in vivo*, donde los adsorbentes son evaluados a un nivel de contaminación de micotoxinas, en el cual pueda demostrarse que se generen diferencias significativas en cuanto a parámetros productivos, entre los grupos control y el grupo que consume estas toxinas. El grupo de inocuidad, que ingiere el mismo alimento que el control con la inclusión del adsorbente debe ser equivalente al grupo control. El grupo de desafío (alimento con micotoxinas y adsorbente), debe mostrar diferencias significativas con el grupo que consume las micotoxinas.

En cuanto a comprobar la inocuidad en: este laboratorio ha desarrollado los ensayos de evaluación de vitamina A y xantofilas en el suero de aves experimentales. Además de aplicar el criterio de cuantificación de la ceniza y el contenido de minerales en la tibia.

Los ensayos *in vitro* utilizando como medio de contacto una solución ácida de pepsina, permiten realizar estudios de comparación de la efectividad de adsorbentes con diferentes micotoxinas, en estos ensayos se ha encontrado que los aluminosilicatos adsorben aflatoxinas, pero no otras micotoxinas. Los organoaluminosilicatos son efectivos para adsorber zearalenona, ocratoxina A y tricotecenos.

La contaminación microbiológica es un parámetro definido dentro de la farmacopea de los Estados Unidos, actualmente se especifica que en los aluminosilicatos deben estar libres de la presencia de *Escherichia coli*: Se analizaron 61 muestras de las cuales sólo 2 muestras resultaron positivas. Al considerar las 16 muestras de aluminosilicatos comerciales no elaborados por esta empresa, se reportó que la cuenta total promedio fue de 300,000 UFC/g, siendo precisamente dos muestras de aluminosilicatos las contaminadas con *E. coli*. La farmacopea británica limitaba la contaminación a sólo 100 UFC/g.

En la Unión Europea, la directiva 2002/32/CE, considera que los niveles máximos, permitidos en suplementos minerales, expresados en ppm, son: arsénico 12, cadmio 5 y plomo 30. En las muestras de adsorbentes se reportó la presencia de arsénico en niveles superiores a los especificados en el 32.89% de las muestras. El promedio, de las 61 muestras analizadas fue de 14.49 ppm, el máximo valor reportado fue de 115 ppm correspondiente a un producto de origen extranjero. En cuanto a la contaminación con plomo, el promedio de las 25 muestras analizadas fue de 14.9 ppm. Sólo una muestra de un aluminosilicato procedente de los Estados Unidos se reportó con 34 ppm, es decir fuera de la especificación.

Los ensayos de dioxinas en adsorbentes de micotoxinas es otra limitación que muy pocas empresas garantizan en sus productos. La preocupación por la contaminación con dioxinas, se inició con la presencia de estos compuestos químicos en aves y huevo procedentes de Bélgica, en 1997. Un problema de contaminación con dioxinas en carne de pollo, llevó a cerrar las minas e instalaciones de la empresa Ball Clay en los Estados Unidos. OMS. 1999. A la fecha ningún lote de los adsorbentes que elabora NUTEK han rebasado el límite máximo permitido de 0.5 ppt, Commission regulation (EC) 1999.

DISCUSIÓN Y CONCLUSIONES

En este trabajo se demuestra que la contaminación con arsénico en los adsorbentes de micotoxinas es el principal problema que afecta la inocuidad. La contaminación con plomo se presenta en menor escala. Falta estudiar la contaminación con

cadmio y con mercurio para tener un panorama completo de la presencia de metales pesados en estos productos. La presencia de enterobacterias, en especial la *E. coli*, no es problema grave, pero sería conveniente que la contaminación microbiológica cumpliera con la normatividad. Es recomendable que en todos los productos comerciales se especifique que están libres de la contaminación microbiológica, dioxinas/furanos y metales pesados.

REFERENCIAS

1. British Pharmacopoeia, London Her Majesty's Stationery Office, vol. 1, pag. 62. 1988.
2. Commission Regulation (EC) No. 2438/1999.
3. Directiva 2002/32/CE del parlamento europeo y del consejo de 7 de mayo de 2002. Sobre sustancias indeseables en la alimentación animal. 2002.
4. Fierro J.A., J.C. Medina and A. Carrera. International Poultry Scientific Forum Abstracts. Pag. 34. 2006.
5. Fierro J.A, J.C. Medina, R. Pérez, L. Duran, y E. Rodríguez. Reducción de los efectos de las

micotoxinas con la incorporación de adsorbentes: Alcances y limitaciones. V Congreso Latinoamericano de Micotoxicología. Florianópolis, SC. Brasil. En prensa. 2006.

6. J.C. Medina, J.A. Fierro, L. Ribera, J. Muñoz, and J. Lara. Vitamina A, xantofilas y minerales traza como parámetros de inocuidad de adsorbentes de micotoxinas. Memorias XXV Convención anual ANECA. Cancún Q.R. Pág.: 185-189. 2000.

7. Official publication .Association of American Feed Control Officials Incorporated. Pág.: 343-347. 2007.

8. OMS. 1999. Ficha descriptiva. No. 225 sobre dioxinas y sus efectos en la salud humana. Ginebra, Suiza. 1999.

9. Phillips T.D., L.F. Kubena, R.B. Harvey, D. S. Taylor, and N.D. Heidelbaugh. Hydrate sodium calcium aluminosilicato: a high affinity sorbent for aflatoxin. Poultry Sci. 67:243-247. 1988.

10. The United States Pharmacopeia The National Formulary, pg. 125. 1990.

EFFECTOS TOXICOS PROVOCADOS POR LA INGESTA DE ALIMENTO CONTAMINADO CON AFLATOXINA B1 Y OCHRATOXINA A EN POLLO DE ENGORDA

AFLATOXIN B1 AND OCHRATOXIN A TOXICITY IN BROILERS

H. José Antonio Fierro^A, F. Rubén Pérez, ^A, M. Leticia Duran ^A, C. Mariana Altamirano^A, B. Juan Carlos Medina^A, y Elizabeth Rodríguez ^B

^ANUTEK S.A. de C.V.

^BInvestigación Aplicada S.A. de C.V., 7 Norte 416 Tehuacán, Pue. México, 75700

SUMMARY

The effect of aflatoxin B1 (AFB1) and ochratoxin A (OTA), alone or in combination in the diets of broilers during 21 days was evaluated. Eighty one-day-old Ross males were randomly allotted to 4 5-bird groups with 4 replicates. Birds received feed and water *ad libitum*. The following treatments were included: T1, no mycotoxins; T2, 200 ppb OTA + 280 ppb AFB1; T3) 280 ppb OTA; T4) 290 ppb AFB1. No statistically-significant differences ($P<0.05$) were observed in weight gain, feed conversion rate, and relative organ weights among all 4 groups. Differences were only found in some biochemical parameters. The effects of both mycotoxins were histopathologically demonstrated in the liver, kidney and gizzard, but not so in the bursa of Fabricius or the spleen. Conclusion:

the combination of these mycotoxins at these dose rates did not result in negative effects on the productive parameters analyzed.

INTRODUCCIÓN

La ocratoxina A (OA), es una micotoxina con propiedades carcinogénicas, teratogénicas e inmunosupresoras, producida por varias especies de hongos del género *Aspergillus* y *Penicillium*, los órganos blanco que afecta principalmente son el riñón (nefrotoxicidad) e hígado (hepatotoxicidad) (7). Al igual que la OA, las aflatoxinas (AFs) tienen las mismas propiedades, pero su órgano blanco es el hígado, principalmente. Los cereales y sus derivados son los productos más susceptibles a la contaminación

con OA y AFs. Además de otros productos de origen vegetal. Los efectos por el consumo de OA en aves son: rechazo de alimento, pérdida en la ganancia de peso, conversión alimenticia, nefropatía, inmunosupresión, carcinogénesis y mortalidad (5). Altas concentraciones de OA en la dieta pueden causar daño al hígado así como también una necrosis intestinal y hemorragias. Por otra parte los efectos de las AFs en animales varían con la dosis, tiempo de exposición, especie, raza, dieta y estado nutricional. Estas AFs pueden ser letales cuando son consumidas en dosis altas. Generalmente los animales jóvenes son más susceptibles. Los signos clínicos que se presentan por el consumo de AFs en aves son: rechazo de alimento, disminución en la ganancia de peso, conversión alimenticia, hemorragias y se incrementa la susceptibilidad a otros factores ambientales y microbianos (3). Pollos que consumieron una dieta con 1,500 ppb de AFs, mostraron histopatológicamente: hígado graso, necrosis e hiperplasia en los conductos biliares (2). En pollos, la ingesta de una dieta con 750 ppb de AFs, afecta los siguientes parámetros clínicos: hipoproteinemia, disminución de la hemoglobina, triglicéridos, fosfolípidos y colesterol (1, Tung *et al.* 1972), además de la actividad de varias enzimas importantes para la digestión de almidones, proteínas, lípidos y ácidos nucleicos (8).

La OA aparentemente previene la degeneración grasa del hígado, causada por las AFs, cuando las dos toxinas son administradas simultáneamente en pollos parrilleros (6).

OBJETIVO

Evaluar los efectos tóxicos en pollo de engorda, provocados por la ingesta de una dieta contaminada con 250 ppb ($\mu\text{g}/\text{kg}$) de OA y 250 ppb de AFB1, en un periodo de 21 días.

MATERIAL Y MÉTODOS

Se utilizaron 80 pollos machos de la estirpe Ross de un día de edad y fueron separados al azar en 4 grupos de 5 aves con 4 repeticiones. El tiempo de experimentación fue de 21 días. El consumo de alimento fue controlado, no así el agua. Se utilizaron 100 kg de alimento iniciador, elaborado por la misma empresa y se mezcló con alimento contaminado naturalmente con *Aspergillus flavus* productor de Aflatoxinas y *Aspergillus melleus* productor de OA (Fierro, 1999). La concentración de ambas micotoxinas en los alimentos contaminados fue confirmada por medio de la cuantificación vía HPLC.

Grupo 1. Control negativo.

Grupo 2. Dieta contaminada con 250 ppb de OA y 250 ppb de AFB1

Grupo 3. Dieta contaminada con 250 ppb de OA.

Grupo 4. Dieta contaminada con 250 de AFB1.

A los alimentos, antes del experimento, se les realizaron los siguientes análisis: micotoxinas (aflatoxinas, zearalenona, ocratoxina A, fumonisinas y tricotecenos), análisis proximal, calcio, fósforo, carotenos, xantofilas, vitamina A, manganeso, zinc y cobre.

La información obtenida fue analizada por medio del programa estadístico SYSTAT, por la prueba de Tukey donde se definió la diferencia entre medias. El valor de significación se basó en 0.05 de probabilidad.

RESULTADOS

No se observó el efecto de las micotoxinas en formas individuales y combinadas sobre la ganancia de peso, conversión alimenticia y peso de órganos. En algunos parámetros bioquímicos se presentaron diferencias estadísticamente significativas (ácido úrico, colesterol, proteínas totales y albúmina). En los análisis histopatológicos solo se presentaron lesiones de leves a moderadas.

Los resultados se presentan en la siguiente tabla:

Ganancia de peso, conversión alimenticia (21 días de experimentación).

| Trat. | Ganancia de peso Medias \pm error std. | C.A. |
|---------|---|-------------------------------|
| Control | 764 \pm 13.1 ^a | 1.40 \pm 0.042 ^a |
| AFs+OA | 766 \pm 10.8 ^a | 1.34 \pm 0.028 ^a |
| OA | 752 \pm 12.3 ^a | 1.33 \pm 0.036 ^a |
| Afs | 740 \pm 12.2 ^a | 1.41 \pm 0.051 ^a |

Medias con letras diferentes son estadísticamente significativas para $p < 0.05$.

ANÁLISIS HISTOPATOLÓGICO

Grupo control: Proventrículo, ventrículo, hígado, riñón, timo, bazo y bolsa de Fabricio. Sin cambios significativos.

Grupo con AFs y OA:

Hígado: Se presento esteatosis leve difusa y colangitis linfocítica leve difusa.

Ventrículo: Se observan en la zona de recubrimiento, escasas erosiones

Riñón, timo, bolsa de Fabricio, bazo, proventrículo, sin cambios significativos.

Grupo con OA:

Hígado: esteatosis moderada multifocal y colangitis linfocítica leve multifocal.

Riñón: tubulonecrosis de leve a moderada multifocal y nefritis intersticial linfocítica leve multifocal.

Ventrículo: Se observan en la zona de recubrimiento, escasas erosiones. Se presento ulcera y ventriculitis heterofílica moderada difusa.

Timo, bolsa de Fabricio, bazo, proventrículo, sin cambios significativos.

Grupo con AFs:

Hígado: esteatosis leve difusa y colangitis linfocítica leve multifocal.

Riñón: tubulonecrosis moderada multifocal y nefritis intersticial linfocítica leve multifocal.

Ventrículo: Se observan en la zona de recubrimiento escasas erosiones.

Timo, bolsa de Fabricio, bazo, proventrículo, sin cambios significativos.

DISCUSIÓN Y CONCLUSIÓN

La OA y las AFs, son de gran importancia debido a su toxicidad y presencia en los alimentos. Los efectos individuales de estas toxinas a diferentes concentraciones han sido bien estudiados, así como la combinación de las mismas pero solo a altas concentraciones (ppm) y utilizando toxinas puras. (Huff, 1981) encontro que la combinación de ambas micotoxinas tienen un efecto sinérgico (2500 ppb de AFs y 2000 ppb de OA) sobre las aves en los parámetros zootécnicos considerados. Diferentes autores han llevado a cabo experimentos con

combinación de toxinas: AFB1 y OA (Huff y Doerr, 1981), AFB1 y DON (Huff *et al.*, 1986), OA y DON (Kubena *et al.*, 1988), OA y citrinina (Doerr *et al.*, 1982), OA y toxina T-2 (Kubena *et al.*, 1987). Los cuales han encontrado efectos severos sobre los parámetros evaluados. Con los resultados obtenidos podemos confirmar que la combinación de estas micotoxinas a estas dosis no se presentaron efectos negativos sobre los parámetros analizados, bajo estas condiciones experimentales.

REFERENCIAS

1. Brown, J.M.M. and L. Abrams. Biochemical studies on aflatoxicosis. Onderstepoort J Vet Res 32:119-146. 1965.
2. Carnaghan, R.B.A., G. Lewis, D.S.P. Patterson, and R. Allcroft. Biochemical and pathological aspects of groundnut poisoning in chickens. Pathol Vet 3:601-615. 1966.
3. Eds, G.T. and R.A. Bortell. Biological effects of aflatoxins: Poultry. Pp. 56-61. In U. L. Diener, R. L. Asquito, and J. W. Dickens (Eds.) Aflatoxin and *Aspergillus flavus* in corn. Southern Cooperative Series Bulletin 279. Auburn University, Auburn, Alabama. 1983.
4. Fierro, J.A. Cinética de la producción de micotoxinas por una cepa de *Aspergillus flavus*. XVI Congreso Latinoamericano de Avicultura. Lima, Perú. 1999.
5. Hamilton, P.B., W.E. Huff, J.R. Harris, and R.D. Wyatt. Natural occurrences of ochratoxicosis in poultry. Poultry Sci 61:1832-1841. 1982.
6. Huff, W.E., J.A. Doerr, C.J. Wabeck, G.W. Chaloupka, J.D. May, and J.W. Merkley. The individual and combined effects of aflatoxin and ochratoxin A on various processing parameters of broiler chickens. Poultry Sci. 63: 2153-2161. 1984.
7. Krogh, P. Ochratoxins. Pp. 448-498. In J.V. Rodricks, C.W. Hasseltine, and M. Mehlman (Eds.). Mycotoxins in Human and Animal Health. Pathotox Publishers, Inc., Park Forest South, Illinois. 1977.
8. Osborne, D.J. and P.B. Hamilton. Decreased pancreatic digestive enzymes during aflatoxicosis. Poultry Sci 60:1818-1812. 1981.

EFICACIA DE DIFERENTES COMBINACIONES ESTRATÉGICAS EN LA REDUCCIÓN DE LOS EFECTOS DE T-2 Y AFLATOXINA B1 SOBRE EL DESEMPEÑO PRODUCTIVO DE POLLOS

EFFICACY OF DIFFERENT COMBINATION STRATEGIES TO DECREASE THE EFFECT OF T2 TOXIN AND AFLATOXIN B1 ON BROILER PERFORMANCE

Luis Micheluzzi^A y Julián Melo^B

^ALab. de Análisis y Granja Exp., Thames 530, San Isidro (1642), Pcia. Bs. As., Argentina
micheluzzi@avimetria.com.ar

^BEspecialización Prod. Avícola, Univ. Nac. Luján, Pcia. Bs. As., Argentina, jemelo@fvet.uba.ar

SUMMARY

Two strategic combinations for the reduction of mycotoxin effects on the productive performance of broilers (0-35 days) were studied. Combination strategies included: 1) a mineral adsorbent + bio-transformation + plant extracts (MP); and 2) mineral adsorbent + MOS + artichoke extract (A+M+B). These strategies were used at the rates of 1,000 and 2,650 ppm, respectively. The diet contained 1.9 ppm de aflatoxin B1 and 3.14 ppm T-2 Toxin. Each treatment was replicated in three 5 broiler-cages. The effects of the diet with or without mycotoxins (Micotox or Control) were also evaluated. Micotox resulted in significantly decreased ($P<0.05$) body weight and increased ($P<0.05$) feed intake and feed conversion rate. Regarding these parameters, Micotox was significantly different ($P<0.05$) from the other 3 treatments but body weight was only different when compared with the controls and with A+M+B-treated broilers ($P<0.05$).

RESUMEN

Se evaluaron dos combinaciones estratégicas (CE) para la reducción de los efectos de las micotoxinas sobre el desempeño productivo de pollos (0-35 días). Las CE utilizadas fueron: adsorbente-mineral + bio-transformación + extractos-vegetales (MP) y adsorbente-mineral + MOS + extracto-alcachofa (A+M+B). Las CE se incluyeron a razón de 1.000 y 2.650 ppm, respectivamente. La dieta con micotoxinas contenía 1.9 ppm de aflatoxina B1 y 3.14 ppm de T-2. Cada tratamiento se repitió en 3 jaulas de 5 pollos c/u, siendo también evaluado el efecto de la dieta con micotoxinas (MICOTOX) y sin micotoxinas (CONTROL). MICOTOX redujo en forma significativa el peso vivo ($p<0.05$) y aumentó el consumo y la conversión ($p<0.05$). Mientras que para estos últimos parámetros MICOTOX se diferenció de los otros tres tratamientos en forma significativa

($P<0.05$), para peso vivo solo lo hizo con respecto a los pollos CONTROL y a los tratados con A+M+B ($p<0.05$).

Un método ampliamente utilizado para el control de las micotoxicosis es el uso de materiales nutricionalmente inertes en la dieta animal, con el propósito de disminuir la absorción de las micotoxinas en el tracto gastrointestinal de las aves. Estas sustancias eran llamadas adsorbentes de micotoxinas y actualmente son genéricamente denominadas Aditivos Anti-micotoxinas (AAM). A pesar de que existen en el mercado un número significativo de productos, Mallmann y cols. (3) comprobaron que apenas el 50% de los productos AAM adecuadamente examinados en el LAMIC (UFSM), presentaron potencial satisfactorio para su utilización con esta finalidad. Se han propuesto diferentes alternativas para minimizar el efecto de las micotoxinas que tienen menor adsorción. Entre ellas se encuentran la bio-transformación y la utilización de extractos vegetales. Definida como la degradación enzimática de micotoxinas para transformarlas en metabolitos no-tóxicos, la bio-transformación se realiza utilizando bacterias o levaduras que producen enzimas para la degradación específica de tricotecenos, ocratoxinas y zearalenona (7). Diferentes sustancias naturales presentes en vegetales (Alcachofa, Carqueja, Manzanilla, Boldo, Cardo Mariano) han mejorado el metabolismo intermedio hepático, siendo el extracto de alcachofa el que se ha estudiado más frecuentemente para la prevención y tratamiento de micotoxicosis en pollos (5,8,9).

El objetivo del trabajo fue la evaluación de dos combinaciones estratégicas (CE) para la reducción de los efectos de las micotoxinas sobre el desempeño productivo de pollos hasta los 35 días de vida, siendo la combinación adsorbente-mineral + bio-transformación + extractos vegetales una de ellas y la combinación adsorbente-mineral + manano-oligosacáridos + extracto de alcachofa, la otra.

MATERIALES Y MÉTODOS

Para iniciar la experimentación se utilizaron 60 pollitos Ross de 1 día de edad, los cuales fueron divididos en 12 jaulas de 5 aves y criados hasta los 35 días de edad. Todo el alimento ofrecido a los pollos fue contaminado con toxinas T-2 y Aflatoxina B1, con la excepción del alimento para el grupo CONTROL. La fuente de contaminación fue un maíz contaminado que se mezcló a razón de 1 Kg. cada 50 Kg. de alimento balanceado, lo cual dio como resultado un alimento con 1,9 ppm de aflatoxina B1 y 3,14 ppm de T-2. Al alimento del grupo CONTROL se le agregó la misma proporción de maíz no contaminado. El alimento y el agua se administraron en forma *ad-libitum*.

Las combinaciones estratégicas (CE) que se utilizaron para la reducción de los efectos de las micotoxinas sobre el desempeño productivo de pollos fueron dos. Una CE fue adsorbente-mineral + bio-transformación + extractos-vegetales (MP), la cual existe en el mercado bajo el nombre comercial Mycofix Plus MTV y se incluyó a razón de 1 Kg./Ton., de acuerdo a la recomendación del distribuidor local (6). La otra CE fue adsorbente-mineral + MOS + extracto-alcachofa (A+M+B), la cual se obtuvo por medio de una combinación de aluminosilicatos y manano-oligosacaridos a razón de 2.5 Kg/Ton y por el agregado de un extracto comercial de alcachofa (Bedgen 40 Premix Concentrado) a razón de 150 g/Ton.

Los cuatro grupos utilizados en la experimentación fueron: 1- CONTROL, alimento sin micotoxinas y sin CE; 2- MICOTOX, alimento con micotoxinas y sin CE; 3- MP, alimento con micotoxinas y MP, 4- A+M+B, alimento con micotoxinas y adsorbente-mineral + MOS + extracto-alcachofa. Cada tratamiento se repitió en 3 jaulas y a los 35 días se determinó el peso vivo individual, mortalidad por jaula y consumo por jaula.

Para el análisis estadístico de las variables consumo y conversión se utilizó un análisis de varianza para un diseño completamente aleatorizado. Mortalidad y peso vivo se analizaron utilizando Kruskal-Wallis por no cumplimentar supuestos ANOVA. Para la comparación entre medias se realizaron contrastes ortogonales. Para realizar todos los análisis se utilizó el software INFOSTAT.

RESULTADOS

El peso vivo a los 35 días de vida de los distintos tratamientos se diferenció en forma significativa ($P<0.05$). Las micotoxinas presentes en el alimento redujeron el peso vivo de los animales que las consumieron (MICOTOX) en forma significativa ($P<0.05$) con respecto al peso vivo que tuvieron los

pollos que no consumieron micotoxinas (CONTROL) y con respecto a los que fueron alimentados con la CE que agregaba extracto de alcachofa y MOS a los aluminosilicatos (A+M+B). Sin embargo, no hubo diferencias significativas ($P>0.05$) entre el peso vivo de los pollos MICOTOX y aquellos que fueron alimentados con la combinación MP. Las medias y DE (\pm) que tuvieron MICOTOX, MP, A+M+B y CONTROL para peso vivo (35d) fueron (g): 1701 (± 19), 1716 (± 24), 1720 (± 44) y 1729 (± 19), respectivamente.

El consumo de los distintos alimentos (0-35 días) también se diferenció en forma significativa ($P<0.05$). MICOTOX aumentó el consumo de los pollos en forma significativa con respecto a los otros tres tratamientos ($P<0.05$), entre quienes no hubo diferencias significativas ($P>0.05$). Las medias y DE (\pm) que tuvieron MICOTOX, MP, A+M+B y CONTROL para consumo (0 -35) fueron (g): 2946 (± 40), 2833 (± 07), 2825 (± 08) y 2837 (± 04), respectivamente.

También la conversión (0-35 días) de los tratamientos utilizados se diferenció en forma significativa ($P<0.05$), siguiendo la tendencia observada para consumo, ya que las micotoxinas en el alimento aumentaron en forma significativa la conversión en el período ($P<0.05$) con respecto a los otros tres tratamientos, entre quienes tampoco hubo diferencias significativas para esta variable ($P>0.05$). Las medias y DE (\pm) que tuvieron MICOTOX, MP, A+M+B y CONTROL para conversión (0-35d) fueron (g/g): 1.73 (± 0.01), 1.65 (± 0.01), 1.64 (± 0.01) y 1.64 (± 0.01), respectivamente.

La mortalidad entre los diferentes grupos no se diferenció en forma significativa ($P>0.05$). Solo en una de las tres jaulas de los animales alimentados con micotoxinas murió un pollo, lo cual no fue suficiente para atribuirle la causa de muerte. Las medias (%) y DE (\pm) que tuvieron MP, A+M+B y CONTROL para mortalidad (0-35 días) fueron 0, salvo MICOTOX, donde fueron: 6.67 (± 11.5).

DISCUSIÓN

Los peores resultados en los parámetros productivos de los pollos que consumieron micotoxinas con respecto al grupo control coincide con lo obtenido en la mayoría de las citas publicadas (3). Mariani y cols.(4) también obtuvieron una significativamente peor performance de crecimiento en pollos alimentados con 5 ppm de aflatoxina B1 hasta los 35 días de edad ($P<0.05$), aunque la magnitud en la disminución del peso fue mucho mayor. Weber y cols.(10), colocando 2.35 ppm de T-2 en el alimento obtuvieron signos clínicos de intoxicación que determinarían una pérdida

de peso significativa, de mantenerse en el tiempo la toxina en el alimento.

Si bien para todas las variables con excepción del peso vivo no hubo diferencia entre la acción de las CE para contrarrestar el efecto de las micotoxinas, el hecho de que para la variable peso vivo la utilización de MP no haya dado una diferencia significativa con los animales con micotoxinas y sin CE podría indicar algún grado menor de protección a la dosis recomendada por el distribuidor local ante situaciones de desafío como las aquí experimentadas. Una tasa de inclusión de MP mayor a la recomendación local (50-100 %) ha sido sugerida por algunos autores (1,2).

La eficacia de la CE de A+M+B para contrarrestar los efectos adversos de las micotoxinas utilizadas en la experimentación estaría basada en la comprobada acción de los aluminosilicatos para adsorber una elevada proporción de las aflatoxinas presentes en el alimento (3), en la comprobada acción de muchos MOS para adsorber una proporción importante de T-2 presente en el alimento (10) y estaría basada también en la comprobada acción detoxificante del extracto de alcachofa sobre las micotoxinas absorbidas (5,8,9), ya que cualquier tipo de adsorbente que se utilice logra ligarse a una proporción variable de los distintos tipos de micotoxinas presentes en el alimento (3). Esto indicaría que la formulación de distintas CE podría utilizarse como medida complementaria a un programa de control de micotoxinas en una empresa avícola.

REFERENCIAS

1. Cortyl, L. y D. Heidler. Prevention and control of feed industry mycotoxins. En: Feed processing & quality control. Technical report series. American Soybean Association-International Marketing Southeast Asia, Singapore. pp 50-56. 2006.

2. Díaz, G., A. Cortes y L. Roldan. Evaluation of the efficacy of four feed additives against the

adverse effects of T-2 toxin in growing broiler chickens. JAPR 14:226-231. 2005.

3. Mallmann, C., P. Dilkin, L. Zanini, R. Hummes y C. Pereira. Critérios para seleção de um bom sequestrante para micotoxinas. Memórias APINCO 2006 de Ciência e Tecnologia Avícolas, Santos, Brasil, pp 213-224. Mayo 2006.

4. Mariani, G. Desempenho produtivo de frangos de corte submetido à intoxicação experimental com aflatoxinas em diferentes idades. Tesis de Maestría, Universidad Federal de Santa Maria. Santa Maria, RGS, Brasil, p 78. Mayo 1998.

5. Melo, J. y R. Harkes. Evaluación productiva de pollos parrilleros consumiendo extracto de alcachofa (*cynara scolymus* L.) durante las tres primeras semanas. Memórias XX Congreso Latinoamericano de Avicultura, Porto Alegre, Brasil, pp 237-239. Septiembre 2007.

6. Micheluzzi, L. Efectos de Mycofix Plus en dietas contaminadas con aflatoxinas, T-2 y ocratoxina en parrilleros. Memórias Jornada de Micotoxicosis, Pilar, Argentina. Abril 2005.

7. Schatzmayr, D. Combined strategies for mycotoxin control. Feed Mix 12:10-13. 2004.

8. Stoev S.D., G. Anguelov, I. Ivanov y D. Pavlov, D. Influence of ochratoxin A and an artichoke extract on vaccinal immunity and helath on broiler chicks. Exp.Toxic.Pathol. 52: 43-55. 2002.

9. Stoev S.D., M. Stefanov, S. Denev, B. Radic, A. Domijan y M. Peraica. Experimental micotoxicosis in chickens induced by Ocratoxin A and Penicillic Acid and intervention with natural plant extract. Vet. Res. Com. 28: 727-746. 2004.

10. Weber, M., K. Balogh, M. Erdelyi y M. Mezes. Effect of T-2 in combination with vitamin E, selenium and mycotoxin binder on lipid peroxidation status and on the glutathione redox system in broiler chicken. J. of Ptry. Sc. 43:222-227. 2006.

REDUCTION OF MOUTH LESIONS IN LAYERS: A CASE STUDY

REDUCCIÓN DE LESIONES ORALES EN PONEDORAS: ESTUDIO DE UN CASO

Greg Cutler

RESUMEN

Las lesiones orales, incluyendo las úlceras, se presentan por diversas razones, como son las micotoxinas, el uso de alimento finamente molido y otros factores. Cuando las micotoxinas son la causa inicial de estas lesiones, la inclusión en el alimento de un secuestrante puede ayudar a la recuperación de la parvada. La inclusión de MTB-100 redujo la incidencia de lesiones orales en una parvada de ponedoras en California. El impacto de la micotoxicosis subclínica sobre la producción puede ser difícil de cuantificar, pero la observación del efecto de las lesiones orales proporciona una medida de la eficacia de los ligantes o secuestrantes de las micotoxinas.

SUMMARY

Oral lesions, including ulcers, present for a variety of reasons. Mycotoxins, fine ground feed and other factors, each play a role. When mycotoxins are the inciting cause of the lesions, inclusion of a mycotoxin binder in the feed can aid in recovery of the flock. Inclusion of MTB-100 reduced the incidence of oral lesions in a California layer flock. The sub-clinical impact of mycotoxins on production can be difficult to quantify, but tracking the effect on oral lesions provides one measure mycotoxin binder efficacy.

EFFECTO DE LOS ANTICUERPOS MATERNOS EN LA RESPUESTA INMUNE DE POLLOS DE ENGORDA VACUNADOS A DIFERENTES EDADES Y CON DIFERENTES VACUNAS INACTIVADAS Y EMULSIONADAS CONTRA EL VIRUS DE INFLUENZA AVIAR

THE EFFECT OF MATERNAL ANTIBODIES ON THE IMMUNE RESPONSE OF BROILERS VACCINATED AT DIFFERENT AGES AGAINST AVIAN INFLUENZA USING KILLED, OIL EMULSION VACCINES

Daniel Marrufo Villa, Daniel Mendoza Avitia, Nancy Christy Santiago, Gerardo Castilla Aguilar y Ricardo Alejo

Laboratorio de Biología, Tehuacan Puebla

SUMMARY

Broilers were vaccinated with killed, oil emulsion avian influenza vaccines in order to evaluate the influence of maternal antibodies on vaccine response. One-day-old broilers and three different vaccines were used. Each vaccine was given at 4 different ages, i.e. 1, 7, 14 and 17 days. Serum samples were collected from each group at vaccination and on days 7, 14, 21 and 28 post-vaccination. Antibodies were detected using the hemagglutination inhibition (HI) test. All three vaccines yielded the highest antibody responses when given at 14 and 17 days of age. We concluded that the presence of maternal antibodies interferes with vaccine

response, i.e., the lower the maternal antibody levels the higher the vaccine response.

RESUMEN

Se aplicaron vacunas inactivadas y emulsionadas contra el virus de Influenza Aviar (IA) en aves para evaluar el efecto de los anticuerpos maternos sobre la respuesta posvacunal. Se utilizaron pollos de engorda de un día de edad y tres marcas de biológicos inactivados y emulsionados. Cada vacuna se aplicó a cuatro diferentes edades: 1, 7, 14 y 17 días; de cada grupo se colectaron sueros el día de la vacunación y a

los 7, 14, 21 y 28 días posvacunación. Para determinar los títulos de anticuerpos se utilizó la técnica de Inhibición de la Hemoaglutinación. Se encontró que con los 3 biológicos hubo un mayor nivel de anticuerpos cuando las aves fueron inmunizadas a los 14 y 17 días. Del presente estudio podemos concluir que la presencia de anticuerpos maternos causa interferencia con la respuesta posvacunal; observándose que a menor nivel de anticuerpos maternos, mayor será la respuesta a la vacunación. También se concluye que el nivel de respuesta está determinado por la calidad de la vacuna.

INTRODUCCIÓN

Tres diferentes clases de inmunoglobulinas se han descrito en las aves, que son similares a las presentes en los mamíferos: IgA, IgM e IgG. Sin embargo, aunque al comparar la estructura de la IgG, se presentan algunas diferencias en su análogo en las aves, tanto en peso molecular y estructura. Por esta razón, este se identifica como la inmunoglobulina IgY (4,5).

La IgY es transportada de la sangre a la yema, y este mecanismo permite en las aves la transferencia de anticuerpos maternos a su prole hasta los primeros días de edad. Sin embargo, la presencia de estos anticuerpos interfiere con la vacunación, ya que los anticuerpos maternos interactúan con el antígeno presentado por la vacuna y bloquean el inicio de una respuesta activa. Los anticuerpos maternos son capaces de proteger a las aves jóvenes durante sus primeras semanas de edad. (2,3,6,7)

Por esta razón, los programas de vacunación tienen que ser diseñados tomando en cuenta lo anterior. Con el fin de evaluar el efecto de la presencia de anticuerpos maternos contra la influenza aviar, se realizó un estudio con el fin de medir el nivel de anticuerpos generado por 3 vacunas comerciales diferentes que se aplicaron a diferentes edades en pollos de engorda provenientes de algunos productores con un alto nivel de anticuerpos.

MATERIAL Y MÉTODOS

Se emplearon 120 pollos de engorda de un día de edad, las cuales fueron divididos en doce grupos, de 10 pollos de engorda cada uno y fueron alojados en unidades de aislamiento Horsfall Bauer, en las cuales fueron aplicadas las vacunas a los días 1, 7, 14 y 17 con la finalidad de evaluar el nivel de anticuerpos y por lo tanto de protección que confirieron las vacunas emulsionadas contra el virus de IA aplicada a diferentes edades. Las vacunas emulsionadas fueron aplicadas por vía subcutánea en la parte posterior media del cuello con la finalidad de evaluar el

comportamiento de anticuerpos contra la IA se obtuvo suero de cada uno de los pollos a los días 0, 7, 14, 21 y 28 post-vacunación. A las muestras de sueros se les realizó la técnica de Inhibición de la Hemoaglutinación (HI) para IA empleando la prueba oficial.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Cuando las aves se vacunaron al día de edad mostraron que únicamente la vacuna del laboratorio 3 logró una expresión serológica mientras que las otras vacunas mostraron una respuesta clara a partir de la cuarta semana posvacunación. Se observó una diferencia de 3.4 logaritmos de diferencia con el grupo A y de 2.7 con el B. a la cuarta semana posvacunal (Gráfica 1).

En aves vacunadas a los 7 días de edad los niveles de anticuerpos fueron satisfactorios para dos vacunas, mientras que la vacuna del laboratorio 3 obtuvo el nivel más alto de anticuerpos. Una vez más la vacuna del laboratorio 1 obtuvo una respuesta prácticamente negativa habiendo una diferencia logarítmica de 5.2 con el laboratorio 3 y de 2.2 con el laboratorio 2 a la cuarta semana (Gráfica 2).

En las aves vacunadas a los catorce días de edad casi no hay presencia de anticuerpos maternos permitiendo que las vacunas del laboratorio 2 y 3 obtuvieron títulos superiores a 5 Log_2 a las tres semanas posvacunación. Sin embargo la respuesta posvacunal para el laboratorio 3 es mucho más alta teniendo una diferencia de 5.1 Log_2 con respecto al laboratorio uno y de 3 Log_2 con el laboratorio 2 (Gráfica 3).

Por último en las aves vacunadas a los 17 días de edad se observaron básicamente los mismos resultados que a los 14 días ya con ausencia de anticuerpos maternos. Se obtuvo el nivel más alto de respuesta posvacunal para cada una de las vacunas, pero siendo muy claro que el laboratorio 3 mostró la mejor respuesta durante toda la prueba (2.3 Log_2) arriba de la vacuna 2 (Gráfica 4).

Los resultados obtenidos se debieron posiblemente a que la vacuna del Laboratorio 3 presenta una mayor cantidad de antígeno, cierto porcentaje de él se inactiva por la presencia de anticuerpos maternos y el resto es suplementado para estimular el sistema inmune para desencadenar una respuesta pos-vacunal. Al igual que lo reportado por Al-Natour, y Arriola este estudio demuestra que las aves vacunadas en presencia de anticuerpos maternos interfieren con la respuesta a la vacunación.

CONCLUSIÓN

La presencia de anticuerpos maternos si interfiere con la respuesta pos-vacunal ya que las aves vacunadas

a los 14 y 17 días de edad obtuvieron la mejor respuesta pos-vacunal en comparación con las aves vacunadas al primer y séptimo día de edad.

La cantidad de antígeno contenido en la vacuna es importante para obtener una respuesta pos-vacunal satisfactoria y que brinde protección en campo. Es importante considerar la cantidad de anticuerpos maternos y el biológico utilizado para instrumentar un programa de vacunación a edad temprana.

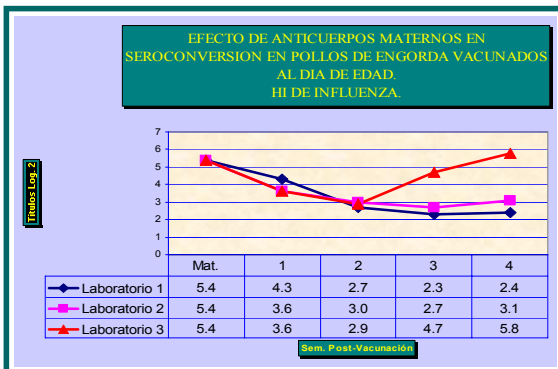
REFERENCIAS

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. Arriola J.M. factores críticos en Enfermedades del Tracto Respiratorio. A.P. Volumen 22, no.6. 2004.
3. 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. 1992.
4. Brugh, M. Beard C.W., and Stone H.D. Immunization of chickens and turkeys against avian

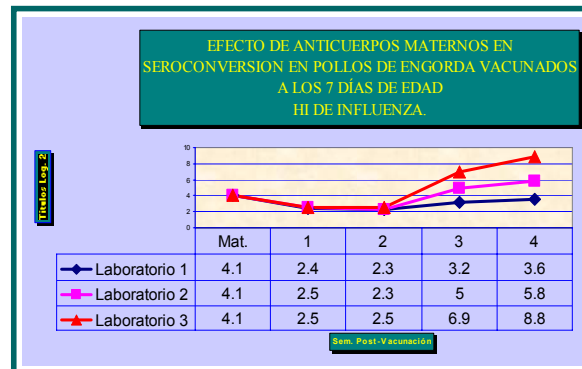
influenza with monovalent and polyvalent oil emulsion vaccines. Am. J. Vet Res. 40:165-169. 1979.

5. Carlander. Avian IgY antibody *in vitro* and *in vivo*. Comprehensive summaries of Uppsala Dissertations from the faculty of Medicine. Acta Universitatis Upsaliensis. 2002.
6. Camenisch, G.M. Tini, D. Chilov, I. Kvietikova, V. Srinivas, J. Caro, P. Spielmann, R. Wenger, M. Gassmann. General applicability of chicken egg yolk antibodies: the performance of IgY immunoglobulins raised against the hypoxia-inducible factor 1 alfa. *FASEB J.* 13: 81-88. 1999.
7. Cowen B.S., R.A. Wilson, S.K. Harris, R.L. Hyde, and J.E. Pearson. Avian Influenza Vaccine (H5n2) Studies In light and heavy breeds of chickens. Western Poultry Disease Conference. Mayo, 1986.
8. Stone, H.D. Efficacy of avian influenza oil-emulsion vaccines in chickens of various ages. Avian Dis. 31:483-490. 1987.
9. Webster, R.G. Enfrentando al Virus de la Influenza Aviar H5N2 Altamente Patógeno. II Curso de Actualización sobre Influenza Aviar. ANECA México D.F. 36-47 Noviembre 1994.
10. Al-Natour M.Q. Effect of different levels of maternally derived antibodies on protection against infectious Bursal Disease virus. Avian Dis. 48:177-182.2004.

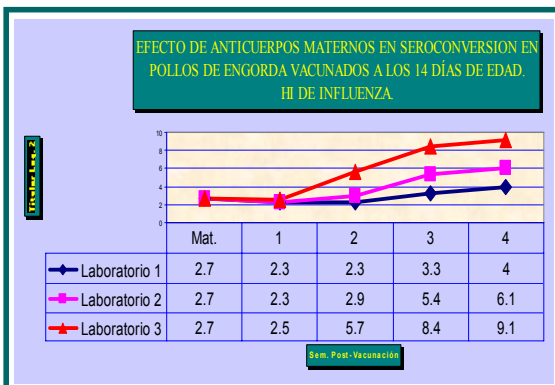
GRÁFICA 1



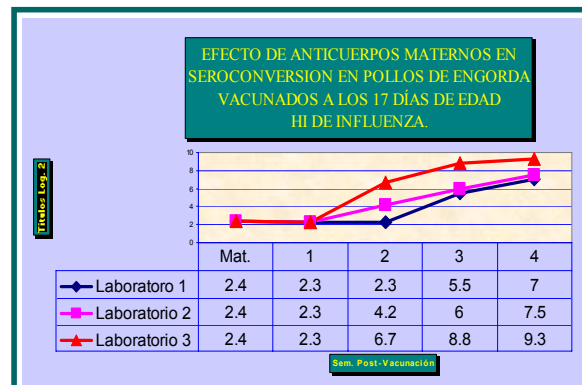
GRÁFICA 2



GRÁFICA 3



GRÁFICA 4



DEVELOPMENT OF AN INNOVATIVE MULTI-SPECIES AVIAN INFLUENZA ANTIBODY BLOCKING ELISA

DESARROLLO DE UNA NUEVA TÉCNICA MULTIESPECIES DE *ELISA* DE BLOQUEO DE ANTICUERPOS PARA LA INFLUENZA AVIAR

K. Velek, R. Munoz, J. Taxter, S. Michaud, V. Leathers, and P. Lopez

IDEXX Laboratories, One IDEXX Drive, Westbrook, Maine 04092, USA

RESUMEN

Se desarrolló una novedosa técnica de ELISA de bloqueo con el antígeno de influenza aviar recubierto en la fase sólida, capaz de fijar los anticuerpos del suero de las aves contra este virus. Después se utiliza un conjugado preparado con un anticuerpo monoclonal dirigido contra la nucleoproteína (NP) A conservada del virus de la influenza, como reactivo para la detección. La presencia de anticuerpos contra la influenza aviar en una muestra problema se determina mediante la capacidad de dicha muestra de inhibir la unión del conjugado anti-NP a la placa. Debido a que la base de la prueba es la capacidad de los anticuerpos de la muestra de bloquear un epítipo inmunodominante conservado sobre la placa recubierta con el virus de la influenza aviar, el formato de este ensayo no requiere el uso de ningún reactivo específico de especie y, por ende, es aplicable ampliamente a las especies de aves capaces de generar una respuesta de anticuerpos contra la nucleoproteína del virus de la influenza aviar. La aplicación de la prueba en pollos, pavos, patos, gansos y avestruces demuestra la detección de numerosos subtipos del virus de la influenza aviar y una excelente correlación con otros métodos tradicionales de análisis como la inmunodifusión en gel de agar (AGID) y la inhibición de la hemaglutinación (HI). La especificidad general es del 99.7%, lo que representa un mejor rendimiento si se la compara con las pruebas indirectas de ELISA.

SUMMARY

An innovative blocking ELISA, the AI MultiS-Screen ELISA, has been developed with avian influenza (AI) antigen coated on the solid phase, which binds avian serum antibodies against AI virus. A conjugate prepared with monoclonal antibody directed against the conserved Influenza A nucleoprotein (NP) is then used as the detection reagent. The presence of the AI antibodies in a test sample is determined by the ability of the test sample to inhibit binding of the anti-NP conjugate to the plate. Because the basis of the test is the ability of a sample antibody to block a conserved

immunodominant epitope on the AI coated plate, the assay format does not require use of any species-specific reagents and is therefore broadly applicable for avian species that generate an antibody response to the nucleoprotein of avian influenza.

Testing in chickens, turkeys, ducks, geese and ostriches demonstrates detection of multiple AI subtypes and excellent correlation with other traditional test methods, such as AGID and HI. Overall specificity is 99.7%, which represents an improvement in performance when compared to indirect ELISAs.

MATERIALS AND METHODS

For chicken sensitivity. Seventy nine chicken serum samples were obtained from Mexico. Samples were divided into 4 groups, which included AI vaccinated and non-vaccinated birds with and without field exposure to AI H5N2 virus. Samples were tested by homologous HI (using H5N2) and the data was provided to IDEXX. For interpretation of the HI data, any titer greater than 5 was considered positive for AI antibody response. Samples were tested on the AI MultiS-Screen ELISA at IDEXX, following standard test protocol and those with sufficient volume were also tested on AGID at IDEXX. AGID reagents were obtained from NVSL.

For chicken specificity. A total of 2430 chicken sera samples representing multiple sites in the United States, Mexico and Europe were obtained following AI testing by a reference test method (AGID, HI or ELISA) to determine AI status. Samples included sera from highly vaccinated breeders and broiler-breeders of various ages, as well as non-vaccinated specific pathogen free (SPF) birds. Each sample was assayed on the AI MultiS-Screen ELISA following standard test protocol. In the event of a positive result, the samples were retested in duplicate to confirm the original test results.

For turkey sensitivity. Five hundred thirty turkey serum samples that had tested positive on the IDEXX indirect AI ELISA were obtained from a turkey breeder in North Carolina. The samples were

from turkey flocks that had been vaccinated for H1N1 and H3N2 and were expected to be serologically positive. Samples were tested at IDEXX on the AI MultiS-Screen ELISA. A subset of these samples was also tested on AGID at IDEXX. AGID reagents were obtained from NVSL. When sufficient sample volume was available, samples with discrepant results were retested in duplicate on the AI MultiS-Screen ELISA.

For turkey specificity. A total of 1128 turkey serum samples, confirmed negative for AI antibodies by AGID or IDEXX AI indirect ELISA, were obtained from sites in the United States, Canada and Europe. These samples were assayed on the AI MultiS-Screen ELISA.

RESULTS

For chicken sensitivity. Of 79 birds in this study, 76 had sufficient volume for testing on AGID, and 70 showed the same results on AI MultiS-Screen ELISA and AGID, resulting in 92% agreement between the two methods. Four of the five discrepant samples, in which AGID was positive and ELISA was negative, were vaccinates. Agreement between AI MultiS-Screen ELISA and HI was 90%, with both tests detecting 52 of 79 birds as positive and 27 as negative.

For chicken specificity. The mean S/N of the 2430 samples tested on the AI MultiS-Screen ELISA was 0.90 with a standard deviation of 0.10, resulting in a population distribution that was 4.0 standard deviations from the assay cut-off.

Initial testing produced seven positive samples in the population, but upon retest in duplicate on the AI MultiS-Screen ELISA, three of the discrepant samples gave negative results, while four samples remained positive. The positive samples were all just below the assay cut-off, in the 0.40-0.50 S/N range. There was not sufficient volume to send the samples out for AGID testing. Four positive samples in a population of 230 represents a specificity of 99.8% for this population.

For turkey sensitivity and specificity. Of 548 AI positive samples tested, six yielded negative results on the AI MultiS-Screen ELISA. Five of six discrepant samples had sufficient quantity for retest on the ELISA. Of these, three could also be tested by AGID. Each of the ELISA retests was negative, while all three AGID tests gave positive results. The six

discrepant samples were considered falsely negative by AI MultiS-Screen ELISA. Overall, 323 of 367 samples set up for AGID testing had sufficient volume available for testing. AGID had 20 false negative test results (303 positive out of 323 vaccinate samples tested). The AI MultiS-Screen ELISA agreement to AGID was 93% and 99% to exposure status. When tested on the AI MultiS-Screen ELISA, all 1128 samples tested negative, for a specificity of 100%. The AI MultiS-Screen ELISA demonstrated a mean S/N of 0.96 for the population and a population distribution that was 3.7 standard deviations from the test cut-off.

Overall results for different avian species. Table 1 shows the performance of the test relative to the exposure status of the birds. Results demonstrate excellent specificity (99.7%) for all of the species tested in which a significant number of samples was evaluated. Results include 99.8% specificity for chickens, 100% for turkeys and 98.8% specificity for ducks. Evaluation of performance in sensitivity for ducks and geese was limited by the inconclusive results produced by reference methods (1,2). The overall sensitivity was 95.4%.

CONCLUSIONS

The new blocking ELISA demonstrated specificity of 99.7% and improved specificity compared to indirect ELISAs. Higher specificity means fewer confirmatory tests. The new test demonstrated excellent correlation of detection with traditional test methods, such as AGID and HI. No need to maintain multiple antigens for different species because the test detects exposure to various AI subtypes.

REFERENCES

1. Brown, J.D., D.E. Stallknecht, J.R. Beck, D.L. Suarez, and D.E. Swayne. Susceptibility of North American ducks and gulls to H5N1 highly pathogenic avian influenza viruses. *Emerg Infect Dis*. Available at: www.cdc.gov/ncidod/EID/vol12no11/06-0652.htm. Accessed October 22, 2007.
2. Starick, E., O. Werner, H. Schirrmeyer, B. Kollner, R. Riebe, and E. Mundt. Establishment of a competitive ELISA (cELISA) system for the detection of Influenza A virus nucleoprotein antibodies and its application to field sera from different species. *J Vet Med B*. 53:370-375. 2006.

Table 1. Summary of AI MultiS-Screen Results by Species.

| AI Antibody Positive Samples* | | | |
|-------------------------------|---------------------------------|-----------------|---------------|
| Species | MultiS-Screen ELISA Positive | Total Tested | % Sensitivity |
| Chicken | 333 | 344 | 96.8% |
| Turkey | 540 | 548 | 98.5% |
| Duck | 182 | 208 | 87.5% |
| Goose | 96 | 107 | 89.7% |
| Ostrich | 41 | 43 | 95.3% |
| Total | 1,192 | 1,250 | 95.4% |

| AI Antibody Negative Samples* | | | |
|-------------------------------|---------------------------------|-----------------|---------------|
| Species | MultiS-Screen ELISA Positive | Total Tested | % Sensitivity |
| Chicken | 2,486 | 2,490 | 99.8% |
| Turkey | 1,130 | 1,130 | 100.0% |
| Duck | 684 | 692 | 98.8% |
| Goose | 311 | 314 | 99.0% |
| Ostrich | 381 | 381 | 100.0% |
| Total | 4,992 | 5,007 | 99.7% |

*AI status determined by consensus analysis of exposure to AI virus and reference test results.

INMUNOCROMATOGRAFÍA EN EL DIAGNÓSTICO DE LA INFLUENZA AVIAR

USE OF IMMUNOCHROMATOGRAPHY IN THE DIAGNOSIS OF AVIAN INFLUENZA

Benjamín Lucio-Martínez

Poultry Diagnostic and Extension Services, Animal Health Diagnostic Laboratory
College of Veterinary Medicine, Cornell University, Ithaca, NY

SUMMARY

Even though not as sensitive as other methods and more expensive, lateral flow immunochromatography (LFIC) for avian influenza (AI) detection are easy and practical to use. If used appropriately offer some advantages over conventional AI virus (AIV) antigen and antibody detection methods in birds. The ability of LFIC to detect and typify AI virus from both tracheal samples and amnio-allantoic fluid was found to be limited by the amount of antigen in the sample. Inhibition of LFIC detected lower levels of AIV antibodies in serum than the agar gel immunodiffusion test.

RESUMEN

La inmunocromatografía de flujo lateral (ICFL) es una herramienta más en el diagnóstico de la influenza aviar (IA), ofrece la ventaja de ser fácilmente transportable, para ser usada fuera del laboratorio, sin necesidad de refrigeración ni equipo especializado.

En este trabajo se presentan resultados sobre el uso de la inmunocromatografía de flujo lateral (ICFL) en el diagnóstico de la influenza aviar (IA). La ICFL se usó para detectar antígeno del virus de la influenza aviar (VIA) en líquido amnio-alantoideo (LAA) de embriones infectados con VIA; en hisopos orales, traqueales, cloacales ó fecales de animales infectados artificialmente con VIA; y en hisopos cloacales de animales infectados en forma natural. Para detectar

anticuerpos contra el VIA se usó la inhibición de la ICFL.

Una breve revisión de la literatura revela resultados muy variables en el uso de inmunocromatografía de flujo para la detección del virus de la influenza aviar (VIA). Davison y cols., Fouchier y cols., y Yuen y cols. (2,3,5), entre otros, encontraron estas pruebas muy confiables, mientras que Capua y cols. (1) obtuvieron una confiabilidad baja, y Woolcock y Cardona (4) encontraron resultados muy poco confiables. Desde la publicación de esos trabajos, cuando menos tres compañías han desarrollado nuevos sistemas de inmunocromatografía (flujo lateral) con mayor sensibilidad: Directigen EZ Flu A+B de Becton Dickinson (BD), para detección de VIA en muestras de humanos. Flu Detect Avian Influenza Type A de Synbiotics Corp. (SC), y Rapid Avian Influenza Virus Antigen Test Kit de Anigen (A), para detección de VIA en muestras de pollos. Los tres sistemas anteriores detectan los antígenos de grupo del VIA, mientras que un cuarto sistema, Rapid H5 Avian Influenza Virus Antigen Test Kit de Anigen (AH5), es específico para el subtipo H5 del VIA.

En los primeros experimentos se comparó la sensibilidad de estos sistemas en LAA de embriones infectados artificialmente, y se encontró que se obtienen resultados positivos con la ICFL cuando la muestra de LAA contiene entre 1000 a 10,000 dosis infectantes para el embrión 50%(DIE₅₀). De los tres sistemas el de BD fue el más sensible, y Anigen H5 el menos sensible.

Para la detección de VIA en pollos infectados experimentalmente se infectaron dos grupos de pollos libres de patógenos específicos. El primer grupo fue infectado con un VIA H7N2 aislado originalmente de pollos, y el segundo grupo con un VIA H5N2 originalmente aislado de pato. De los pollos infectados se tomaron hisopos oro-faríngeos, traqueales, cloacales y fecales 1, 2, 3, 4, 5, 6 y 7 días post-inoculación (DPI).

En los pollos infectados con H7N2 la ICFL detectó antígeno viral en los hisopos traqueales desde 1 DPI en 3 de 5 pollos infectados. A los 2 y 3 DPI se detectó virus en hisopos oro-faríngeos y traqueales en todos los pollos examinados, pero sólo en 2 hisopos traqueales a los 4 DPI y 1 sólo a los 5 DPI. La prueba no detectó antígeno viral en hisopos cloacales o fecales.

En los pollos infectados con H5N2 la ICFL no detectó antígeno viral en los hisopos oro-faríngeos, traqueales, cloacales ni fecales.

La ICFL no detectó antígeno viral en un número limitado (5) de hisopos cloacales de pollos infectados en forma natural, pero Anigen H5 permitió la identificación (H5) del virus en el LAA de los embriones inoculados con sobrenadante de los hisopos cloacales.

La inhibición de la ICFL fue mucho más sensible que la prueba de precipitación en agar en la detección de anticuerpos contra VIA en suero de pollos y capaz de detectar anticuerpos contra VIA en suero de codornices. La inhibición de ICFL H5 detectó anticuerpos contra H5 en suero de perdices, pavos, patos, faisanes, pavos reales y gallinas de Guinea vacunadas con H5 recombinado en viruela de gallina.

La ICFL es una herramienta más en el diagnóstico de la IA, pero es necesario reconocer que la prueba tiene limitaciones vinculadas a la cantidad de antígeno viral presente en la muestra a analizar.

REFERENCIAS

1. Capua, Ilaria, C. Terregino, G. Cattoli, and A. Toffan. Increased resistance of vaccinated turkeys to experimental infection with an H7N3 low-pathogenicity avian influenza virus. *Avian Pathology*. 33:158-163. 2004.
2. Davison, Sherrill, A.F. Ziegler; and R.J. Eckroade. Comparison of an antigen-capture enzyme immunoassay with virus isolation for avian influenza from field samples. *Avian Diseases*. 42: 791-795. 1998.
3. Fouchier, R.A.M., P.M. Schneeberger, F.W. Rozendaal, J.M. Broekman, S.A.G. Kemink, V. Munster, T. Kuiken, G.F. Rimmelzwaan, M. Schutten, G.J.J. van Doornum, G. Koch, A. Koch, G.A. Bosman, M. Koopmans, and A.D.M.E. Osterhaus. Avian influenza A virus (H7N7) associated with human conjunctivitis and a fatal case of acute respiratory distress syndrome. *PNAS*. 101: 1356-1361. 2004.
4. Woolcock, P.R. and C.J. Cardona. Commercial immunoassay kits for the detection of influenza virus type A: evaluation of their use with poultry. *Avian Dis*. 49: 477-481. 2005.
5. Yuen, K.Y., P.K.S. Chan, M. Peiris, D.N.C. Tsang, T.L. Que, K.F. Shortridge, P.T. Cheung, W.K. To, E.T.F. Ho, R.Sung, A.F.B. Cheng. Clinical features and rapid viral diagnosis of human disease associated with avian influenza A H5N1 virus. *The Lancet*. 35:467-471. 1998.

AISLAMIENTO Y SEROTIPIFICACIÓN DE CEPAS DE BRONQUITIS INFECCIOSA

ISOLATION AND SEROTYPING OF INFECTIOUS BRONCHITIS VIRUS STRAINS

P. Muñoz, T. Cañedo, R. Ortega, and J. Chapa

SUMMARY

In this study, eight infectious bronchitis (IB) virus isolates (6 from broilers and 2 from broiler breeders) from farms in Northern and Central Mexico were characterized. Virus isolation, reverse transcriptase-polymerase chain reaction (RT-PCR), restriction fragment length polymorphism (RFLP) and sequencing techniques were used. RFLP showed that 4 isolates were of the Massachusetts serotype, one of the Connecticut serotype, and three of a variant serotype. By sequencing, the Massachusetts, Connecticut, and two variants (BL56 serotype) showed to be consistent, while one isolate showed 76.2% consistency with the Arkansas serotype. For a serotype to be considered as a variant, it must show >90% similarity, so that the latter isolate was considered as a new field isolate based on S1 protein sequencing similarity. Results show agreement between both RFLP and sequencing. The usefulness of these techniques in the diagnosis of IB was demonstrated. The importance of molecular identification of field strain variations in order to establish proper preventive/control programs was also shown.

INTRODUCCIÓN

La bronquitis infecciosa aviar (BIA) es una enfermedad causada por un coronavirus que afecta el sistema respiratorio y urogenital de los pollos de engorda, ponedoras y reproductoras, generando grandes pérdidas económicas a la industria avícola, debido principalmente al bajo rendimiento de los pollos de engorda, disminución en la producción y calidad de los huevos, así como de la fertilidad

La BIA es controlada mediante el uso de vacunas vivas e inactivadas, pero la amplia variabilidad antigénica que posee el virus hace difícil un control eficaz, presentándose brotes de la enfermedad en parvadas vacunadas, debido probablemente a que los virus de campo difieren antigénicamente de los serotipos vacunales, por lo cual la BIA continua siendo un problema en la cría de las aves comerciales al no existir protección cruzada entre los diferentes serotipos o variantes del virus.

Tradicionalmente la BIA es diagnosticada por aislamiento e identificación del virus con pruebas convencionales, el aislamiento viral del virus de la BIA

es definitivo, pero esta es una prueba que implica tiempo. Un nuevo y rápido método basado en la biología molecular ha sido diseñado para la identificación genómica de este virus llamado RT-PCR-RFLP, con el que se analiza el ácido nucleico, y pueden diferenciarse serotipos conocidos incluyendo cepas variantes. Este método ha sido reconocido por su alta sensibilidad y especificidad en el diagnóstico del virus de la BIA.

MATERIAL Y MÉTODOS

En el presente trabajo se caracterizaron 8 cepas del virus de la BIA, seis fueron aisladas de pollo de engorda y dos de reproductoras pesadas procedentes de granjas ubicadas en la región norte y centro del país. Las técnicas utilizadas fueron Aislamiento viral, RT-PCR, RFLP y secuenciación. Por RFLP, cuatro correspondieron al serotipo Massachusetts, una a Connecticut y tres a un serotipo variante. Por secuenciación concordaron los serotipos Massachusetts y Connecticut, dos variantes (serotipo BL56) y una en 76.2 % con Arkansas. Para que un serotipo sea considerado como variante debe tener similitud mayor al 90% con el mismo, por tal efecto este último se considera una nueva cepa de campo basado en la similitud de la secuenciación de la proteína S1.

RESULTADOS

Los resultados del presente trabajo se muestran en la Tabla N^o 1

CONCLUSIONES

Los resultados obtenidos demuestran concordancia entre las pruebas de RFLP y secuenciación y su utilidad en el diagnóstico de la enfermedad, así como la importancia de la identificación molecular para detectar variaciones en las cepas de campo para establecer programas adecuados de prevención y control.

REFERENCIAS

1. Cavanagh, Naqi. Infectious Bronchitis. In: Diseases of Poultry, 10th ed., B.W. Calnek, H.J. Burnes,

C.W. Beard, L.R. McDougald y Y.M. Saif, eds. Iowa State University Press, Ames, IA pp.511-526. 1997.

2. Gelb, J. JR. and Andm. W Jackwood. Infectious Bronchitis Virus. In: S.B. Hitchner, C.H. Domermuth, H.G. Purchase and J.E. Williams (eds.), Isolation and Identification of Avian Pathogens. Am. Assoc. Avian Pathol. Kenneth Square, PA, pp 169-174. 1998.

3. Ignjatovic, J. and L. Galli. Immune responses to structural proteins of avian infectious bronchitis virus. Avian Pathol., 24:313-332. 1995.

4. Parsons, M., Ellis Cavanagh, and J. Ka cook. Characterization of an infectious bronchitis virus isolated from IB vaccinated broiler breeder flocks. Veterinary Record, 131:408-411. 1992.

Tabla 1. Análisis y resultados obtenidos.

| Cepa No. | Aislamiento viral | RFLP | Secuenciación Proteína S1 |
|----------|-------------------|---------------|--------------------------------|
| 1 | Positivo | Massachusetts | Massachusetts 97.2% cepa H120 |
| 2 | Positivo | Massachusetts | Massachusetts 92 % cepa H120 |
| 3 | Positivo | Massachusetts | Massachusetts 92 % cepa H120 |
| 4 | Positivo | Connecticut | Connecticut 100% |
| 5 | Positivo | Variante | BL-56 92.3 % |
| 6 | Positivo | Variante | Arkansas 76.2 % |
| 7 | Positivo | Massachusetts | Massachusetts 97.1 % cepa H120 |
| 8 | Positivo | Variante | BL-56 alta similitud |

CARACTERIZACIÓN MOLECULAR DEL VIRUS DE BRONQUITIS INFECCIOSA EN AISLAMIENTOS DE 10 AÑOS UTILIZANDO LA TÉCNICA DE RT-PCR-RFLP

PCR/RFLP MOLECULAR CHARACTERIZATION OF INFECTIOUS BRONCHITIS VIRUSES ISOLATED THROUGHOUT TEN YEARS

Belem Huerta, Manuel Gay, Refugio Cortés, Bernardo Lozano, David Sarfati, y Ernesto Soto

Laboratorio AVI-MEX SA de CV. México, www.avimex.com.mx

SUMMARY

A total of 141 infectious bronchitis viruses (IBV, or VBI in Spanish) isolated from broilers and hens involved in clinical cases throughout Mexico in the last 10 years were genetically typified using the polymerase chain reaction and the restriction fragment length polymorphism (PCR-RFLP) techniques. Fifty-seven (57) samples corresponded to the Mass type, 35 to BL-56, 18 to Conn type, 17 to Ark, 5 to DS-57, and 4 to the Mass-Conn types. Between 1998 and 2001, the highest frequency of isolation (HFA, or MFA in Spanish) corresponded to the Mass type, even though

the Mass-Conn and the DS-57 types were also detected. In 2002 the HFA corresponded to Conn and Ark, but also the Mass and BL-56 types were detected. In 2003, the HFA corresponded to the Mass, BL-56 and Ark types, even though the Conn and Mass-Conn types were also detected. Between 2004 and 2007, the HFA corresponded to the Mass and BL-56 types, even though the Ark and DS-57 types were also detected, while the Conn and Mass-Conn types were not found.

INTRODUCCIÓN

La bronquitis infecciosa (BI) es una enfermedad viral altamente contagiosa que afecta el tracto respiratorio y urogenital de pollos y gallinas de todas las edades. La enfermedad se encuentra distribuida a nivel mundial. En México es una de las enfermedades de mayor importancia económica por que disminuye la productividad de las parvadas e incrementa la susceptibilidad de las aves a infecciones secundarias (2).

La BI es causada por un virus (VBI) con cubierta que pertenece a la familia *Coronaviridae*. Su genoma es una única cadena de RNA de sentido positivo (27 Kb) y codifica para cuatro proteínas principales estructuralmente: Proteína de la nucleocápside (N), glicoproteína de membrana (M), glicoproteína de cubierta (E) y glicoproteína especular (S) formada por dos subunidades, S1 y S2 (1,3). La subunidad S1 presenta regiones inductoras de anticuerpos neutralizantes, anticuerpos serotipo-específicos y anticuerpos inhibidores de la hemoaglutinación (3,6).

La proteína S1 se ha utilizado tradicionalmente para la identificación de cepas por virus-neutralización (VN) e inhibición de la hemoaglutinación (HI); sin embargo éstas pruebas son lentas y poco específicas para el diagnóstico del VBI (4,5).

Las técnicas de biología molecular como RT-PCR (Transcriptasa Reversa - Reacción en Cadena de la Polimerasa) y RFLP (Polimorfismo en la Longitud de los Fragmentos de Restricción) permiten tener un diagnóstico más rápido y específico del VBI. El objetivo de este trabajo fue caracterizar molecularmente aislamientos del virus BI utilizando las pruebas RT-PCR-RFLP con la finalidad de conocer la prevalencia de cepas virales tradicionales y variantes en México.

MATERIALES Y MÉTODOS

Se utilizaron 141 aislamientos del VBI de casos clínicos de pollos y gallinas obtenidos de diferentes zonas de México.

El RNA fue obtenido y purificado a partir del líquido alantoideo utilizando el reactivo Trizol. El RNA fue utilizado como material diana en la prueba de RT-PCR donde se utilizaron secuencias de oligonucleótidos específicos para la amplificación de la región del gen que codifica para la proteína S1.

Los fragmentos amplificados fueron digeridos con tres enzimas de restricción *Bst*YI, *Hae* III y *Xcm*I que permiten identificar el polimorfismo de las diferentes cepas del VBI.

Los fragmentos digeridos fueron separados de acuerdo a su tamaño por electroforesis en geles de agarosa teñidos con bromuro de etidio. Los patrones

de digestión obtenidos se compararon entre si para determinar el tipo de VBI de los diferentes aislamientos.

RESULTADOS

De los 141 aislamientos de virus de BI, los resultados indican que 57 muestras corresponden al tipo Mass, 35 al tipo BL-56, 18 al tipo Conn, 17 al tipo Ark, 5 al tipo DS-57 y 4 a los tipos Mass-Conn.

- Entre 1998 y 2001, la mayor frecuencia de aislamiento (MFA) fue del tipo Mass, pero se detectaron los tipos Mass-Conn y DS-57.
- En el 2002 la MFA fue para Conn y Ark, detectándose también los tipos Mass y BL-56.
- Para 2003 la MFA fue para los tipos Mass, BL-56 y Ark, aunque también se detectaron los tipos Conn y Mass-Conn.
- Del 2004 y hasta el 2007 la MFA fue para los tipos Mass y BL-56, aunque también se detectaron los tipos Ark y DS-57, pero no los tipos Conn y Mass-Conn.

DISCUSIÓN

La caracterización molecular del VBI es una importante y práctica herramienta diagnóstica que factibiliza el seguimiento epidemiológico del VBI en campo. En nuestro país las cepas vacunales oficialmente autorizadas son tipo Mass y Conn. No obstante, en el laboratorio es común encontrar cepas antigénica y genéticamente diferentes.

Este trabajo es importante ya que proporciona información acerca de la variación genética y la prevalencia de las distintas cepas del VBI en México, misma que puede ser usada para tener más conocimiento sobre el comportamiento de los VBI, desarrollar nuevas vacunas y modificar los programas de vacunación en determinadas áreas geográficas y así proveer una mayor protección contra la enfermedad del VBI.

CONCLUSIÓN

Con base a los resultados obtenidos, se concluye que al menos desde 1998 en México ha predominado el serotipo Mass del VBI, que se han detectado los serotipos BL-56, DS-57 y el Mass-Conn de forma alterna, y que desde el 2002 y hasta la fecha se ha detectado el serotipo Ark. Así mismo, se concluye que a partir del 2004 ya no se ha detectado la presencia del serotipo Conn, misma que solo se había detectado en el 2002 y 2003.

REFERENCIAS

1. Bournsnel, M.E., T.D. Brown, I.J. Foulds, P.F. Green, F.M Tomley, and M.M. Binns. Completion of the sequence of the genome of the Coronavirus avian infectious bronchitis virus. *J. Gen Virol.* 68 (Pt 1): 57-77. 1987.
2. Calnek, B. W. Enfermedades de las Aves. *Ed Manual Moderno.* 1997.
3. Cavanagh, D., P.J. Davis, J. H. Darbyshire, and R.W. Peters. Coronavirus IBV: virus retaining spike glycopolypeptide S2 but not S1 is unable to induce virus-neutralizing or haemagglutination –inhibiting

antibody, or induce chicken tracheal protection. *J. Gen. Virol.* 67:1435-1442. 1986.

4. Darbyshire, J. H., J. G. Rowell, J.K.A. Cook, and R.W. Peter. Taxonomic studies on strains of avian infectious bronchitis virus using neutralization test in tracheal organ cultures. *Arch. Virol.* 61:227-238. 1979.

5. King, D.J., and S.R. Hopkins. Rapid serotyping of infectious bronchitis virus isolates with the hemagglutination-inhibition test. *Avian Dis.* 28:727-733. 1984.

6. Koch, G., A. Hartog, A. Kant, and D.J. Roozear. Antigenic domains on the peplomer protein of avian infectious bronchitis virus: Correlation with biological functions. *J. Gen Virol.* 71:1929-1935. 1990.

RE-EMERGENCE OF NEPHROPATHOGENIC INFECTIOUS BRONCHITIS IN THE U.S.?

RESURGIMIENTO DEL VIRUS NEFROPATÓGENO DE LA BRONQUITIS INFECCIOSA EN EE.UU.

Holly S. Sellers, Erich Linnemann, Guillermo Zavala, Susan Williams, and Mark Jackwood

Poultry Diagnostic & Research Center
College of Veterinary Medicine, The University of Georgia, Athens, GA, U.S.A. 30602

RESUMEN

Durante el verano de 2007 se diagnosticó bronquitis infecciosa nefropatogena en varias granjas. Presentaremos un informe de los hallazgos histológicos, el aislamiento y la caracterización de estos virus.

SUMMARY

Infectious bronchitis virus is most frequently associated with respiratory disease that can be characterized by sneezing, coughing, and nasal discharge. IBV typically affects chickens less than six weeks of age and affected flocks have high morbidity but low mortality. The majority of IBVs isolated in the U.S. are from clinical cases of respiratory disease. It is recognized that IBV isolates differ in virulence and tissue tropism. Nephropathogenic strains of IBV have been isolated from clinical cases of nephritis. Mortality associated with these viruses varies between 15-30%. Within the U.S., there have been sporadic outbreaks of nephritis associated with nephropathogenic IBV. The last U.S. outbreak occurred in Pennsylvania between the years 1998-2000.

During the early summer of 2007, clinical cases from four broiler farms in the southeastern U.S.

experiencing airsacculitis, septicemia, and severe flushing were submitted to the diagnostic laboratory. The affected broilers ranged in age from 38 to 43 days of age. Swollen kidneys were observed macroscopically at necropsy. Microscopic examination of the kidneys revealed moderate to severe lymphoplasmacytic interstitial nephritis along with acute multifocal tubular degeneration and necrosis. Coronavirus was amplified from the kidneys by RT-PCR. Infectious bronchitis virus was isolated from the kidneys in embryonated eggs from each farm. At least four blind passages in chicken embryos via the chorioallantoic sac were necessary before mortality or embryo lesions consistent with IBV were observed. Embryo lesions consisted primarily of stunting and kidney urates. Agglutination of chicken red blood cells by neuraminidase-treated allantoic fluid from affected embryos was not observed as it is with other respiratropic IBVs. IBV isolates were genotyped by RT-PCR and sequence analysis of a region within the spike glycoprotein 1 (S1). The isolates were closely related to each other at the nucleotide level (98%). When the public database was used for comparison, the closest match based on nucleotide analysis was to nephropathogenic strains of IBV (85%). One field isolate was selected for cross neutralization studies in

embryos against three current U.S. vaccine strains Mass, Conn, and ArkDPI. The field isolate was poorly neutralized by three of the primary vaccine strains used

in the U.S. The results suggest that the viruses associated with nephritis are genotypic and antigenic variants of IBV.

COMPARATIVO DEL EFECTO ANTIMICROBIANO *IN VITRO* DE DOS ANTIBIOTICOS, COMPUESTOS DE UNA COMBINACIÓN DE FOSFOMICINA Y TRIMETOPRIM, CONTRA UNA CEPA DE *ESCHERICHIA COLI*

COMPARISON OF THE *IN VITRO* ANTIMICROBIAL EFFECT OF TWO FOSFOMYCIN-TRIMETOPRIM COMBINATION PRODUCTS AGAINST ONE *E. COLI* STRAIN

Nancy Christy Santiago, Gerardo Castilla Aguilar, Daniel Marrufo Villa, Daniel Mendoza Avitia, y Ricardo Alejo Zarate

Investigación Aplicada S.A. de C.V. 7 Norte #416 Col. Centro. Tehuacan Puebla, México

SUMMARY

The *in vitro* antimicrobial effect of two fosfomycin (10%) + trimetoprim (2.5%) combination products against an *Escherichia coli* strain was compared by determining the minimum inhibitory concentrations (MIC) and the minimum bactericidal concentrations (MBC). Product A MIC was 0.0015 mg/mL fosfomycin and 0.00038 mg/mL trimetoprim, while product B MIC was 0.1308 mg/mL fosfomycin and 0.0292 mg/mL trimetoprim. Product A MBC was 0.0422 mg/mL fosfomycin and 0.0061 mg/mL trimetoprim. Product B MBC was 134 mg/mL fosfomycin and 30 mg/mL trimetoprim. Conclusion: in order to inhibit bacterial growth with product A, 87 X of product B would be needed. Product A was bactericidal and it was therapeutically effective at the recommended dose of 10 mg/kg. Product B was not bactericidal and it should be 4,000% cheaper than product A to obtain a similar effect.

RESUMEN

Se comparó el efecto antimicrobiano *in vitro* de dos antibióticos con una combinación de fosfomicina (10%) y trimetoprim (2.5%) contra una cepa de *E. coli*, utilizando pruebas de concentración mínima inhibitoria (CMI) y concentración mínima bactericida (CMB). La CMI para el producto "A" fue una dilución de 0.0015 mg/mL de fosfomicina y 0.00038 mg/mL de trimetoprim, para el "B" fueron 0.1308 mg/mL de fosfomicina y 0.0292 mg/mL de trimetoprim. La CMB del grupo "A" fue 0.0422 mg/mL de fosfomicina y 0.0061 mg/mL de trimetoprim, mientras el "B" requirió

134 mg/mL de fosfomicina y 30 mg/mL de trimetoprim. Concluimos que para lograr el efecto de inhibición del crecimiento de una dosis del antibiótico "A" necesitaría 87 dosis del "B", el producto "A" fue bactericida y efectivo a dosis terapéutica (10 mg/ Kg). El grupo "B" no fue bactericida y debería ser 4,000% mas barato que el "A" para tener un efecto similar.

INTRODUCCIÓN

Con frecuencia en las granjas se realizan prácticas terapéuticas que rompen con lo establecido en la aplicación de antimicrobianos contra diversos padecimientos que afectan las especies comercialmente explotables, pudiendo ser estas: La modificación de las dosis, la utilización en forma empírica de mezclas entre antibióticos y otras sustancias, además del empleo de fármacos no evaluados adecuadamente y muchas otras prácticas diversas; lo que propicia la formación de resistencias bacterianas. Lo anterior, además, disminuye la efectividad y el periodo de uso de los antibióticos, con la consecuente generación de cepas resistentes y la aparición de cuadros clínicos complicados (3).

Para evitar lo antes mencionado, es necesario hacer un uso racional y adecuado de los antimicrobianos utilizado actualmente dentro del proceso productivo pecuario (4).

Una herramienta importante para tomar la decisión de que tipo de antimicrobiano utilizar para el tratamiento de una parvada, es su evaluación mediante pruebas de laboratorio, con la finalidad de medir su eficacia y efectividad contra las diferentes bacterias

involucradas en los problemas de salud que aquejan las explotaciones avícolas.

Una de las pruebas de mayor confiabilidad para conocer el comportamiento de un antimicrobiano, lo constituyen la prueba de CMI y CMB (8,9).

MATERIAL Y MÉTODOS

Con la utilización de una asa bacteriológica se realizó la preparación del inoculo tomando una colonia representativa de la cepa antes mencionada y se incubo a 37°C durante 16 horas. Posteriormente con la pipeta se agrego a la micro placa cada uno de los antibióticos en los primeros dos pocillos, y también a los controles (positivo y negativo). En seguida se adicionó caldo de Mueller Hinton (caldo MH, CaCl y MgCl₂) a los pocillos, realizándose las diluciones logarítmicas seriadas hasta llegar al último pocillo.

Interpretación de los resultados: En caso de crecimiento hay turbidez o un botón formado por colonias del microorganismo, lo cual indica que el antibiótico no logro matar a la bacteria, comparándose con los controles (positivo y negativo).

Para la prueba de CMB se tomo con el asa de los pocillos una muestra de ellos en los que no se observó turbidez y se coloco en una placa de agar sangre fraccionada, incubándose a 37°C durante 24 horas. La interpretación se hace de la misma forma indicada para el procedimiento de la CMI.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

La CMI se interpreta como la menor concentración del antibiótico que pueda inhibir el crecimiento bacteriano. Para el caso de el antibiótico "A" solamente se necesitaron 0.0015mg/mL de fosfomicina y 0.00038mg/mL de trimetoprim para inhibir el crecimiento de *E. coli* y en el caso del Antibiótico "B" se requirieron 0.1308mg/mL de fosfomicina y 0.0292mg/mL de trimetoprim para inhibir el crecimiento de la misma bacteria.

La CMB se interpreta como la menor concentración del antibiótico que cause la muerte bacteriana. Para el caso de el antibiótico "A" únicamente se necesitaron 0.0422mg/mL de fosfomicina y 0.0061mg/mL de trimetoprim causar la muerte de *E. coli* y en el caso de Antibiótico "B" se necesitaron 134mg/mL de fosfomicina y 30mg/mL de trimetoprim para causar la muerte de *E.coli*.

Posiblemente los resultados obtenidos son diferentes entre los antibióticos utilizados (A y B) por

la calidad de los principios activos y de los vehículos, biodisponibilidad, dosis, potencia, etc.

CONCLUSIÓN

Una de las pruebas de mayor confiabilidad para conocer el comportamiento de un antimicrobiano, lo constituyen la prueba de CMI y CMB; basados en estas pruebas concluimos que para lograr el efecto de inhibición del crecimiento de una dosis del antibiótico "A" se necesitarían 87 dosis del "B", el producto "A" fue bactericida y efectivo a dosis terapéutica (10 mg/Kg). El grupo "B" no fue bactericida y debería ser 4,000% mas barato que el "A" para tener un efecto similar, lo cual seguramente repercute en el efecto producido en campo.

REFERENCIAS

1. Barnett, J.A., M. Paul, Southern Jr, P.L. James, and P.S. Jay. Efficacy of phosphomycin in treatment of urinary tract infections. *Antimicrob. Agents and Chemoth* 349-351. 1969.
2. Clark, H., N.K. Brown, J.F. Wallace, and M. Truck. Evaluation of phosphomycin, a new ceil wall-active antibiotic. *Antimicrob. Agents and Cbemoth* 338-342. 1969.
3. Colusi, D.A., E. Linares. Sinergismo *in vivo* e *in vitro* de la fosfomicina con otros antibioticos. *Memorias del XI Congreso Latinoamericano de Avicultura*; noviembre; Costa Rica. 1989: 98-103. 1989.
4. Gallego, A., J.M. Rubio. Fosfomycin: *in vitro* activity. *Chemother* 23: 23-24. 1979.
5. Hedlin, D.E., O. Stapley, M. Jackson, W. Wallick, A.K. Miller, F.J. Wolf, T.W. Miller, L. Chaiet, F.M. Kahan, E.L. Foltz, H.B. Woodruff, J.M. Mata, S. Hernandez, and S. Mochales. Phosphomycin, A new antibiotic produced by strains of *Streptomyces*. *Science* 66:122-123. 1969.
6. Kahan, F.M., S.K. Jean, J.C. Patrick, and H. Kropp. The mechanism of action of fosfomycin (phosphomycin). *An N.Y. Acad. Sc* 235: 364-386. 1974.
7. Stapley, E.O., D. Hedlin, J.M. Mata, M. Jackson, S. Wallick, S. Hernandez, S.A. Mochales, R.M. Miller, Phosphomycin Y. *Discovery and In vitro biological Characterization*. *Antimicrob. Agents and Chemotb* 284-290. 1969.
8. Victor, L.M.D. *Antibiotics in laboratory medicine*. 4^a de. EUA: Williams &Wilkins eds. 1996.

COMPARATIVO DE LA EFICACIA DE DOS ANTIBIOTICOS COMPUESTOS DE UNA COMBINACIÓN DE FOSFOMICINA Y TRIMETOPRIM, EN EL TRATAMIENTO DE UNA PARVADA DE POLLO DE ENGORDA EN LA PRIMER SEMANA DE EDAD

EFFICACY COMPARISON OF TWO FOSFOMYCIN-TRIMETOPRIM COMBINATION PRODUCTS ON FIRST WEEK BROILER PERFORMANCE

Gerardo Castilla Aguilar, Daniel Marrufo Villa, Daniel Mendoza Avitia,
Nancy Christy Santiago, y Ricardo Alejo Zarate.

Investigación Aplicada S.A. de C.V., 7 Norte No. 416 Col. Centro, Tehuacán Puebla, México.

SUMMARY

The preventive effect of two fosfomicin (10%) plus trimetoprim (2.5%) combination products against *Escherichia coli* was evaluated in a broiler farm. Two 200,000-bird groups were used. The dose rate was based on fosfomicin (10 mg/kg body weight) in the drinking water from 3 through 7 days of age. On day 7, birds were weighed and mortality rates were recorded. Body weights in groups A and B were 149g and 138g, and mortality rates were 1.4% and 1.8%, respectively, for 4% lower mortality and 11 g heavier body weight in group "A", with a statistically-significant difference. Conclusion: product A given in the first week of age resulted in lower mortality and increased weight gain.

RESUMEN

Se evaluó un tratamiento preventivo para *Escherichia coli* utilizando dos productos a base de fosfomicina (10%) mas trimetoprim (al 2.5%) en una granja de pollo de engorda; se utilizaron dos grupos de 200,000 aves cada uno. La dosificación fue en base a la Fosfomicina a 10 mg/kg de peso y suministrados en agua de bebida del día 3 al 7 de edad. Al séptimo día de edad se realizó el pesaje de las aves y se determinaron los porcentajes de mortalidad, obteniendo con el Producto "A" 149 g de peso y 1.4% de mortalidad y con el Producto "B" 138 g de peso y 1.8% de mortalidad. Se obtuvo un 4% menos de mortalidad y 11g mas de peso vivo con el Producto "A", observándose diferencia estadística significativa. Concluimos que el Producto "A" aplicado la primera semana de edad presentó un menor porcentaje de mortalidad y una mayor ganancia de peso.

INTRODUCCIÓN

La fosfomicina es un antibiótico de amplio espectro, que fue aislado por primera vez a partir de

cepas de *Streptomyces* sp. el cual se encuentra en el suelo y fue reportado en 1969 por Hedlin y col.(8), aunque también se puede obtener a partir de algunas cepas de *Pseudomonas* sp., como la *Pseudomonas syringae* (12). La fosfomicina es un antibiótico con acción bactericida que actúa inhibiendo la formación de pared celular en su primera etapa, a diferencia de los betalactámicos los cuales limitan su acción sobre la tercera etapa de la síntesis de la pared celular y de los aminoglucósidos los cuales inhiben la síntesis de proteínas de la bacteria (10).

La fosfomicina posee una gran actividad sobre gérmenes tales como: *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus* beta hemolítico, *Pseudomonas aeruginosa*, *Salmonella* spp, *Shigella* spp, *Proteus* spp., y *H. influenzae*. Una de sus propiedades más importantes es la de presentar sinergismo con antibióticos como el trimetoprim (4,5,7).

El trimetoprim pertenece al grupo de las diaminopirimidinas siendo el segundo compuesto sintetizado de esta familia, posee propiedades antibacterianas (14). La mayoría de las bacterias Gram (-) y Gram (+) son sensibles al trimetoprim, pero se desarrolla resistencia si se emplea solo, *Pseudomonas aeruginosa*, *Bacteroides fragilis* y los enterococos son resistentes. Existe una variación de la susceptibilidad al trimetoprim en las enterobacterias de diferentes regiones geográficas debido a la difusión de la resistencia mediada por plásmidos.

Las parvadas afectadas por infecciones bacterianas primarias u oportunistas requieren de una medicación adecuada, para evitar pérdidas económicas y obtener un mejor comportamiento productivo de las aves. Con frecuencia en las granjas se realizan prácticas terapéuticas que rompen con lo establecido en la aplicación de antimicrobianos como modificar las dosis, utilizar en forma empírica de mezclas de antibióticos y otras sustancias, además del empleo de fármacos no evaluados adecuadamente; lo que propicia

la formación de resistencias bacterianas, la aparición de cuadros clínicos complicados, disminuye la efectividad y el periodo de uso de los antibióticos.

La transmisión de bacterias al embrión es muy común por el manejo del huevo en granjas, mala calidad del huevo, prácticas de limpieza y desinfección inadecuadas en plantas incubadoras, son la causa de altas mortalidades en el pollito en la primera semana de vida principalmente por infección del saco vitelino, donde frecuentemente se aíslan cepas patógenas de *E. coli* en aves recién nacidas (1).

La colibacilosis es una enfermedad que actualmente sigue siendo un problema en la avicultura nacional y de muchos otros países, tiene varias presentaciones, en donde este microorganismo puede fungir como causante primario y en otras se encuentra en asociación con otros agentes infecciosos o estresantes. Existen diversos cuadros clínicos relacionados con la *Escherichia coli* tales como: colisepticemia, coligranuloma (enfermedad de Harre), enfermedad de sacos aéreos (enfermedad crónica respiratoria), celulitis aviar (procesos inflamatorios), Síndrome de cabeza hinchada, peritonitis, salpingitis, osteomielitis/sinovitis, panoflalmatitis y onfalitis/infección del saco vitelino (1,8).

OBJETIVO

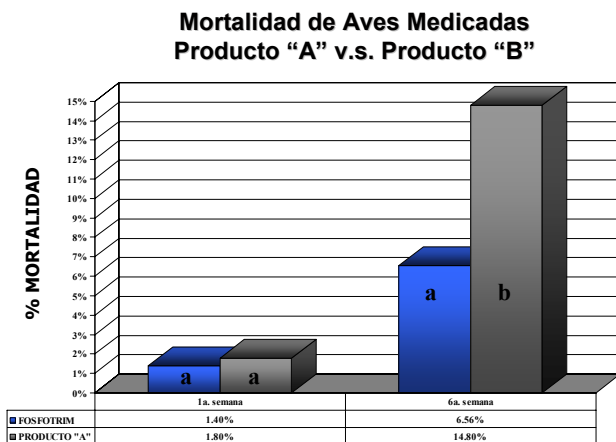
Se evaluó la eficacia de un tratamiento preventivo para problemas de *Escherichia coli* en la que se aplicaron dos productos comerciales a base de fosfomicina (10%) mas trimetoprim (al 2.5%), determinándolo en base al comportamiento de la mortalidad y pesos de la primera semana de edad

MATERIAL Y MÉTODOS

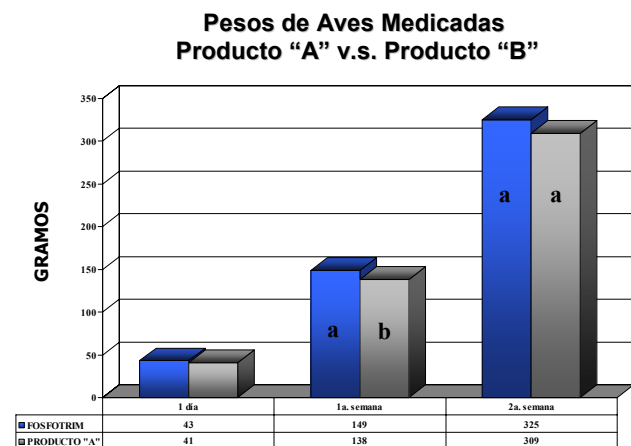
La prueba se realizo en una granja de pollo de engorda ubicada en el centro-occidente de México. En esta evaluación se utilizaron 12 casetas de 34,000 aves cada una, obtenidas de la misma fuente, las cuales fueron divididas en dos grupos quedando conformados por 204,00 pollos para cada tratamiento. En la granja se realizaron las prácticas de manejo, medidas de bioseguridad y alimentación que normalmente se llevan a cabo en la empresa. Los productos fueron dosificados en base a la fosfomicina a 10mg/kg de peso vivo y fueron aplicados en el agua de bebida del día 3 al día 7 de edad. Se realizó el seguimiento de los pesos corporales y los porcentajes de mortalidad a los 7 días de edad. Adicionalmente se obtuvo el peso a los 14 días y el porcentaje de mortalidad a las 6 semanas de edad de cada grupo, para conocer la diferencia del comportamiento de estos parámetros con la aplicación del producto "A" y del producto "B".

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Al séptimo día de edad se obtuvo un peso de 149g y un porcentaje de mortalidad de 1.4% con el Producto "A" y con el Producto "B" 138g de peso y 1.8% de mortalidad. A los 14 días se obtuvo un peso de 325g en el Producto "A" y 309g con el Producto "B" y el resultado de la mortalidad a las 6 semanas fue para el Producto "A" de 6.56% y en el Producto "B" de 14.80%. En el siguiente cuadro se ilustran los resultados en forma gráfica:



En base a los resultados de los parámetros medidos podemos señalar que con el Producto "A" se obtuvo una diferencia estadística significativa de un 4% menos de mortalidad y 11g mas en ganancia de



peso vivo a los 7 días de edad, con respecto al Producto "B". En referencia al pesaje a los 14 días las aves tratadas con el Producto "A" obtuvieron 16 gramos mas de ganancia de peso y con este mismo tratamiento

a las 6 semanas se pudo apreciar una diferencia de 8.24% de menor mortalidad con respecto al Producto "B".

Los resultados obtenidos con el Producto "A" pueden atribuirse a la calidad de las sales utilizadas, al tipo de principio activo, a una mayor distribución, biodisponibilidad y absorción, lo cual se refleja en una mejoría importante en el desarrollo corporal y en una menor mortalidad debido a la disminución de la carga bacteriana patógena presente en los pollos.

CONCLUSIONES

De esta evaluación se puede concluir que con el tratamiento del Producto "A" en la primera semana de edad se obtuvo un menor porcentaje de mortalidad y una mayor ganancia de peso que representa un ingreso económico superior por la mejora de estos parámetros.

El peso de las aves medicadas con el Producto "A" en la segunda semana fue superior al del Producto "B". Aunque a esta edad el peso aún no es determinante para obtener más kilos de carne al final del ciclo, es indicativo de pollos sanos y con un mejor desarrollo corporal.

Es importante verificar en granjas el comportamiento de los medicamentos del mercado, porque pueden ser más económicos pero al final no se logra un costo beneficio.

REFERENCIAS

1. Calnek, B.W., H.J. Barnes, C.W. Beard, W.M. Reid, and H.W. Yoder. (Eds). *Disease of Poultry*. 10nd ed. EUA: Iowa University Press. 1997.
2. Barnett J.A., M. Paul, Southern Jr, P.L. James, and P.S. Jay. Efficacy of fosfomycin en treatment of urinary trac infections. *Antimicrob. Agents and Chemoth* 349-351. 1969.
3. Clark, H., N.K. Brown, J.F. Wallace, and M. Truck. Evaluation of fosfomycin, a new ceil wall-active antibiotic. *Antimicrob.Agents and Cbemoth* 338-342. 1969.

4. Colusi, D.A., Linares E. Sinergismo "*in vivo* e *in vitro* de la fosfomicina con otros antibioticos. *Memorias del XI Congreso Latinoamericano de Avicultura*; 1989 noviembre; Costa Rica.: 98-103. 1989.

5. Dulaney, E.L. and A.J. Carol. Synergy between Fosfomycin and Arenaemmycin. *J.Antibiotics* 41:982-983. 1988.

6. Victor, L.M.D. *Antibiotics in laboratory medicine*. 4ª de. EUA: Williams &Wilkins eds., 1996.

7. Gallego A. and J.M. Rubio. Fosfomycin: *in vitro* activity. *Chemother* 23: 23-24. 1979.

8. Hedlin D.E., O. Stapley, M. Jackson, W. Wallick, A.K. Miller, F.J. Wolf, T.W. Miller, L. Chalet, F.M. Kahan, E.L. Foltz, H.B. Woodruff, J.M. Mata, S. Hernandez, and S. Mochales. Phosphono mycin, A new antibiotic produced by strains of *Streptomyces*. *Science* 66:122-123. 1969.

9. Holloway, W.J., C. Janet, and R. Rosemary. Preliminary Clinical trials with fosfonomycin. *Antimicrob. Agents and Chemoth* 327-331. 1969.

10. Kahan F.M., S.K. Jean, J.C. Patrick, and H. Kropp. The mechanism of action of fosfomycin (phosphonomycin). *An N.Y. Acad. Sc* 235: 364-386. 1974.

11. Rios, C.F. Comunicación Personal. 1998.

12. Shoji, J., K. Toshivuki, H. Hino, T. Hattori, K. Hirooka, K. Matsumoto, T. Tanimoto, and E. Kondo. Production of Fosfomycin (phosphonomycin) by *Pseudomonas Syringae*. *J. Antibiotics* 39:1011-1012. 1986.

13. Stapley, E.O., D. Hedlin, J.M. Mata, M. Jackson, S. Wallick, S. Hernandez, S.A. Mochales, and R.M. Miller. Phosphonomycin Y. Discovery and *in vitro* biological Characterization. *Antimicrob. Agents and Chemotb* 284-290. 1969.

14. Goodman, G.A., W. Theodore, M.S. Rail, and P.T. Nies. *The Pharmacological basis of therapeutics*. 8ª ed. EUA: Pergamon Press Inc. 1990.

15. Yogaratan, V. Analysis of the causes of high rates of carcass rejection at a poultry processing plant. *Vet.Rec.* 137:215-217. 1995.

CONTROL OF NECROTIC ENTERITIS IN COMMERCIAL BROILERS

CONTROL DE LA ENTERITIS NECRÓTICA EN POLLOS DE ENGORDA COMERCIALES

Mueez Ahmad^A and Daniel Karunakaran^B

^ADraper Valley Farms, Mt Vernon, WA

^BAgtech Products, Inc., Waukesha, WI

RESUMEN

La enteritis necrótica es una importante enfermedad del pollo de engorda, causante de severas pérdidas económicas. Cada vez más los clientes exigen la producción de pollos sin antibióticos. Avicorr es un aditivo alimenticio elaborado con bacilos, que representa una opción viable para el control de la enteritis necrótica en los pollos productores de carne. Presentaremos los resultados de pruebas de campo y de laboratorio.

DISCUSSION

Commercial broilers have become more vulnerable to necrotic enteritis caused by *Clostridium* spp. Several production systems experience this challenge from time to time. The causative agents are natural habitants of the gastrointestinal tract (GIT). Necrotic enteritis is caused by these organisms when the opportunity is right for them to produce the toxins to result in mucosal damage.

In an attempt to control this challenge, the use of feed grade antibiotics has become widespread at both therapeutic and sub-therapeutic levels. However, partly as a result of various public health scares associated with the antibiotic resistant microorganisms, there is increasing consumer pressure to reduce the use of antibiotics in feed. This has logically led to an increased interest in other methods of enhancing poultry performance and helping the bird to withstand disease. Hence, biotechnology companies are increasing the investment of time and money to look at alternatives to maintain growth and performance in farm livestock. Several biotechnology companies have invested significant resources to focus on using scientifically selected microorganism for application into the poultry industry to control diseases. One such intervention is using the body's natural defense mechanisms referred to as "colonization resistance" by Van der Waaij *et al.*, (1). This is in reference to the existence of a population of non-pathogenic bacteria which are normally and naturally present within the

GIT of all domestic animals and birds. There is a delicate balance of beneficial and pathogenic bacteria in the GIT with many symbiotic and competitive interactions occurring between them (2). Several mechanisms by which the normal microbial population provides host protection have been proposed. These include: the production of substances such as volatile fatty acids, which inhibit multiplication of non-indigenous organisms, competition with non-indigenous organisms for nutrients present in limited supply, and competition with non-indigenous organisms for available tissue attachment sites (3). Stimulation of the host immune system and production of antimicrobial factors are also proposed mechanisms. There may be multiple means to impact this gut microbial environment. One method is by the continuous addition of a bacterial culture to the feed. This is done as a way to prevent colonization by potentially pathogenic microorganisms while also enhancing the host's immune system.

Clostridium spp. is typically one of the most ubiquitous microorganisms in poultry production systems. As anaerobic bacteria, *Clostridium perfringens* and *Clostridium septicum* continue to become more prevalent in commercial poultry production. To control clostridial diseases, it is increasingly evident that one needs to better understand the gut microorganisms involved in the GIT that maintain the balance between beneficial flora and pathogens. Clostridial spores are typically found in high numbers in both the litter and the GIT of poultry. These organisms are capable of producing an array of extra-cellular enzymes and toxins that degrade host tissues. Many different antimicrobials are currently used in poultry production to promote bird growth or to treat diseases caused by microorganisms. Three of the more common drugs fed at sub-therapeutic doses for growth promotants are bacitracin, flavomycin, and virginiamycin. Other drugs, penicillin and either chlortetracycline or oxytetracycline, are often administered to control clostridial disease breaks. Penicillin has proven to be the most effective antibiotic tested at

inhibiting the growth of *Clostridium* spp. *in vitro*. This was not a surprise as it continues to be the on-farm drug of choice for the control of clostridial outbreaks today.

Over the last several years researchers have worked extensively to better understand the microorganisms involved in clostridial diseases of poultry (5). This work has revealed an incredible amount of genetic diversity within the species of *Clostridium perfringens*. This organism is often present in high numbers in the GIT of birds experiencing necrotic enteritis. Interestingly, this work also suggests that multiple strains of each species are often involved. Although *C. perfringens* and *C. septicum* have been the most commonly observed toxigenic clostridia, other species such as *C. cadaveris*, *C. sordellii* and *C. tertium* have been identified as well. A better understanding of these organisms and the diseases they cause is a prerequisite for the development of new intervention strategies to control these diseases.

Controlling gut health including coccidiosis is important to gain a good handle on necrotic enteritis.

Results of several intervention strategies from a commercial broiler company will be discussed

REFERENCES

1. Vander, Waaij, *et al.* Colonization Resistance of the Digestive Tract in conventional and antibiotic treated mice. *J. Hyg.* 69, 405-411. 1971.
2. Ewing, W.N. and D.J.A. Cole. The Living Gut. Context. Dungannon, Ireland.
3. Hentges, D.J. The protective function of the indigenous intestinal flora. *Pediatr. Infect. Dis.* 5, S17-S20. 1986.
4. Breves, G., C. Winckler, and R. Leister. Untersuchungen im Gastrointestinalen Wirksamkeit von Probiotika beim Schwein. In *Aktuelle Themen der Tierernaehrung*, 83-86. 1997.
5. Neumann, T, D. Ritter, S. Dunham, J. Skalecki, and T. Rehberger. Characterization of *Clostridium* from broiler farms experiencing recurrent outbreaks of gangrenous dermatitis. Abstract # T51. Poultry Science Association 95th Annual Meeting, 2006.

EFFICACY OF MICROENCAPSULATED INOVAPURE®222 ON THE CONTROL OF CLOSTRIDIAL NECROTIC ENTERITIS IN BROILER CHICKENS

EFICACIA DE INOVAPURE®222 MICROENCAPSULADA EN EL CONTROL DE LA ENTERITIS NECRÓTICA CLOSTRIDIANA EN POLLO DE ENGORDA

Guopeng Zhang, Greg F. Mathis, Stephen R. Smith, and Stewart J. Ritchie

RESUMEN

Clostridium perfringens tipo A causa las formas clínica y subclínica de la enteritis necrótica en las aves domésticas (1). Se descubrió que la lisozima inhibe tanto a *Clostridium perfringens* tipo A como a la producción de su toxina α (2). Se encontró que el microencapsulamiento protege la actividad de la lisozima durante el proceso de peleteado del alimento. Se realizó un estudio bajo condiciones similares a las que prevalecen en la industria avícola estadounidense, utilizando un modelo de desafío bien desarrollado de enteritis necrótica. Parece que Inovapure®222 es casi tan efectivo como el antibiótico promotor del crecimiento virginiamicina en la prevención de los casos clínicos y subclínicos causados por *C. perfringens*. Los tratamientos con Inovapure redujeron significativamente la calificación de lesiones y la mortalidad causada por este germen, en comparación con el grupo testigo desafiado y no medicado.

SUMMARY

Clostridium perfringens type A causes both clinical and subclinical forms of necrotic enteritis in domestic avian species (1). Lysozyme was found to inhibit *Clostridium perfringens* (CP) type A and its α -toxin production (2). Microencapsulation was found to protect lysozyme's activity during the feed pelleting process. A floor pen study that approximates U.S. poultry industry standards was carried out using a well-developed necrotic enteritis (NE) challenge model. Inovapure®222 appears to be nearly as effective as the antibiotic growth promotant virginiamycin in preventing both clinical and subclinical effects of *C. perfringens*. The Inovapure treatments significantly reduced the lesion score and NE mortality rate and they were significantly better than the challenged, non-medicated control.

MANAGING GASTROINTESTINAL HEALTH AND GANGRENOUS DERMATITIS

MANEJO DE LA SALUD GASTROINTESTINAL Y LA DERMATITIS GANGRENOSA

M. A. Quiroz, J. Dibner, and C. Knight

Novus International, Inc. 20 Research Park Dr., St. Charles, MO 63304 USA
marco.quiroz@novusint.com

RESUMEN

La dermatitis gangrenosa es una infección clostridiana del pollo de engorda que causa alta mortalidad y lesiones de necrosis en la piel y los músculos subyacentes. La vía de la infección puede ser la ruptura de la función de barrera que tiene el intestino, lo que permite la distribución sistémica de *C. perfringens* y/o *C. septicum*, con la subsiguiente producción de la toxina α . Un enfoque para tomar la iniciativa de controlar el riesgo de que ocurra dermatitis gangrenosa es modificar el ambiente del intestino delgado y su microflora, para que el ave sea menos susceptible al crecimiento clostridiano exagerado. Los miembros de este género bacteriano se pueden manipular mediante cambios en la dieta y la modificación de las poblaciones microbianas del intestino se asocia con una menor producción de toxinas y menor patología. Por el contrario, es evidente que si no logramos manejar el ambiente intestinal asegurando la administración de ingredientes alimenticios altamente digestibles y de buena calidad, protegidos adecuadamente contra la degradación y el crecimiento microbiano, esto puede favorecer la proliferación de *Clostridium* y aumentar el riesgo de que ocurra alta mortalidad en los pollos de engorda que, de lo contrario, estarían sanos.

SUMMARY

Gangrenous dermatitis (cellulitis), recently associated with high mortality in market-age turkeys, is a clostridial infection that results in necrotizing lesions of skin and underlying muscle. The route of infection may include a breakdown in the barrier function of the gut, resulting in systemic distribution of *C. perfringens* and/or *C. septicum*. The organisms can then multiply and produce α -toxin in an environment rich in free amino acids such as in damaged muscle or skin. One approach to proactively controlling gangrenous dermatitis (GD) risk is to modify the small intestinal environment and its microflora to be less susceptible to clostridial overgrowth. Data presented demonstrate that clostridia numbers can be manipulated through changes in the diet and that changing the gut microbial

populations is associated with reduced toxin production and reduced pathology. Conversely, it is evident that a failure to manage the gut environment by ensuring highly digestible, good quality feed ingredients that are properly protected against degradation and microbial growth can favor clostridial proliferation and the risk of high mortality in otherwise healthy market-age turkeys.

INTRODUCTION

The poultry industry has experienced an increase in the incidence of anaerobic clostridial cellulitis over the last decade, which can be a significant source of mortality in otherwise healthy market-age turkeys (3). The disease, also called gangrenous dermatitis (31), occurs in chickens and turkeys and primarily affects the skin and muscle of the abdomen and thorax, although necrosis in the wings and tail head area is often seen. The lesion is necrotic and usually hemorrhagic, with darkened skin overlying a thick serous exudate containing a significant amount of gas. Frequently the underlying muscle is also affected and can be discolored and necrotic. Often the disease occurs without warning with increased mortality as the initial event (25).

The causative agents include clostridia, an anaerobic, spore-forming Gram-positive rod. The species most commonly isolated include *C. perfringens* type A and *C. septicum*, although other clostridial species are often found (25). The genetic diversity of *C. perfringens* isolates from GD lesions is quite substantial (18), suggesting that the organism is highly adaptable, perhaps in association with stationary phase evolution in the ceca of normal hosts (10,33, Zinser and Kolter, 2004). Other bacterial species such as *E. coli* and *S. aureus* may also be isolated from lesions and may contribute to the severity of the disease (31). In a recent study, Rehgerber *et al.*, (24) reported isolation of *C. perfringens* or *C. septicum*, or both, from skin and muscle lesions of 19 out of 20 broilers exhibiting symptoms associated with GD. Experimentally, GD has been reproduced in turkeys by the intramuscular inoculation of *C. septicum* (28).

This is not a new disease, as it was originally reported in 1930 (19); however, historical interventions

based on disinfection, litter management, and prevention of immunosuppression seem to be less effective than previously observed (25). Nevertheless, a recent report reveals that immunosuppression remains a significant risk factor for GD in broilers (13). Recent *C. perfringens* isolates from cases of anaerobic cellulitis in market-age turkeys indicate that they continue to remain sensitive to penicillin, the treatment of choice to control a clinical outbreak (18). The same authors report that there is some indication that the organism is developing resistance to monensin.

The absence of skin damage in birds exhibiting GD has led to some uncertainty about the route of infection. As discussed by Ritter (25), there is evidence to support both “outside-in” and “inside-out” routes of infection. In the former case, organisms gain entry to the body from the environment. Since clostridia are normally found in poultry litter, they are a constant threat and can enter through any breach in the integument and cause disease locally. In the latter case, clostridia in the gut microflora become systemic in association with a failure in gut epithelial integrity. Intravenous injections of a mix of *C. perfringens* and *C. septicum* cause the disease, confirming the hypothesis that GD can result from a release of these organisms into the systemic blood, i.e. the “inside-out” route of infection (25). Once systemic, the organism may then cause disease in a number of locations, but is particularly prone to subcutaneous sites with nearby damaged muscle tissue. Efforts to generate a reproducible animal model for GD research are ongoing in several locations and include oral delivery as one route of infection. The possibility that clostridia responsible for GD can originate from the gut suggests the strategy of reducing risk by manipulation of the gut environment and the resident microflora, a subject recently reviewed by Collett (6).

Gut *C. perfringens*, especially in association with enteritis, can also cause necrotic enteritis (NE), a rapidly fatal disease in poultry, with lesions usually confined to the jejunum and ileum (32). The mechanism responsible for the ability of the same organism to cause NE in some flocks and GD in other flocks has been discussed by Ritter (25) and may include such factors as antibiotic growth promotant use and the coccidial control program. Like GD, the pathology of NE is associated with the bacterial toxin and its ability to hydrolyze cell membranes (29). For this reason, model systems of NE can yield some information that likely applies to GD.

ROLE OF NUTRITION

Perhaps the central risk factor for GD and NE is the presence in the animal of clostridia in active proliferation. The production of α -toxin takes place during vegetative growth of the organism in an anaerobic, amino acid-rich medium (16). Although

clostridia are normally found in the gut microflora of poultry, they are most common in the lower gut, particularly in the ceca, where low nutrient concentration controls their rate of growth (2, 29). However, the equilibrium of the microbiota is dynamic, responding to many environmental factors, including nutrition (5,6,23).

Nutrient availability in the lumen of the ileum can be increased in a number of ways. First, feeding poorly digestible feed ingredients can increase the presence of undigested protein in the lower gut. Second, the concentration of amino acids and other nutrients can be increased during periods of rapid feed passage due to disease, stress or other factors. In addition, water soluble non-starch polysaccharides may increase digesta viscosity, adversely affecting digestibility (4). Finally, the presence of free Zn can be increased by supplementation using inorganic Zn salts. A chelated form of Zn is more stable in the gut environment and less likely to dissociate and ionize in the lumen (8). If the α -toxin of *C. perfringens* is secreted in a Zn-free environment it is almost immediately degraded (16).

Since retrograde peristalsis is essentially continuous in poultry (1,9,26), clostridia can be carried from the colon or cecum into the ileum at any time and enter a more rapid rate of growth in response to the nutrients available there. One factor that prevents this from occurring under normal circumstances is the presence of an acid-tolerant gut microflora in the ileum. This keeps the pH below neutral which reduces the likelihood of dominance by the acid intolerant species such as clostridia. However, subclinical coccidiosis or enteritis can disrupt the normal microbiota, raising the pH and increasing the rate of mucin production by goblet cells, which would favor an overgrowth of clostridia (5,6). Thus, the causative organism for GD can exist in a range of concentrations and locations within the animal's digestive system.

The association of dietary glycine supplementation with *C. perfringens* numbers and location, α -toxin production and gut lesion scores has recently been reported (7). In this research, dietary glycine ranged from 0.5 to 4.21% in a series of studies evaluating its effect on gut microbial populations, toxin production and NE lesions.

The gut environment and its resident microflora can also be modified using organic acids either in the feed or in the water. It is possible that providing an exogenous source of acid could be a factor discouraging overgrowth of clostridia in the small intestine, but it may also simply favor the establishment and maintenance of the normal acid tolerant microbial flora present in the crop, gizzard, and upper small intestine. The effect of providing antimicrobial organic acids on necrotic enteritis incidence and severity has been reported by Hofacre (14). The model system combined coccidial (day 14) and clostridial (days 18, 19 and 20) challenge to

generate NE in broilers. In this experiment, treatments consisted of unchallenged birds, challenged birds, birds challenged but treated with BMD, and birds challenged but treated with an organic acid blend (ACTIVATE[®] WD). Post-challenge lesion scores for the control birds were significantly better than for any of the challenge treatments.

Among the challenged treatments, the organic acid blend gave performance significantly better than the untreated birds and numerically superior to the antibiotic treatment. The possibility that this effect might be associated with a shift in gut environment that favors lactobacilli over clostridia is a subject for further research.

[®]ACTIVATE is a trademark of Novus International, Inc. and is registered in the United States and other countries.

REFERENCES

1. Akester, A. R. Anderson, K. Hill, and G. Osbaldiston. A radiographic study of urine flow in the domestic fowl. *Brit. J. Nutr.* 8:209-212. 1967.
2. Bjornhag, D. and I. Transport of various food components through the digestive tract of turkeys, geese and guinea fowl. *Swedish J Agric. Res.* 7:57-66. Sperber. 1977.
3. Carr, D., D. Shaw, D. Halvorson, B. Rings, and D. Roepke. Excessive mortality in market-age turkeys associated with cellulitis. *Avian Diseases* 40:736-741. 1996.
4. Choct, M. and G. Annison. The inhibition of nutrient digestion by wheat pentosans. *Brit. J. Nutr.* 67:123-132. 1992.
5. Collett, S. 2005. Strategies for improving gut health in commercial operations. Pages 395-435. In: *Poultry Beyond 2010: 3rd International Poultry Broiler Nutritionist's Conference.* Auckland, New Zealand. April 3-8, 2005.
6. Collett, S. 2007. Strategies to manage wet litter. 134-144. In: *Aust. Poult. Sci. Symp.*, Sydney, Australia, February 12-14, 2007.
7. Dahiya, J., D. Hoehler, D. Wilkie, A. van Kessel, and M. Drew. Dietary glycine concentration affects intestinal *Clostridium perfringens* and Lactobacilli populations in broiler chickens. *Poult. Sci.* 84:1875-1885. 2005.
8. Dibner, J. and J. Richards. Antibiotic growth promoters in agriculture: History and mode of action. *Poult. Sci.* 84:634-643. 2005.
9. Duke, G. Gastrointestinal motility and its regulation. *Poult. Sci.* 61:1245-1256. 1982.
10. Finkel, S. and R. Kolter. Evolution of microbial diversity during prolonged starvation. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 96:4023-4027. 1999.
12. Grossman, I., D. Heitkamp, and B. Sacktor. Morphologic and biochemical effects of *Clostridium perfringens* alpha-toxin on intact and isolated skeletal muscle mitochondria. *Am. J. Pathol.* 50:77-88. 1967.
13. Hoerr, F. 2007. Case reports from Alabama. Pages 1-3. In: *56th Western Poultry Disease Conference, Las Vegas, Nevada, March 26-29, 2007.*
14. Hofacre, C. Natural alternatives to prevent necrotic enteritis. *International Poultry Production* 13:7-9. 2005.
15. Kennedy, C., E. Krejany, L. Young, J. O'Connor, M. Awad, R. Boyd, J. Emmins, D. Lyras, and J. Rood. The alpha-toxin of *Costridium septicum* is essential for virulence. *Mol. Microbiol.* 57:1357-1366. 2005.
16. Murata, R., A. Yamamoto, and H. Sato. Factors influencing the production of alpha-toxin (phospholipase C) by *Clostridium perfringens*. Pages 385-398. In: *Animal, Plant, and Microbial Toxins.* Ohsaka, A., K. Hayashi and Y. Sawai, (Eds.). Plenum Press, New York. 1975.
17. Nakamura, M., M. Cook, and W. Cross. Lecithinase production by *Clostridium perfringens* in chemically defined media. *Appl. Microbiol.* 16:1420-1421. 1978.
18. Neumann, T., J. Skalecki, D. Karanadarun, and T. Rehberger. 2007. Examining the diversity and antimicrobial susceptibility of *Clostridium perfringens* associated with anaerobic cellulitis in market-age turkeys. 136-139. In: *56th Western Poultry Disease Conference, Las Vegas, Nevada, March 26-29, 2007.*
19. Niemann, K. *Clostridium welchii* infection in the domesticated fowl. *J Am Vet Med Assoc* 77:604-606. 1930.
20. Norton, R., S. Bilgili, and B. McMurtrey. A reproducible model for the induction of avian cellulitis in broiler chickens. *Avian Diseases* 41:422-428. 1997.
21. Norton, R., K. Macklin, and B. McMurtrey. Evaluation of scratches as an essential element in the development of avian cellulitis in broiler chickens. *Avian Diseases* 43:320-325. 1999.
22. Olkowski, A., C. Wojnarowicz, M. Chirino-Trejo, B. Wurtz, and L. Kumor. The role of first line of defense mechanisms in the pathogenesis of cellulitis in broiler chickens: Skin structural, physiological and cellular response factors. *J Vet Med* 52:517-524. 2005.
23. Oviedo-Rondon, E., P. Ferket, and A. Santos Jr. 2006. The role of nutrition in the cause and prevention of gastrointestinal perturbation. 1-24. In: *ACPV Workshop "Enteric diseases of poultry: The evolving challenges and new developments"*, Sacramento, CA, March 5, 2006.
24. Rehberger, T., T. Neumann, K. Bos, G. Ritter, and S. Dunham. 2006. Isolation and characterization of the *Clostridium* and gastrointestinal communities in broilers with gangrenous dermatitis. Pages 66-77. In:

41st National Meeting on Poultry Health and Processing, Ocean City, MD, Oct. 9-11, 2006.

25. Ritter, G. 2006. Proposed pathogenesis of gangrenous dermatitis in chickens and attempts at experimental reproduction. 59-66. In: 41st National Meeting on Poultry Health and Processing, Ocean City, MD, Oct 9-11, 2006.

26. Sacranie, A., P. Iji, L. Mikkelsen, and M. Choct. Occurrence of reverse peristalsis in broiler chickens. 161-164. In: Aust. Poult. Sci. Symp., Sydney, Australia. 2007.

27. Sakurai, J., M. Nagahama, and M. Oda. *Clostridium perfringens* alpha-toxin: Characterization and mode of action. J. Biochem. 136:569-574. 2004.

28. Saunders, J. and A. Bickford. Clostridial infections of growing chickens. Avian Diseases 9:317-326. 1965.

29. Stevens, D. and J. Rood. Histotoxic Clostridia. Pages 563-572. In. Gram-Positive

Pathogens. Fischetti, V., R. Novick, J. Ferretti, D. Portnoy and J. Rood, (Eds.). ASM Press, Washington, DC. 2000.

30. Vaillancourt, J.P. and H. Barnes. Coliform cellulitis (inflammatory process). Pages 652-656. In. Diseases of Poultry. Saif, Y., (Ed.). Iowa State Press, Ames, Iowa. 2003.

31. Wages, D. and K. Opengart. Gangrenous dermatitis. Pages 791-795. In. Diseases of poultry. Saif, Y., (Ed.). Iowa State Press, Ames, Iowa. 2003a.

32. Wages, D. and K. Opengart. Necrotic enteritis. Pages 781-784. In. Diseases of Poultry. Saif, Y., (Ed.). Iowa State Press, Ames, Iowa. 2003b.

33. Zambrano, M., D. Siegele, M. Almiron, A. Tormo, and R. Kolter. Microbial competition: *Escherichia coli* mutants that take over stationary phase cultures. Science 259:1757-1760. 1993.

CELLULITIS IN TURKEYS: A PRIMARY CLOSTRIDIAL DISEASE

CELULITIS EN PAVOS: UNA ENFERMEDAD CLOSTRIDIANA PRIMARIA

Anil J. Thachil^A, Brian McComb^B, David A. Halvorson^A, and Kakambi V. Nagaraja^A

^ADepartment of Veterinary and Biomedical Sciences, University of Minnesota, 1971 Commonwealth Ave, St. Paul, MN, USA

^BJennie-O Turkey Store, Willmar, MN, USA

RESUMEN

En pavos la celulitis se ha identificado como una enfermedad infecciosa emergente que causa pérdidas económicas significativas para la meleagricultura. Actualmente se le está diagnosticando en Minnesota, Wisconsin, Missouri, Virginia y otras áreas de esta especialidad en EE. UU. Se han reportado mortalidades hasta del 1 a 2% por semana en las parvadas afectadas. Se ha observado que la celulitis es más común en aves adultas de 7 a 8 semanas de edad y las lesiones se han observado en varias partes del cuerpo, incluyendo la pechuga, el abdomen, las piernas, los muslos, las ingles y el dorso. A menudo, la palpación de las áreas afectadas revela la presencia de burbujas de gas en el tejido subcutáneo y en la musculatura. A la necropsia se observa acumulación de líquido serosanguinolento con burbujas en el subcutis. Los principales agentes infecciosos aislados a partir de estas lesiones son *Clostridium perfringens* y *Clostridium septicum*. El objetivo de nuestro estudio fue investigar el papel de estos dos gérmenes en la celulitis del pavo y desarrollar las medidas preventivas contra la enfermedad usando un toxoide experimental. Después de la reproducción

experimental de la enfermedad en pavos con estas bacterias, se desarrolló una vacuna clostridiana polivalente, encontrando que es altamente segura y que protege muy bien a las aves bajo nuestros modelos de desafío experimental y en condiciones de laboratorio. Las pruebas de campo de esta vacuna también han determinado que es promisorias y han establecido el papel de las bacterias de este género en el desarrollo de celulitis y en la producción de mortalidad en pavos adultos.

SUMMARY

In turkeys, cellulitis has been identified as an emerging infectious disease causing a significant economic loss for turkey producers. Currently, cellulitis in turkeys is being diagnosed in Minnesota, Wisconsin, Missouri, Virginia and other turkey producing areas in USA. The mortality is reported to be as high as 1-2% per week in the affected flocks. Cellulitis is found to be more common in adult birds of 7-8 weeks of age and the lesions have been seen in various parts of the body, including: the breast,

abdomen, legs, thighs, groin, and the back of the bird. Palpation of the affected areas often reveals gas bubbles in the subcutis and musculature. At necropsy, there is an accumulation of bubbly, serosanguinous fluid in the subcutis. The major infectious agents isolated from the lesions are *Clostridium perfringens* and *Clostridium septicum*. The objective of our study was to investigate the role of *Clostridium perfringens* and *Clostridium septicum* in cellulitis in turkeys and to develop preventive measures against the disease using an experimental toxoid. After post experimental

reproduction of cellulitis in turkeys with clostridial agents a polyvalent clostridial vaccine was developed. It was found to be highly safe and protective in our experimental challenge models under laboratory conditions. The field testing of the vaccine is also found to be promising and establishes the role of clostridia in the development of cellulitis and mortality in adult turkeys.

(The full-length article will be published in *Avian Diseases*.)

INTERACTIVE PROBLEM SOLVING OF FIELD CASES INVOLVING COMMERCIAL POULTRY, AN AUDIENCE PARTICIPATION PRESENTATION

SOLUCIÓN INTERACTIVA DE PROBLEMAS DE CAMPO DE LA AVICULTURA COMERCIAL DEL OCCIDENTE DE ESTADOS UNIDOS Y CANADÁ, CON LA PARTICIPACIÓN DE LOS ASISTENTES

Mark C. Bland

Cutler Associates, Napa California
California Animal Health and Food Safety Laboratory, Turlock, California

RESUMEN

Compartiré con el público una serie de casos de campo interesantes, proporcionándoles los antecedentes de cada caso y solicitando la participación de los asistentes a la reunión conjunta ANECA–WPDC. Trataremos de formular un plan para identificar la causa y resolver el problema, ya sea mediante el diagnóstico adecuado, el tratamiento o los cambios necesarios de manejo para mitigar el problema.

SUMMARY

My plan is to share with you the WPDC/ANECA audience a number of interesting field cases involving small commercial poultry operations where background information will be provided regarding each case and with WPDC/ANECA participation, we will try and formulate a plan to find the cause and resolve the issue at hand be it through proper diagnosis, treatment or through necessary management changes to mitigate the problem. This is to be an interactive presentation by both the speaker and the audience. Space is provided for you to write down your answers and comments for the presentation.

CASE DISCUSSIONS

Case 1: Broiler breeders experiencing a sudden drop in egg production.

History: A 45-week-old specialty broiler breeder flock of 300 experienced a drop in egg production from 59 % to less than 5 % over a two-week period of time. A 45-week-old Silkie breeder flock, which was housed in an adjacent building, was at that time laying 63 % with no apparent drop or decrease in egg production. The flock is raised on litter in an environmentally controlled building. Laying house is equipped with

nipple drinkers and manual hanging circular feeders. The owner will need fertile eggs from this flock to reproduce next year's breeder flock(s) and therefore depopulation and replacement are not options.

- a) What are your possible diagnoses?
- b) What additional questions would you ask the producer in an attempt to get a clearer picture of the situation?

- c) What samples, procedures, and tests would you submit?
- d) What is your tentative diagnosis based on the answers provided to your questions during the presentation?
- e) How will you prove your answer?
- f) What procedures would you suggest to the grower to get the flock back into production.
- d) What is your tentative diagnosis based on the answers provided to your questions during the presentation?
- e) What do you recommend to the producer to “treat” the flock?
- f) What if any will be the down side of the treatment you recommend?
- g) What is the take home message for the veterinarian and the producer?

Case 2: A 30 week-old flock of Hy-line W-36’s is experiencing an increase in mortality from 0.05% to 0.1% per week in six weeks.

Mortality peaks at 1.6 % per week at 37 weeks of age. The flock in question is housed on a multiage in-line complex with 8 other flocks. Each flock has approximately 110 - 150,000 hens. Egg production has maintained throughout the 6-week period at 86 – 88 %. Both external and internal eggshell quality does not appear to be affected. Morbidity is about 20 %. Producer states that the affected birds appear to die suddenly and you can hear “gasping squeals” throughout the house. A quick field necropsy of 4 birds showed that the tracheas were reddened and all four birds had a yellowish plug in the larynx. Two more flocks are starting to show a similar picture with increasing mortality up to 0.5 % per week with no real affect on egg production.

- a) What are your possible diagnoses?
- b) What additional questions would you ask the producer in an attempt to get a clearer picture of the situation?
- c) What samples, procedures, and tests would you submit?

Case 3: Layers experiencing a slow production drop.

A layer complex with approximately 1,000,000 layers of different ages has experienced a slow egg production drop of approximately 0.5 – 1.5% per week starting around 40 – 45 weeks of age and continuing until molt in each of their production flocks regardless of strain. Both external and internal egg quality does not appear to be affected.

- a) What are your possible diagnoses?
- b) What additional questions would you ask the producer in an attempt to get a clearer picture of the situation?
- c) What samples, procedures, and tests would you submit?
- d) What is your tentative diagnosis based on the answers provided to your questions during the presentation?
- e) What is your recommendation to prevent the slow egg production drop in future flocks?

f) Future outcome.

Case 4: Brief period of increased water consumption in broilers.

A small poultry farm which grows approximately 80,000 broilers has been experiencing an increase in water consumption from 23 – 25 days of age in each of the past 5 grow cycles. Water intake doubles for approximately 2 to 3 days then immediately falls back to normal consumption levels. Birds have been observed to “flush” (diarrhea) and litter conditions become wet and caked during this time period of increased water consumption. Daily mortality rates are within industry standards and are not affected during this time period.

a) What are your possible diagnoses?

b) What additional questions would you ask the producer in an attempt to get a clearer picture of the situation?

c) What samples, procedures, and tests would you submit?

d) What is your tentative diagnosis based on the answers provided to your questions during the presentation?

e) What do you recommend to solve the situation?

DOES FLUOROQUINOLONE SUSCEPTIBILITY STATUS EFFECT CLINICAL DISEASE SEVERITY IN CAMPYLOBACTERIOSIS? A NEW LOOK AT AN OLD QUESTION

CAMPYLOBACTER DE ORIGEN ALIMENTARIO, RESISTENTE A LAS FLUOROQUINOLONAS. NUEVA INFORMACIÓN SOBRE RIESGOS Y DAÑOS A LA SALUD PÚBLICA

Barry J. Kelly and Michael Vaughn

Bayer HealthCare, 12707 Shawnee Mission Parkway, Shawnee, KS, 66216

RESUMEN

Información reciente de la Unión Europea nos da más luz sobre el "Daño" que previamente se había atribuido a las infecciones causadas por aislamientos de campylobacter resistentes a las fluoroquinolonas (N. del T.: denominados en inglés *FQ-R* en contraposición a los aislamientos sensibles o *FQ-S*), derivados de aves. En este trabajo presentaremos una revisión de dichos datos, además de información nueva sobre la incidencia del problema, de acuerdo con el programa NARMS o Sistema Nacional de Supervisión y Registro ("Monitoreo") de Resistencia a los Antimicrobianos, de EE.UU.

SUMMARY

An extensive new database summary on Campylobacteriosis surveillance in the U.K. from 2000-2003 (1) suggests that fluoroquinolone resistant (*FQ-R*) *Campylobacter* infections do not cause more severe clinical disease than fluoroquinolone susceptible (*FQ-S*) ones. These findings are at odds with previous findings published in the U.S. by Nelson *et al.* who reported that *FQ-R* infections are responsible for an additional two days of diarrhea (3).

OVERVIEW & DISCUSSION

The CVM of FDA removed the approval of fluoroquinolones in poultry in September of 2005 because it deemed that new evidence not known at the

time of approval showed that such use was no longer considered to be safe. In the end, it was considered that the causal chain of fluoroquinolones acting as a selective pressure to give rise to FQ-R *Campylobacter* which were present on consumer ready product that had the potential to cause disease in humans that would be refractory to FQ treatment and result in a prolonged course of disease was judged to meet. The early events in this continuum are more easily shown than the latter, and new information from Europe warrants that the topic of increased disease severity (i.e. either refractory to treatment or more severe if left untreated) for FQ-R *Campylobacter* be revisited. The European Union and its veterinary governing body the CVMP, continues to consider the drinking water use of FQ's in poultry to be a safe and humane therapy of choice for severe respiratory disease. The primary studies dealing with the issue of "harm" from resistant organisms are a case-control study from the U.S. (3) and a larger case-case study from the U.K. (1) which has newly added data. Table 1 shows a summary of the U.S. case-control study data conducted from 1998-1999. Table 2 shows the results of the U.K. Sentinel Study and Table 3 shows the extended findings of that study. The recent review by Wassenaar *et al.* (4) summarizes additional details of these two and other studies.

CONCLUSION

While the Nelson *et al.* study found an association between FQ-R infections and an additional two days

duration of diarrhea in people with those infections, new surveillance data from Europe using a very large database imply that foreign travel not antimicrobial susceptibility status is the more important determinant of disease severity. Several issues of interpretation preclude direct comparison of these two studies results, however it suffices to say that the completed European data set comprising 11,597 total cases argues in a compelling way that there is little difference between these two types of infection. Additional study insights will be presented.

REFERENCES

1. *Campylobacter* Sentinel Surveillance Scheme collaborators. Ciprofloxacin resistance in *Campylobacter jejuni*: case-case analysis as a tool for elucidating risks at home and abroad. *J Antimicrob Chemother* 50:561-8. 2002.
2. Cox Jr., L.A., D. Copeland, and M. Vaughn. Ciprofloxacin resistance does not affect duration of domestically acquired campylobacteriosis. *J Infect Dis* 191:1565-6. 2005.
3. Nelson, J.M., K.E. Smith, and D.J. Vugia, *et al.* Prolonged diarrhea due to ciprofloxacin-resistant *Campylobacter* infection. *J Infect Dis* 190:1150-7. 2004.
4. Wassenaar, T.M., M. Kist, and A. de Jong. Re-analysis of the risks attributed to ciprofloxacin-resistant *campylobacter jejuni* infections. *Intl J Antimicrob Ag* 30: 195-201. 2007.

Table 1.

| Nelson <i>et al.</i> (3) – Campylobacteriosis Diarrhea Days (n) | | | | |
|--|------------|------------|---------------------|------------------------|
| | Overall | No Anti- D | Took FQ & No Anti-D | No Antimicrobial or AD |
| FQ-R | 8 (82) | 9 (26) | 8 (9) | 12 (7) |
| FQ-S | 7 (658) | 7 (264) | 6 (76) | 6 (56) |

Table 2.

| Duration of Campylobacteriosis Diarrhea in Days (n) | | | | |
|--|-------------------------|-------------|--|-----------|
| | U.K. Sentinel Study (1) | | Cox <i>et al.</i> (2) based on data from (3) | |
| | FQ-R | FQ-S | FQ-R | FQ-S |
| Domestic Cases | 11.8 (291) | 11.2 (1593) | 6.9 (41) | 6.9 (529) |
| Foreign Travel Cases | 12.7 (347) | 13.5 (148) | 8.1 (29) | 7.6 (48) |

Table 3.

| Duration of Campylobacteriosis Diarrhea in Days – Extended Data from 2000-2003; 10,843 Additional Cases | | |
|--|---------------------------|---------------------------|
| | FQ-R | FQ-S |
| Domestic Cases | 11.1 (10.6-11.7) (n=1286) | 11.4 (11.1-11.7) (n=7460) |
| Foreign Travel Cases | 13.1 (12.4-13.8) (n=1215) | 13.3 (12.0-14.7) (n=882) |

ACTIVE MOTILITY IS NOT REQUIRED FOR *CAMPYLOBACTER* COLONIZATION OF CHICKENS

CAMPYLOBACTER NO REQUIERE SER ACTIVAMENTE MÓVIL PARA COLONIZAR AL POLLO

A. Singh Dhillon, Michael E. Konkel, and Kari Shoaf-Sweeney

Avian Health and Food Safety Laboratory/Dept. of Microbiology, School of Molecular Biosciences
7613 Pioneer Way E, Puyallup, WA 98371, Washington State University

RESUMEN

Se está investigando el papel de la motilidad del microorganismo y la secreción de las proteínas bacterianas de *C. jejuni* en la colonización del pollo. En nuestro primer experimento descubrimos que la bacteria debía ser móvil para poder colonizar al pollo, pero actualmente estamos investigando si es necesario el aparato flagelar para la secreción de las proteínas que contribuyen con dicha colonización. Estamos intentando generar mutantes inmóviles de *C. jejuni* que sean capaces de secretar proteínas. Presentaremos los resultados obtenidos con estas cepas mutantes.

SUMMARY

Campylobacter jejuni is a Gram-negative, motile, spiral-shaped bacterium, and a common cause of gastroenteritis in humans. The flagellum of *C. jejuni*, which confers motility and serves as a secretion apparatus for the export of virulence proteins from the bacterium, is composed of a basal body, hook, and filament. The filament is comprised of two proteins, termed FlaA and FlaB. While these two proteins are 94% homologous, the *flaA* and *flaB* genes differ in that they are expressed from separate promoters controlled by different sigma factors (σ^{28} and σ^{54} , respectively). The sigma factor RpoN (σ^{54}) and filament protein FlaB

are adequate for a functional secretion apparatus, but only confer partial motility, whereas both the FliA (σ^{28}) and RpoN (σ^{54}) sigma factors and the FlaA and FlaB filament proteins are required for full motility of the bacterium. We hypothesized that *C. jejuni* colonization of chickens does not require fully motile bacteria. To test this hypothesis, we inoculated Leghorn broiler chickens with the *C. jejuni* F38011 wild-type strain, *fliA* (σ^{28}) mutant, and *rpoN* (σ^{54}) mutant. We then determined the number of *C. jejuni* in the cecum at 7 and 14 days post-inoculation. The *C. jejuni fliA* mutant colonized a majority of the inoculated chickens, albeit at a reduced level when compared to the F38011 wild-type strain. Specifically, 5 of 10 chickens were colonized with the *C. jejuni fliA* mutant at day 7, whereas 10 of 10 chickens were colonized with this mutant by day 14. In contrast, the *C. jejuni rpoN* mutant was not recovered from any of the chickens at either time point. *In vitro* assays revealed that the *C. jejuni* strains used had the expected motility, flagellar structure as judged by transmission electron microscopy, and ability to adhere to tissue culture cells. Collectively, these findings support the hypothesis that active motility, which requires σ^{28} and the FlaA filament protein, is not required for *Campylobacter* colonization of chickens.

CO-INFECTION OF MULTIPLE *CAMPYLOBACTER* STRAINS IN TURKEYS: WHAT CO-INFECTION MEANS FOR SAMPLE COLLECTION

COINFECCIÓN CON VARIAS CEPAS DE *CAMPYLOBACTER* EN PAVOS Y SUS EFECTOS SOBRE LA RECOLECCIÓN SIGNIFICATIVA DE MUESTRAS

Donna K. Carver^A, Lee Shepherd^B, R. Siletzky^B, and Sophia Kathariou^B

Department of Poultry Science^A and Department of Food Science^B, North Carolina State University, Raleigh, NC 27695

RESUMEN

Se obtuvieron muestras de 30 parvadas de pavos para analizar la presencia de especies de *Campylobacter*. Se identificó a dos de ellas como habitantes del tracto gastrointestinal de estas aves, a saber: *C. jejuni* y *C. coli*. Algunas granjas estaban colonizadas predominantemente con una cepa más que con la otra, pero en otras granjas se encontraron niveles iguales de diseminación de ambas especies. Se recolectaron intestinos de aves de parvadas que se sabía eran positivas al sacrificio. Originalmente se tomaron muestras de ciego y en este órgano predominó *C. coli*. Al examinar el intestino en su totalidad, con frecuencia se encontró tanto *C. coli* como *C. jejuni*, mostrando predilección específica por ciertos sitios del tracto gastrointestinal. *C. jejuni* tendió a colonizar la porción superior del intestino mientras que *C. coli* estaba mayormente presente en los ciegos. Las estrategias de muestreo fecal para la detección de estos microorganismos diseminados en la granja resultaron adecuadas para determinar la presencia o ausencia de las especies de *Campylobacter*. La diferenciación adecuada entre las cepas de *Campylobacter* que colonizan a las aves requirió la obtención de los intestinos completos y el muestreo de ellos en diferentes sitios.

ABSTRACT

Turkey flocks from 30 farms were sampled for the presence of *Campylobacter* species. Six fresh fecal samples were obtained from turkeys in varying locations throughout one turkey house on each farm. Fecal samples were plated directly onto selective media and incubated for 24 hours. Two strains of *Campylobacter* were identified as inhabiting the gastrointestinal tracts of turkeys: *C. jejuni* and *C. coli*. Some farms were colonized predominately with one strain or the other, but other farms exhibited equal shedding of both strains. Intestines were collected from birds from known positive flocks at processing. Originally cecal samples were collected. *C. coli* was the predominant strain isolated from the ceca. When the entire intestine was examined, both *C. jejuni* and *C. coli* were often found and exhibited site-specific predilections within the gastrointestinal tract. *Campylobacter jejuni* tended to colonize the upper gut, while *C. coli* tended to be present in the ceca. Fecal sampling strategies for organisms being shed on the farm were adequate for determining presence or absence of *Campylobacter* species. Adequate differentiation among strains of *Campylobacter* colonizing birds required harvesting of intestines and sampling multiple sites.

(The full-length article will be published in the *Journal of Food Protection*.)

SALMONELLA AND LISTERIA – TRUE CONTROL...

SALMONELLA Y LISTERIA: SU CONTROL VERDADERO

Robert O'Connor

RESUMEN

El gobierno de EE.UU. considera a *Salmonella* y *Listeria monocitogenes* (Lm) como patógenos

importantes en materia de inocuidad alimentaria. Es necesario considerar a estas bacterias como patógenos que se pueden presentar, al formular el plan de HACCP (Análisis de Riesgos y Puntos Críticos de Control) para

las instalaciones avícolas en que se prepararán alimentos listos para la cocina o listos para el plato. El control de estos patógenos se ha convertido en una alta prioridad para los avicultores, pues las leyes sobre *Salmonella* cada vez imponen más restricciones, mientras que *L. monocitogenes* se considera un patógeno para el cual debe existir tolerancia cero. Estos aspectos son de la incumbencia de los profesionales de la inocuidad de los alimentos, incluyendo a los médicos veterinarios, para comprender la naturaleza verdadera no sólo de los microorganismos sino de las formas de controlarlos. En esta presentación hablaremos de diferentes experiencias sobre la materia en relación con las instalaciones de producción en vivo y en el rastro. No obstante, el tema principal y el mayor enfoque de la charla será el énfasis en el personal, las personas que impactan más directamente a los microorganismos, mientras trabajan en el ambiente donde se producen los alimentos para consumo humano. En esencia, ellos son quienes más contribuyen para lograr el verdadero control.

SUMMARY

Salmonella and *Listeria monocytogenes* (Lm) are both considered food safety pathogens by the U.S. government. It is necessary to consider them a hazard likely to occur, when formulating a HACCP plan for a ready-to-cook, or ready-to-eat, poultry facility respectively. Control of these pathogens has become a priority for poultry producers. Regulations regarding *Salmonella* are becoming increasingly more restrictive; and Lm is considered a zero-tolerance pathogen. As such, it behooves Food Safety professionals, which includes veterinarians, to understand the true nature of not only the organisms but the means to control them. This presentation covers different experiences in the area as it relates to live production and the processing plant facilities. However, the main theme and point of this presentation is an emphasis on personnel – those people who most directly impact the organisms as they work in the environment in which food is produced. They, in essence, are some of the most important contributors to true control.

***BRACHYSPIRA PILOSICOLI*, LA IMPORTANCIA DE UN NUEVO AGENTE ETIOLÓGICO PRESENTE EN MÉXICO**

***BRACHYSPIRA PILOSICOLI*: THE IMPORTANCE OF AN EMERGING PATHOGEN IN MEXICO**

P. F. J. Venosa, L.F. Vázquez Rojas, y R. E. González

Novartis Salud Animal SA de CV, Pedro Moreno 1677 5to piso. CP 44600
Guadalajara, Jalisco. México, javier.venosa@novartis.com

SUMMARY

Brachyspira pilosicoli is a motile, aerobic, gram negative spirochete with the ability of infecting laying hens, geese, ducks, broilers and human beings. Clinical signs of the infection in birds include watery scours; wet litter; increased incidence of dirty eggs with feces; retarded laying onset and decreased egg production, egg weight, and egg carotenoid content; poor eggshell quality; and poor performance of infected breeders. The bacterium is spread through the feces, aerosols, feed, water, and fomites contaminated with feces. The adherence of *B. pilosicoli* can be associated with microvilli destruction, damaged brush border, and disrupted enterocyte function. The *B. pilosicoli* was reported in a fighting cock in Mexico.

RESUMEN

Brachyspira pilosicoli (*Bp*) es una espiroqueta, móvil, anaerobia, Gram. negativa que infecta a las gallinas de postura, gansos, pavos, pollo de engorda y a los humanos. Los signos que produce la infección en las aves son: incremento en el contenido de agua en las heces (diarrea acuosa), camas húmedas, aumenta el porcentaje de huevo manchado con heces, retarda el inicio de la postura y/o reduce la producción de huevo, el peso del huevo y el contenido de carotenoides del huevo, propicia pobre calidad del cascarón y el pobre desempeño de pollitos procedentes de reproductoras infectadas. La transmisión de esta bacteria es vía heces, aerosoles, alimento, agua y otros elementos contaminados con heces. La adherencia de *Bp* puede ser asociada con la destrucción de las microvellosidades, daño a la red terminal de los

microfilamentos y pérdida de la función de los enterocitos. Esta bacteria ha sido reportada en México.

EPIZOOTIOLOGÍA

Las espiroquetas son bacterias en espiral, gram negativas, anaerobias estrictas que habitan ciego y colon de mamíferos, incluyendo al humano y aves. Esta reportada la infección en gallinas de postura, reproductoras pesadas, gansos, pavos (13) y pollo de engorda. La enfermedad que produce se denomina espiroquetosis intestinal aviar (EIA). Se han reportado casos de espiroquetosis intestinal aviar en Europa, Norteamérica y Australia. En Australia se detectó 40% de parvadas de postura comercial y reproductoras pesadas infectadas con espiroquetas intestinales (15), y en otro estudio, 20% de 600 muestras de heces de 5400 aves resultaron positivas a *Brachyspira* spp. (12). En México *Bp* ha sido aislada en cerdos (3) y en un ave de combate (4). Dada la dificultad de su cultivo y la carencia de laboratorios especializados en la identificación de este género, la incidencia de esta bacteria en las especies productivas en México es desconocida. Actualmente los especialistas en producción aviar deben considerar la presencia de esta bacteria por las frecuentes manifestaciones que son acordes a la signología descrita. La falta de conciencia en la enfermedad y la falta de conocimiento en las técnicas de diagnóstico son la causa de una deficiente búsqueda para su control.

ETIOLOGÍA

Las especies que infectan a las aves son: *B. hyodysenteriae* (*Bh*), *B. intermedia* (*Bi*), *B. innocens* (*Bin*), "*B. pulli*" (*Bp*), *B. alvinipulli* (*Ba*), *B. murdochii* (*Bm*) y *B. pilosicoli* (*Bp*) y pertenecen al orden Spirochetes, familia Spirochaetes y al género *Brachyspira*. Las especies consideradas como patógenas a las aves son: *Bi*, *Bp*, *Ba*, y *Bh*. Son gram negativas, anaerobias, crece en medios de cultivo con sangre de ovino adicionados con antibióticos. Crece a temperaturas de 37 a 42°C incubada hasta por 10 días. El crecimiento se detecta por la hemólisis completa o parcial que produce. Se pueden observar teñidas con Wright – Giemsa o Gram en el microscopio. La diferenciación de las especies se basa en: tipo de hemólisis, producción de indol, presencia o no de α -galactosidasa y α -glucosidasa. Las espiroquetas pueden sobrevivir en las heces hasta 17 h a temperatura de 37°C, y 84 h a 4°C y son susceptibles a la acción de los desinfectantes (11).

Factores de virulencia. Las hemolisinas inducen degeneración epitelial y necrosis (18). Existen otras toxinas potenciales como los lipopolisacáridos, un inhibidor del transporte de sodio y cloro a través de la

membrana de los enterocitos y un proteasa similar a la tripsina. La motilidad de las espiroquetas en la mucosa propicia una mayor sobrevivencia, colonización y proliferación. La proliferación de las espiroquetas induce un desbalance en la flora intestinal que puede resultar en alteraciones en la absorción de fluidos y cambien en el contenido de iones orgánicos que se excretan o absorben.

Patogenicidad. Se consideran tres patotipos: Espiroquetas severamente patógenas, moderadamente patógenas y subclínicas o apatógenas. La patogenicidad de las espiroquetas varía de acuerdo a: la especie de espiroqueta, ruta de inoculación, edad del huésped, especie del huésped, factores ambientales estresantes, microflora intestinal. Se reporta también diferencia en la virulencia de cepas de la misma especie (10). Las espiroquetas infectan gallinas, ñandúes, urogallos, faisanes, pavos y otras aves silvestres. Los aislamientos de espiroquetas de aves silvestres infectan a las gallinas, pavos y patos. Se ha demostrado la infección experimental de gallinas con *Bh* aislada de cerdos y humanos (10).

Potencial zoonótico. *Bp* es una bacteria de especial interés dado que infecta aves y mamíferos incluyendo al humano. Reportes de colonización en humanos están registrados en Omán y Papua Nueva Guinea (19) y los asocian a factores predisponentes como la homosexualidad y la infección con el virus de la inmunodeficiencia humana (HIV). Los signos descritos en los enfermos son; diarrea crónica y con sangre, sangrado rectal, pseudo apendicitis y dolor abdominal. Está demostrada la capacidad de *Bp* aislada de humanos de producir cambios en la consistencia de las heces en aves de postura comercial (1). Aunado a lo anterior y a la capacidad de infección cruzada entre especies diferentes, esto tiene implicaciones importantes para el control en las parvadas comerciales por lo que es necesaria mayor investigación (16).

Período de incubación. Es variable y depende de la dosis infectante, de factores ambientales. Experimentalmente los signos se presentan a los cinco días después de la infección. Las espiroquetas infectan persistentemente el ciego hasta por 23 semanas postinfección.

Signos clínicos. Las bacterias tienden a colonizar crónicamente el ciego de las aves y afectan en menor grado el ileon y el recto. La enfermedad subclínica se asocia a la infección con especies apatógenas que cuando se inoculan en pollitos de un día de edad produce diarrea fugaz de color amarillo verdosa con espuma.

Los signos clínicos que produce la infección con *Bp* en aves de postura son: diarrea, empastamiento cloacal, incremento en la grasa en las heces, incremento en el porcentaje de huevo manchado con heces, inicio tardío de la producción, reducción de

hasta el 5% de postura (9), reducción del peso de huevo, reducción de la velocidad de crecimiento, incremento en el consumo y pobre digestión del alimento (16). En reproductoras pesadas, la infección experimental con *Bp*, la colonización persistió hasta por 4 semanas. Mostraron diarrea pasajera con incremento en la humedad en las primeras semanas post infección, heces espumosas de color café, tardío inicio de la producción de huevo, reducción de 14 huevos menos que el grupo sin desafío e incremento en huevo manchado con heces, no se observa incremento en la mortalidad. (16). Al parecer las aves jóvenes tienen un nivel de colonización menor que las aves con edad intermedia (12).

En el pollo de engorda procedente de reproductoras infectadas, se reporta pobre conversión de alimento, aumento de pollitos débiles, crecimiento lento y pobre digestión de alimento (14). En ñandúes jóvenes de más de 6 meses de edad, la enfermedad severa consiste en tiflitis y necrosis con mortalidades de hasta 80%, en los meses de Julio a Octubre. El estrés del transporte es un factor predisponente a la presentación clínica en los adultos. Los signos clínicos son depresión, pérdida de peso, diarrea acuosa y muerte después de dos días. Los ciegos muestra dilatación, engrosamiento, ulceraciones en la pared y formación de pseudo membranas. *Bh* es la especie que se ha aislado en cuadro clínicos como el descrito.

Los factores que influyen la manifestación de la enfermedad incluyen las características de alojamiento, la nutrición, (Por ejemplo se ha observado que la inclusión de 50 ppm de bacitracina de zinc (ZnB) en la dieta incrementa la susceptibilidad a la infección con *Bp* (8)), el ambiente, la genética, la muda, el inicio de la producción de huevo, calidad del alimento y el piso de las casetas.

Lesiones. Las bacterias colonizan el epitelio y producen un “falso borde en cepillo” constituido por las espiroquetas adheridas por un extremo al epitelio del ciego, colon o recto. Los ciegos muestran heces espumosas y viscosas, de color amarillo a café, sin inflamación o con tiflitis linfocítica. Es frecuente con las cepas europeas de *Brachyspira* sp. la penetración del epitelio y/o la submucosa por lo que se produce erosión/necrosis del tejido.

Vectores. Las espiroquetas se eliminan en las heces por lo que las ratas, ratones, moscas, perros y los mismos trabajadores pueden actuar como vectores y diseminar la bacteria.

DIAGNÓSTICO

Mediante microscopia de campo oscuro, se pueden identificar las espiroquetas en las heces de las aves afectadas. Los signos en la parvada y las lesiones en los ciegos contribuyen a orientar el diagnóstico. El aislamiento y la identificación de la especie son

definitivos. Las espiroquetas pueden evidenciarse mediante tinciones especiales (plata), inmunofluorescencia, inmunohistoquímica, en cortes de ciego de aves afectadas. El aislamiento de la bacteria es necesario para identificar la espiroqueta pero es difícil, se requieren medios especiales con antibióticos, incubación de 3 a 5 días en anaerobiosis, muestras de heces o tejidos cecales frescos (18).

Diagnóstico diferencial. Salmonelosis, colibacilosis, coccidiosis, diarreas crónicas asociadas a exceso de sal, grasa o soya en la dieta. Las espiroquetas deben diferenciarse de *Campylobacter*, sp., *Arcobacter* sp., *Helicobacter* sp., y *Spirillum* sp.

TRATAMIENTO

La infección puede prevenirse o tratarse con tiamulina (Denagard®)¹ a dosis de 25 mg/kg peso/día, durante cinco días (17). Tiamulina soluble utilizada a dosis de 12.5 mg/kg durante tres días, en una parvada infectada crónicamente con *Bp* propició un 9.85% de mejora en la producción de huevo por gallina encasetada así como el 8.6% de reducción en la mortalidad (2). En estudios de concentraciones mínimas inhibitorias (CMI) para *Bp* y *Bi*, se ha demostrado la eficacia de tiamulina (7). En un estudio comparativo con siete antibióticos con diferentes *Brachyspira* spp., todas mostraron ser sensibles a la tiamulina con valores de CMI de >0.1 µg/mL (6). La figura adjunta muestra las CMI de *Bp* a tres antibióticos.

¹Denagard® es marca registrada por Novartis Salud Animal SA de CV, contiene Tiamulina con recubrimiento propietario.

PREVENCIÓN Y CONTROL

Establecer el diagnóstico correcto de las diarreas en las parvadas de posturas comerciales y reproductoras es la base de la prevención.

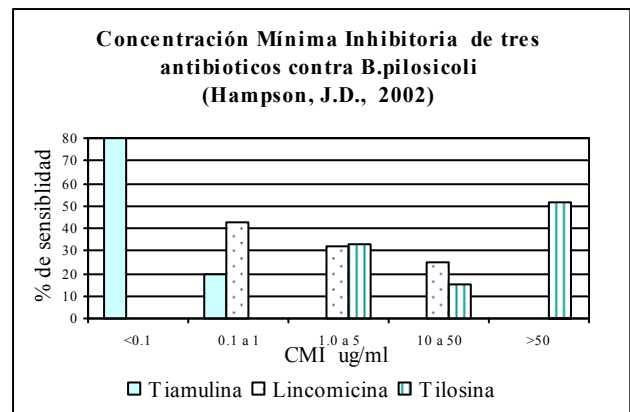
Reducir los riesgos del contacto de las aves con las heces, esto implica un estricto control de ratas, moscas y otros insectos, retirar constantemente las heces, limpiar, lavar y desinfectar los pisos de las jaulas, minimizar estrés por cambios de dieta y pelecha, alimento de excelente calidad, medidas de bioseguridad como baños, tapetes con desinfectantes al ingresar a las casetas, desinfección del equipo de limpieza. El control estricto de las moscas mediante insecticidas o larvicidas es crucial no solo para prevenir la infección con esta bacteria.

El correcto procedimiento de eliminación de heces, limpieza, lavado y desinfección de las instalaciones reduce el riesgo de mantener viables las bacterias en la materia orgánica. La cercanía de

granjas porcinas puede ser un factor de riesgo para que ocurra la infección (5).

REFERENCIAS

1. Abdollah, J., *et al.* Experimental infection of layers hens with a human isolate of *Brachyspira pilosicoli*. *Journal of Medical Microbiology*, 52 p 361 – 364. 2003.
2. Burch, D.G., *et al.* Treatment of a field case of avian intestinal spirochaetosis caused by *Brachyspira pilosicoli* with tiamulin. *Avian Pathol. Jun*; 35(3):211-6. 2006.
3. Corona, E., *et al.* Aislamiento de espiroquetas intestinales del genero *Brachyspira* en el estado de México. XLI congreso Nacional AMVEC, Ixtapa, Guerrero. México. 2006. p 197. 2006.
4. Corona-Barrera, E., *et al.* Aislamiento de espiroquetas intestinales del genero *Brachyspira* de ave de combate en el estado de México. XXXII CONVENCION ANUAL ANECA, p.48-49. 25-28 Abril, 2007 Acapulco, Guerrero, México. 2007.
5. Hampson, D.J., *et al.* Influence of feed zinc bacitracin and tiamulin treatment on experimental avian intestinal spirochaetosis caused by *Brachyspira intermedia*. *Avian Pathology* 31, 258-291. 2002.
6. Hampson, D.J., *et al.* Intestinal Spirochaete Infections in Chickens. A report for the Rural Industries Research and Development Corporation. August 2002. Rural Industries Research & Development Corporatio Publication No 02/087, Project No UMU-23J). 18 – 22. 2002a.
7. Hampson, D.J., *et al.* Antimicrobial susceptibility testing of *Brachyspira intermedia* and *Brachyspira pilosicoli* isolates from Australian chickens. *Avian Pathol. Feb*; 35(1):12-6. 2006.
8. Jamshidi, A., *et al.* 2002. Zinc bacitracin enhances colonization by the intestinal spirochaete *Brachyspira pilosicoli* in experimentally infected layer hens. *J Avian Pathol. Jun*; 31(3):293-8. 2002.
9. Mac, Laren *et al.* Genetic and phenotypic characterization of intestinal spirochaetes colonizing chickens, and allocation of known pathogenic isolates to three distinct genetics groups. *Journal of clinical Microbiology* 35, 412 – 417. 1997.
10. Nagaraja, M., *et al.* Laboratory identification and enteropathogenicity testing of *Serpulina pilosicoli* associated with porcine colonic spirochetosis. *J. Vet. Diagn Invest* 9 165 - 171. 1997.
11. Phillips, N.D., *et al.* Survival of intestinal spirochaete strains from chickens in the presence of disinfectants and in faeces held at different temperaturas. *Avian Pathol. Dec*; 32(6):639-43. 2003.
12. Phillips, N.D., *et al.* A cross-sectional study to investigate the occurrence and distribution of intestinal spirochaetes (*Brachyspira* spp) in three flocks of laying hens. *Veterinary Microbiology* 105, 189 – 198. 2005.
13. Shivaprasad, H.L., *et al.* Cecal spirochetosis caused by *Brachyspira pilosicoli* in commercial turkeys. *Avian Dis. Dec*; 49(4):609-13. 2005.
14. Smit, H.F., *et al.* Observations on the influence of intestinal spirochaetosis in broiler breeders on the performance of their progeny and on egg production. *Avian Pathology* 27, p 133 – 141. 1998.
15. Stephens, C.P. and D.J. Hampson. Intestinal spirochete infections of chickens: a review of disease associations, epidemiology and control. *Anim Health Res Rev. Jun*;2(1):83-91.2001.
16. Stephens, C.P. and D.J. Hampson. Experimental infection of broiler breeder hens with the intestinal spirochaete *Brachyspira* (*Serpulina*) *pilosicoli* causes reduced egg production. *Avian Pathol. Apr* 31(2):169-75. 2002.
17. Stephens, C.P., *et al.* Evaluation of tiamulin and limcomicycyn for the treatment of broiler breeders experimentally infected with the intestinal spirochaete *Brachyspira pilosicoli*. *Avian Pathology* 31, 299-304. 2002a
18. Swayne, D.E. Avian intestinal Spirochetosis. In *Diseases of Poultry*, tenth edition edited by: Calnek B.W. 1997 p 325 – 332. 1997.
19. Trot., *et al.*: The prevalence of *Serpulina pilosicoli* in humans and domestics animals in the Eastern Highlands of Papua New Guinea. *Epidemiol. Infect.* p 119, 369 – 379. 1997.



INCREMENTO DE CASOS DE TIFOIDEA AVIAR (*SALMONELLA ENTERICA*, SUBESPECIE *ENTERICA*, SEROVAR PULLORUM - GALLINARUM) EN AMERICA LATINA

FOWL TYPHOID (*SALMONELLA GALLINARUM*) RE-EMERGENCE IN LATIN AMERICA: CAUSES AND MEASURES ADOPTED TO DECREASE ITS INCIDENCE

Mariano Salem^A, B. Cardoso^A, A. Botero^B, y E. Peña^C

^ALohmann Animal Health International,

^BAvidesa, ^CBinveca

Msalem@lahinternational.com

SUMMARY

A tremendous increase in the number of fowl typhoid cases is occurring in several Latin American countries with mortality rates $\geq 50\%$ in commercial layer and broiler breeders, thus increasing vertical transmission to both layer and broiler progeny. Also, horizontal transmission is fairly common among commercial layers. The scarcity of day-old layer/broiler chick suppliers is pushing producers to keep infected breeders in production thus perpetuating the infection. This epizootic has resulted from poor biosecurity associated with short distances between farms, abundant rodents, and attempts to hide the disease. Antibiotic treatments are not able to stop the outbreaks. Vaccination using live *Salmonella* vaccines, particularly *S. enteritidis*, either alone or injected in combination with killed *Salmonella* vaccines seem to be the best disease control jeans.

INTRODUCCIÓN

La tifoidea aviar (TA) una enfermedad septicémica de las aves que puede tener un curso agudo o crónico. De cualquier forma el porcentaje de mortalidad por esta infección puede llegar hasta el 90%. La enfermedad se caracteriza por causar lesiones típicas de hepatomegalia muchas veces con hígado de color café verdoso o “bronceado”, esplenomegalia, focos miliares en hígado y en el miocardio, ovaritis, con yemas hemorrágicas y deformes. Además, se pueden ver focos blancos/grises en pulmones, corazón y molleja en pollitos afectados También, se sabe que el agente causal (*Salmonella entérica*, subespecie *entérica*, serovar Pullorum-Gallinarum) (Sg) (antes llamado *Salmonella gallinarum*) además de ser transmitido horizontalmente también es transmitido en forma transovárica.

Las aves infectadas que sobreviven a la infección quedan como portadoras. Por tal razón la forma más efectiva de controlar la difusión es por detección

serológica y bacteriológica de las aves infectadas y el sacrificio de éstas (6).

En los EU el control y erradicación de esta enfermedad de parvadas comerciales se logró con la creación del programa NPIP (Programa Nacional de Mejoramiento Avícola). La TA se consideró erradicada de granjas comerciales en 1980 (6). El éxito de este programa consistió en el muestreo serológico esencialmente usando la prueba de aglutinación en placa de aves reproductoras y la eliminación de aquellas confirmadas infectadas por confirmación bacteriológica. De ésta manera las compañías avícolas con parvadas libres de este problema tenían ventaja competitiva y prestigio. Sin embargo, la TA siguió siendo un problema serio en otras áreas del mundo como Africa (1), En Mexico (3) y en Centro y Sudamérica (4). En éstos lugares los intentos de erradicación se han basado mas que en muestreo y sacrificio, en el tratamiento con antibióticos y vacunación sin lograr la erradicación.

Aumento de casos en América Latina. Es difícil poder determinar con precisión en que cantidad han aumentado últimamente los casos de TA en Latinoamérica pues los casos no se reportan por varias razones, algunas de ellas son:

- 1) Carencia de medios diagnósticos apropiados.
- 2) Pérdida de estatus libre de la provincia o país lo cual cancela las ventas y exportación de productos avícolas.
- 3) Pérdida de prestigio entre los avicultores locales.
- 4) Insuficiente cantidad de reproductoras libres de TA que proveen los pollitos de un día.
- 5) En algunos países, sacrificio sin compensación al reportar a las autoridades etc.

Por otro lado, que los casos han ido en aumento se confirman por las narrativas de veterinarios, técnicos y avicultores locales y la venta de vacunas no aprobadas. Esta situación trae como consecuencia una mayor difusión de TA sin conocimiento real de la

incidencia real, porcentajes de mortalidad y una falta de control por parte de las autoridades y por los avicultores. Además los intentos de control se llevan a cabo en forma independiente y los resultados de los intentos no se conocen, ni se conoce la ubicación de las parvadas infectadas en una región determinada. Ocultamiento es igual a difusión.

CAUSAS DE LOS BROTES

- 1) Permanencia en granja (finca) de aves reproductoras o abuelas infectadas.
- 2) Venta de pollitos/as a clientes o cría en integraciones procedentes de parvadas infectadas
- 3) Cría de pollitos/as mezclando en la misma parvada de aves infectadas con aves libres.
- 4) Granjas de edades múltiples con parvadas infectadas.
- 5) Proximidad de granjas de diferentes dueños.
- 6) Problemas con roedores, perros y otros animales que transitan de una granja infectada a otra limpia.
- 7) Deficiente manejo de las mortalidades en las granjas.
- 8) Uso ilimitado de antibióticos como única estrategia.
- 9) Prohibición oficial del uso de vacuna por mantener el estatus de “libre de *Salmonellas*”.
- 10) Vacunación con cepas vivas que perpetúan la infección.

INTENTOS DE CONTROL DE TA EN AMÉRICA LATINA

Uso de diferentes tipos de antibióticos. Los resultados son muy variables pero sólo controlan la mortalidad emporalmente y no evitan el estado de portador. Los tratamientos repetidos ocasionan resistencia a éstos. Algunas veces se usan antibióticos de uso en humanos. A la larga el uso de antibióticos perpetúa la enfermedad.

Programas de vacunación con vacunas inactivadas de *Salmonella enteritidis* (Se). Debido a la estructura de antígenos somáticos iguales entre Sg y Se (antígenos somáticos 1,9, y 12) se obtienen buena inmunidad cruzada. Sin embargo, las aves son reactoras positivas a las pruebas serológicas que se usan en el monitoreo oficial de la enfermedad. Es necesario manejar a las aves generalmente durante el levante. El efecto de la emulsión puede retrasar la postura de huevo. Es caro aplicarlas a los pollos de engorda. Además dejan un hueco de varios meses durante el cual las aves se pueden infectar.

Aplicación de vacunas a base de la cepa 9r de Sg viva. Igual que las inactivadas, dejan un hueco

inmunológico de varios meses durante el cual las aves se pueden infectar. Hay que manejar a las aves. La bacteria viva de la cepa 9r pueden colonizar el ovario, pasar a los pollitos y sembrar el medio ambiente y perpetuar la enfermedad (5). Lasa aves vacunadas con la cepa 9r pueden ser positivas a la prueba de aglutinación contra Sg.

Vacunas vivas de Se. Estas son las últimas formas de inmunización contra TA. Las bacterias contenidas son cepas mutantes naturales con capacidad limitada de reproducción. Contienen los mismos antígenos somáticos que la Sg (1, 9 y 12) y por lo tanto producen una inmunidad cruzada muy efectiva. Se aplican en el agua desde el día de edad y 2 veces mas durante el levante en el agua ,cerrando así los huecos de protección. La bacterias vivas deficientes de Se de la vacuna desaparecen del intestino después de una estancia breve, no sobreviven ni siembran el medio ambiente, no colonizan los órganos internos ni el ovario, y tampoco pasan a los huevos. Además, son diferenciables de las cepas de campo por pruebas fáciles de antibiogramas. Estas bacterias vacunales de Se no son nocivas ni para el humano ni para otras especies domésticas. Las aves vacunadas con vacunas vivas de Se solo desarrollan una fuerte inmunidad local y no desarrollan anticuerpos circulantes por lo tanto no son positivas a la pruebas de aglutinación en placa. Esto representa una gran ventaja pues no interfieren con los programas de erradicación.

En países en AL se usa como medida preventiva superando los resultados obtenidos con otros programas. En muchos casos clínicos de TA, se han aplicado estas vacunas de Se vivas sobre brote después de la aplicación de antibióticos para frenar la difusión y se han logrado muy buenos resultados. Se ha visto incluso la disminución y desaparición de las aves reactoras producidas por la infección de campo. En algunos casos se han combinado 2 aplicaciones de vacuna viva de Se con una inyectada de vacuna viva o con una vacuna inactivada de Se con buenos resultados. La desventaja en este último programa es que debido a la aplicación parenteral de las vacunas, las aves serán positivas a la prueba de aglutinación rápida en placa (2).

REFERENCIAS

1. Bouzouba, K. and K.V. Nagaraja. Epidemiological studies on the incidente of salmonellosis in chickens breeder hatchery operations in Moroco. In G.H Snoyenbos(e.d), Proc. Int. Symp., *Salmonella* , New Orleans , P 337. Am Assoc Avian Pathol, Kennet Square, PA. 1984.

2. Cardoso, Beatriz. Seminario en Control de Salmomella enteritidis y gallinarum con vacunas vivas. Lohmann Animal Health, puerto alegre, Brasil. 2007.

3. Lucio B, .M. Padron, and A. Mozqueda. Fowl Typhoid in Mexico. In G.H. Snoyenbos (ed). Proc Int. Symp *salmonella*, pp 382-383. Am Assoc Avian Path. Kenneth Square. PA. 1984.

4. Silva, E.N. The *Salmonella* gallinarum problem in Central and South America. In G.H Snoyenbos (ed), Proc Int Symp *Salmonella*, pp150-156 Am Assoc Avian Pathol, Kenneth Square, PA. 1984.

5. Silva, E.N., G.H Snoyenbos, O.M Weinack, and C.F Smeyer. Studies on the use of 9r strain of *Salmonella* gallinarum as a vaccine of chickens. Avian Diseases 25: 38-52. 1981.

6. Pomeroy, B.S, K.V. Nagaraja, and J.E. Williams. Fowl Typhoid in Diseases of Poultry, PP 87-99, 9th Edition, ISUP. 1991.

TIFOIDEA AVIAR EN PONEDORAS COMERCIALES: DIAGNÓSTICO Y PROPUESTA DE CONTROL DE UNA ENFERMEDAD EMERGENTE

FOWL TYPHOID IN COMMERCIAL LAYERS: DIAGNOSIS AND A CONTROL PROPOSAL FOR AN EMERGING DISEASE

M. Pulido y J. Mantilla

Universidad Nacional de Colombia, Sede Bogotá

SUMMARY

Several health problems in commercial brown layer operations in Colombia were reported in 2006, characterized by high morbidity/mortality, depression, reduced feed intake, and diarrhea. Major impacts included egg drops of up to 50% and mortality rates of up to 80%. The original diagnosis included a Group D *Salmonella* organism, mostly isolated from liver, gall bladder, and ovarian follicles. Molecular diagnosis further identified the presence of *Salmonella enterica*, serovar Gallinarum, biovar gallinarum, the etiology of fowl typhoid. Based on this diagnosis, increasing specific biosecurity measures and the responsible use of available vaccines were recommended in an attempt to decrease disease incidence.

INTRODUCCIÓN

En Colombia existen varias zonas avícolas densamente pobladas dedicadas a la producción de huevo para consumo humano y carne de pollo. A partir del año 2003 se registró un aumento en la casuística relacionada con infecciones por *Salmonella* spp. que se agravó durante el año 2006, cuando se presentaron varios casos de problemas sanitarios, principalmente en explotaciones de ponedoras comerciales (huevo rojo), caracterizados por alta morbi-mortalidad, aves deprimidas, con bajo consumo de alimento y cuadros diarreicos. El mayor impacto se observó en una disminución en la producción del orden del 30 al 50% con mortalidad hasta del 80%. Para los casos

registrados en pollo de engorde no se observó sintomatología aparente ni alta mortalidad pero sí un preocupante incremento en las lesiones hepáticas, ocasionando el decomiso de estas vísceras y el hallazgo por pruebas de laboratorio de canales contaminadas con *Salmonella* spp. principalmente del grupo D; donde se encuentran, entre otras, *S. enteritidis*, *S. gallinarum*, y *S. pullorum* (LPA-UN, Historias clínicas, 2006).

ETIOLOGÍA

El género *Salmonella* se relaciona taxonómicamente dentro de las gamma-proteobacterias, en el orden Enterobacteriales, perteneciendo a la familia Enterobacteriaceae. Posee tres especies (4) *Salmonella bongori*, *Salmonella enterica* y *Salmonella typhi*, las cuales se dividen en subespecies. (Tomado de Alvarez y Pulido, 2005).

La clasificación reconocida actualmente para las diferentes *Salmonellas* existentes es:

- Género *Salmonella*
- Dos especies:
 - *Salmonella enterica*: 6 subespecies
 - *Salmonella bongori*
- Se han descrito 2375 serovariedades

Salmonella enterica incluye serotipos móviles e inespecíficos de hospederos como *S. Enteritidis* y *S. Typhimurium*. Actualmente se utiliza el esquema de Kauffmann-White para caracterizar los diferentes serogrupos del género *Salmonella* de acuerdo con su compleja fórmula antigénica, la cual consiste en tres partes que describen los antígenos somáticos (O),

determinados por polisacáridos asociados con la célula, y las fases 1 y 2 de los flagelares (H) especificadas por proteínas flagelares. Algunos factores somáticos aparecen sólo en ciertos miembros de un serotipo. En otras ocasiones los factores somáticos aparecen subrayados, ya que su existencia se establece por la presencia de un fago 4, (tomado de Alvarez y Pulido, 2005).

Las bacterias del género *Salmonella* presentan una amplia variedad de huéspedes y producen diferentes cuadros clínicos en las aves comerciales. Las enfermedades de importancia en avicultura producidas por el género *Salmonella* son: tifoidea aviar o tifosis aviar (*S. enterica*, serovariedad Gallinarum, Biotipo gallinarum, *S. gallinarum*) y pullorosis aviar (*S. enterica*, serovariedad Gallinarum, Biotipo pullorum, *S. pullorum*).

PROBLEMÁTICA COLOMBIANA

En el año 2006 se presentaron varios casos de problemas intestinales principalmente en ponedoras comerciales rojas, en el Laboratorio de Patología Aviar de la Universidad Nacional (LPA-UN) se manejaron un total de 13 casos que incluyeron el hallazgo de la infección en reproductoras pesadas, ponedoras comerciales y pollo de engorde; la mayoría de los casos provenían de Cundinamarca y Santander.

En el 90% de los casos se detectó la presencia de *Salmonella* perteneciente al grupo D, la mayoría provenían de ponedoras comerciales rojas con alta morbi-mortalidad, el microorganismo se aisló de hígado, vesícula biliar y folículos ováricos.

Uno de los aspectos que más llama la atención en los casos analizados en el LPA-UN es la alta resistencia de las bacterias aisladas hacia los antimicrobianos de uso común en avicultura. El uso indiscriminado de antibióticos, con tratamientos cortos, la utilización de las llamadas “bombas” (mezcla indiscriminada) de medicamentos, la mala dosificación sin tener en cuenta las dosis requeridas en mg/kg de peso, y en la gran mayoría de los casos la mala calidad de agua en la que se administran estos productos; ha traído como consecuencia la poca efectividad de los tratamientos y la adquisición de resistencia por parte de las bacterias.

Diversos laboratorios que analizaron los casos que se presentaron en Colombia durante 2006, diagnosticaron la presencia de *Salmonella*, en especial del grupo D; la mayoría de aislamientos se hicieron de hígado, vesícula biliar y folículos ováricos. Una de las cepas aisladas fue remitida al Laboratorio de Bacteriología, Área de Sanidad, Departamento de Producción Animal en el INTA, Argentina; a cargo del Dr. Horacio Terzolo. Las pruebas bacteriológicas y moleculares (PCR) realizadas en ese laboratorio

identificaron una de las cepas como *Salmonella enterica*, serovariedad Gallinarum, biotipo gallinarum, cepa lisa; este hallazgo pone de manifiesto la presencia de *S. gallinarum* en explotaciones avícolas colombianas y la necesidad de establecer esquemas de control específicos para esta bacteria. Vale la pena anotar que la mayoría de los lotes afectados se habían vacunado con cepas de *Salmonella entérica*, subespecie *enteritidis*.

Como se puede concluir de la información anteriormente presentada, la problemática sanitaria que se ha presentado en Colombia relacionada con *Salmonella*, puede tener diversos orígenes pero uno de los que debe estudiarse está relacionado con la posibilidad de que exista una deficiencia en la inmunización de las aves al no usar cepas específicas para la prevención de enfermedades aviares tales como la tifoidea aviar, ocasionada por *S. gallinarum*, cepa identificada en uno de los aislamientos realizados.

DIAGNÓSTICO

El diagnóstico de esta enfermedad se basa principalmente en pruebas microbiológicas, las cuales pueden tardar días en dar resultados. Teniendo en cuenta la problemática anterior, se hace necesaria la implementación de métodos de diagnósticos rápidos, capaces de identificar en forma eficiente el o los agentes causantes de estas patologías. Uno de estos métodos son las técnicas moleculares cuya sensibilidad y especificidad han aumentado la posibilidad de diferenciar entre las cepas bacterianas de la misma especie y han facilitado el llevar a cabo estudios epidemiológicos más precisos. (4).

La elección de la técnica molecular depende de factores de tipo técnico como rapidez, facilidad de realización e interpretación, sumados a con un elevado poder de discriminación y reproducibilidad. Dada la similitud genotípica que existe entre *Salmonellas* del grupo D (*S. gallinarum*, *S. pullorum* y *S. enteritidis*) es importante recurrir a herramientas moleculares que permitan diferenciar cepas del mismo grupo. Una de estas es la utilización de secuencias Repetitivas Intragélicas de Enterobacterias (secuencias ERIC). Esta técnica se basa en la realización de un PCR utilizando iniciadores que se hibridan con secuencias de ADN repetidas que se encuentran distribuidas en los genes de *Salmonella gallinarum*. Con esta técnica se amplifican las regiones que separan las secuencias ERIC, por lo que el polimorfismo resulta de la variabilidad en la repetición de dichas secuencias y de la distancia entre reproducciones contiguas causadas por inserciones o deleciones de ADN (1,3).

Otra herramienta molecular que permite diferenciar *Salmonellas* del grupo D es la utilización de PCR alelos específicos. Ya que existen reportes de

estudios en donde se encuentran regiones de polimorfismo en nucleótidos en el gen rfbS de *S. gallinarum* y de *S. pullorum*. El primero fue encontrado en la posición 598 para *S. gallinarum* y el otro en la posición 237 para *S. pullorum*. Para el caso de *S. gallinarum* el polimorfismo se da en el cambio de una adenina en lugar de guanina en la posición 598. Este gen (rfbS) se ha encontrado únicamente presente en *Salmonellas* grupo D. Con este tipo de herramienta se puede identificar y diferenciar la relación genética existente entre cepas de *S. pullorum* y *gallinarum* (2).

CONSIDERACIONES FINALES

- La gran frecuencia de presentación de esta condición sumada a las grandes pérdidas económicas que se producen exige una acción inmediata de los Médicos Veterinarios dedicados a la avicultura quienes deberán mejorar o implementar nuevos métodos de prevención y control en sus granjas con el fin de eliminar el impacto negativo de esta enfermedad.
- Dentro de los aspectos a tener en cuenta en el control de los problemas ocasionados por *Salmonella* en las regiones afectadas se deben considerar como muy importantes:
 - Uso racional de antimicrobianos: los problemas de resistencia detectados en estudios realizados en el LPA-UN, muestran la necesidad urgente de la toma de conciencia acerca del mal uso que hacemos de la medicación y hasta donde puede ir la responsabilidad del Médico Veterinario en los problemas de resistencia hacia los antibióticos de las cepas de *Salmonella* aisladas.
 - Uno de los manejos que ha disminuido la presentación del problema en zonas problema ha sido la disminución de la densidad utilizada. El avicultor dedicado a la explotación de ponedoras comerciales debe tomar conciencia de la imperiosa necesidad de mejorar las condiciones de las aves en sus granjas. Una densidad máxima de 8 aves por metro cuadrado ha mostrado disminuir la frecuencia de presentación de problemas por *Salmonella*.
 - El manejo adecuado de las gallinaza, mediante sistemas de compostación o sanitización contribuye al control del problema.
 - Es crucial la implementación de un control estricto de roedores en las granjas.

- Debe evitarse la presencia de animales ajenos a la explotación avícola tales como bovinos y cerdos. En el evento de contar con perros guardianes o con gatos, debe manejarse un número racional dentro de la granja, estos animales deben mantenerse aislados y no deben consumir ni mortalidad ni huevos de desecho.
- La calidad del agua debe ser evaluada constantemente, en especial en época de verano, debe conocerse el estado en el que se encuentra el agua que se almacena en los reservorios; muchas veces esta agua se contamina por presencia de roedores, aves silvestres y en general otros animales que pueden ser vehículo de *Salmonella*.

- Se hace necesario realizar estudios epidemiológicos y de diagnóstico real de la situación en las zonas afectadas, con el fin de determinar el verdadero agente causal de los problemas de alta morbi – mortalidad identificados en ponedoras comerciales.
- Con base en lo anterior, debe estudiarse detenidamente la posibilidad de utilizar vacunas específicas para tifoidea aviar en las zonas donde se haya detectado este problema. Es necesaria la evaluación responsable y ética del tema para no incurrir en el error de incluir vacunas no necesarias o que resulten riesgosas y pueda llegarse a empeorar la situación en las zonas afectadas.

La mayoría de información consignada en este escrito proviene de dos fuentes: 1) Historias Clínicas del Laboratorio de Patología Aviar de La Facultad de Medicina Veterinaria y de Zootecnia de la Universidad Nacional de Colombia, 2003-2007, y 2) Álvarez D.C.M.*; Pulido M.**; Pulido A Diagnostico Microbiologico de Casos de Salmonelosis Aviar en Granjas de pollo de engorde en cundinamarca. Reporte de caso.

REFERENCIAS

1. Finger, Alison, Billie Velapatiño, Margaret Kosek, Livia Santivañez, Daiva Dailidiene, Willi Quino, Jacqueline Balqui, Phabiola Herrera, Douglas E. Berg, and Robert H. Gilman. Effectiveness of Enterobacterial Repetitive Intergenic Consensus PCR and Random Amplified Polymorphic DNA Fingerprinting for *Helicobacter pylori* Strain Differentiation. Applied and Environmental Microbiology, 7:16: 4713–47. 2005.
2. Desai, Atul R., Devendra H. Shah, Smriti Shringi, Mi-Jin Lee, Ying-Hua Li, Mae-Rim Cho, Jin-Ho Park, Seong-Kug Eo, John-Hwa Lee, and Joon-

Seok Chae^A An Allele-Specific PCR Assay for the Rapid and Serotype-Specific Detection of *Salmonella Pullorum*. Avian Diseases 49:558–561. 2005.

3. Versalovic, James, Thearith Koeuth and James R.Lupski. Distribution of repetitive DNA sequences in eubacteria and application to fingerprinting of bacterial genomes. Nucleic Acids Research, 24:19. 1991.

4. Vadillo, S. Manual de Microbiología Veterinaria. 2002.

EXPERIENCES BEHIND *SALMONELLA* ENTERITIDIS TESTING AT THE CAHFS – TURLOCK BRANCH

RESPALDO CIENTÍFICO DE LA PRUEBA DE *SALMONELLA* ENTERITIDIS EN EL CAHFS, SUCURSAL TURLOCK

B. R. Charlton^A, Cathy Bauer^A, L. Effinger^B, and H. Kinde^C

^ACalifornia Animal Health and Food Safety Laboratory System - Turlock Branch, University of California, Davis, P.O. Box 1522, Turlock, CA 95381

^BOregon Department of Agriculture – Animal Health Laboratory, 635 Capitol St. NE, Salem, Oregon 97301

^CCalifornia Animal Health and Food Safety Laboratory System – San Bernardino Branch, University of California, Davis, San Bernardino, CA 92408

RESUMEN

Salmonella enterica, serotipo enteritidis (SE) ha sido una causa importante de enfermedad alimentaria asociada con el consumo de huevo entero crudo (1). Los programas de aseguramiento de la calidad del huevo han desempeñado un papel de gran importancia en la reducción de estos problemas (2). En los laboratorios de diagnóstico tradicionalmente se han utilizado los métodos de cultivo para el diagnóstico de SE. El Plan Nacional de Mejoramiento Avícola (NPIP) de EE.UU. ha reconocido al cultivo secundario retardado con medios de enriquecimiento (DSE) como el procedimiento recomendado. La introducción reciente de métodos moleculares ha facilitado la detección de esta bacteria y ha acortado de manera importante el tiempo requerido para el diagnóstico. En esta charla presentaremos nuestras observaciones y experiencias con el cultivo y la detección molecular de SE en el ambiente de las aves ponedoras.

SUMMARY

Salmonella enterica serotype Enteritidis (SE) has been a major cause of food-borne illness and has been associated with the consumption of raw shelled eggs (4). These illnesses began in 1978, spread across the US over the following decade and then began declining in 1996. Egg quality assurance programs probably played a major role in this decline (2). In 1994, the California Egg Quality Assurance Plan (CEQAP)

(<http://animalscience.ucdavis.edu/Avian/ceqap.html>) was developed and consists of about 20 separate components. Two components involve laboratory testing for SE: 1) chick paper swabs to ensure incoming birds are free of SE and 2) environmental drag swabs to monitor the birds environment for SE. This testing has traditionally been performed by culture methods (5). The delayed secondary enrichment (DSE) culture procedure is the recommended procedure recognized by the National Poultry Improvement Plan (NPIP). This procedure takes approximately 10 working days to complete to the *Salmonella* Group level. *Salmonella* serotyping can add an additional 2 to 4 weeks to confirm an SE was isolated. A cost analysis of this test, performed in 2004, is dependent on the results. A negative for *Salmonella* result costs \$30.14, a *Salmonella* sp. not Group D result costs \$41.58 and *Salmonella* sp. Group D isolated and serotyped costs \$80.62.

California Animal Health and Food Safety (CAHFS) Laboratory – Turlock Branch has parallel tested a PCR based SE detection procedure with the DSE culture procedure in 2002 to 2006. In mid-2006, CAHFS began utilizing the PCR based test as a screening test for the detection of SE on drag swabs from environmental sources and chick papers. This SE-PCR test has a turn-around-time of 3 to 4 days and a cost of \$15.00. This test is now undergoing NPIP validation along with a Group D *Salmonella* real-time PCR procedure (3). The validation involves the

collection of field drag swab samples from commercial layer facilities and testing by three laboratories, CAHFS – San Bernardino, CAHFS – Turlock, and the Oregon Department of Agriculture. Seventy three samples from five premises were collected. Three premises were known to be infected with SE and two were attempting to clean-up their facilities. Two premises had no history of SE. The two premises with no history of SE tested negative for both procedures by all three laboratories on all 42 samples. Thirty one samples were tested from the three premises with a history of SE and 20 samples tested positive. Both the traditional PCR procedure and the RT-PCR procedure identified all 20 positive samples when all three laboratory samples were combined. The DSE culture method was only performed at CAHFS – Turlock and identified only 5 of the 20 positive samples. Preliminary conclusions indicate both PCR methods are compatible and much more capable of identifying positive SE drag swabs.

REFERENCES

1. Charlton, B. R., Walker, R. L., Kinde, H., Bauer, C. R., Channing-Santiago, S. E., Farver, T. B. Comparison of a *Salmonella Enteritidis*-specific

polymerase chain reaction assay to delayed secondary enrichment culture for the detection of *Salmonella Enteritidis* in environmental drag swab samples. Avian Dis. 49:418-422. 2005.

2. Mumma A., Patricia M. Griffin, Martin I. Meltzer, Chris R. Braden, and Robert V. Tauxe. Egg Quality Assurance Programs and Egg-associated *Salmonella Enteritidis* Infections, United States. Emerging Infectious Diseases • www.cdc.gov/eid • Vol. 10, No. 10, October 2004.

3. Seo, K. H., L.E. Valentin-Bon, R. E. Brackett and P. S. Holt. Rapid, Specific Detection of *Salmonella Enteritidis* in Pooled Eggs by Real-Time PCR. J Food Prot 67:864-869. 2004.

4. St Louis M. E., D. L. Morse, M. E. Potter, T. M. DeMelfi, J. J. Guzewich, R. V. Tauxe and P. A. Blake. The emergence of grade A eggs as a major source of *Salmonella enteritidis* infections. New implications for the control of salmonellosis. JAMA. 259:2103-7. 1988.

5. Waltman, W.D., R. K. Gast, and E. T. Mallinson. Salmonellosis. 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, W. M. Reed, eds. Rose Printing, Tallahassee FL. Pp.4-13. 1998.

A SURVEY OF *SALMONELLA* SEROTYPES FOUND IN ENVIRONMENTAL AND FEED INGREDIENT SAMPLES

ENCUESTA SOBRE LOS SEROTIPOS DE *SALMONELLA* ENCONTRADOS EN MUESTRAS AMBIENTALES Y DE INGREDIENTES ALIMENTICIOS

S. Gustin and J. Schultz

Cobb-Vantress, Inc., Siloam Springs, AR

RESUMEN

Las industrias de reproductoras primarias y de aves comerciales están ahora bajo presión para eliminar o manejar la *Salmonella* en sus pies de cría. En Estados Unidos el principal énfasis que se ha hecho para controlar la a los gérmenes de este género en las parvadas de reproductoras se ha centrado en la correcta limpieza de las casetas, la bioseguridad y la vacunación. No obstante, una vez que la incidencia de parvadas positivas está en un nivel muy bajo, con frecuencia se presenta la introducción de aislamientos nuevos o poco comunes de *Salmonella* spp., obligándonos a examinar áreas no convencionales por las que se pueda introducir este germen. En el presente trabajo presentaremos los resultados de 2 años de

muestreos ambientales y de ingredientes alimenticios, con ejemplos de casos clínicos reales y las estrategias de intervención.

INTRODUCTION

Commercial poultry production is currently under pressure to reduce levels of *Salmonella* in product destined for the consumer. Both primary breeding companies and commercial integrators are using a variety of strategies to combat colonization of flocks with *Salmonella* serotypes that may transfer to progeny. Unfortunately, little data exists on *Salmonella* spp. that may be found in poultry house exterior environments and in the feed milling process. The

purpose of this study was to determine which serotypes were found in a monitoring program of one feed mill and a broiler breeding complex environment.

MATERIALS AND METHODS

The sampling in both the feed mill and poultry house exterior environments was done utilizing drag swab sponges (Medical Wire and Equipment Co.), consisting of a 50cm² blue sponge swab pre-moistened with sterile skim milk. Feed raw ingredients were either sampled by the same sponge method or as delivered materials submitted to the laboratory.

Cultural methods used were as described in the USDA National Poultry Improvement Plan methods for Isolation and identification of *Salmonella* in environmental samples. A pre-enrichment 1:10 dilution of sample in Buffered Peptone Broth (BPW) was incubated at 37°C for 18-24 hours, followed by inoculation into both modified semisolid Rappaport-Vassilades (MSRV) Media and Tetrathionate (TT) enrichment media for incubation at 42°C for 18 to 24 hours. This was followed by inoculation of each selective enrichment media onto *Salmonella* selective plating medias, Brilliant Green Novobiocin and XLT-4. They were then incubated at 37°C for 18 to 24 hours at which point physical examination for *Salmonella* occurred. Suspect *Salmonella* was identified by serological methods internally and confirmed by NVSL.

RESULTS AND DISCUSSION

The most common serotypes found in the feed milling raw ingredients and feed milling environment were (in decending order): *Mbandaka* (18.7%), *Seftenberg* (16.0%), *Havana* (6.9%), *Orion* (6.4%), *Taksony* (5.0%), *Schwarzengrund* (4.6%), *Montevideo* (4.1%), *Worthington* (3.7%), *Tennessee* (3.2%), and *Livingstone* (2.7%). These serotypes are primarily from the C1 and E4 serogroups. *Salmonella* serotypes that have been found to be of significance in broiler carcass rinses (1) were found, but at a much lower frequency. However, most of the aforementioned serotypes in the feed milling ingredients and environment have been anecdotally found to be poor colonizers of broiler breeding stock.

The most common serotypes found in the poultry house exterior environment were (in decending order): *Seftenberg* (20.0%), *Heidelberg* (11.9%), *Schwarzengrund* (9.4%), *Bareilly* (6.9%), *Typhimurium* and 4, 5, 12:i- (5.6%), *Orion* (5.0%), *Enteritides* (4.4%), *Mbandaka* (3.8%), and *Kentucky* (3.8%). Several of these serotypes found in the external environment pose a more serious risk as they are much more proficient colonizers of broiler breeders and are often found on broiler carcass rinses in the commercial industry.

REFERENCES

1. Food Safety and Inspection Service, USDA. 2007. http://www.fsis.usda.gov/PDF/Q1-2_2007_Salmonella_Serotypes.pdf.

MONENSIN ON QUANTITATIVE REDUCTION OF *SALMONELLA* IN THE GI TRACT OF TURKEYS

USO DE LA MONENSINA PARA LA REDUCCIÓN CUANTITATIVA DE *SALMONELLA* EN EL TRACTO GASTROINTESTINAL DEL PAVO

K. V. Nagaraja, Binu Velayudhan, and Anil Thachil

Veterinary and Biomedical Sciences, University of Minnesota, Saint Paul, MN

RESUMEN

Investigamos tres concentraciones diferentes de monensina sobre la reducción cuantitativa de *Salmonella* en pavos. La importancia del presente estudio es que si la monensina reduce la carga de *Salmonella* en los pavos tratados, aumentará la inocuidad alimentaria para los consumidores.

El estudio se diseñó para utilizar 500 pavos, con el fin de obtener cuatro réplicas experimentales. En cada experimento se utilizarían 125 pavos, por lo que se propusieron cuatro réplicas con el fin de analizar la capacidad de reproducir los datos, con el fin de interpretar los resultados de manera precisa.

Resultados. Se presentará la significancia y los detalles del estudio. En pocas palabras, 1) Se observó una diferencia significativa ($P < 0.05$) entre las aves tratadas o no con monensina a razón de 75 y 90 g/tonelada de alimento, en la reducción de *Salmonella senftenberg*, en los ciegos de las aves infectadas. 2) Se encontró una diferencia significativa entre las aves tratadas o no con monensina, a razón de 90 g/ton de alimento, en la reducción de *Salmonella* en el intestino delgado de las aves infectadas. 3) No se encontraron diferencias significativas entre las aves no tratadas con monensina y las que la recibieron a dosis de 60 g/ton de alimento, en la reducción de *Salmonella senftenberg* en los pavos infectados, 4) La reducción de *Salmonella* varió grandemente entre los tejidos. El uso de 75 y 90 g de monensina por tonelada de alimento redujo con mayor efectividad el número de microorganismos en el ciego que en el intestino delgado.

SUMMARY

The specific objective of this project was to examine the effect of three different concentrations monensin on quantitative reduction of *Salmonella* in turkeys. The relevance of this study is that if monensin reduces the *Salmonella* load in treated turkeys, it will increase the safety of food to the consumers.

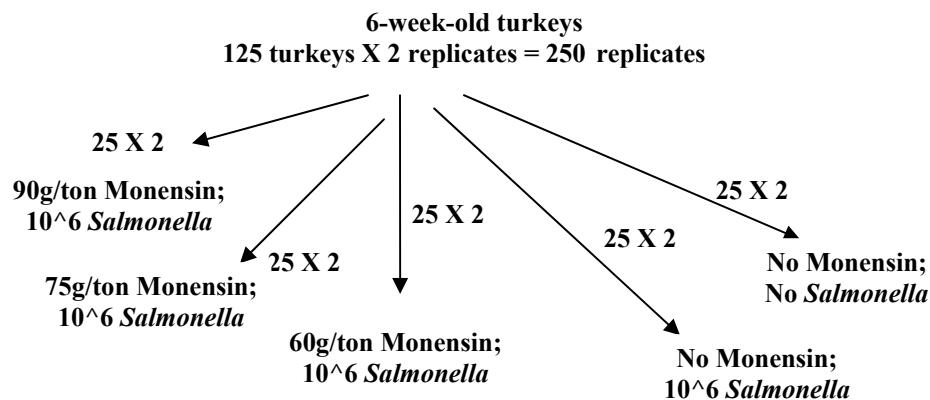
In the past, we had conducted pilot studies on the effect of monensin on *Salmonella* and had found very encouraging results in the reduction of intestinal carriage of *Salmonella* in turkeys post-treatment with monensin. This study was designed to use 500 turkeys for the four replicates of the experiment. Each

experiment would utilize 125 turkeys and four replicates were proposed to analyze the reproducibility of the data for accurate interpretation of the results.

One hundred twenty five five-week-old turkeys were procured from a farm with no history of salmonellosis. They were housed in the isolation rooms in the Research Animal Resources (RAR) facilities in the College of Veterinary Medicine at the University of Minnesota. After an acclimatization period of one week, birds were divided into five groups, 1 through 5. At six weeks of age, birds in groups 1, 2, and 3 were treated with monensin at 60, 75, and 90g/ton of feed respectively. Birds in groups 4 and 5 were not treated with monensin. At three days post monensin treatment birds in groups 1, 2, 3, and 4 were orally inoculated with 1×10^5 *Salmonella* per bird. Birds in group 5 were kept as no-monensin and no-*Salmonella* inoculated controls. At 2, 7, 12, and 17 days post monensin treatment 5 birds from each group were sacrificed with CO₂ inhalation and samples such as liver, spleen, ceca and small intestine were collected for the quantitative estimation of *Salmonella* in the gut. In this experiment birds were kept in the isolation rooms for an over all period of 4 weeks.

The results from each group were compared and analyzed statistically. In order to show the experimental reproducibility of this study and improve the reliability of our results we conducted four replicates in total. This necessitated the use of 500 turkeys (5 X 100) in the experiment This model has previously been used to investigate similar objectives (1,2).

EXPERIMENTAL DESIGN



- 3 days post monensin treatment, birds were inoculated orally with nalidixic acid resistant *Salmonella senftenberg* at the rate of 1×10^6 cfu/bird.
- At days 2, 7, 12, and 17 days post infection, 5 birds from each group were sacrificed and liver, spleen, ceca and a small piece of small intestine were collected.
- A 10% homogenate was prepared in PBS with each sample and serial dilutions were prepared in PBS.

- 10^{-1} , 10^{-2} , 10^{-3} , 10^{-4} , and 10^{-5} dilutions were plated on BGA containing 150ug/mL of nalidixic acid.
- Plates were incubated at 37°C for 48 hrs and the colonies were counted and tabulated.
- The data were analyzed for the statistical significance of the results.

RESULTS

Reisolation and quantitation of *Salmonella senftenberg* from tissues collected from infected birds with and without monensin supplementation.

Experiment 1. (Average of first two replicates).

| DPI | 90g/ton Mon; 10^6 <i>Salmonella</i> | | 75g/ton Mon; 10^6 <i>Salmonella</i> | | 60g/ton Mon; 10^6 <i>Salmonella</i> | | No Mon; 10^6 <i>Salmonella</i> | |
|-----|---------------------------------------|-------------------------|---------------------------------------|-------------------------|---------------------------------------|-------------------------|----------------------------------|-------------------------|
| | Caeca (Cfu/g) | Small intestine (Cfu/g) | Caeca (Cfu/g) | Small intestine (Cfu/g) | Caeca (Cfu/g) | Small intestine (Cfu/g) | Caeca (Cfu/g) | Small intestine (Cfu/g) |
| 2 | 320 | 11 | 1144 | 67 | 2310 | 210 | 2530 | 80 |
| 7 | 120 | 30 | 760 | 50 | 2520 | 110 | 2240 | 110 |
| 12 | 30 | 0 | 60 | 3 | 420 | 41 | 2460 | 240 |
| 17 | 3 | 0 | 21 | 0 | 12 | 0 | 33 | 0 |

Experiment 2. (Average of the second 2 replicates).

| DPI | 90g/ton Mon; 10^6 <i>Salmonella</i> | | 75g/ton Mon; 10^6 <i>Salmonella</i> | | 60g/ton Mon; 10^6 <i>Salmonella</i> | | No Mon; 10^6 <i>Salmonella</i> | |
|-----|---------------------------------------|-------------------------|---------------------------------------|-------------------------|---------------------------------------|-------------------------|----------------------------------|-------------------------|
| | Caeca (Cfu/g) | Small intestine (Cfu/g) | Caeca (Cfu/g) | Small intestine (Cfu/g) | Caeca (Cfu/g) | Small intestine (Cfu/g) | Caeca (Cfu/g) | Small intestine (Cfu/g) |
| 2 | 110 | 11 | 340 | 36 | 1850 | 64 | 1770 | 42 |
| 7 | 140 | 13 | 340 | 55 | 1380 | 46 | 1910 | 35 |
| 12 | 17 | 2 | 241 | 37 | 390 | 7 | 1090 | 4 |
| 17 | 2 | 0 | 18 | 2 | 27 | 0 | 12 | 0 |

No *Salmonella* Senftenberg could be isolated from liver and spleen in any of the four groups mentioned above

STATISTICAL ANALYSIS

An ANOVA analysis was run on both the caeca and the small intestine data, using treatment (monensin), day (and their interaction), and group as predictors.

For caeca, analysis showed that monensin was an important factor in reducing the count of *Salmonella*, so we next looked at which treatments are different.

For caeca, (0 and 60g) and (75g and 90g) were not statistically significantly different, but all other treatments are.

So 75g and 90g of monensin caused a reduction in the number of organism in the caeca which was

statistically significant but there was no significant difference between 75g and 90g.

For small intestine, we saw that the difference between (0 and 90) was statistically significant, but all the rest were not.

CONCLUSION

1. There was significant difference ($P < 0.05$) between no-monensin and monensin at the rate of 75 and 90g per ton of feed, in the reduction of *Salmonella senftenberg* in the ceca of infected birds.

2. There was significant difference between no-monensin and monensin at the rate of 90 g per ton of feed, in the reduction of *Salmonella* in the small intestine of infected birds.

3. There was no significant difference between no-monensin and monensin at the rate of 60 g per ton of feed, in the reduction of *Salmonella senftenberg* in infected turkeys.

4. The reduction of *Salmonella* varied greatly between tissues. 75 and 90g of monensin per ton of feed more effectively reduced the number of organisms in ceca than in small intestine.

REFERENCES

1. Cox, N.A., S.E. Craven, M.T. Musgrove, M.E. Berrang, and N.J. Stern. Effect of sub-therapeutic levels of antimicrobials in feed on the intestinal carriage of *Campylobacter* and *Salmonella* in turkeys. *J Appl Poult Res.* 12: 32-36. Species - turkeys. 2003.

2. Craven, S.E., T.S. Cummings, N.A. Cox, M.E. Berrang, and N.J. Stern. Changes in intestinal tract bacteria associated with dietary change from monensin to bacitracin, virginiamycin, or bambermycins in turkeys. *J Appl Poult Res.* 10: 121-127. Species – turkeys. 2001.

COMPARISON OF TEN AVIAN PATHOGENIC *E. COLI* STRAINS IN COMMERCIAL BROILER CHICKENS

COMPARACIÓN DE DOCE CEPAS DE *E. COLI* PATÓGENAS PARA LAS AVES EN PARVADAS COMERCIALES DE POLLO DE ENGORDA

Kalen Cookson^A, Steve Davis^B, and Lisa Nolan^C

^AFort Dodge Animal Health, Overland Park, Kansas

^BColorado Quality Research, Wellington, Colorado

^CDept. of Vet Microbiology & Preventive Medicine, Iowa State University

RESUMEN

Se comparará la patogenicidad de 12 cepas de *Escherichia coli* patógenas para las aves procedentes del estado de Iowa, EE.UU. mediante la inoculación intratraqueal de pollos de engorda comerciales. Los datos que se registrarán serán la calificación de lesiones por colibacilosis, la mortalidad y el peso corporal.

INTRODUCTION

E. coli induced cellulitis and chronic respiratory disease are leading causes of broiler mortality and condemnations at processing. A common perception is that birds succumb to *E. coli* only as a result of previous compromise to local immune defenses and this can enable even commensal organisms to cause disease. However, recent surveys at Iowa State reveal that most *E. coli* isolates coming from diseased flocks

contain a preponderance of virulence genes, as measured by PCR analysis, while commensal fecal isolates tend to contain very few (2). The goal of this study was to compare a variety of avian pathogenic *E. coli* (APEC) organisms for their ability to cause primary disease and mortality in commercial broilers.

MATERIALS AND METHODS

Ten broiler APECs were selected for this challenge study from a large bank of poultry isolates that had previously been characterized by the following attributes: O serotype, presence/absence of 40 virulence genes and phylotype. Based on these criteria, the ten APEC isolates were picked from six of the most common O serotypes and the three most common phylotypes found in the databank.

One-thousand day of age commercial, straight-run broilers were coarse sprayed at day-of-age with an

attenuated Newcastle/bronchitis vaccine, then divided and placed into ten identical solid-wall rooms. Birds were raised on wood shavings and given feed and water *ad libitum* throughout the course of the study. At 38 days of age each room of birds was pared down to 90 viable birds, then subdivided into three different challenge titer groups using wing bands for identification. Eighteen extra birds were placed into a separate room to serve as negative controls. Birds were inoculated intratracheally (IT) with either 7 logs₁₀ (low dose) or 9 logs₁₀ (high dose) of the respective APEC challenge isolate. Birds were monitored for clinical signs and any mortality was examined for lesions. At five days post challenge all groups were weighed and necropsied. Lesions of colibacillosis were scored using the following scale, from none to severe: Pericarditis (0,1), perihepatitis (0,1) and airsacculitis (0,1,2,3).

RESULTS

The eighteen non-challenged controls remained free of disease, as seen by the lack of internal lesions at the termination of the study. Two birds had very mild airsac “suds” (1-score), which is considered normal, especially given the time of year the study was executed (January in Colorado). In contrast, all challenged groups showed varying levels of mortality and high morbidity starting as early as 24 hours post inoculation. Mortality and post-mortem findings are summarized in the Table 1.

Airsacculitis (AS). All ten APECs produced a significant incidence of AS ranging from 20% to 97%. At the high challenge dose, seven of the ten APECs were not significantly different from each other in the incidence of AS they caused. The high-dose challenges tended to yield a higher incidence of AS than the low-dose groups (76% vs. 60%). However, the differences were significant only in three of the ten APECs (#2, 3 and 4). Likewise, the average AS lesion score tended to be more severe in the high-dose groups (2.18 vs. 1.80), but the difference only appeared to be significant in a handful of isolates (#3, 7 and 9).

Mortality and polyserositis. At the high dose, half of the APECs (#2, 6, 7, 8 and 10) caused significant mortality levels. However, only two of these five were still capable of causing significant mortality at the lower dose. The six APECs that were able to cause polyserositis (in general, lesions besides AS) included isolate #5 as well as all five of the APECs that caused significant mortality. Lastly, six of the ten APECs also caused a low incidence of cellulitis.

DISCUSSION

E. coli has generally been regarded as an opportunistic organism that is capable of causing

disease in poultry only after some part of the bird’s natural defenses have been compromised. However, using a respiratory route of (IT) challenge exposure—without any further compromise to the bird—we have been able to reproduce the full range of disease that is seen in the field. The ten *E. coli* isolates that were used in this study were considered APEC based on the presence of numerous putative virulence genes.

All ten APECs caused significant levels of AS, demonstrating the predictive value of PCR analysis of virulence genes. With the exception of one isolate (#5), the severity or incidence of AS did not vary tremendously when using the high-dose 9-log titer. However, three isolates (#2, 3 and 4) showed a significant decrease in AS at the 7-log titer. This suggests that the challenge load can sometimes have a dramatic effect on AS outcome. Perhaps the other APECs saw no reduction in AS at the lower titer because they can cause disease at a much lower exposure level. This is certainly a quality that more virulent strains of other infectious agents often possess.

The ratio of internal lesions to AS lesions varied by APEC isolate, from as low as 1:25 to as high as 1:2, with an average ratio of 1:4—regardless of challenge titer. This ratio may have the potential to rank APECs by relative invasiveness using this respiratory challenge model. Using an IT challenge route, it would seem reasonable to suppose that AS lesions were the result of direct contact on these tissues. However, lesions of internal organs are generally thought to be the result of hematogenous spread. Thus, isolates having a higher ratio of internal organ lesions relative to AS might be considered more capable of reaching and persisting in vascularized areas. Using a cut-off ratio of 1:5 (# birds with internal organ lesions:AS), it is interesting that the five APECs that had ratios <1:5 at both titers were the same five (#2, 6, 7, 8 and 10) that caused significant mortality levels. Of these five, only #6 and 8 (both O18s) were equally lethal at both challenge titers.

A total of six different somatic O serotypes were used in this study: O1, O2, O18 (3), O25, O78 (3) and O111 (see Table 1). The less invasive APECs consisted of one each of O1, O2, O18, O25 and O78. The more invasive APECs consisted of two O78s, two O18s and one O111. Two out of three O78 and O18 APECs were highly invasive and lethal. However, isolates #3 and 4 were relatively unimpressive in their invasiveness and even in their ability to cause AS at the lower dose, showing that APEC serotype does not necessarily correlate to increased virulence.

We previously reported on a broiler challenge study (1) where an O78 challenge strain did not cause cellulitis lesions when given IT, although it caused a high incidence of grade 3 and 4 cellulitis (81%) when injected subcutaneously. Therefore, it was somewhat

surprising when six of these ten APECs showed the ability to cause cellulitis (at a rate of 3-13%) when given IT, despite none of them being known for this characteristic. Whereas the previous study suggested that an APEC must be inoculated under the skin to cause cellulitis, the current study suggests that some APECs may create this lesion from an airborne route of exposure—and, thus, perhaps via hematogenous spread. Future studies focusing on “IP” APECs might better explore the potential of this alternative pathogenesis of cellulitis in chickens.

REFERENCES

1. Cookson, K.C. and S. Davis. *E. coli* challenge study in commercial broilers by either respiratory or skin route of exposure and the effect of prior vaccination with a live attenuated (aro-A) *E. coli*. Abstract 4457. 144th AVMA Annual Convention, Washington, D.C. 2007.
2. Rodriguez-Siek, K.E., C.W. Giddings, C. Doetkott, T.J. Johnson, and L.K. Nolan. Characterizing the APEC pathotype. *Vet Res.* 36: 241-256. 2005.

Table 1. Summary of mortality and *E. coli* lesions related to each APEC challenge isolate.

| APEC isolate ID# | serotype | dose | Airsacculitis % >1 | mean score | Peri-Carditis % | Peri-Hepatitis % | Femoral Head Necrosis | Synovitis % | Cellulitis % | Mortality % |
|------------------|----------|------|--------------------|------------|-----------------|------------------|-----------------------|-------------|--------------|-------------|
| #1 | Hi | | 73 | 2.06 | 3 | -- | -- | -- | 3 | 7 |
| O1 | Lo | | 63 | 1.67 | 3 | -- | -- | -- | 3 | -- |
| #2 | Hi | | 63* | 1.70 | 10 | 7 | 7 | 23 | 3 | 20* |
| O78 | Lo | | 33 | 1.50 | 13 | -- | -- | 7 | 10 | -- |
| #3 | Hi | | 73* | 2.00 | 3 | -- | -- | 7 | 3 | 7 |
| O78 | Lo | | 20 | 0.94 | 3 | 3 | -- | -- | 3 | -- |
| #4 | Hi | | 83* | 2.16 | 13 | 10 | -- | 10 | -- | 13 |
| O18 | Lo | | 30 | 1.23 | 16 | 13 | -- | -- | -- | 3 |
| #5 | Hi | | 48 | 1.52 | 24* | 7 | 3 | 3 | 7 | 14 |
| O25 | Lo | | 63 | 1.76 | 3 | 3 | 3 | 3 | 3 | 3 |
| #6 | Hi | | 97 | 2.83 | 37 | 37 | 30* | 30* | -- | 60 |
| O18 | Lo | | 83 | 2.57 | 27 | 27 | 7 | 7 | 13 | 50 |
| #7 | Hi | | 87 | 2.61 | 17 | 17 | 17 | 20 | -- | 67* |
| O111 | Lo | | 70 | 2.04 | 27 | 33 | 13 | 13 | -- | 17 |
| #8 | Hi | | 73 | 2.17 | 27 | 20 | 13 | 13 | -- | 27 |
| O18 | Lo | | 80 | 2.17 | 20 | 17 | 23 | 27 | -- | 33 |
| #9 | Hi | | 87 | 2.54 | 13 | 7 | -- | -- | 7 | 7 |
| O2 | Lo | | 80 | 1.90 | -- | -- | -- | -- | 3 | -- |
| #10 | Hi | | 76 | 2.24 | 24 | 17 | 3 | 3 | -- | 28* |
| O78 | Lo | | 73 | 2.17 | 27 | 13 | 13 | 13 | -- | 3 |
| Neg. Control | | | -- | 0.11 | -- | -- | -- | -- | -- | -- |

*Lesion incidence between high (Hi) and low (Lo) dose of a given APEC is significantly different ($p < 0.01$).

EFFICACY STUDY COMPARING THE EFFECT OF ADMINISTERING A LIVE *E. COLI* VACCINE BY VARIOUS ROUTES

ESTUDIO DE EFICACIA PARA COMPARAR EL EFECTO DE LA ADMINISTRACIÓN DE UNA VACUNA VIVA DE *E. COLI* MEDIANTE VARIAS VÍAS

Cheryl Gustafson^A, Ken Macklin^B, and Kalen Cookson^A

^AFort Dodge Animal Health, 9225 Indian Creek Parkway, Overland Park, KS 66210

^BAuburn University, 201 Poultry Science Bldg., Auburn, AL 36849

RESUMEN

El objetivo del presente estudio fue comparar la eficacia de una vacuna viva de *Escherichia coli* administrada por diferentes vías. Dado que es una práctica común administrar las vacunas por vías diferentes, se evaluó la eficacia después de la aplicación intramuscular, oral, punción a través de la membrana del ala, aspersión con gota fina y aspersión con gota gruesa. La vacuna se administró a los 15 días y el desafío se realizó a las seis semanas de edad. A los siete días después del desafío todas las aves se sacrificaron para hacerles la necropsia y evaluar las lesiones de colibacilosis.

SUMMARY

Escherichia coli infection is often the cause of peritonitis in long-lived birds such as commercial layers and the cause of high morbidity and mortality in both layers and broilers. Decreases in production caused by *E. coli* peritonitis and other *E. coli* infections can cause significant economic losses to the producer. A review of the literature suggests that respiratory origin colisepticemia is the most common form of avian pathogenic *E. coli* (APEC) infection in poultry. Inhaled coliform-contaminated dust via the sinuses and trachea to the bronchi and air sacs has been implicated as one of the most important sources of infection that frequently develops into colisepticemia. A commercial live *E. coli* vaccine labeled for coarse spray administration has shown to provide protection against field challenges. Since birds are handled at various times in the field there is an opportunity to vaccinate using different administration routes. It is the purpose of this study to look at the efficacy of various routes of administration that are not licensed for a commercial live *E. coli* vaccine.

MATERIALS AND METHODS

SPF white leghorn chickens (228) were randomly divided into 6 treatment groups (fine spray, coarse spray, wing web, oral gavage, eye drop, and control) and reared in battery cages with feed and water available *ad libitum* until the completion of the study. A live *E. coli* vaccine (Poulvac[®] *E. coli*) was administered at 2 weeks of age for all treatment groups except the control group which received no *E. coli* vaccine.

The spray applicator consisted of a wand with a nozzle body adaptor and a pressure gauge. This wand was attached to an electric sprayer. For treatment Group 1, a Hardi #8 spray nozzle with a blue swirl was used at a pump pressure of 60psi to spray at a droplet size of 25 microns. For treatment Group 2, a TeeJet XR 8001 VS spray nozzle was used at a pump pressure of 40 psi to spray at a droplet size of 250 microns. Both nozzles generated a full cone spray pattern. A wing stabber was used for the wing web administration, and a syringe and eye dropper were used for the oral gavage and eye drop administration respectively.

Birds were observed daily for respiratory reactions or any other clinical signs. At 42 days-of-age, all groups were challenged with a pathogenic O78 *E. coli* isolate given intratracheally at 1.29×10^{10} CFU/bird, according to an established challenge model. One week following challenge, at 49 days-of-age, all birds were necropsied and examined for *E. coli* lesions.

RESULTS

Mortality occurred in 31 birds following the challenge with virulent O78 *E. coli*. The treatment that had the most mortality was the unvaccinated control group (10). This was followed by the fine spray group (6), coarse spray group (5), wing web vaccinated group (4), eye drop vaccinated group t (3), and oral gavage vaccinated group (3). None of this mortality data was significantly different.

Airsacculitis (AS) data were analyzed for incidence, severity (scored 0-4), and severity score greater than 1 (2-4). In addition to the airsacculitis data,

the incidence and severity of pericarditis and incidence of perihepatitis was recorded and analyzed.

Table 1. Mean lesion severity score and airsacculitis scores greater than 1 for the six treatment groups.

| Route | Avg. Severity Score | % AS Scores > 1 |
|--------------|---------------------|--------------------|
| Coarse Spray | 1.42 ^a | 47% ^a |
| Eye Drop | 1.47 ^a | 50% ^a |
| Wing Web | 1.53 ^a | 53% ^a |
| Oral Gavage | 1.55 ^a | 55% ^a |
| Fine Spray | 1.74 ^{a,b} | 61% ^{a,b} |
| Control | 2.13 ^b | 82% ^b |

Values within columns with different letters are significantly different at $P < 0.05$ using General Linear Models (GLM)

DISCUSSION

The *E. coli* isolate used as the challenge isolate produced a significant number of moderate to severe airsacculitis lesions. There were more moderate to severe air sac lesions in the non-vaccinated control birds compared to the other five vaccinated treatments. When averaging all lesion scores, the non-vaccinated group was found to have the highest compared to the vaccinated groups. The wing web treatment group had the lowest and least severe rate of internal organ lesions (pericarditis and perihepatitis). This may be due to the vaccine going systemic sooner, leading to more and/or better circulating immunity. It would also be interesting to investigate if this route of administration would lead to better protection for infections such as Infectious Process (IP) in broilers.

With more birds, differences between the treatment groups may be realized and the effect of the vaccine on body weight gain/loss could easily be measured. A seventh and eighth treatment group could be added with one of the groups being vaccinated and the other unvaccinated; both of these treatments would not be challenged with *E. coli*. The use of commercial broilers in place of the SPF leghorns, would give a better measure as to the vaccine's efficacy in that bird type.

The results of this study clearly indicate that various routes of administration of a live *E. coli* vaccine provide protection against the given *E. coli*

challenge. Administering this vaccine by routes other than coarse spray is an off-label use and should not be recommended without veterinary advisement.

REFERENCES

1. Ask, B., E.H. van der Waaij, J.H. van Eck, J.A. van Arendonk, and J.A. Stegeman. Defining Susceptibility of Broiler Chicks to Colibacillosis. *Avian Pathology*. Apr; 35(2): 147-53. 2006.
2. Gibbs, P.S., S.R. Petermann, and R.E. Wolley. Comparison of Several Challenge Models for Studies in Avian Colibacillosis. *Avian Diseases*. 48:751-758. 2004.
3. Peighambari, S.M., D.B. Hunter, P.E. Shewen, and C.L. Gyles. Safety, Immunogenicity, and Efficacy of Two *Escherichia coli* cya crp Mutants as Vaccines for Broilers. *Avian Diseases*. 46:287-297. 2002.
4. Rodriguez-Siek, K.E., Giddings, C. Doetkott, T.J. Johnson, and L.K. Nolan. Characterizing the APEC pathotypes. *Vet. Res*. 36:241-256. 2005.
5. Vandekerchove, D., P. De Herdt, H. Laevens, and F. Pasmans. Colibacillosis in Caged- Layer Hens: Characteristics of the Disease and the Aetiological Agent. *Avian Pathology*. 33:117-125. 2004.
6. Vandekerchove, D., P. De Herdt, H. Laevens, and F. Pasmans. Risk Factors Associated with Colibacillosis Outbreaks in Caged-Layer Flocks. *Avian Pathology*. 33:337-342. 2004.

FRECUENCIA DE ASCAROIDEOS ENCONTRADOS EN AVES PSITÁCIDAS DE LA CIUDAD DE CUERNAVACA MORELOS

ASCARID FREQUENCY IN PSITACINE IN CUERNAVACA, MEXICO

Alicia García E., Juan J. Zarate R., Luís E. Rodríguez T., Gustavo Ortiz M., y Francisco A. Santoyo de E.

Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia, Universidad Autónoma de Nuevo León, Av. Lázaro Cárdenas 4600, Unidad Mederos Monterrey N.L. CP 64890 México

SUMMARY

The purpose of this study was to learn about the frequency of parasitic helminths affecting Psitacine birds held in captivity in the city of Cuernavaca, State of Morelos, Mexico. *Ascaridia* spp. was found as the most frequent parasite. Eggs of this worm were detected by the flotation concentration and the direct coproparasitoscopic methods. Four out of 241 birds sampled were positive to *Ascaridia* spp. eggs, while one pair of birds was positive for *Capillaria* spp. Samples from privately-owned bird collections yielded negative results probably related to cage types, such as flight cages with soil contact and suspended cages with improved hygiene, thus avoiding the accumulation of feces and preventing the clinical expression of parasite infections. The weather could have also influenced these results

RESUMEN

El presente trabajo se realizó con la intención de conocer la frecuencia de parásitos helmintos que afectan aves Psitácidas en cautiverio en la ciudad de Cuernavaca Morelos, encontrando que el parásito mas frecuente fue *Ascaridia* spp. El cuál fue identificado a partir de los huevos detectados por métodos coproparasitoscópicos de concentración por flotación y por método directo. De las 241 aves muestreadas se encontró que cuatro resultaron positivas a huevo de *Ascaridia* spp. Y una pareja de aves positiva a *Capillaria* spp. Es posible que las muestras tomadas de las colecciones particulares hayan salido negativas debido al tipo de jaulas, como las de tipo voladeros y con contacto con el suelo, y las otras son de tipo suspendidas, teniendo mayor higiene, evitando la acumulación de heces en la jaula y por tanto una manifestación clínica de las parasitosis. El clima pudo influenciar éstos resultados.

INTRODUCCIÓN

¿PORQUE PREOCUPARNOS DE LAS AVES DE MÉXICO? Existen muchas razones objetivas para responder esta pregunta. Por un lado, estas aves son

simbólicamente importantes para el mundo. México, es un país megadiverso y su avifauna, con 1050 especies, es una de las más diversas del planeta. (1). La mayoría de nuestras aves Psitácidas en cautiverio pertenecen a tres órdenes: Psitaciformes (guacamayas, loros, cacatúas, cotorras), Paseriformes (canarios, golondrinas), y dos o tres especies del orden Piciformes (tucanes). En raras ocasiones hallamos aves enjauladas pertenecientes a los restantes órdenes, aunque pueden hallarse en aviarios particulares (2). Los aves Psitácidas predominan en las regiones tropicales de América, África, Asia y Oceanía, necesitando de temperaturas cálidas en cautiverio. La mayoría de las especies son monomórficas, siendo necesarios exámenes de ADN o endoscopia para determinar el sexo del ave. (3).

MATERIALES Y MÉTODOS

Características del área de estudio- El municipio de Cuernavaca se encuentra localizado al noroeste del estado de Morelos. El primer lugar donde se llevó a cabo la toma de muestras es en la UMA (Sistema de Unidades para la Conservación, Manejo y Aprovechamiento Sustentable de la Vida Silvestre) del Sr. Javier Braun, la cual cuenta con más de 200 aves. El segundo lugar fue en la colección particular del Sr. Bernardo Castillo, quien cuenta con 33 aves. El tercer sitio en la colección particular del Sr. Ramón Díaz, con un total de 25 aves.

Técnicas Microscópicas Cualitativas utilizadas en este trabajo -Método directo simple: Con una varilla de vidrio se toma una muestra de materia fecal del tamaño de un grano de arroz y se coloca sobre un portaobjeto, agregando unas cuantas gotas de agua destilada y/o Suero Salino Fisiológico, mezclándose; separando las partículas grandes de materia fecal procurando que la preparación quede transparente, se coloca un cubreobjeto y se observa al microscopio. (4). Método de concentración por Flotación- Esta técnica, tiene como fundamento utilizar soluciones con pesos específicos mayores que el agua (1,200-1,300) en donde los huevos con menor peso subirán (flotarán) a la superficie. (4,5).

Resultados- En el presente trabajo se realizaron dos muestreos, el primero de los muestreos se llevo a cabo durante los meses Noviembre-Diciembre, resultando 2 pareja de aves positivas, una con *Ascaridia* spp., la otra con *Capillaria* spp., mientras que el segundo muestreo se llevo a cabo en el mes de Enero, siendo tres parejas de aves positivas con *Ascaridia* spp.

Conclusiones- Las aves en cautiverio en los criaderos son susceptibles a las parasitosis.

Es posible que las muestras tomadas de las colecciones particulares hayan salido negativas debido al tipo de jaulas, ya que en Avix Braun, hay jaulas de tipo voladeros, donde las aves tienen suficiente espacio para volar, teniendo también contacto con el suelo, en cambio las jaulas de las colecciones particulares son de tipo suspendidas, teniendo una mayor higiene, evitando la acumulación de heces en la jaula y por tanto una manifestación clínica de las parasitosis.

Dado que existe mayor densidad de animales en Avix Braun, probablemente, esta carga tenga relación con los resultados. El clima pudo influenciar éstos resultados, ya que Avix Braun se encuentra localizado en una barranca, con gran cantidad de árboles provocando que la temperatura sea más húmeda y fresca, en cambio en las colecciones particulares, las

aves se encuentran en un ambiente más ligero, con menos cantidad de árboles a su alrededor y en un lugar más céntrico.

REFERENCIAS

1. Ceballos, G. y L. Valdelamar. Las Aves de México en Peligro de Extinción. Instituto de Ecología UNAM. Fondo Cultural Económica. CONABIO. Pág. 13, 214. 2000.
2. Steiner, V. Ch; R.B. Davis. Caged Bird Medicine Selected Topics Pág. 87. 1981.
3. Aguilar, R., S.M. Hernandez-Divers, y S.J. Hernandez-Divers. Atlas de Medicina, Terapéutica y Patología de Animales Exóticos. Editorial Inter-médica. Pág. 213-215. 2005.
4. Miller, K.D, J.J. Zárate Ramos, y H. Fimbres Durazo. Manual de Principales Parásitos del Perro y Gato. Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia Universidad Autónoma de Nuevo León. Pág. 5-7. 2002.
5. Hernández, A.A. y E. Romero. Manual de Prácticas de Laboratorio de Parasitología y Enfermedades Parasitarias. Universidad Nacional Autónoma de México Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia. Pág. 1- 4. 1985.

EFFECT OF NITARSONE (HISTOSTAT®) ON ROUNDWORMS IN TURKEYS

EFEECTO DE HISTOSTAT® (NITRASONA) SOBRE LOS NEMÁTODOS DEL PAVO

Steven Clark^{A, C}, Jana Reynolds^B, Chris Tucker^B, and TA Yazwinski^B

^AAlpharma Animal Health, 440 Route 20 East, Bridgewater, New Jersey 08807

^BDepartment of Animal Sciences, University of Arkansas, Fayetteville, Arkansas 72701

^CContact: 336-877-2528 or steven.clark@alpharma.com

RESUMEN

Se llevó a cabo una prueba para ver si Histostat® (nitrasona) tiene beneficios colaterales contra los nemátodos de los pavos. El estudio se realizó de manera controlada en un corral como preventivo antes de la infección con los nemátodos, y como tratamiento después del desafío. Algunas observaciones anecdóticas de campo hacen alusión a que no es necesario usar antihelmínticos en el agua de bebida ni en el alimento cuando las parvadas se tratan con nitrofurazona, aunque su evaluación para esta indicación no se ha reportado en la literatura científica. Con base en el definitivo efecto supresor de Histostat sobre la producción de huevecillos de los parásitos y su

eventual efecto antihelmíntico, demostrado en el presente estudio, parece que este producto tiene propiedades que pueden ser de utilidad para el control de la ascaridiasis en pavos comerciales. Se demostró que Histostat disminuye de manera importante la fecundidad de *Ascaridia dissimilis*, además de reducir la carga parasitaria.

SUMMARY

Anecdotal field observations have occasionally reported that anthelmintics are not needed when flocks are medicated with nitarsona (Histostat®^a). There are no reports in the scientific literature regarding the

effects of nitarsona on roundworms. A trial was conducted to evaluate if nitarsona has ancillary benefits against roundworms in turkeys. Nitarsona was tested in a controlled pen study as a preventative, medicated prior to roundworm infection, and as a therapeutic, medicated post-infection. Nitarsona decreased *Ascaridia dissimilis* fecundity as well as worm

burdens. Based on the suppressive effect of nitarsona on parasite egg production and an eventual anthelmintic effect, it appears that nitarsona has properties that may be of utility in the control of ascariasis in commercial turkeys.

^aHistostat is a trademark of Alpharma Inc.

SEVERE CRYPTOSPORIDIOSIS IN SEVERAL FLOCKS OF CHUKARS RAISED ON WIRE

CRIPOTOSPORIDIOSIS SEVERA EN PERDICES CHUKAR

A. Singh Dhillon

Avian Health and Food Safety Laboratory, 7613 Pioneer Way E, Puyallup, WA 98371
Washington State University

RESUMEN

Se diagnosticó un severo brote de criptosporidiosis en una parvada de perdices chukar (N del T. Perdiz de antifaz, cuyo nombre proviene de la voz que emite. Símbolo nacional de Pakistán) con mortalidad extremadamente alta. El intestino estaba pálido, flácido y lleno de líquido de color amarillo. No se encontraron lesiones significativas en el hígado, el bazo, los pulmones ni los sacos aéreos. La histopatología reveló la presencia de grandes cantidades de microorganismos del género *Cryptosporidium* en las superficies apicales del intestino y la bolsa de Fabricio.

SUMMARY

Severe outbreaks of cryptosporidiosis were diagnosed in several flocks of chukars with extremely high mortality. The chukars were raised in four rooms on wire; the disease was present in a few successive

flocks. The intestine was pale, flaccid and full of yellow colored fluid contents. Moderate to marked crop mycosis was also present. No significant alterations were present in the liver, spleen, lungs and airsacs. Histopathologic alterations present in multiple sections of intestines include flanking on the brush border of enterocytes with a few to numerous, 3-5 microns diameter, deeply basophilic, round cryptosporidial organisms. In severely affected sections, the mucosal epithelium was elevated off the lamina propria by clear spaces which were interpreted as edema fluid. The cellular infiltrate was comprised of small to moderate numbers of eosinophils intermingled with occasional heterophils, variable number of lymphocytes and plasma cells. In some areas, villi were mildly to moderately blunt. Numerous protozoal organisms as described for the intestine were found to be attached to the apical surface of the bursal epithelium. In the affected bursa of Fabricius, lymphoid follicles were moderately atrophied.

CASO CLÍNICO DE CANDIDIASIS EN GUACAMAYO AZUL Y AMARILLO (*ARA ARARAUNA*) NACIDO EN CAUTIVERIO EN UN AVIARIO DE ARGENTINA

A CLINICAL CASE OF CANDIDIASIS IN A BLUE/YELLOW MACAW (*ARA ARARAUNA*) HATCHED IN CAPTIVITY IN AN AVIARY IN ARGENTINA

Hugo Marcantoni^A, Enso Hugo Reinoso^C, Miguel Piscopo^A, Leandro Aicardi^{B,C}, Elena del Barrio^A, Virginia Grillo^A, Maria Verónica Prio^A, y Celina Buscaglia^{A,B}

^ACátedra de Zootecnia Especial III (Aves y Pilíferos), Facultad de Ciencias Veterinarias, Universidad Nacional de La Plata, CC 296 (B190AVW) La Plata, Argentina, E- mail: cb235@yahoo.com

^BComisión de Investigaciones Científicas de la Provincia Buenos Aires, Argentina.

^CCátedra de Micología Médica e Industrial "Prof. Dr. Pablo Negroni", Facultad de Ciencias Veterinarias, Universidad Nacional de La Plata

SUMMARY

An eight-month-old blue/yellow macaw (*Ara ararauna*) already eating by itself, thus not cleaned regularly, showed extreme depression, thick saliva production, and difficult swallowing, therefore wasting. Lesions were observed in the left beak juncture, with a detached portion of the lower jaw horn plate and creamy plaques in the inner oral mucosa, consisting in creamy white-yellowish plaques or pseudomembranes, and secretions. Diagnosis was obtained by the isolation and identification of *Candida albicans* after culturing lesion swabs. *C. albicans* can affect psittacine after predisposing factors such as poor hygiene (the most common cause of oral mycosis in young parrots). The condition was successfully treated with the local application of a nistatine (100,000 U/g) cream for 20 days.

RESUMEN

Un guacamayo azul y amarillo (*Ara ararauna*) de 8 meses de edad, que ya comía solo por lo que no se lo higienizaba periódicamente, presentó abatimiento, falta de vivacidad, producción de saliva muy viscosa, dificultad para deglutir y en consecuencia adelgazamiento.

Se observaron lesiones en la comisura izquierda del pico, con desprendimiento de parte de la placa cornea de maxilar inferior y placas cremosas en la mucosa de la cavidad bucal que consistieron en placas o pseudo membranas cremosas de color blanco amarillento así como secreciones.

El diagnóstico se realizó por medio del aislamiento e identificación del agente en las lesiones, a partir de un hisopado y posterior cultivo. Se aisló y tipificó *Candida albicans*, huésped normal del aparato digestivo de las aves, que puede afectar a psitácidos

cuando se presentan factores predisponentes como la falta de higiene que es la causa más común de las micosis orales en loros jóvenes.

El tratamiento resultó efectivo y consistió en la aplicación local de nistatina 100.000 U/g en forma de crema durante 20 días, es decir hasta la desaparición de las lesiones y nunca recidivó.

INTRODUCCIÓN

Candidiasis, Muguet, moniliasis, son algunos de los términos aplicados a infecciones micóticas de las vías digestivas. La *Candida albicans* es el patógeno más frecuentemente aislado en estas micosis. Otras especies de *Candida* como la *C. Krusei*, *C. Tropicalis* y *C. Parapsilosis* pueden ser otros de los patógenos hallados. Afecta aves de variadas especies, gallinas, pavos, palomas, perdices y como en este caso psitácidos (1, 3).

Las aves jóvenes de todas las especies, son las más afectadas, sus sistemas inmunes están inmaduros y la microflora gastrointestinal está poco desarrollada. En cambio en aves adultas, esta situación ocurre cuando algún factor infeccioso o carencia nutricional debilita sus defensas ya que *Candida albicans* se halla en el aparato digestivo de las aves en forma normal como parte de su flora. En la cría natural, los propios padres pueden infectar a los pichones con el alimento ofrecido, pero esto es poco frecuente, no así en la cría artificial, donde esta infección es mucho más observable. Esto es debido a que entran en juego una cantidad de factores (alimento artificial, mala higiene, etc.) que pueden favorecer el ingreso de la *Candida* al aparato digestivo de la cría.

El caso que se reseña, fue diagnosticado en el mes de junio de 2006 (comienzo del invierno), se refiere a un guacamayo azul y amarillo (*Ara ararauna*) de 8

meses de edad, procedente de uno de los primeros aviarios habilitado de la Argentina. Nacido en cautiverio fue criado artificialmente y ya comía solo por lo que no se lo higienizaba periódicamente. Presentó abatimiento, falta de vivacidad, producción de saliva muy viscosa, dificultad para deglutir y en consecuencia adelgazamiento.

MATERIALES Y MÉTODOS

Se tomaron muestras de mucosa bucal con hisopos de algodón estériles y para su transporte fueron humectados con solución fisiológica estéril.

El estudio micológico incluyó:

a) Observación microscópica directa (D): previo tratamiento de las muestras con Lacto fenol de Amman en frío.

b) Observación microscópica de extendidos: previa tinción por método de Gram

c) Cultivo de las muestras en: Agar glucosado + extracto de levadura (5gr/L) + cloranfenicol (0.05 gr/L) + actidione (0.5 gr/L) y Agar glucosado + extracto de levadura (5 gr/L) + cloranfenicol (0.05 gr/L), ambos en pico de flauta en tubos de ensayo de 170 x 17 mm.

d) Incubación: a 25-28°C y 37°C durante 7-15 días.

e) Tipificación: previo aislamiento, las colonias de levaduras fueron identificadas por sus características macroscópicas y microscópicas. La determinación de especie se realizó a través de test adicionales de fermentación y asimilación de hidratos de carbono y derivados nitrogenados (métodos convencionales).

RESULTADO Y DISCUSIÓN

En este caso clínico un guacamayo azul y amarillo (*Ara ararauna*) de 8 meses de edad presentó lesiones en la comisura izquierda del pico, con desprendimiento de parte de la placa cornea de maxilar inferior y placas cremosas en la mucosa de la cavidad bucal que consistieron en placas o pseudo membranas cremosas de color blanco amarillento así como secreciones.

El diagnóstico se realizó por medio del aislamiento e identificación del agente en las lesiones, a partir de un hisopado y posterior cultivo donde se aisló y tipificó *Candida albicans*. Si bien en Europa la enfermedad tiene una incidencia estacional siendo principalmente en Julio (2), en este caso se observó en invierno.

El tratamiento resultó efectivo y consistió en la aplicación local de nistatina 100.000 U/g en forma de crema durante 20 días, es decir hasta la desaparición de las lesiones que no volvieron a repetirse hasta la fecha, es decir que nunca recidivó.

REFERENCIAS

1. Chute, H.L. Muguet (micosis de las vías digestivas). Cap. 16. 372-374 Enfermedades de las aves. B.W Calnek Editorial Manual Moderno. Segunda edición.

2. Keymer, I.F. Mycosis. Chapter 26. 2nd Edition Diseases of Cage and Aviary Birds. Petrak, M.L. Lea & Febiger. Philadelphia, 601-602, 1982.

3. Kunkle, R.A. Fungal Infections. Chapter 26. 11th Edition Diseases of Poultry, Editorial Board for the American Association of Avian Pathologists. Iowa State Press (E.E.U.U.), pp 896- 899, 2003.

THE FUTURE OF POSTGRADUATE EDUCATION AND TRAINING FOR AVIAN VETERINARIANS

EL FUTURO DE LOS ESTUDIOS DE POSTGRADO Y LA CAPACITACIÓN DE MÉDICOS VETERINARIOS ESPECIALISTAS EN AVES

Charles L. Hofacre^A, Karen Burns Grogan^A, and Trevor J. Bagust^B

^A Poultry Diagnostic and Research Center, Department of Population Health, College of Veterinary Medicine, The University of Georgia, 953 College Station Road, Athens, GA 30602

^B Faculty of Veterinary Science, University of Melbourne, 250 Prince's Highway, Werribee Victoria, Australia 3030

RESUMEN

La Maestría en Medicina de Salud Avícola (MAHM) es un novedoso programa desarrollado

conjuntamente entre la Universidad de Melbourne, Australia y la Universidad de Georgia, EE.UU. Su misión es brindar una oportunidad educativa a un

mayor número de médicos veterinarios para especializarse en salud avícola, a diferencia de los programas existentes que requieren de la capacitación en las instalaciones mismas de las universidades. Conforme continúe creciendo la producción avícola mundial, la demanda de médicos veterinarios altamente especializados en aves rebasará rápidamente los programas educativos existentes en el mundo. En esta presentación mencionaremos los aspectos únicos de este programa, su desarrollo e implementación.

SUMMARY

The need for a constant supply of inexpensive protein sources drives the ever-increasing global poultry market. Worldwide, consumers eat approximately 10 Kg of chicken meat per person per year, corresponding to a production level of 71.8 million tonnes of chicken meat in 2005. To meet the growing demand from consumers, the market must also grow and is predicted to expand to 100.6 million tonnes by 2015, with 60% of the growth occurring in countries such as Brazil, China, and Mexico (3).

The expanding poultry industries in these developing countries have increased the demand for highly qualified poultry veterinarians around the world. As the poultry industries in developing countries expand and emulate production practices in developed countries, the role of the poultry veterinarian will also need to take on more than the traditional roles. Poultry veterinarians have key functions along every step of the production process, including to:

- Develop, implement and manage disease-prevention programs in production and primary breeding companies.
- Monitor breeding, hatching, rearing and slaughter of birds to ensure disease prevention and product quality.
- For companies having facilities in multiple locations, the veterinarian must be able to tailor programs suitable for each geographic location.
- Train personnel within production facilities to implement the disease programs.
- Monitor flock health through data analysis, site visits, and surveillance.
- Insure wholesomeness of final product for assurance of food safety.
- Deal with complex issues such as animal welfare and environmental quality (1).

In order to properly train veterinarians to meet all of these demands in modern poultry production, a novel academic program is emerging as a joint project between the University of Melbourne and the University of Georgia. The Master of Avian Health and Medicine (MAHM) will be a jointly awarded degree for students completing the six semester program. The program, delivered through Avian Health Online™, is designed for the veterinarian who is already employed in the field, and seeking additional education and knowledge. All classes are web-based instruction requiring approximately a 15 hour a week commitment during the 16 weeks of each semester. Learning is accomplished via on-line lectures, assigned readings, on-line discussions and forums, and preparation of assignments and learning exercises. On-line instructors are available for direct questions in discussion forums and students also can interact regularly in the forums to discuss issues they are experiencing in their current positions. Assessments are via on-line quizzes and exams (2).

Advances in technology have allowed development of on-line learning programs for various professionals and poultry veterinarians should not be an exception to this trend. Traditional undergraduate veterinary programs are not able to educate their students in all the skills and competencies that a poultry veterinarian will need to meet their modern job roles in the poultry industry. Advanced academic training allows students to quickly be an asset to their employer as compared to just on-the-job training. Present and future training needs for the number of veterinarians needed globally for the expanding poultry industry is most likely going to be met through web-based programs like the MAHM.

REFERENCES

1. Glisson, J.R. and C.L. Hofacre. The future of veterinary medicine in poultry production. *J. Vet. Med. Educ.* 33: 492-495. 2006.
2. Hofacre, C.L. and T.J. Bagust. Postgraduate education and training for avian veterinarians: Past, Present and Future. *Proceedings of 15th World Veterinary Poultry Association Congress.* Beijing, China. pp 53-58. September 2007.
3. United Nations Food and Agricultural Organization. 2005 Statistics and World Agriculture: Towards 2015/2030. An FAO perspective. 2003. www.fao.org.

PROGRESSION OF PERIPHERAL NEURAL LESIONS IN RIBOFLAVIN DEFICIENCY OF CHICKENS

PROGRESIÓN DE LAS LESIONES NEURALES PERIFÉRICAS EN POLLOS CON DEFICIENCIA DE RIBOFLAVINA

F. A. Uzal^A and G. Cutler^B

^ACalifornia Animal Health and Food Safety Laboratory, San Bernardino Branch, UC Davis, 105 W Central Ave, San Bernardino, CA 92408. e-mail: fuzal@cahfs.ucdavis.edu

^BPoultry veterinarian. Moorpark, CA 93020

RESUMEN

La deficiencia de riboflavina en los pollos causa neuropatía periférica, condición conocida clínicamente como “parálisis de los dedos encorvados”. Presentaremos aquí los resultados de un estudio sobre la progresión de las lesiones en los nervios periféricos de los pollos de siete días de edad con deficiencia de riboflavina. Se enviaron 20 pollas vivas Bovan Brown de 7 días de edad a nuestro laboratorio con historia de menos de 24 horas de parálisis en las piernas. Sacrificamos 4 de estas aves a intervalos de 3 días, les realizamos la necropsia y realizamos análisis histopatológicos, no encontrando ninguno el día 0, pero a los 3 días se detectaron ligeros cambios degenerativos en ambos nervios ciáticos. Estos cambios se hicieron progresivamente más severos los días 6, 9 y 12. Los resultados sugieren que la ausencia de cambios histopatológicos en los nervios ciáticos no descarta la deficiencia de riboflavina, toda vez que las lesiones microscópicas probablemente no sean evidentes en las etapas sobreagudas de esta enfermedad.

SUMMARY

Deficiency of riboflavin in chickens causes peripheral neuropathy; a condition clinically known as “curly-toe paralysis”. We present here the results of a study of the progression of lesions in the peripheral nerves of seven day old chickens with riboflavin deficiency. Twenty, seven-day-old Bovan Brown pullets were submitted alive to our laboratory with a history of less than 24 hr leg paralysis. Four of the birds were euthanized at three day intervals, necropsied, and examined histologically. No histological abnormalities were observed at day 0, but mild degenerative changes in both sciatic nerves were seen at day 3. These changes became progressively more severe at days 6, 9, and 12. These results suggest that absence of histological changes in the sciatic nerves does not rule out riboflavin deficiency, because histological lesions may not be evident in the hyperacute stages of this condition.

(The full length article will be published in *Avian Diseases*.)

PRACTICAL USE OF MOLECULAR TOOLS FOR EPIDEMIOLOGICAL STUDIES OF CURRENT MYCOPLASMA RESPIRATORY PROBLEMS

USO PRÁCTICO DE HERRAMIENTAS MOLECULARES PARA ESTUDIOS EPIZOOTIOLÓGICOS DE PROBLEMAS RESPIRATORIOS ACTUALES

Guillermo Zavala

Poultry Diagnostic and Research Center, Department of Population Health, University of Georgia, Athens, GA

RESUMEN

La infección de campo con *Mycoplasma gallisepticum* (MG) y *Mycoplasma synoviae* (MS) se

ha venido incrementado significativamente en meses recientes en algunas regiones de Norteamérica. Algunas de las cepas de campo recientes de MG han

resultado ser más difíciles de aislar de lo habitual en el laboratorio, por lo que la serología y la detección molecular mediante la reacción en cadena con polimerasa (PCR) se han popularizado mucho para el diagnóstico de *Mycoplasma*. A partir de muchos casos de campo se han amplificado y secuenciado los siguientes genes: el gen *vlhA* de MS y los genes *mgc2* e *IGSR* de MG, utilizando PCR. El examen filogenético de estos genes ha resultado invaluable para ayudarnos a comprender la epizootiología de los brotes causados recientemente en el campo por estos dos gérmenes.

SUMMARY

Field infection with *Mycoplasma gallisepticum* (MG) and *Mycoplasma synoviae* (MS) has increased significantly in recent months in some regions of North America. Some of the recent field MG strains have been more fastidious to isolate in the laboratory than ordinarily seen. Thus, serology and molecular detection using PCR have been at the forefront of Mycoplasma diagnostics. The *vlhA* gene of MS, and the *mgc2* and *IGSR* genes of MG were PCR-amplified and sequenced for multiple field cases. Examination of the phylogeny of such genes proved highly valuable in understanding the epidemiology of recent outbreaks of MG and MS in the field.

INTRODUCTION

Mycoplasma gallisepticum (MG) and *Mycoplasma synoviae* (MS) cause significant economic losses due to respiratory disease, increased mortality and condemnations, and reduced egg production (6). In addition, MS has been associated with arthritis and synovitis (6). Most losses associated with MG or MS in broiler chickens are due increased or complicated respiratory disease and condemnations. Most losses in commercial layers are due to suboptimal egg production. MS infection in broiler breeders is usually asymptomatic, whereas MG infection in broiler breeders may be asymptomatic or may result in respiratory disease, increased mortality and reduced egg production and hatchability. Freedom of MS and MG infection is essential for compliance with provisions dictated by the National Poultry Improvement Plan, and is also required for exporting live poultry and fertile eggs for incubation. Infection with MG and/or MS is treatable with anti-Mycoplasma drugs and field infection has been prevented or mitigated through the use of live Mycoplasma vaccines or bacterins (6). Although MG or MS outbreaks are not uncommon in broiler breeders and broilers, the frequency of outbreaks of MG and MS in meat type chickens has increased significantly in the South

Eastern United States during 2006-2008. Mycoplasma detection methods typically rely on serology, isolation and identification, and polymerase chain reaction (PCR) (3). Recently, nucleotide sequencing of targeted genes of MG and MS has been used to attempt molecular epidemiology studies of Mycoplasma outbreaks. The rapid plate agglutination test (PAT) is typically used as a screening test and is highly sensitive but not very specific (6). The hemagglutination inhibition test (HI) has often been used as a diagnostic test and most laboratories consider a flock infected when the HI titers for MG or MS are $\geq 1:80$. Although isolation and identification is considered the "gold standard", some MG and MS isolates can be difficult to isolate and many might require weeks for a positive identification (S. Kleven, personal communication). Molecular detection of MG and MS has become a standard diagnostic procedure that is very sensitive, rapid, and inexpensive (1-3,5,7,10).

Although the detection methods listed above are useful in Mycoplasma diagnostics and epidemiological studies, none is capable of easily differentiating field and/or vaccine strains of MG or MS. Recently, sequence analysis of PCR products has proven useful in molecular epidemiology studies. MS is typically detected by PCR targeting the *vlhA* gene, which encodes a hemagglutinin/lipoprotein protein (5,8). PCR amplification of MG DNA regions can be done targeting the *mgc2* and *IGSR* regions of the MG genome (1,3,4,7). The *mgc2* region encodes an accessory cytoadhesin protein that is homologous to the P1 protein of *M. pneumoniae* (4). The *IGSR* (intergenic spacer region) is represented by 3 copies in the MG genome (9,10), with each copy being flanked by the 16S and 5S ribosomal RNA coding regions.

The *mgc2* PCR system is sensitive and specific for PCR, but nucleotide sequences contained in *mgc2* PCR products of vaccine strains are often indistinguishable from those of field MG. In contrast, the *IGSR* can be used successfully to differentiate vaccine MG from field MG strains (2,10). It is important to indicate that two strains that differ in their *IGSR* can be considered different, which may be valuable in epidemiological studies. However, due to the proportional shortness of *IGSR* compared to the entire MG genome, two identical *IGSR* sequences may or may not correspond to two different MG strains and thus additional criteria must be applied during epidemiological investigations.

Practical use of DNA sequencing. Multiple outbreaks of MS and MG occurred during 2006 and 2007. Diagnosis was done using the rapid plate agglutination test (PAT), hemagglutination inhibition (HI), Mycoplasma culture and identification (using fluorescent antibody), and molecular detection using PCR. In all cases, MG and MS detection was

accomplished reasonably promptly, but differentiation of field Mycoplasma from vaccine strains, or epidemiological links between field outbreaks was not possible with the panel of tests aforesaid. Thus, sequencing of multiple MS and MG isolates or strains was attempted while targeting the *vlhA* region of MS, or the *mgc2* and IGSR regions of MG. DNA sequence analysis of the corresponding regions proved useful in constructing epidemiological links and also in differentiating field MG from MG vaccine strains in vaccinated or naïve flocks. In one case of MG and MS infection in broiler breeders, it was possible to demonstrate that both organisms were present in backyard birds located adjacently to the affected breeder pullet flocks and in broiler breeders after transfer to the production facilities. It was also possible to demonstrate that MG spread to broiler breeders from yet another company and then to the progeny of broiler breeders from both companies. After some investigation, it was learned that the breeder growers from both companies had contact soon before the outbreak, and that the owner of the backyard birds was a broiler catcher for yet another company.

In another instance, one meat type chicken integrator underwent outbreaks of MG in multiple broiler breeder flocks and as expected, in multiple broiler progeny flocks. Upon sequencing of the *mgc2* and IGSR regions, it was possible to demonstrate that there were at least two separate introductions of MG, and that the MG strains involved were not related to any recently detected MG infection cases in the same geographical region. Finally, it was possible to demonstrate that the MG involved in the two aforesaid introductions was not related to live attenuated vaccine strains.

Thus, MG/MS PCR and DNA sequencing can be useful to: a) rapidly and specifically detect MG and/or MS; b) establish epidemiological links between outbreaks; c) differentiate field MG from vaccine MG strains.

Although DNA sequencing of specific regions in the MG and MS genomes can be extremely useful in epidemiological studies, detection of wild MG in MG-vaccinated flocks remains challenging. Young flocks vaccinated with live attenuated MG vaccines could potentially get superinfected with wild MG. The nucleotide sequences detected may reflect the dominant MG in the sample (field or vaccinal), which could lead to an erroneous interpretation. A situation where clear and rapid differentiation between wild and vaccinal MG may be necessary is exemplified with MG-vaccinated spike breeder males. Before using the MG-vaccinated males for spiking multiple hen flocks it is desirable to prove that they are carriers of vaccinal MG only, and that wild type MG has been ruled out. In practice, this sort of strain discrimination has not been

possible in many instances and thus an optimized method of strain differentiation is needed for dually infected flocks.

REFERENCES

1. Biro, J., N. Erdei, I. Szekely, and L. Stipkovits Differentiation of mycoplasma gallisepticum strains using molecular methods. *Acta veterinaria Hungarica* 54:437-448. 2006.
2. Callison, S.A., S.M. Riblet, S. Sun, N. Ikuta, D. Hilt, V. Leiting, S. H. Kleven, D. L. Suarez, and M. Garcia Development and validation of a real-time Taqman polymerase chain reaction assay for the detection of Mycoplasma gallisepticum in naturally infected birds. *Avian diseases* 50:537-544. 2006.
3. Garcia, M., N. Ikuta, S. Levisohn, and S.H. Kleven Evaluation and comparison of various PCR methods for detection of Mycoplasma gallisepticum infection in chickens. *Avian diseases* 49:125-132. 2005.
4. Hnatow, L.L., C.L. Keeler, Jr., L.L. Tessmer, K. Czymbek, and J.E. Dohms Characterization of MGC2, a Mycoplasma gallisepticum cytoadhesin with homology to the Mycoplasma pneumoniae 30-kilodalton protein P30 and Mycoplasma genitalium P32. *Infection and immunity* 66:3436-3442. 1998.
5. Hong, Y., M. Garcia, V. Leiting, D. Bencina, L. Dufour-Zavala, G. Zavala, and S.H. Kleven Specific detection and typing of Mycoplasma synoviae strains in poultry with PCR and DNA sequence analysis targeting the hemagglutinin encoding gene *vlhA*. *Avian diseases* 48:606-616. 2004.
6. Kleven, S.H. Mycoplasmosis. In: *Diseases of Poultry*. Y. M. Saif, H. J. Barnes, JH. R. Glisson, A. M. Fadly, L. R. McDougald, and D. E. Swayne., ed. Blackwell Publishing, Ames, IA. pp 719-774. 2003.
7. Lysnyansky, I., M. Garcia, and S. Levisohn Use of *mgc2*-polymerase chain reaction-restriction fragment length polymorphism for rapid differentiation between field isolates and vaccine strains of Mycoplasma gallisepticum in Israel. *Avian diseases* 49:238-245. 2005.
8. Mardassi, B.B., R.B. Mohamed, I. Gueriri, S. Boughattas, and B. Mlik Duplex PCR to differentiate between Mycoplasma synoviae and Mycoplasma gallisepticum on the basis of conserved species-specific sequences of their hemagglutinin genes. *Journal of clinical microbiology* 43:948-958. 2005.
9. Papazisi, L., T.S. Gorton, G. Kutish, P.F. Markham, G.F. Browning, D.K. Nguyen, S. Swartzell, A. Madan, G. Mahairas, and S. J. Geary The complete genome sequence of the avian pathogen Mycoplasma

gallisepticum strain R(low). Microbiology (Reading, England) 149:2307-2316. 2003.

10. Raviv, Z., S. Callison, N. Ferguson-Noel, V. Laibinis, R. Wooten, and S. H. Kleven The *Mycoplasma gallisepticum* 16S-23S rRNA intergenic

spacer region sequence as a novel tool for epizootiological studies. Avian diseases 51:555-560. 2007.

INTRASPECIFIC DIFFERENTIATING REAL-TIME PCR FOR *MYCOPLASMA GALLISEPTICUM* LIVE VACCINE EVALUATION STUDIES

EVALUACIÓN DE UNA PCR DE TIEMPO REAL PARA LA DIFERENCIACIÓN INTRAESPECÍFICA DE UNA VACUNA VIVA DE *MYCOPLASMA GALLISEPTICUM*

Ziv Raviv, Scott A. Callison, N. Ferguson-Noel, and Stanley H. Kleven

Department of Population Health, Poultry Diagnostic and Research Center,
The University of Georgia, 953 College Station Rd., Athens, GA 30602-4875

RESUMEN

Mycoplasma gallisepticum causa enfermedad respiratoria y pérdidas en la producción avícola. La inmunización con vacunas vivas de este germen es un enfoque eficaz para reducir la susceptibilidad de las aves a la infección e impedir pérdidas económicas. El desarrollo y la evaluación de vacunas vivas por lo general requieren la utilización de varias cepas vacunales y de desafío en un mismo diseño experimental. Nuestro objetivo fue desarrollar una herramienta que permita la diferenciación absoluta entre diferentes cepas conocidas de *M. gallisepticum*, de una manera cuantitativa. Desarrollamos cinco ensayos de PCR de tiempo real para diferenciar a una de las cinco cepas vacunales comerciales y de laboratorio, a saber: F, ts-11, 6/85, K5831, K5054, y la cepa común de desafío R_{low}, probadas mediante cultivos *in vitro*. También se probó el ensayo K5831 vs. R_{low} con especímenes procedentes de aves vivas que habían sido vacunadas con la cepa K5831 y desafiadas con la R_{low}, pudiendo establecer con éxito la diferencia entre las cepas vacunales y de desafío, de manera cuantitativa. Esta aplicación preliminar del método *in vivo* también nos ha dado luz sobre los posibles mecanismos de protección de la cepa vacunal K5831 de *M. gallisepticum*.

SUMMARY

Mycoplasma gallisepticum causes respiratory disease and production losses in poultry. Vaccination of poultry with *Mycoplasma gallisepticum* live vaccines is an approach to reduce susceptibility to infection and to prevent the economic losses. The development and evaluation of live vaccines usually requires the involvement of several vaccine and challenge strains in the same experimental setup. Our goal was to develop a tool to allow the differentiation between a set of known *Mycoplasma gallisepticum* strains in a quantitative manner. We developed five real-time PCR assays that strictly differentiated between one of the five commercial and laboratory vaccine strains: F, ts-11, 6/85, K5831, K5054, and the challenge strain R_{low} when tested on *in vitro* cultures. The assay K5831 vs. R_{low} was also tested on specimens from live birds that were vaccinated with K5831 and challenged with R_{low}, and successfully differentiated between the vaccine and the challenge strains in a quantitative manner. This preliminary *in vivo* application of the method also shed light on possible protection mechanisms for the *Mycoplasma gallisepticum* K5831 vaccine strain.

(The full-length article will be published in *Veterinary Microbiology*.)

THERMOGRAPHIC EVALUATION OF AEROSOL VACCINATION

EVALUACIÓN TERMOGRÁFICA DE LA UNIFORMIDAD DE LA VACUNACIÓN POR ASPERSIÓN

Daniel Venne and Amer N. Silim

RESUMEN

La aspersión es la vía de vacunación que se utiliza más frecuentemente contra la bronquitis infecciosa debido a la rapidez del procedimiento, la protección de la vacuna contra la destrucción por el ambiente y el estímulo más directo del sistema inmune en el tracto respiratorio. Si la vacunación se aplica de manera desuniforme se pueden producir reacciones recurrentes, lo que aumenta la mortalidad y los decomisos. Dado que la vacunación con frecuencia se realiza con luz de poca intensidad, es difícil evaluar la uniformidad de la vacunación. Analizamos distintos aspersores bajo diferentes ambientes utilizando una cámara termográfica. La nube vacunal causa una reducción transitoria de la temperatura superficial y esto se puede usar para evaluar la uniformidad de la vacunación. Con esto se pueden hacer recomendaciones para mejorar dicha uniformidad y disminuir las pérdidas de producción asociadas con la vacunación deficiente.

ABSTRACT

Aerosol vaccination for bronchitis is more frequently used because of the rapidity of the procedure, protection of the vaccine from destruction by the environment and more direct stimulation of the respiratory immune system. Un-uniform vaccination can lead to rolling reactions and increase mortality and condemnations.

Since vaccination is often done in low light it is difficult to evaluate the uniformity of the vaccination. We evaluated different vaccinators in different environments using a thermographic camera. The vaccine mist causes a transient reduction in surface temperature and can be used to evaluate vaccination uniformity.

Recommendations can thus be made to increase vaccination uniformity and decrease production losses associated with vaccination failure.

INTRODUCTION

The importance of uniform vaccination is especially important in the case of respiratory diseases such as infectious bronchitis or Newcastle disease, which in the case of un-uniform vaccination can cause a rolling reaction. Mass vaccinations of large

populations of birds using live attenuated vaccines are common practice in avian veterinary medicine but are generally not administered by veterinarians. The personnel or growers that administer the vaccine often do not have the knowledge to understand the importance of uniform vaccine administration. We often come to the conclusion that vaccination does not necessarily mean immunization.

Using the images generated by the thermographic camera we have found that it is easier to teach personnel administering the vaccine how to achieve more uniform vaccination and thus a better immunization of the whole population in the barn.

This presentation follows a clinical case from a farm where thermography was used to evaluate vaccination technique following an increase in the condemnation rate on the farm. Among the problems identified on the farm to explain the increase in condemnation, an increase in the coefficient of variation for bronchitis titers was observed as well as a chronically small size in bursas at the end of the grow-out.

Evaluating vaccination technique during aerosol vaccination is complicated by the fact that growers dim the lights during the procedure to keep the birds from moving from the sides of the barns to the center of the barn. The use of dyes in the vaccine can help but the birds tend to move to the center after the vaccination and missed spots are mixed with vaccinated birds and the result are then difficult to interpret.

The thermographic camera works by measuring differences in infra-red radiations emitted by the surfaces it measures and translating this infrared wavelength into temperature measurements. During aerosol vaccination the water that falls on the birds absorbs some infrared energy emitted by the birds and creates a temperature differential that can be recorded by the camera and displayed using different color schemes. Computerized software can also generate data that can be statistically analyzed. We used a fluke Ti40FT model camera and obtained images as presented in Figure 1. The data was then analysed using the smart view software provided by fluke with the camera.

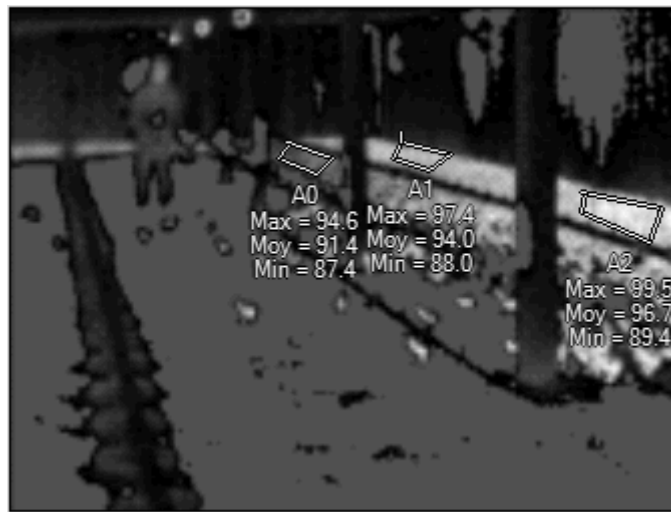
Vaccinations were evaluated using the regular procedures and were evaluated again following

recommendations by the veterinarian according to the thermographic evaluation.

Table 1. Comparison of the farm serological data to our serologic database for infectious bronchitis using the Synbiotics ELISA system.

| | Database | Farm before the problem | Farm during the problem |
|--------------------------------------|----------|-------------------------|-------------------------|
| Number of observations | 656 | 3 | 8 |
| Average titer | 3180 | 2893 | 4361 |
| C.V. of the average titers | 122.81% | 31.03% | 92.2% |
| Average coefficient of variation | 85.55% | 57.25% | 55.91% |
| C.V. of the coefficient of variation | 55.55% | 31.55% | 51.59% |

Figure 1.



Differences in temperature decrease along the walls were observed. Birds that were uniformly vaccinated had an average drop in temperature of 5°F (2.8°C) whereas birds along the sides of the walls only had a 2 to 3°F (1.1 to 1.7°C) decrease in temperature.

A recommendation was made to walk closer to the birds during the vaccination procedure and a more uniform drop of about 4°F in temperature was

observed. The results of the dye evaluation after the thermographic evaluation tend to show a more uniform vaccination with less missed birds also.

Thermographic evaluation of the vaccination procedure on this farm along with other recommendations helped return the condemnation rates to a normal level.

Table 2. Vaccination uniformity using dye.

| | Before adjustments | After thermographic observations and adjustments |
|---------------------------------|--------------------|--|
| Percent birds with no dye (-) | 23 | 7 |
| Percent birds with some dye (+) | 21 | 34 |
| Percent birds with dye (++,+++) | 56 | 59 |

PATHOGEN INACTIVATION BY IN-HOUSE COMPOSTING OF POULTRY LITTER USING AN AERATOR/WINDROWING EQUIPMENT

INACTIVACIÓN DE PATÓGENOS PREPARANDO COMPOSTA EN LA GRANJA CON LA CAMA MEDIANTE UN EQUIPO AERATOR/WINDROWING

Daniel A. Bautista^A, Jose Miguel Ruano^A, George W. Malone^A, Kathy Phillips^A, Rommel Tan^B, and Nathaniel Tablante^B

^AUniversity of Delaware-Lasher Laboratory, Georgetown, DE 19947

^BVirginia-Maryland Regional College of Veterinary Medicine, University of Maryland at College Park
bautista@udel.edu

RESUMEN

Se ha renovado el interés en Estados Unidos por fabricar composta con la cama usada, para resolver los problemas de escasez de cama, costo de la misma y problemas de enfermedades por el uso de cama vieja (o cama "caliente"). Evaluamos la compostación de la cama en la granja, entre parvadas, usando un equipo Aerator/Windrowing. Los resultados preliminares mostraron la reducción o eliminación del material apelmazado y de algunos patógenos comunes en las aves, menos amoníaco y menos escarabajos negros, al tiempo que se mejoró la salud y el rendimiento de las aves. Los análisis microbianos revelaron la inactivación de *E. coli*, *Salmonella enteritidis*, *S. typhimurium*, *S. kentucky*, *Staphylococcus aureus* y la reducción de *Clostridium* spp. Se inactivó el virus de la laringotraqueítis infecciosa pero no el reovirus, el adenovirus ni el virus de la infección de la bolsa de Fabricio. Se pueden alcanzar temperaturas superiores a los 54°C (130°F) en diferentes tiempos. El uso del citado equipo de compostación durante sólo 5 días puede ser suficiente para inactivar a las bacterias y virus comunes de las aves. Esperamos que este procedimiento prolongue la vida de la cama y elimine la necesidad de sacar y almacenar la cama apelmazada, mejorando las características físicas y microbianas de la cama usada.

INTRODUCTION

Litter material shortages and escalating bedding costs have forced the Delmarva poultry industry to change production practices in recent years. Many have postponed cleanouts and prolonged the reuse of litter in poultry houses. Others are transporting materials to Delmarva at distances up to 250 miles and trying to clean out houses annually. Both practices resulted in the emergence of disease problems and reduced flock performance as well as the creation of

numerous problems for nutrient and waste management planning (3). As consecutive flocks are reared on the same litter, accumulation of microbial pathogens in the built-up litter becomes a major problem that impacts flock performance and even food safety programs (1).

During the past five years there has been renewed interest in in-house composting of litter in various parts of the US. Once stockpiled, many litter pathogens are reduced or eliminated due to thermal inactivation, exposure to high ammonia levels, and heat-tolerant bacteria. The reported benefits include reduction or elimination of cake, better quality litter, reduction of ammonia and darkling beetle population, improved bird health, and suggestions that it may alter the release rate of nutrients from litter(2). Research suggested this process eliminates coliforms and *Salmonella*. Infectious Laryngotracheitis virus was inactivated in the litter after in-house windrow composting and heating the house at 100°F (37.8°C) for 120 hr. Aerobic, anaerobic, and enteric bacteria were also significantly reduced from initial levels. Anaerobic and enteric bacteria were significantly lower than uncomposted litter. A significant reduction of spiked *Salmonella*, *Campylobacter*, and *C. perfringens* samples was also reported (2)

We used a commercially available windrowing equipment to evaluate pathogen inactivation and replacement flock performance. Windrows formed with the aeration equipment pulverize the litter, cake and hardpan, aerate and compost the windrows.

MATERIALS AND METHODS

Bacterial inactivation. Bacterial indicators important to poultry health and food safety (*Escherichia coli*, *Salmonella kentucky/typhimurium/enteritidis* cocktail, *Staphylococcus aureus*, *Clostridium perfringens* were inoculated in brain-heart (BHI) infusion slants (in 15 mL screw-cap tubes) and

incubated at 37°C for 16 hr. One set of BHI slants is covered with screw cap, while another set, with gauze, to determine the effect to temperature and temperature and ammonia combined. These tubes are then buried in the windrowed litter 1 ft (0.3 m) deep, 6 in. (15 cm) from a temperature probe. Replicates (n=12) were removed at 4.5 days post-windrow, and the pile was turned. The remaining replicates (n=12) were removed from the pile 2 days later at 6.5 days post-windrow. The slants were then swabbed and cultured for viable bacteria. Litter samples (n=12) were also taken within an hour of windrowing (n=12) and before the windrow was broken and spread throughout the house.

Virus inactivation. Sealed screw-cap 15 mL polypropylene tubes individually containing the following: reconstituted ILT chicken embryo-origin vaccine, and previously frozen tissues with reovirus (intestines from runtting-stunting enteropathy case), adenovirus (liver from inclusion body hepatitis case) and Infectious Bursal Disease virus (bursa) from experimentally infected chicken, were inserted into the windrow at 1 ft. (0.3 m) depth. The tube containing viruses were in duplicates. The first set was removed from the pile at 3.5 days post-windrow and the second at 6.5 days post-windrow. Virus isolation was done in 11-day old SPF embryonated chicken eggs.

RESULTS AND DISCUSSION

The temperatures in the windrows reached 130°F (54.4°C) at the end of the first day of windrowing and peaked at 147°F (63.9°C) on the second day. The litter moisture ranged from 24-29%.

Some samples were lost at 3.5 days post-windrowing, when the pile was turned, decreasing the sample size per time point, from 12 to 7 remaining samples. No viable bacteria were cultured from the *E. coli*, *S. kentucky/typhimurium/enteritidis* mixed culture at 3.5 and 6.5 days post-windrowing. *S. aureus* was cultured 7/7 (viable) in all sealed and gauze-capped tubes at 3.5 days. However, *S. aureus* is partially inactivated in screw-cap (2/7 viable) and gauze-cap

(4/7 viable) tube slants. There was a low incidence of viable *C. perfringens* at 3.5 days post-windrow (1/12 screw cap and 2/12 gauze cap tubes respectively). No *C. perfringens* was cultured (0/7 viable) from screw cap and gauze cap tube samples at 6.5 days. The mean litter counts showed a very low count of coliforms ($0.68\log_{10}$) before treatment. There were no viable coliforms found 6.5 days post-windrow. Total aerobic plate counts were decreased after windrowing (6.89 to $4.98\log_{10}$). The same is true with *Clostridium* spp. (2.32 to $1.47\log_{10}$).

There is a significant inactivation of coliforms, including *Salmonella* spp. using this composting process. *S. aureus* is environmentally tougher as shown in culture and in part deduced from total aerobic counts. *Clostridium* spp. in litter is more resistant *C. perfringens* in the BHI slants. This is explained by *Clostridium* spp. cultured in the litter being mostly in durable spore forms compared to the vegetative forms in the BHI media.

Virus isolation showed that the CEO LT vaccine virus can be inactivated by in-house litter composting temperatures. However, environmentally tougher reovirus, adenovirus, and IBD virus were still viable, indicating limited impact of this process in getting rid of RSS, IBH and Gumboro. Overall, in-house composting may be useful as a practical tool to reduce the incidence of food safety pathogens and poultry respiratory viruses such as ILT. Improved flock performance parameters will be presented.

REFERENCES

1. Blake, J. In the Beginning, There Should Be Litter Management. <http://www.wattpoultryusa-digital.com/wattpoultryusa/2007/05>. 2007.
2. Macklin, K. In-House Windrow Composting. In 2007 Delmarva Breeder, Hatchery, and Growout Conference, Sept 12, 2007. Ocean City, MD. 2007.
3. Malone, G.W. Delmarva Bedding Update. In 2007 Delmarva Breeder, Hatchery, and Growout Conference, Sept 12, 2007. Ocean City, MD. 2007.

STRATEGIES FOR INCORPORATING GAME FOWL PRODUCERS INTO A STATEWIDE BIOSECURITY PLAN

ESTRATEGIAS PARA INCORPORAR A LOS PRODUCTORES DE AVES DE PRESA A UN PLAN ESTATAL DE BIOSEGURIDAD

F. A. Bradley and B. A. McCrea

Animal Science, University of California, Davis, Davis, California 95616

RESUMEN

El Plan de Aseguramiento de la Salud de las Aves de Presa (GFHAP) fue el primer paso para atraer a la comunidad de las aves de presa de California para incorporarlos a los esfuerzos de bioseguridad estatal la confianza en los coordinadores del citado plan y la garantía de la confidencialidad fue esencial para que estos avicultores aceptaran la idea. Se pidió a los participantes que dos veces al año enviaran muestras a los laboratorios de Salud Animal e Inocuidad Alimentaria de California (CAHFS). Para demostrarles el valor de la utilización de estos laboratorios, revisamos con ellos los informes, explicándoles la terminología y haciéndoles sugerencias sobre el uso de esta información para mejorar la salud de las parvadas. Los productores de aves de presa son sumamente competitivos, por lo que nosotros capitalizamos esta característica, ofreciéndoles que las primeras personas certificadas por el GFHAP recibirían el reconocimiento de la Cooperativa de Extensionismo, difundiendo esto en las publicaciones del ramo. Para fomentar la adopción de las prácticas de bioseguridad y las nuevas técnicas de manejo, se realizaron concursos con premios. La combinación de entender el valor de los esfuerzos en materia de bioseguridad y el hecho de experimentar el reconocimiento individual fue la clave del éxito para trabajar con esta comunidad.

ABSTRACT

The Game Fowl Health Assurance Plan (GFHAP) was the first step in attracting California's game fowl community into statewide biosecurity efforts (1). Essential to producer buy-in was a sense of trust in GFHAP coordinators and the assurance of confidentiality. Participants were required to make biannual submissions to the California Animal Health and Food Safety (CAHFS) labs. To demonstrate the value of utilizing CAHFS, we reviewed reports with owners. Terminology was explained and suggestions made as far as using the information to improve flock health.

Game fowl producers are very competitive and we capitalized on that trait. We offered recognition in Cooperative Extension and game fowl publications to the first certified GFHAP individuals. To encourage the adoption of biosecurity practices and new management techniques, contests with premiums were hosted. We were able to successfully work in the game fowl community because breeders experienced the value of biosecurity practices and were individually recognized for their efforts.

Participation of California's large game fowl industry is integral to the success of the state's biosecurity programs. Many game fowl breeders have an inherent distrust of the government, so enlisting their involvement was a challenge.

CASE REPORT

As breeders joined the GFHAP and completed sections of the program (educational sessions, culturing their birds, submitting birds to CAHFS, etc.), we started receiving calls asking if that particular individual was the "first" to complete the requirement. This clientele group is extremely competitive and we were able to capitalize on their competitive nature.

To encourage timely compliance with the program requirements or adoption of suggested practices (e.g., placement of a foot bath at property entrance), we offered incentives to the first individuals to complete the step. These ranged from large laminated biosecurity signs to hats with the GFHAP logo. A newsletter was also developed for disseminating information and for crediting those breeders who were being especially good participants.

DISCUSSION

Our strategies worked and breeders were encouraged to participate and to complete the annual program requirements in a prompt fashion. Most people appreciate being recognized for their efforts and the members of the game fowl community are no exception. Through the use of various incentives and

recognition programs, we have engaged game fowl breeders throughout California. We are now able to conduct meaningful disease surveillance and effectively disseminate biosecurity information.

REFERENCES

1. Bradley, Francine A. and David M. Castellan. Development of a game fowl health assurance program in California. Proceedings of the XXII World's Poultry Congress. Available on CD ROM only. 2004.

EFFECTS OF FEED-BORNE *FUSARIUM* MYCOTOXINS ON HEALTH AND PERFORMANCE OF LAYING HENS

EFFECTOS DE LAS MICOTOXINAS DE *FUSARIUM* GENERADAS EN EL ALIMENTO SOBRE LA SALUD Y EL RENDIMIENTO DE LAS PONEDORAS

S. R. Chowdhury^A, C. K. Girish^A, T. K. Smith^A, and A. E. Sefton^B

^ADepartment of Animal and Poultry Science, University of Guelph, Guelph, Ontario, Canada N1G 2W1

^BAlltech Biotechnology Centre Inc., Guelph, Ontario, Canada N1G 4Z7

RESUMEN

Se llevó a cabo un experimento para evaluar los efectos del uso de granos contaminados naturalmente con una combinación de micotoxinas de *Fusarium*, en el alimento de las gallinas ponedoras. Se utilizaron 144 aves de 45 semanas de edad cuyas dietas fueron: 1) testigo, 2) granos contaminados, 3) granos contaminados + 0.2% de glucomanano polimérico adsorbente de micotoxinas (GMA; Mycosorb, Alltech Inc., Nicholasville, KY, EE.UU.). La administración de los granos contaminados disminuyó la producción de huevo y el consumo de alimento en comparación con los testigos durante las primeras 4 semanas. No obstante, el consumo de alimento se incrementó entre las 4 y 8, y entre las 8 y 12 semanas. La eficacia de la utilización del alimento disminuyó en comparación con los testigos durante los períodos de 4 a 8 y de 8 a 12 semanas, cuando las aves consumían los granos contaminados. La suplementación con GMA previno estos efectos. La administración de granos contaminados incrementó las concentraciones de ácido úrico en la sangre y causó nefromegalia. La administración de GMA en la ración también previno estos efectos. Se concluyó que las gallinas ponedoras son sumamente sensibles al consumo de dietas contaminadas con micotoxinas de *Fusarium*.

INTRODUCTION

Contrasting findings regarding *Fusarium* mycotoxicoses with layers may be due to deoxynivalenol (DON), or to a synergistic effect between DON and other mycotoxins (1,2). Polymeric mycotoxin adsorbents are reported to prevent the

deleterious effects of mycotoxins and prevent subsequent transport to target tissues (3). This study was designed to evaluate the effects of feed-borne *Fusarium* mycotoxins on layer performance, hematology, metabolism and immunological parameters and to evaluate the efficacy of glucomannan mycotoxin adsorbent (GMA).

MATERIALS AND METHODS

One hundred and forty-four 45-wk old ISA Brown laying hens were fed corn, wheat, soybean meal mash diets with the following treatments: control, naturally contaminated grains, with and without 0.2% GMA (Mycosorb, Alltech Inc, Nicholasville, KY) for 12 weeks. Twelve replicates, four individually caged bird/replicate, randomly assigned to each of the three treatments. Feed and water were provided *ad libitum*. Contaminated diets had DON (12.1 ppm), 15-acetyl DON (0.5 ppm) and zearalenone (0.6 ppm). Egg parameters, plasma chemistry, hematology, phenotyping of peripheral blood lymphocytes, serum and bile IgA levels, antibody response to sheep red blood cells (SRBC) and dinitrochlorobenzene (DNCB)-induced cell mediated immune response were evaluated at different time intervals. Data were subjected to ANOVA using the general linear model procedure of SAS in a completely randomized design with sub-sampling. Preplanned contrasts were used to determine the response exhibited by different parameters. Significance was at $P < 0.05$ level.

RESULTS AND DISCUSSION

The reduced performance of hens fed contaminated grains (Table 1) agrees with only some reports (1,3). The use of artificially contaminated grains vs. naturally contaminated grains may account for the difference in results. Increased plasma uric acid concentrations are an indication of renal damage from chronic exposure to *Fusarium* mycotoxins (Table 1). Trichothecene mycotoxins such as T-2 toxin inhibit hepatic protein synthesis, causing aminoacidemia (4), plus leads to increased degradation of free amino acids for energy use, thus increased uric acid synthesis. The observed mycotoxin-induced reduction in peripheral lymphocyte numbers could be considered as a significant finding only if it correlates with functional assays (5). The early increase in DNCB-response in birds fed mycotoxin-contaminated grains may be due to increased lymphocyte trafficking to the site of application. It is possible that *Fusarium* mycotoxins decrease biliary IgA concentrations, despite maintenance of serum IgA concentrations, by inhibiting synthesis of secretory component proteins required for IgA transport into the bile. GMA counteracted the effects of *Fusarium* mycotoxins.

REFERENCES

1. Keshavarz, K. Corn contaminated with deoxynivalenol: Effects on performance of poultry. *J. Appl. Poult. Res.* 2:43-50. 1993.
2. Danicke, S., K.-H. Ueberschar, I. Halle, S. Matthes, H. Valenta, and G. Flachowsky. Effect of addition of a detoxifying agent to laying hen diets containing uncontaminated or *Fusarium* toxin-contaminated maize on performance of hens and on carryover of zearalenone. *Poult. Sci.* 81:1671-1680. 2002.
3. Ramos, A.J., J. Fink-Gremmels, and E. Hernandez. Prevention of toxic effects of mycotoxins by means of non-nutritive adsorbent compounds. *J. Food Prot.* 59:631-641. 1996.
4. Meloche, J.L., and T.K. Smith. Altered tissue amino acid metabolism in acute T-2 toxicosis. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* 210:260-266. 1995.
5. Holsapple, M.P. The plaque forming cell response in immunotoxicity: An approach to monitoring the primary effector function of B lymphocytes. Page 71 in *Methods in Immunotoxicology*. G.R. Burleson, J.H. Dean, and A.E. Munson, ed. Wiley-Liss, New York.

Table 1. Effect of dietary *Fusarium* mycotoxins on performance and uric acid concentrations.

| Diet | Feed consumption - wk | Feed efficiency ^A | Uric acid (μmol/L) |
|---|-------------------------|------------------------------|--------------------|
| | 8 to 12 (g/hen per day) | Wk 8 to 12 | Wk 8 to 12 |
| Control | 117 | 1.90 | 390 |
| Contaminated | 132 | 2.23 | 1030 |
| Contaminated + GMA ^B | 121 | 1.94 | 487 |
| Pooled SD | 7 | 0.17 | 159 |
| <i>P</i> Control vs. Contaminated | 0.0001 | 0.001 | 0.001 |
| <i>P</i> Contaminated vs. Contaminated +GMA | 0.0006 | 0.003 | 0.001 |

^A Feed consumption/egg mass;

^B Polymeric glucomannan mycotoxin adsorbent.

SEPTICEMIA ASSOCIATED WITH *AEROMONAS HYDROPHILA/CAVIAE* IN AN ADULT MALE OSTRICH

SEPTICEMIA ASOCIADA CON *AEROMONAS HYDROPHILA* EN UN AVESTRUZ MACHO ADULTO

M. França^A, R. L. Walker^B, R. Kokka^A, and H. L. Shivaprasad^A

^ACalifornia Animal Health and Food Safety Laboratory System - Fresno Branch

^BCalifornia Animal Health and Food Safety Laboratory System - Davis Branch
University of California, Davis, 2789 S. Orange Avenue, Fresno, CA 93725

RESUMEN

Aeromonas hydrophila se asoció con enteritis necrosante y septicemia en un avestruz negro africano macho de 10 años de edad, aproximadamente, que presentó inapetencia durante tres semanas y signos neurológicos durante dos días antes de morir. Una semana antes, otro avestruz de la misma parvada había muerto con dignos clínicos similares. Macroscopicamente no se observaron lesiones significativas, excepto por congestión en el hígado, los riñones y el bazo. La histopatología reveló severa enteritis necrosante asociada con bacterias Gram negativas, degeneración y necrosis vascular fibrinoide en el hígado, degeneración y necrosis del miocardio. Se aisló *Aeromonas hydrophila* del intestino, el hígado, los pulmones y la tráquea.

INTRODUCTION

Aeromonas hydrophila is a gram-negative, beta-hemolytic, motile and facultative anaerobic bacilli commonly found in aquatic environments. This bacterium is well known to be a primary pathogen in reptiles, fishes, and amphibians. *A. hydrophila* has been described as the causative agent of septicemia in commercial turkeys (2), hemorrhagic enteritis in a ground-hornbill (3), and salpingitis (1) in ducks. There are no reports of septicemia caused by this bacterium in ratites.

CASE REPORT

A deceased 10-year-old male African Black ostrich was submitted to California Animal Health and Food Safety Laboratory System (CAHFS), Fresno Branch, for necropsy and diagnostic examination. Clinical history was inappetence for three weeks, regurgitation and neurological signs two days prior to death. One week before the death of this bird, another ostrich in the same flock had died with similar clinical signs. The diet consisted of pelleted ration and alfalfa

leaves and water *ad libitum*. Grossly, the liver, kidneys, and spleen were moderately congested. The heart had focally extensive pale tan areas in the myocardium and endocardium of the left ventricle, and in the endocardium of the right atrioventricular valve. Histopathology revealed severe necrotizing enteritis in the small intestine associated with large numbers of gram-negative rod-shaped bacteria. The myocardium had moderate multifocal degeneration, necrosis of myocytes and fibrosis. The liver had severe hepatic lipidosis, multifocal fibrinoid vascular necrosis of centrilobular veins and portal vessels. In addition, the epithelium of the glands of the esophagus and external ears had undergone squamous metaplasia. *A. hydrophila/caviae* was isolated in pure culture from the intestine, liver, lungs and trachea. Anaerobic culture performed on liver and intestine also yielded *A. hydrophila/caviae*, but negative for *Clostridium sp.* The presence of necrotizing enteritis associated with large numbers of gram-negative rod-shaped bacteria and the isolation of *A. hydrophila/caviae* in pure culture from intestine and other visceral organs, suggest that this bacterium caused severe enteritis, septicemia, and death in this ostrich. The source of this bacterium was not determined and further characterization of this bacterium is underway.

(A full-length article will be published in *Avian Diseases*.)

REFERENCES

1. Bisgaard, M. Salpingitis in web-footed birds: prevalence, aetiology and significance. *Avian Pathology*. 24:443-452.1995.
2. Gerlach, H., and Bitzer, K. Infection with *Aeromonas hydrophila* in young turkeys. *Deutsche Tierärztliche Wochenschrift*. 78:593-608. 1971.
3. Ocholi, R. A., and Kalejaiye, J.O. *Aeromonas hydrophila* as cause of hemorrhagic septicemia in a Ground-Hornbill (*Bucorvus abyssinicus*). *Avian Diseases*. 34(2):495-496.

ALTERNATIVAS DE PRODUCCIÓN ORGÁNICA 1: SUSTITUCIÓN DE LOS ANTIBIÓTICOS POR MANANOLIGOSACÁRIDOS Y UN CULTIVO DE LEVADURAS Y/O UN MICROORGANISMO VIVO EN LA DIETA DE POLLOS DE ENGORDA

ORGANIC PRODUCTION ALTERNATIVES 1: REPLACING ANTIBIOTICS WITH MANNANOLIGOSACCHARIDES + A YEAST CULTURE AND/OR A LIVE ORGANISM IN BROILER DIETS

R. S. Gómez^A, M. L. Angeles^A, E. M. C. Mojica^B

^ACentro Nacional de Investigación Disciplinaria en Fisiología y Mejoramiento Animal- INIFAP

gomez.sergio@inifap.gob.mx

^BSynbios SA de CV

SUMMARY

The productivity, nutrient ileal digestibility and intestinal morphology of chickens fed mannanoligosaccharides plus a yeast (*Saccharomyces cerevisiae*) culture (MOS+CL) in combination with live *Bacillus subtilis* (Bs) in chickens (1 - 21 days and 29 - 42 days of age) fed an antibiotic-growth-promoter-free diet were. Chickens were housed in batteries (brooding) or individual cages (grow out), and they were assigned to 4 treatment groups under a factorial design, i.e. two MOS+CL levels (0 or 1 kg/ton) x 2 Bs levels (0 or 125 g/ton). The effects of MOS+CL and Bs were independent. Both products improved growth and carcass traits, as well as divergent changes in intestinal digestibility and morphology. In summary, using MOS+CL and Bs in antibiotic-free diets improved growth, apparently using different mechanisms.

INTRODUCCIÓN

Por muchos años se ha reconocido que los antibióticos usados como promotores del crecimiento (APC) promueven el crecimiento eficiente y salud de las aves. Sin embargo, también se han documentado peligros potenciales cuando los APC no son usados apropiadamente, por lo que en la industria avícola se consideran otras alternativas biológicamente seguras. Los componentes de paredes celulares y cultivos de levaduras provenientes de *Saccharomyces cerevisiae* y los microorganismos vivos como *Bacillus subtilis* y *Bacillus licheniformes* han demostrado tener efectos benéficos sobre la productividad de pollos de engorda y se perfilan como potenciales sustitutos de los APC por lo que su inclusión en la alimentación de aves cada vez es más común (2,3,4). Debido a que los mecanismos básicos de acción de los mananoligosacáridos y los microorganismos vivos no

se han dilucidado completamente, y a que se desconoce el efecto de la adición combinada de estos sobre la fisiología de las aves, el presente trabajo se diseñó para evaluar el comportamiento productivo y morfología intestinal en pollos de 0 a 21 días de edad y evaluar la productividad, digestibilidad ileal, retención de nutrientes y morfología intestinal en pollos de 28 a 42 días de edad alimentados con mananoligosacáridos y un cultivo de levaduras (MOS+CL) combinados con *Bacillus subtilis* (Bs) vivo en dietas desprovistas de antibióticos promotores del crecimiento.

MATERIALES Y MÉTODOS

Experimento 1. Se usaron 160 machos Ross B300 alojados en baterías de 1 a 21 días de edad que fueron asignados a una de 16 jaulas cada una con 10 pollos. Se evaluaron cuatro tratamientos, productos de un arreglo factorial 2 x 2, con cuatro repeticiones por tratamiento: Tx1= Dieta control sin antibiótico, con coccidiostato (Nicarbacina, 125 ppm/ton); Tx2= Como 1) + MOS+CL (1 kg/ton); Tx3= Como 1) + Bs (125 g/ton); Tx4= Como 1) + MOS+CL (1 kg/ton) + Bs (125g/ton]). Los días 7 y 21 de edad, dos pollos por jaula fueron sacrificados para el análisis de morfología intestinal.

Experimento 2. Se usaron 72 machos Ross B300 de 29 a 42 días de edad alojados individualmente en baterías. Los tratamientos fueron similares a los usados en el Experimento 1. Se tuvieron 18 repeticiones/tratamiento. Del día 39 al 41 se realizó colecta total de excretas. Al final, se obtuvo muestra del contenido ileal, una porción de duodeno y la canal y sus componentes fueron procesados y pesados. En el contenido ileal y excretas se determinó materia seca (MS), cenizas (C), nitrógeno (N) y energía (E).

Además, en las dietas y contenido ileal se determinó como.

Análisis estadísticos. En ambos experimentos, los resultados fueron sometidos a análisis de varianza siguiendo los procedimientos de los Modelos Lineales Generales del paquete estadístico SAS.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Comportamiento productivo y rendimiento en canal. La adición de MOS+CL o Bs en iniciación mejoró ($P<0.10$) la ganancia diaria de peso a los 21 días. La eficiencia alimenticia fue mayor con MOS+CL o Bs solos o combinados (Interacción MOS+CL y Bs, $P<0.10$). En la etapa de crecimiento, MOS+CL incrementó la ganancia de peso ($P<0.10$), peso ($P<0.10$) y rendimiento de la pechuga ($P<0.01$). La inclusión de Bs mejoró el consumo de alimento ($P<0.01$), ganancia de peso ($P<0.05$), peso ($P<0.05$) y rendimiento de la canal ($P<0.10$) y peso de la pechuga ($P<0.05$). Resultados similares han sido reportados previamente (1,2,4).

Digestibilidad y retención de nutrientes. La digestibilidad ileal de MS ($P<0.10$), C y E ($P<0.05$) fue mayor con MOS+CL sin Bs (interacción de MOS+CL y Bs); la digestibilidad ileal de N fue mayor ($P<0.05$) con MOS+CL. Estos resultados confirman las mejorías en las funciones digestivas que se han observado en otros trabajos con el uso de mananoligosacáridos y levaduras en aves (1,4). La retención de N fue mayor con MOS+CL ($P<0.01$) o Bs ($P<0.05$). Estas respuestas están en concordancia con los aumentos en el crecimiento y rendimiento en canal encontrados en ambos experimentos.

Morfología intestinal. Al día 7, el espesor de la mucosa ($P<0.01$), la altura de las vellosidades y profundidad de las criptas ($P<0.05$) fueron menores con MOS+CL. La menor proliferación de la mucosa observada con MOS+CL contrasta con reportes previos al respecto (4). Al día 21, el espesor de la mucosa ($P<0.05$) y altura de las vellosidades ($P<0.05$) fueron menores con Bs con y sin MOS+CL (interacción de MOS+CL y Bs). Al día 42, el espesor de la mucosa ($P<0.01$), y altura de las vellosidades ($P<0.10$) fueron

menores con Bs sin MOS+CL (interacción de MOS+CL y Bs); el espesor de las vellosidades fue mayor con MOS+CL y Bs (interacción de MOS+CL y Bs; $P<0.10$); la profundidad y grosor de las criptas fueron mayores ($P<0.10$) con MOS+CL y la profundidad ($P<0.05$) de las criptas ($P<0.10$) fue menor con Bs. Los efectos de MOS+CL al día 21 y 42 apoyan otros reportes que indican la inducción de una mayor proliferación de las vellosidades intestinales con la inclusión de MOS en aves.

CONCLUSIONES

Ambos productos mejoraron el crecimiento y las variables de la canal; también provocaron cambios divergentes en la digestibilidad y morfología intestinal. En resumen, el uso de MOS+CL y Bs en dietas desprovistas de antibióticos mejoró el crecimiento, pero en apariencia bajo diferentes mecanismos de acción.

REFERENCIAS

1. Cepero, B.R. Retirada de los antibióticos promotores de crecimiento en la unión europea: causas y consecuencias. XII Congreso bienal AMENA. Puerto Vallarta, Jal. 2005.
2. Hooge, D.M. Meta-analysis of broiler chicken pen trials evaluating dietary mannan oligosaccharide, 1993-2003. Int. J. Poult. Sci 3:163-174. 2004.
3. Parra, F.B.H., C.A. Cortes, G.E. Ávila, y S. Gómez, S. Respuesta en rendimiento cárnico y pigmentación en pollos de engorda alimentados con dietas sorgo-soya adicionada con esporas de *Bacillus subtilis* y *bacillus licheniformis*. Memorias XLII Reunión Nacional de Investigación Pecuaria. Veracruz, Méx. pp 234. 2006.
4. Zhang, A.W., B.D. Lee, S.K. Lee, K.W. Lee, G.H. An, K.B. Song, y C.H. Lee. Effects of yeast (*Saccharomyces cerevisiae*) cell components on growth performance, meat quality, and ileal mucosa development of broiler chicks. Poult Sci 84:1015-1021. 2005.

EFFECTOS DEL TIPO DE PROTEÍNA Y LA INCLUSIÓN DE PAREDES CELULARES Y CULTIVO DE LEVADURAS EN LA DIETA DE POLLOS EN CRECIMIENTO

ORGANIC PRODUCTION ALTERNATIVES 2: EFFECTS OF INCLUDING MANNANOLIGOSACCHARIDES AND A YEAST CULTURE AND A PROTEIN SOURCE IN BROILERS

R. S. Gómez^A, M. L. Angeles^A, R. E. Ramírez^A, R. V. González^A, M. X. Pastrana^B, y M. J. Guerrero^B

^ACentro Nacional de Investigación Disciplinaria en Fisiología y Mejoramiento Animal – INIFAP
gomez.sergio@inifap.gob.mx

^BUniversidad Autónoma de Querétaro

SUMMARY

The purpose of this trial was to evaluate the nutrient digestibility, intestinal morphology and digestive enzymes in broilers fed antibiotic-free diets, with the addition of mannanoligosaccharides plus a yeast culture (MOS+CL) and different protein sources. Seventy five 35 - 49 day-old chickens were housed in individual cages. MOS+CL were added to diets containing soybean meal, canola meal, and dried distillers' grains with solubles (DDGS). Productivity was dramatically reduced in the diet not containing MOS+CL ($P<0.01$). The addition of MOS+CL to the diets containing any combinations with the above-mentioned protein sources resulted in improved broiler growth. The addition of MOS+CL also increased nutrient digestibility ($P<0.01$), decreased intestinal epithelium proliferation ($P<0.01$) and increased the activity of maltase and saccharase in the epithelium.

INTRODUCCIÓN

Las levaduras como *Saccharomyces cerevisiae* y sus productos derivados son de uso común en la alimentación de las aves y se ha comprobado que pueden sustituir a los antibióticos promotores del crecimiento. En la mayoría de los casos, se han observado mejorías en el crecimiento, rendimiento en canal, desarrollo digestivo y en la respuesta inmune (2,3,5). Actualmente, la investigación sobre el uso de promotores del crecimiento del tipo no antibiótico está siendo dirigida a mejorar la eficacia de sus efectos para obtener el mayor beneficio tanto en el crecimiento, salud y bienestar de las aves. Debido a que la mayoría de los ingredientes usados en aves presentan contenidos variables de fibra, y dada la sugerencia de mejorías en la capacidad de digestión en las aves alimentadas con levaduras (1), se plantea el siguiente trabajo con el objetivo de evaluar la productividad, digestibilidad de nutrientes, morfología intestinal y la

actividad de enzimas digestivas en pollos de 35 a 49 días de edad alimentados con diferentes fuentes de proteína y mananoligosacáridos y cultivo de levaduras (MOS+CL) en dietas desprovistas de antibióticos promotores del crecimiento.

MATERIALES Y MÉTODOS

Se usaron 75 machos Ross B300 de 35 a 49 días de edad que fueron asignados en un diseño completamente al azar a cinco dietas que variaron en el contenido de nutrientes y la fuente de proteína: Dieta 1= Alimento a base de sorgo y pasta de soya formulado para cubrir o exceder las recomendaciones de nutrientes de Ross para pollos en finalización, Dieta 2= Alimento formulado con sorgo, pasta de soya, pasta de canola y grano seco de destilería (ddgs) y 10% menos de la energía y lisina que la Dieta 1, Dieta 3. Similar a 2 más la adición de MOS+CL a una dosis de 1 kg/ton, Dieta 4= Similar a 3 pero sin ddgs y Dieta 5= Similar a 3 pero sin la pasta de canola. Como coccidiostato se usó monensina al 20% a una dosis de 500 g/ton. Los pollos fueron alojados individualmente en jaulas elevadas.

Al final todos los pollos fueron sacrificados y se procedió a extraer una porción del íleon para análisis de la actividad enzimática, y otra porción para análisis de morfología intestinal. El contenido ileal fue usado para el análisis de digestibilidad de nutrientes.

Los resultados fueron sometidos a un análisis de varianza para un modelo de bloques completos al azar con 5 tratamientos. La jaula fue la unidad experimental. Las diferencias entre medias fueron evaluadas usando el método de la diferencia mínima significativa.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

No se encontró diferencia estadística en el consumo de alimento, sin embargo, se observa que

aritméticamente el consumo fue menor en los pollos alimentados con la dieta 1 con relación a las otras cuatro dietas. Esta respuesta es normal ya que por el menor contenido de energía y aminoácidos de las dietas 2 a la 5, los pollos consumieron más alimento para tratar de cubrir su requerimiento de nutrientes (Lesson y Summers, 2001).

La ganancia de peso se redujo ($P<0.01$) dramáticamente en los pollos alimentados con la dieta 2 (sin MOS+CL) en comparación con la dieta 1; la magnitud de la caída en la ganancia diaria fue de aproximadamente 28%. La adición de MOS+CL en las dietas 3, 4 y 5 mejoró notablemente la ganancia diaria de peso con relación a la ganancia observada con la dieta 2; la magnitud de la mejora fue del orden del 27%. El efecto positivo de la adición de MOS+CL fue independiente de la fuente de proteína ya que entre las dietas 3, 4 y 5 no hubo diferencias en la ganancia de peso. Sin embargo, la ganancia de peso en los pollos alimentados con las dietas 3, 4 y 5 fue también menor a la mostrada por los pollos alimentados con la Dieta 1, aunque las diferencias se estrecharon ya que en promedio, la reducción de la ganancia solo fue del 8%. En la eficiencia alimenticia se presentó el mismo panorama descrito para la ganancia de peso. La eficiencia alimenticia se redujo ($P<0.01$) un 30%, aproximadamente, en los pollos alimentados con la dieta 2 en comparación con la dieta 1. La adición de MOS+CL en las dietas 3, 4 y 5 mejoró de manera sobresaliente la eficiencia alimenticia con relación a la eficiencia observada con la dieta 2; la magnitud de la mejora fue del orden del 27%. El efecto positivo de la adición de MOS+CL fue independiente de la fuente de proteína ya que entre las dietas 3, 4 y 5 no hubo diferencias en la eficiencia alimenticia. La eficiencia alimenticia en los pollos alimentados con las dietas 3, 4 y 5 fue también menor a la mostrada por los pollos alimentados con la Dieta 1, siendo la diferencia en promedio de 10%.

La digestibilidad ileal de materia seca ($P<0.01$), nitrógeno ($P<0.10$) y energía ($P<0.01$) fue similar entre las dieta 1 y las dietas 3, 4 y 5 que fueron adicionadas con MOS+CL, mientras que la digestibilidad de nutrientes fue menor en los pollos alimentados con la dieta 2 que no fue adicionada con MOS+CL.

Con relación a los cambios en la morfología de las vellosidades el efecto más sobresaliente se encontró en la relación altura de las vellosidades ($P<0.01$) encontrándose la menor respuesta con la dieta 1 (sorgo-soya) y la mayor con la dieta 2 (sorgo-soya-canola-ddgs) lo que sugiere una menor proliferación celular con la primera, y una mayor proliferación de la mucosa intestinal con la segunda dieta sin la presencia de MOS+CL. La adición de MOS+CL a las dietas 3, 4 y 5 redujo la proliferación celular en comparación de la dieta 2 en aproximadamente un 30%. Esto es, que la

presencia de MOS+CL redujo los efectos negativos sobre la pared intestinal de los polisacáridos no amiláceos en las dietas donde se incluyó pasta de canola y ddgs's.

En el duodeno, la actividad específica y total de maltasa y sacarasa fue menor en la dieta 1 ($P<0.05$) mientras que en los otros tratamientos no hubo diferencias estadísticas. En el ileon no se encontraron diferencias entre tratamientos en la actividad específica y total de las enzimas estudiadas. En otros trabajos también se han encontrado aumentos en la actividad de algunas enzimas digestivas (4,5). Sin embargo, los hallazgos en la actividad enzimática no ayudan a explicar las mejoras observadas en la digestibilidad de nutrientes en las dietas con MOS+CL. Se desconoce la razón de esto.

CONCLUSIONES

La adición de MOS+CL en dietas para pollos de engorda desprovistas de antibióticos promotores del crecimiento, formuladas con diferentes fuentes de proteína mejoró la ganancia de peso y eficiencia alimenticia entre 27 y 28%, así como la digestibilidad ileal de nutrientes con relación a una dieta donde no se incluyó MOS+CL.

REFERENCIAS

1. Cepero, B.R. Retirada de los antibióticos promotores de crecimiento en la unión europea: causas y consecuencias. XII Congreso bienal AMENA. Puerto Vallarta, Jal. 2005.
2. Ferket, P.R., C.W. Parks y J.L. Grimes. Benefits of dietary antibiotic and mannanoligosaccharide supplementation for poultry. In: Proc. Multi-State Poultry Feeding and Nutr. Conf., Indianapolis, Indiana, USA. 2002.
3. Hooge, D.M. Meta-analysis of broiler chicken pen trials evaluating dietary mannan oligosaccharide, 1993-2003. Int. J. Poultry Sci. 3:163-174. 2004.
4. Iji P.A., A.A. Saki y D.R. Tivey. Intestinal structure and function of broiler chickens on diets supplemented with a mannan oligosaccharide. J. Sci. Food Agric. 81:1186-1192. 2001.
5. Zhang, A.W., B.D. Lee, S.K. Lee, K.W. Lee, G.H. An, K.B. Song y C.H. Lee. Effects of yeast (*Saccharomyces cerevisiae*) cell components on growth performance, meat quality, and ileal mucosa development of broiler chicks. Poultry Sci 84:1015-1021. 2005.

PARVOVIRUS-LIKE HEPATITIS IN GREY PARTRIDGE (*PERDIX PERDIX*): PRELIMINARY OBSERVATIONS

HEPATITIS CAUSADA POR UN AGENTE SIMILAR AL PARVOVIRUS EN LA PERDIZ GRÍS (*PERDIX PERDIX*): OBSERVACIONES PRELIMINARES

G. Grilli^A, V. Ferrazzi^A, G. Cislighi^A, G. Sironi^A, A. Lavazza^B, and D. Gallazzi^A

^ADepartment of Veterinary Pathology, Hygiene and Public Health, University of Milan, Via Celoria 10, 20133, Milano, Italy, E-mail: daniele.gallazzi@unimi.it

^BIstituto Zooprofilattico Sperimentale della Lombardia e dell'Emilia Romagna, Laboratorio di Microscopia elettronica, Sez. di Brescia, Italy

RESUMEN

Durante la primavera de 2007 se observó un síndrome en una granja de desarrollo de 3,000 perdices (*Perdix perdix*) en el norte de Italia. La enfermedad se caracterizó por depresión, anorexia, enteritis leve y mortalidad baja pero repentina (0.05%) en las aves de 25 a 30 días de edad. La necropsia reveló sufusiones y duodenitis catarral, hígado marmoleado, bazo y bolsa de Fabricio atrofiados en muchas de las aves. Los demás órganos tenían apariencia normal. Se tomaron muestras tisulares apropiadas para análisis bacteriológico, virológico, histopatológico y ultraestructural. Todos los cultivos resultaron negativos a bacterias patógenas específicas. El examen ultraestructural mostró diversos grados de cambios característicos nucleares en el hígado, observándose dentro del material nuclear áreas con mayor densidad de electrones, por lo general cerca del nucleolo y de la membrana nuclear. Con alta amplificación, estas áreas consistían en partículas regulares redondeadas de aproximadamente 20 nm de diámetro. La morfología, la regularidad del tamaño y el acomodo de las partículas sugieren que estos viriones pueden identificarse como similares al parvovirus.

SUMMARY

During the summer 2006 a pathologic syndrome was observed in a rearing facilities of 3,000 partridges (*Perdix perdix*) in Northern Italy. The disease was characterized by depression, anorexia, mild enteritis, and sudden death in 50-day-old partridges. The mortality rate was very low (5%).

Post-mortem examination showed blood suffusions and catarrhal duodenitis. The liver was marbled. Spleen and bursa of Fabricius frequently appeared atrophied. Other organs appeared normal. Appropriate tissue samples were taken for bacteriologic, histopathologic, and virologic

examinations. All bacteriological cultures were negative for specific pathogens.

The negative staining electron microscopy examination of liver and spleen homogenates evidenced the presence of both scattered and grouped small regular roundish particles about 20 nm in diameter. Morphology and regular size of the particles suggested their identification as virions similar to parvovirus.

INTRODUCTION

The grey partridge (*Perdix perdix*) is a medium-sized galliform and the natural populations have declined considerably during the last decades. The grey partridge is listed among species with unfavourable conservation status in Europe (1). Therefore it is necessary to increase the reared partridge release to supplement stocks for shooting, with an increase of the risk to wild populations due to the possible introduction of new diseases into the field. It's important to check mating, incubation, and rearing procedures aimed at monitoring the diseases of this bird.

During the reproductive season 2006 in a farm of Northern Italy an outbreak of a disease was observed in young partridges. The lesions and laboratory examinations pointed out the presence of a parvovirus-like hepatitis similar to that firstly described in Italy on 1994 in reared game pheasants (2).

MATERIALS AND METHODS

During the summer of 2006, a pathologic syndrome occurred in a rearing facilities of 3,000 partridges (*Perdix perdix*) in Northern Italy. The disease was particularly observed in 50-day-old partridges and it was characterized by depression, anorexia, mild enteritis, and sudden death. The course

of the disease was very short and the mortality rate was 5%.

Appropriate tissue samples were taken for bacteriologic, histopathologic and virologic examinations. Bacteriologic examination of liver, intestine, and lung was performed according to standard methods (3).

Virologic examination was made by negative staining electron microscopy (EM) on 10% liver and spleen homogenates in phosphate-buffered saline. Samples were firstly centrifuged to eliminate gross debris and then ultracentrifuged at 89,000 rpm for 15 minutes in Airfuge Beckman. Pelleting was directly performed on 3mm copper grids using specific adaptors. Grids were stained with 2% sodium phosphotungstate (pH 6.8) and examined with a Philips CM10 TEM operating at 80 kV at 28,500x (4).

For histopathologic examination, samples of liver, spleen, bursa, kidney, and intestine were fixed in 10% buffered formalin, dehydrated, embedded in paraffin, sectioned at 5 µm, and stained with hematoxylin and eosin (HE).

RESULTS

The disease appeared in at the end of July and August 2006 and it occurs in young animals (50 day old) from two consecutive hatchings when they were already in outdoor pens. The clinical course was rarely appreciated: most birds were showing depression and anorexia and then suddenly died. At necropsy grossly blood suffusions or pinpoint subcutaneous and muscular scattered pinpoint hemorrhages were detected. The liver was normal in size and consistency but it was pale and mottled due to hemorrhagic suffusions. Spleen and bursa of Fabricius frequently appeared atrophied. Catarrhal duodenitis was often found, with swelling of the intestinal loops. Other organs appeared normal.

All bacteriological cultures were negative for specific pathogens.

The negative staining electron microscopy examination of liver and spleen homogenates evidenced the presence of small, nonenveloped icosahedral viral particles, approximately 18-22 nm in diameter. Morphology and regular size of the particles suggested their identification as virions similar to parvovirus. Virions were present in modest quantities, both as scattered particles and in small groups.

The histopathologic findings observed in the liver were distinctive and similar to those previously detected in the pheasant affected by parvovirus hepatitis (2). Hepatocytes frequently showed necrobiosis and necrosis, with loss of intercellular connections and roundish appearance. Their cytoplasm was homogeneous and more eosinophilic than normal.

The nuclei of many hepatocytes were occupied by acidophilic inclusion bodies. Frequently in areas with more evident necrosis, nuclei were karyorrhectic. Occasionally, a few lymphocytes and plasmacytes infiltrated hepatic cords. Histopathologic changes were also observed a severe lymphocyte depletion of the follicular structure. The intestine showed mild catarrhal enteritis. Other organs did not show significant microscopic changes.

DISCUSSION

An outbreak of inclusion body hepatitis has been observed in young grey partridge during the 2006 hatching season in Italy, characterized by low mortality rate (5%). Liver histopathologic findings and the observation of parvovirus-like particles in the liver homogenates confirm the final diagnosis of viral hepatitis. Similar viral particles have been previously observed in the liver of other avian species. Moreover, parvovirus hepatitis is observed in Derzsy's disease of geese and in the related disease of Muscovy ducks and mallard which are both frequently reported in Europe and China (5,6,7,8,9).

The disease was not similar to any other previously reported in partridges. The outbreak was limited to two sole hatchings during 2006 reproductive season and the disease did not appear the year after (2007) thus making impossible to better describe epidemiological features and improve the knowledge on its pathogenesis.

REFERENCES

1. Hagemeyer, E.J.M. and M.J. Blair. The EBCC Atlas of European breeding birds: their distribution and abundance. T & A D Poyser, London. 1997.
2. Gelmetti, D., M. Fabbi, G. Sironi, G. Grilli, and A. Lavazza. Identification of parvovirus-like particles associated with three outbreaks of mortality in young pheasants (*Phasianus colchicus*). J Vet Diag Invest 8:108-112. 1996.
3. Carter, G.R., and J.R. Cole. Diagnostic procedures in veterinary bacteriology and mycology, 5th ed. Academic Press, San Diego, CA. 1999.
4. Lavazza, A, S. Pascucci and D. Gelmetti. Rod shaped viruslike particles in intestinal contents of three avian species. Vet Rec 125:581. 1990.
5. Gough R.E. Goose parvovirus infection. In: Diseases of poultry, 11th ed. Iowa State Press, Ames, Iowa, USA. pp. 367-374. 2003.
6. Samorek-Salamonowicz, E. and W. Kozdrun. Parwovirozy drobiu wodnego. Zycie Weterynaryjne 11: 744-747. 2006.

7. Diao, Y., G. Lu, F. Zheng, J. Yang, Q. Chen, and Y. Liu. Isolation and identification and characteristics of the pathogen of a new duck plague. *Chinese Journal of Veterinary Science* 26:136-139. 2006.

8. Glavits, R., A. Zolnai, E. Szabo, E. Ivanics, P. Zarka, T. Mato, and V. Palya. Comparative pathological studies on domestic geese (*Anser anser*

domestica) and Muscovy ducks (*Cairina moschata*) experimentally infected with parvovirus strains of goose and Muscovy duck origin. *Acta Veterinaria Hungarica* 53:73-89. 2005.

9. Holmes, J.P., J.R. Jones, R.E. Gough, D. De B. Welchman, M.E. Wessels, and E.L. Jones. Goose parvovirus in England and Wales. *Veterinary Record* 155: 127. 2004.

MODELO DE APRENDIZAJE BASADO EN PROBLEMAS (ABP) CON METODOLOGÍA DE TRIPLE SALTO BASADO EN UN CASO CLÍNICO DE INFECCIÓN DEL SACO VITELINO EN AVESTRIPOLLOS NEONATOS

A PROBLEM-BASED (APB) MODEL WITH TRIPLE JUMP METHODOLOGY USING AN EGG YOLK SAC INFECTION IN NEONATAL OSTRICHES

Marco A. Juárez-Estrada^A y Jaime Esquivel Peña^B

^ADepartamento de Producción Animal: Aves FMVZ-UNAM, Avenida Universidad 3000, Ciudad Universitaria, Del. Coyoacán, México D.F. CP. 04510

^BCentro de Enseñanza, Investigación y Extensión en Producción Avícola FMVZ-UNAM, Salvador Díaz Mirón S/N Col Zapotitlán Tláhuac, México D.F. CP. 13209

SUMMARY

Problem-based learning (ABP for its initials in Spanish) is a poultry clinic learning methodology. A real clinical case from a commercial ostrich farm will be discussed in this presentation, proposing the triple jump evaluation. A Delphi's-based ABP was constructed. The information generated is focused on a 2-phase primary evaluation, generating materials for both the tutor and the student. Time 1 includes setting up the scenario. Time 2 includes the search of information. Time 3 includes complementing the student-provided data for case resolution, after setting up a second scenario. Information search is mostly based on evidence-supported medicine methodology. The evaluation is integrated with the supplementary materials provided by the tutor. Aspects related with the difficulty of ABP triple-jump evaluation will be discussed.

RESUMEN

El aprendizaje basado en problemas (ABP) es una metodología didáctica del aprendizaje en clínica aviar, aquí se considera un caso clínico proveniente de una explotación comercial de avestruces, la evaluación propuesta es por triple salto. El ABP se construyó con base a criterios desarrollados por medio de la técnica

Delphi, la información generada se enfoca a la evaluación primaria presentada en dos fases con generación de material para el tutor y para el alumno. El primer momento incluye el planteamiento del escenario, el segundo la búsqueda de información y el tercero considera la complementación de datos aportados por el alumno para la resolución del caso después de planteado un segundo escenario. La búsqueda de información se basa principalmente en la metodología de medicina basada en evidencia. La evaluación se integra con el material complementario del tutor. Se consideran aspectos de dificultad en la evaluación de los ABP de triple salto.

La información genera conocimiento, la cual es el arma más poderosa para cambiar las circunstancias de los individuos. En la actualidad y bajo el contexto de globalización acelerada que vivimos existen cambios importantes en las tendencias educativas lo cual muestra cada vez más un fuerte impacto sobre la forma de instrumentar el proceso educativo en la educación superior. Las políticas internacionales en educación se han centrado en la promoción para la implementación del enfoque educativo de la educación basada en competencias, lo cual ha conducido a la implementación de metodología de aprendizaje basado en problemas (ABP) y la medicina basada en evidencia (MBE). Existe un consenso general de que el ABP es

un abordaje novedoso de tipo educacional que ayuda a los estudiantes a adquirir un conocimiento integral que al convertir el proceso de aprendizaje en una actividad dinámica favorece la interacción de los elementos que construyen el conocimiento, contribuyendo directamente sobre la motivación intrínseca de los participantes. El aprendizaje basado en problemas es un procedimiento direccional que en contraste a la educación convencional transfiere el control del proceso de aprendizaje del maestro a los estudiantes. En este modelo de enseñanza-aprendizaje, los estudiantes son motivados a generar y persistir en sus propios objetivos de aprendizaje y a seleccionar los recursos de aprendizaje que más se adaptan a sus requerimientos de información. El formato de ABP facilita que los estudiantes se centren en la resolución de un problema planteado secuencialmente facilitando el proceso de aprendizaje. El punto más importante en este modelo es que el maestro como instructor contribuye al proceso de aprendizaje proporcionando únicamente sugerencias sobre aspectos de estudio que permitan al estudiante avanzar cada vez más rápido y por sí mismos, no necesariamente para el cumplimiento de actividades de aprendizaje previamente especificadas.

El ABP se centra en el alumno en sí como un modelo de auto-aprendizaje en oposición al método tradicional donde el modelo se encuentra centrado únicamente en el profesor, quien en este modelo asume un papel de facilitador que contribuye construyendo la base del conocimiento, desarrollando los materiales del modelo de ABP, desarrollando herramientas para la resolución del problema, contribuyendo a lograr una colaboración efectiva al proporcionar las herramientas necesarias para conseguir que el estudiante se adapte exitosamente a largo plazo a la metodología de auto-aprendizaje.

El ABP se caracteriza por que se aplica a pequeños grupos de estudiantes (de 6 a 8), los cuales se reúnen en equipos que son confrontados con problemas. Los estudiantes que se desenvuelven bajo esta metodología, inicialmente se involucran en el análisis de un problema a resolver, aumentando consecuentemente su propia motivación. Un problema consiste comúnmente de una serie de descripción de eventos (escenario) que requieren de una explicación. Esta explicación puede tomar la forma de una descripción de procesos, principios o mecanismos que explican la problemática propuesta.

Cuando se presenta el material de un escenario condensado en un formato los estudiantes inician su trabajo analizando el problema, identifican el problema básico. Discuten el problema tratando de entenderlo a través del sentido común y el conocimiento previo que poseen. Al avanzar en el análisis del problema el estudiante desarrolla herramientas de autopercepción, lo

cual aumenta en el grado de cooperación e interrelación que se obtiene cuando el estudiante trabaja en equipo, analizando los puntos clave del escenario propuesto en el formato de ABP. En este punto de análisis, se espera que surjan una serie de preguntas acerca de los aspectos del problema que se encuentran pobremente entendidos o que no se encuentran suficientemente explicados, se redacta una lista de preguntas, diferencias de opinión y otro tipo de inquietudes que emerjan del análisis inicial. Las preguntas contribuyen a generar los objetivos de aprendizaje, los cuales son perseguidos por los estudiantes por medio del estudio individual auto-dirigido. Las posibles respuestas a las preguntas planteadas son buscadas utilizando textos apropiados a la temática, haciendo consulta de fuentes, libros y a expertos del área en particular, así también a través de búsquedas de literatura actualizada (revistas indexadas), sustentando las hipótesis surgidas. En una siguiente sesión la información recientemente adquirida es intercambiada y sintetizada, los estudiantes verifican si después de esta actividad de consulta son capaces de proveer mejores explicaciones al problema (menos superficiales), o bien pueden formular nuevas preguntas de mayor refinamiento. Si el problema bajo investigación es de tipo clínico, después de generar un diagnóstico presuncional el grupo puede tratar de formular preguntas directas, o bien sugerir exámenes complementarios de laboratorio con la finalidad de llegar a un diagnóstico final.

El formato de ABP, se construye con base al método científico, plantea una serie de metodología que contribuye a un eficiente planteamiento y resolución de un problema, frecuentemente en nuestra área, este es de índole médico, sin descartar los de tipo productivo.

Operativamente el formato de ABP plantea un escenario (anamnesis) que incluye la descripción pormenorizada del problema, a partir de allí el alumno inicia el estudio y resolución del mismo, el tutor le proporciona al estudiante un material inicial, el estudiante estudia lo analiza y metodológicamente con base a sus conocimientos previos procede a desprender las pistas, hechos y datos orientadores, posteriormente en el mismo momento y con base al análisis de las pistas, hechos y datos más importantes desprendidos del escenario plantea puntualmente cuál es el problema, identificado este lo expresa por medio de una serie de interrogantes planteados por medio de preguntas. Posteriormente el estudiante formula una serie de hipótesis a las mismas, da explicaciones de los hechos y sugiere diagnósticos presuncionales. El estudiante debe identificar a su vez las áreas de estudio que involucra el problema analizando su alcance a través de plantear una serie de objetivos que deben alcanzarse con la ejecución de la metodología de ABP.

Con fines de evaluación se determina el tipo de fuentes de información consultada. Después de este primer salto (Aplicación inicial del ABP), al estudiante se le plantea un segundo escenario, bajo el mismo formato del primero. En este segundo escenario el tutor proporciona datos complementarios al escenario inicial, en este momento se evalúa el primer material generado por el estudiante, con la finalidad de verificar que tan acertado se encuentra dentro de sus planteamientos. El estudiante en un segundo salto aborda el análisis del segundo material proporcionado, donde en el escenario se ahonda con estudios complementarios de tipo clínico, radiológico, microbiológico, etc., que contribuyen a dar un panorama más amplio al primer escenario. Con base a ello el estudiante debe plantear a su vez los nuevos datos que lo orientan más hacia la explicación de las hipótesis planteadas en el primer salto, plantea nuevas pistas o claves principales, identifica los hechos más pertinentes al escenario inicialmente planteado. Posteriormente, identifica la principal problemática, lo cual lo hace nuevamente por medio de preguntas. Genera nuevas hipótesis, nuevas explicaciones, sustenta con base a ello la ratificación de sus diagnósticos presuncionales o bien ya que estudio el nuevo escenario puede plantear nuevos diagnósticos presuncionales. Se identifican las áreas de estudio, donde el estudiante puede ahondar con la finalidad de hallar evidencia médica para la comprobación de su hipótesis y diagnóstico presuncional, el estudiante plantea los objetivos de aprendizaje y proporciona al tutor la resolución del formato junto con las fuentes de información consultadas. El tercer salto (ABP) es la evaluación del material generado por el alumno por parte del tutor, se coteja el grado de avance alcanzado con base a un primer y segundo material resuelto previamente por parte del mismo tutor. En el presente trabajo se considera el planteamiento de escenario para la elaboración del material complementario del tutor para la construcción de un formato de ABP con base a un caso clínico proveniente de una explotación comercial de avestruces.

MATERIAL DEL ABP (Estudiante)* Parte uno

Escenario. De la granja productora de avestruces “*Rancho Sierra*” llegó al Departamento de Producción Animal: Aves de la FMVZ-UNAM para su estudio el cadáver de un avestruz (*African black*) macho de 17 días de edad. El ave previamente a su deceso había

presentado durante los últimos 13 días anorexia, letargo, diarrea moderada, deshidratación y depresión severa. En los registros clínicos de la explotación a la que pertenece el ave estudiada se reporta que del total de los avestripollos nacidos aproximadamente el 30% han fallecido mostrando previamente esta signología, lo cual ha mostrado ser el principal motivo de mortalidad en avestripollos menores a un mes, lo cual constituye un problema fuerte para la producción. A todos los avestripollos nacidos se les ha tratado profilácticamente desde el primer día por medio del suministro de una combinación de vitaminas y antibióticos contra los gérmenes susceptibles a penicilina-estreptomicina. Sin embargo, no ha habido una disminución aparente en la presentación del cuadro. Las avestruces son criadas desde el principio de acuerdo a las recomendaciones hechas por la empresa comercializadora que suministró el pie de cría original, los avestripollos recién eclosionados se alojan en criadoras individuales por un día, posteriormente se crían los primeros 15 días de vida en corrales con piso de alfombra de pasto sintético con calor artificial, del día 15 al 90 se trasladan a corrales con piso de tierra apisonada que van de suave a semiduro. La alimentación y aprovisionamiento de agua es *ad libitum*, se les suministra un alimento comercial formulado específicamente para cubrir los requerimientos de las avestruces a esta edad. El dueño desea saber qué es lo que está ocasionando este padecimiento y cómo puede curar a las avestruces que lo tienen o bien quiere saber cómo prevenir la presentación del mismo en su granja.

Pistas/hechos/ datos orientados (Se describen puntos clave).

Problema (s) (Se identifica la problemática importante por medio de preguntas).

Hipótesis (Se plantea la probable casuística del problema).

Explicaciones (Se formulan los argumentos más probables).

Diagnósticos presuntivos (Se propone el diagnóstico más convincente).

Áreas de influencia del problema (Se identifican las principales áreas a estudiar).

Objetivos de aprendizaje (Se plantean las metas operativas a alcanzar).

Fuentes de información (Considera la propuesta y consulta de bibliografía básica y complementaria para la primera parte).

MATERIAL DEL ABP (Estudiante)* Parte dos

Escenario. Debido a que se ha suministrado terapia antibacteriana sin lograr disminuir la presentación del problema, el agua y el alimento se sometieron a un análisis bacteriológico, no se encontraron cantidades de UFC significativas. El registro de pesado para este ejemplar el primer día fue de 1,170 gramos, posteriormente el patrón de peso mostró un comportamiento irregular:

| Peso día 3 | Peso día 5 | Peso día 7 | Peso día 10 | Peso día 13 |
|------------|------------|------------|-------------|-------------|
| 1,130 | 1,209 | 1,150 | 1,187 | 1,075 |

Se efectuó la necropsia del ejemplar juvenil con la finalidad de formular el diagnóstico presuntivo principal, las lesiones halladas en la necropsia fueron caquescia severa, deshidratación subcutánea de moderada a severa, persistencia del saco vitelino, saco vitelino hemorrágico con contenido de consistencia cremosa con coloración verde oscuro, congestión severa del mesenterio con peritonitis y presencia de fibrina. Se efectuó un aislamiento bacteriológico del contenido obtenido a partir del saco vitelino, se aisló *Escherichia coli* y *Citrobacter* spp.

Pistas/hechos/datos orientados (Se revelan nuevos puntos clave).

Problema (s): (Se perfila la principal problemática por medio de preguntas).

Hipótesis (Se plantea nuevamente la probable casuística).

Explicaciones (Se proporcionan argumentos validados por medio de la información consultada).

Diagnósticos presuntivos (Se ratifica o propone un nuevo diagnóstico).

Áreas de influencia del problema (Se identifican las principales áreas de estudio).

Objetivos de aprendizaje (Se plantean nuevas metas operativas a alcanzar).

Fuentes de información (Considera la bibliografía básica y complementaria empleada).

Con base al trabajo efectuado el alumno reconsidera el trabajo hecho con base al material perteneciente al tutor, el cual se encuentra ya contestado y sirve de guía al tutor en la orientación y dirección durante la ejecución del ABP por parte del estudiante. El formato de ABP propuesto para el estudiante en el presente trabajo es susceptible de aplicación, evaluación y modificación, con base a su análisis progresivo. Es susceptible de mejorar con la finalidad de que los alumnos tengan cada vez más una mejor comprensión de la metodología y del problema en sí. El material generado es apto para la enseñanza-aprendizaje. Aunque debe considerarse también que tiene sus limitantes, una de las cuales es el tiempo de ejecución y otra es el requerimiento de sólidos conocimientos previos.

De acuerdo a Marchais en el área de la medicina aún no se cuenta con criterios específicos que aseguren el éxito en la construcción y aplicación de un formato de ABP (sin embargo, se han propuesto diversos aspectos clave a considerar. Majoor *et al.*, por ejemplo, sugiere 4 criterios para la construcción del formato ABP:

1. El formato planteado debe complementar el nivel de conocimientos previamente adquiridos por el estudiante.

2. El formato propuesto debe motivar al estudiante a alcanzar nuevos conocimientos por medio del estudio.

3. El problema debe ser apropiado para un proceso de análisis que tenga una aplicación futura.

4. El problema debe dirigir al estudiante inevitablemente a la completación de uno o más de los objetivos educacionales propuestos por el tutor.

Bajo el análisis propuesto por Majoor *et al.*, Barrows, dimensiono que los criterios de construcción de ABP deben ser más concretos a un nivel específico de conceptualización:

1. Estructuración del conocimiento para su uso en un contexto de diagnóstico médico.

2. Generación de un proceso de razonamiento clínico efectivo.

3. Desarrollo efectivo de herramientas de aprendizaje autodirigido.

4. Incremento de motivación para aprender.

Rouen desprende a su vez solo tres de los cuatro objetivos educativos de Barrows:

1. Favorecer el pensamiento crítico, el análisis y el razonamiento.

2. Estimular el aprendizaje autodirigido.

3. Hacer uso del conocimiento previo.

Con base a la técnica Delphi, Marchais contribuye jerarquizando nueve criterios para la construcción de problemas ABP:

1. Estimulación del pensamiento crítico, análisis y razonamiento (apertura).

2. Aseguramiento del autoaprendizaje efectivo (autonomía).

3. Utilización del conocimiento previo (enriquecimiento).
4. Propuesta de un contexto real o verdadero (atractividad).
5. Dirección hacia el descubrimiento de los objetivos de aprendizaje (cobertura).
6. Estimulación de la curiosidad (inquisitividad).
7. Elección de temas relacionados a salud animal o humana (relevancia).
8. Asegurar un amplio contexto (comprensibilidad).
9. Elegir el vocabulario apropiado (lenguaje médico).

Los criterios anteriormente generados inicialmente tienen la finalidad de colocar a los estudiantes en el proceso de aprendizaje, mientras que estimulan sus herramientas de aprendizaje auto-dirigido. El problema debe ser anclado en los conocimientos previos y ser presentado bajo un escenario atractivo, guiando al estudiante hacia los objetivos de aprendizaje y el contenido particular del formato ABP. El problema propuesto debe aumentar la curiosidad intelectual y deberá estar relacionado a prioridades de salud relevantes, finalmente los problemas deben asegurar detalles contextuales del caso clínico tratado favoreciendo la adquisición de lenguaje médico específico y descriptivo.

La evaluación del ABP, es compleja, la propuesta es el grado de complementación obtenida en el material del alumno con relación a la propuesta original del tutor académico, a través de la metodología de triple salto. Sin embargo, a pesar de lo acotado por Dolmans *et al*, no establece una calificación del desempeño de manera puntual y objetiva, lo cual puede conducir a una subjetividad del aprendizaje logrado por parte del estudiante. Si bien ya están propuestos los criterios y

bases para la construcción efectiva de los formatos ABP, aún no se cuenta con una metodología validada para la evaluación del estudiante al momento de la ejecución de un ABP, en el futuro deberá ahondarse más en la propuesta de opciones para resolver esta problemática.

REFERENCIAS

1. Barrows, H.S. and R.M. Tamblyn. Problem-Based learning. An approach to medical education. New York: Springer-Verlag Co. 1980.
2. Beringer, J. Application of problem based learning through research investigation. J of Geogra in High Educ. 31:445-457. 2007.
3. Dolmans, D.H.J., H. Snellen-Balendong, I.H.A. Wolfhagen, and C.P.M. Van Der Vleuten. Seven principles of effective case design for a problem-based curriculum. Medical Teacher. 9:185-189. 1997.
4. Holmes, D.B. and D.M. Kaufman. Tutoring in problem-based learning: A teacher development process. Medical Education, 28: 275-283. 1994.
5. Marchais, J.E.D. A Delphi technique to identify and evaluate criteria for construction of PBL problems. Medical Education. 33:504-508. 1999.
6. Majoor, G.D., H.G. Schmidt, H.A.M. Snellen-Balendong, J.H.C. Moust, and B. Stalenhoef-Halling. Construction of Problems for Problems-Based Learning. In: Nooman Z., H.G. Schmidt, E.S. Ezzat, eds. Innovation in medical Education. New York, USA: Springer-Verlag. 144-222. 1990.
7. Ramírez, L.N.L. Taller sobre la metodología del aprendizaje basado en problemas. Memorias del Diplomado "Enfoques y Estrategias para la Enseñanza Aprendizaje de la Medicina Veterinaria". Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia. UNAM. Ciudad Universitaria, México. D.F. Octubre de 2007.

DIRECT APPLICATION OF ACID TO CONTROL AMMONIA AND BACTERIA LEVELS IN LITTER

APLICACIÓN DIRECTA DE ÁCIDO PARA CONTROLAR EL AMONIACO Y LOS NIVELES DE BACTERIAS EN LA CAMA

K. S. Macklin, J. P. Blake, and J. B Hess

Department of Poultry Science, Auburn University, Auburn, AL 36849-5416

RESUMEN

La mayoría de los tratamientos de la cama se realiza utilizando ácidos. Al aplicar estos productos se reduce significativamente el pH de la cama y con ello,

se reduce de manera importante la producción de amoníaco y el crecimiento bacteriano. En el presente estudio se comparó el H₂SO₄ con dos tratamientos disponibles comercialmente para la cama: PLT y

Poultry Guard (PG) para probar su eficacia, diseñamos experimentos aplicando los tratamientos a la cama limpia de viruta de pino a las dosis de 20, 40 y 60 lb/100 pies² (H₂SO₄) y 50, 100 y 150 lb/pie² (PLT y PG). Se tomaron muestras semanales de estos corrales durante siete semanas y se midieron los siguientes parámetros: nivel de amoníaco, humedad de la cama, pH y niveles de bacterias (aerobias totales, anaerobias totales, *C. perfringens* y *Salmonella*). Los resultados de los experimentos muestran que la aplicación directa del ácido a la cama produjo resultados comparables a los obtenidos con los dos productos comerciales.

SUMMARY

The majority of litter treatments are acid based. By applying these products onto litter there is a significant lowering of litter pH. By lowering the pH there is a significant reduction in ammonia production and bacterial growth. In this report, sulfuric acid (H₂SO₄) was compared to two commercially available litter treatments, Poultry Litter Treatment (PLT) and Poultry Guard (PG). In order to test their efficacy, experiments were designed where the treatments were applied to clean pine shavings at doses of 75.7, 151.4, and 227.1 L/92.9 m² for H₂SO₄ and 22.7, 45.5, and 68.2 kg/92.9 m² for PLT and PG. From these pens, samples were collected weekly for seven weeks and the following parameters were measured: ammonia level, litter moisture, pH and bacterial levels (total aerobic, total anaerobic, *C. perfringens*, and *Salmonella*). Results from the experiments show that direct application of acid to litter produced comparable results to the two commercially available litter treatments.

INTRODUCTION

During the typical life span of commercial broilers, one metric ton of litter is produced per 1,000 birds. Over the course of a year this could lead to 120 metric tons of litter produced in one 20,000 bird poultry house. This built-up litter can result in high ammonia levels, which can adversely affect poultry health by making the birds more susceptible to respiratory diseases like ILTV or airsacculitis. Methods to reduce ammonia levels and pathogenic microbes include changes in management practices and the use of litter treatments. A problem with litter treatments is that they are typically effectual for only 3-4 weeks while broilers are housed for 6+ weeks. A goal of this study was to determine the optimal application rate of PLT, PG and H₂SO₄ for prolonging the effectiveness of litter treatments in reducing both ammonia and bacteria.

MATERIALS AND METHODS

Trials 1-3

Housing. Clean pine shavings were placed to a depth of 8 cm in 16 environmental chambers (2.44 x 2.44 x 2.44 m). One-day old chicks were acquired from a commercial hatchery and 70 were randomly placed into each chamber.

Litter Treatments. PLT and PG were applied according to manufacturer's instructions, 22.7 kg per 92.9 m². Two additional levels were also utilized 45.5 and 68.2 per 92.9 m² to see if the additional product would significantly affect the results. Another treatment group was H₂SO₄ applied at 75.7, 151.4, and 227.1 L/92.9 m². In addition to the three treated groups there was a non-treated control group. Each treatment group consisted of four randomly assigned chambers.

Ammonia measurements. The Drager CMS Analyzer equipped with the remote air sampling pump was employed using the appropriate ammonia CMS chip (0.2-5ppm, 2-50ppm and 10-150ppm). The tube from the sampling pump was inserted into a (36x46x12 cm) container then run for 60 seconds. If after 60 seconds there was no reading, additional time would be given (up to 300 seconds).

Litter collection. Litter was collected weekly, starting the day prior to chick placement and continued for 7 weeks. Collection was performed in each pen by using the grab sampling technique.

Microbiology. Total aerobic, total anaerobic, *C. perfringens* and *Salmonella* levels were enumerated (CFU/g) for each pen. This was performed using Plate Count Agar (PCA), Reduced Blood Agar (RBA), Tryptose Sulfite Cycloserine Agar (TSC), and XLT4 respectively. Dilutions were performed by adding 10 g of litter to 90 mL of sterile physiological saline (0.75% NaCl); this produced a 10⁻¹ dilution. Further dilutions were performed by transferring 10 mL into another 90 mL sterile saline bottle; this was performed until dilutions ranging from 10⁻¹ to 10⁻⁸ were made. The dilutions were then spiral plated in duplicate onto their respective media types and incubated under appropriate conditions. PCA and XLT4 were incubated aerobically at 37°C; while RBA and TSC were incubated at 37°C in an anaerobic chamber containing 5% CO₂, 5% H₂ and 90% N₂. After 18 hours colonies were quantified on a digital plate reader and average bacterial counts obtained.

Determination of pH. Litter samples were mixed 1:1 with distilled water and allowed to sit overnight at 4°C. The following day pH was measured in triplicate and recorded.

Percent moisture. After litter arrival in the lab, 10g of litter was weighed and placed in a drying oven that was set for 150°C and allowed to dry for 36 hours.

After 36 hours, the samples were reweighed and percent moisture was determined.

Statistical analysis. All of the data was analyzed using SPSS version 12.0 using GLM procedure. If there was a significant difference ($P \leq 0.05$), means would be analyzed using Tukey's Multiple Comparison Test. Before analysis, all percentage data were arcsine transformed to normalize this data. Additionally, CFU/g counts were normalized for analysis by using log 10 transformations.

RESULTS AND DISCUSSION

The pH results for the three litter treatments (table 1) were similar with H₂SO₄ actually being able to maintain a lower pH in the litter, for a longer period of time than either PLT or PG. The next best treatment was PLT, followed by PG for keeping the pH low in the litter. These reductions in pH did lead to a reduction in detected ammonia. Interestingly, in this study PLT was able to keep ammonia emissions below

detection levels for all but one treatment group (T45.5) for 4 weeks and it was not until week 6 that ammonia levels among the three treatment groups was similar to CON. H₂SO₄ was similar in that it was not until week 6 that the ammonia levels in all of the treatment groups were similar to CON. There was no observed reduction in ammonia levels in any of the PG treated groups.

Bacteriologically there was no difference detected between the three treatment groups (PLT, PG and H₂SO₄) and the control. However, there was a trend that those pens that receiving the high dose of the litter treatment had slightly lower aerobic and anaerobic bacteria counts for the first 3 weeks. There was no observed difference in moisture levels between the CON group and the treatment groups.

From these results it was concluded that none of the litter treatments significantly reduced bacterial numbers or affected the litter moisture. The significant change was in the reduction in litter pH and, in the case of PLT and H₂SO₄, a reduction in pH and ammonia.

Table 1. The pH levels associated with PLT, PG, and H₂SO₄ treated pine shavings bedding. PLT and PG was applied at three levels 22.7, 45.5 and 68.2 kg per 92.9 m² before chick placement, while H₂SO₄ was applied at the following levels 75.7, 151.2 and 227.1 L per 92.9 m². For each trial measurements were taken weekly. Letter differences within a treatment group in a specific week signify statistically significant differences at $P \leq 0.05$.

| Treatments | Dose | Week 0 | Week 1 | Week 2 | Week 3 | Week 4 | Week 5 | Week 6 | Week 7 |
|--------------------------------|--------|-------------------|-------------------|-------------------|---------------------|-------------------|---------------------|-------------------|---------------------|
| PLT | CON | 6.35 ^a | 6.30 ^a | 6.52 ^a | 6.82 ^a | 6.67 ^a | 7.95 ^a | 8.47 ^a | 8.75 |
| | T22.7 | 2.45 ^b | 2.52 ^b | 5.75 ^a | 6.52 ^a | 6.57 ^a | 7.82 ^a | 8.12 ^a | 9.25 |
| | T45.5 | 2.32 ^b | 2.42 ^b | 4.47 ^b | 5.40 ^b | 6.40 ^a | 7.27 ^b | 7.47 ^b | 8.72 |
| | T68.2 | 2.28 ^b | 2.32 ^b | 4.07 ^b | 5.02 ^b | 5.57 ^b | 6.95 ^b | 7.32 ^b | 9.03 |
| PG | CON | 6.35 ^a | 6.40 ^a | 7.80 ^a | 9.20 ^a | 9.88 ^a | 9.80 ^a | 9.18 ^a | 9.78 ^a |
| | T22.7 | 2.45 ^b | 3.55 ^b | 7.15 ^a | 8.73 ^b | 9.40 ^b | 9.78 ^a | 9.17 ^a | 9.70 ^a |
| | T45.5 | 2.33 ^b | 2.90 ^c | 5.95 ^a | 8.78 ^b | 9.48 ^b | 9.55 ^b | 8.93 ^b | 9.60 ^{a,b} |
| | T68.2 | 2.28 ^b | 2.60 ^c | 2.65 ^b | 8.48 ^c | 9.40 ^b | 9.30 ^c | 8.80 ^b | 9.45 ^b |
| H ₂ SO ₄ | CON | 6.73 ^a | 6.83 ^a | 6.30 ^a | 6.65 ^a | 7.68 ^a | 7.83 ^a | 8.38 ^a | 8.85 ^a |
| | T75.7 | 2.40 ^b | 2.85 ^b | 3.55 ^b | 4.83 ^b | 5.70 ^b | 7.28 ^{a,b} | 7.80 ^b | 8.70 ^{a,b} |
| | T151.4 | 2.35 ^b | 2.68 ^b | 2.60 ^c | 3.58 ^{b,c} | 5.60 ^b | 7.18 ^{a,b} | 7.68 ^b | 8.23 ^{b,c} |
| | T227.1 | 2.18 ^b | 2.30 ^c | 1.88 ^d | 2.58 ^c | 4.50 ^b | 6.43 ^b | 7.55 ^b | 8.08 ^c |

MANAGEMENT FACTORS IN THE DEVELOPMENT AND PREVENTION OF PODODERMATITIS

FACTORES DE MANEJO EN EL DESARROLLO Y PREVENCIÓN DE LA PODODERMATITIS

Trisha Marsh Johnson

Veterinary & Environmental Technical Solutions, PC, 125 Fox Trace, Athens, GA 30606

RESUMEN

En muchas compañías, las patas son la porción más rentable del pollo. El desarrollo de pododermatitis con lesiones conducentes a reducción de la calidad se presenta durante la primera semana de vida. Disertaremos sobre los factores de manejo durante la crianza, conducentes al desarrollo de estas lesiones y las intervenciones prácticas para prevenirlas.

DISCUSSION

Chicken paws are of high commercial value and often represent the portion of a broiler with the highest profit margin. Paws intended for export to the Asian market are an integral portion of an integrator's profitability. The presence of pododermatitis or footpad dermatitis (FPD) is the number one cause of downgrades of chicken feet due to paw lesions. Since there is no market for USDA Grade "B" paws, the presence of footpad lesions can seriously erode a complex's profitability. Pododermatitis or footpad dermatitis is an erosion or ulceration on the bottom of a bird's foot most frequently caused by ammonia burns and moisture at the litter surface. These lesions develop often within the first week after bird placement. Lesions that result in downgrades of paws are far less severe than those lesions considered being of animal welfare concern. Because of this, housing conditions during brooding must be managed more vigilantly. Management factors that lead to FPD development, practical ways to prevent FDP development, and a new scoring system for measuring pre-FPD lesions in young birds that result in plant downgrades are discussed.

Chicken paws are of high commercial value and often represent the portion of a broiler with the highest profit margin. Paws intended for export to the Asian market are an integral portion of an integrator's profitability. The presence of paw or footpad lesions (pododermatitis or footpad dermatitis) is the number one cause of downgrades of chicken feet. Since there is no market for Grade "B" paws, the presence of footpad lesions can seriously erode a complex's bottom line. Lesions that result in downgrades of paws are far less

severe than those lesions considered being of animal welfare concern. Pododermatitis or footpad dermatitis (FPD) is an erosion or ulceration on the bottom of a bird's foot most frequently caused by ammonia burns and moisture at the litter surface. The large weight bearing, metatarsal pad is most frequently affected while in severe cases the digital pads and the interdigital webs between the toes are also affected. In very severe cases, the hock region can also be involved (1). Hock involvement is most commonly seen with straw based litter and so it is rare to see this in US poultry production.

Factors in the development of FPD. Much attention has been paid to the condition of the litter in the last week or so of a bird's life in regards to FPD development. However, paw lesions begin to form in the first week of the bird's life (5,6). The formation of liquid ammonia at the litter surface occurs anywhere there is even the least bit of damp litter. The severity and moistness of the caking present in the houses seems to play the predominant role in lesion development. Common culprits are small wet spots under the drinkers (commonly referred to as donuts) and caked areas along the sidewalls. When newly hatched chicks step onto those damp areas, the damp litter sticks to their feet and ammonia in the litter begins to erode the skin. Visible paw lesions are evident by the time the bird is 7 days old and the lesions continue to worsen over time. Serial examination of these birds shows that the lesions do not heal even if the litter dries out. Surprisingly, in houses with dry litter, the bottoms of the birds' feet are very clean and it is unusual to find a footpad lesion on a bird with clean feet. The adherence of wet litter to the bird's foot at a young age seems to be the key to lesion development. This is consistent with literature reports of increased FPD in houses with higher relative humidity and moisture at the litter surface (2,3,4,8).

Ambient ammonia levels do not seem to influence the development of FPD. The two factors that need to be present for lesion development are substantial levels of ammonia deep in the litter and moisture at the litter surface. Ammonia in the gas phase does not seem to be

sufficiently irritating to the skin of the feet. Ammonia in solution, however, in the damp areas of the litter is corrosive to the skin and causes FPD development. Houses with no or low ammonia at bird level can still have a substantial percentage of FPD if the litter is damp. This is most commonly seen in brand new houses or on new litter where the relative humidity is high even though the ammonia is not, and litter slicking occurs. At the same time, houses with dry litter except for quarter size donuts under the drinkers due to leaky nipples will still have a substantial number of birds with paw lesions.

Preventing FPD. The key to preventing paw lesions is to ventilate poultry houses for relative humidity (RH) in order to prevent moisture build-up around the drinker/feeder lines and the sidewalls, manage drinkers to prevent leaks, and acidify the litter surface to neutralize ammonia. This is especially critical in the first week after bird placement. Litter that is dry until later in the flock does not have as much influence over lesion development, presumably because the ventral surface of the foot is thickens as the bird ages. In houses that are ventilated through a curtain crack or fixed inlet boards ventilating for RH is difficult as air entering the houses does not have sufficient velocity to flow across the ceiling but rather drops straight to the floor dumping moisture along with it. In a study conducted by Weaver and Meuerhof (8), raising birds at a 45% RH compared to a 75% RH reduced paw lesions substantially. Birds in the 75% RH group had three times the ammonia burns on the feet and the severity of the lesions was greater than those birds raised in the 45% RH group. In addition to decreasing moisture at the litter surface, use of a litter acidifier such as sodium bisulfate (PLT[®] litter acidifier, Jones Hamilton Co., Walbridge, OH) prior to bird placement to neutralize the ammonia that is in solution is also important.

Scoring system for predicting USDA plant grades. In the European Union, FPD scoring is often used as an indicator of animal welfare conditions during the live production phase. The FPD scoring systems reported in the poultry literature such as the Ekstrand score (1) and the modified Ekstrand score (7) are the ones that have been developed in the EU strictly for this purpose. In these scoring systems, the total surface area that the lesions cover determines the foot score rather than the depth of the lesion. These scoring systems are also designed for use at processing in order to evaluate the performance of farms that may not be vertically integrated with the plant.

For processing plants in the United States, however, paws are evaluated for their export potential and not for animal welfare reasons. The USDA grading measurements are far stricter than the animal welfare measurements of the EU. USDA classifies ammonia

burns as a “resolving or healing wound” and allows 13 small (≤ 0.5 inches) (≤ 1.3 cm), 6 medium (> 0.5 to 1 inch) (> 1.3 to 2.5 cm), or 3 large (> 1 inch) (> 2.5 cm) lesions per sample size of 50 randomly selected feet. In order for a FPD scoring system to be useful in the US, a scale matching the USDA grading system is needed. In addition, a scoring system that can be used in the field on young birds as a predictor of how a flock will grade at processing is useful.

After serial evaluation of a large number of birds on a wide variety of farms, the following 3-score system was devised for scoring birds at 7-10 days of age in order to predict how a flock will grade at the processing plant. Only the underside of the bird’s foot is scored. Paws that have attached dirt should be washed prior to scoring. Both paws are scored with the higher score recorded. A minimum of 30 birds per house should be evaluated. Scoring birds at this age allows remedial action to be taken to prevent further deterioration of the paws as well as makes the catching and handling easier on both the birds and the scorer.

Score of zero. A score of zero reflects a bird with no sign of redness or minor hemorrhage. The skin is intact. Some staining of the footpad may be present.

Score of one. Foot pads with minor redness or petechiation. A small crack in the skin may be present between individual scales. These may be as small as a pinpoint. If the foot has a callus or proliferation of the scales without a break in the skin it is classified as a one.

Score of two. Birds with a score of two have erosions on the feet that have begun to break the skin. These can be circular or irregular shaped. Calluses or proliferation of the scales with a break in the skin are classified as a two.

Birds with a score of one will tend to present at the plant with a small lesion under 0.5 inch (1.3 cm) in size while birds with a score of two will present with lesions that are categorized as medium or large by the USDA grading system. The ratio of birds in each category may worsen by the time the birds are processing age but it rarely improves.

Impact of sodium bisulfate treatment on development of FPD. Sodium bisulfate (SBS) neutralizes ammonia produced at the litter surface through conversion into ammonium sulfate. Paw lesions were scored in a broiler complex with a high rate of sodium bisulfate usage. Ten farms (618, 204 birds) applied sodium bisulfate at a rate of 50 lbs per 100 ft² (2.4 kg/m²) in the brood chamber and six farms (463,177 birds) served as an untreated control. The birds raised on sodium bisulfate showed significant improvement in paw quality with 55% of the birds having no paw lesions compared to only 16% of the control birds. The SBS group had 19% fewer Major Paw Lesions and 20% fewer Minor Paw Lesions than

the control birds. Birds raised on SBS also showed improvements in feed conversion (1.77 vs. 1.80), weight, livability, and condemnations. In a controlled trial completed at Colorado Quality Research, the footpads of birds raised on untreated litter, PLT, AI+Clear, and Microtreat-P were compared at processing. Of the birds raised on PLT, 67.5% had no lesions compared with only 10.3% of the controls (see Table 1).

REFERENCES

1. Ekstrand, C. *et al.* Prevalence and Control of foot pad dermatitis in Sweden. *Brit. Poult. Sci.* 39:318-324. 1998.
2. Harms, R.H., B.L. Damron, and C.F. Simpson. Effect of wet litter and supplemental biotin and/or whey on the production of foot pad dermatitis in broilers. *Poult. Sci.* 56(1):291-6. 1977.
3. Harms, R.H. and C.F. Simpson. Influence of wet litter and supplemental biotin on foot pad

dermatitis in turkey poult. *Poult. Sci.* 56(6):2009-12. 1977.

4. Jones, T.A., C.A. Donnelly, and M. Stamp Dawkins. Environmental and Management factors affecting the welfare of chickens on commercial farms in the United Kingdom and Denmark at five densities. *Poult. Sci.* 84(8): 1155-65. 2005.

5. Kjaer, J.B., *et al.* Foot pad Dermatitis and hock burn in broiler chickens and degree of inheritance. *Poult. Sci.* 85(8):1342-8. 2006.

6. Mayne, R.K., P.M. Hocking, and R.W. Else. Foot pad dermatitis develops at an early age in commercial turkeys. *Br. Poult. Sci.* 47(1):36-42. 2006.

7. Pagazaurtundua, A. and Warriss, P.D. 2006. Measurements of footpad dermatitis in broiler chickens at processing plants. *Veterinary Record* 158:679-682.

8. Weaver, W.D. and R. Meuerhof. 1991. The effect of different levels of relative humidity and air movement on litter conditions, ammonia levels, growth and carcass quality for broiler chickens. *Poultry Science* 70:746-755.

Table 1. Foot Pad Scores (%).

| | 0 | 1 | 2 |
|---------------------|----------|----------|----------|
| Control | 10.3 | 11.0 | 78.7 |
| PLT | 67.5 | 18.4 | 14.1 |
| AI+Clear | 47.8 | 32.3 | 19.9 |
| Microtreat P | 35.6 | 23.0 | 41.4 |

COMPATIBILITY STUDY OF A LIVE *E. COLI* VACCINE AND A LIVE *SALMONELLA THYPHIMURIUM* VACCINE WHEN THEY ARE CO-ADMINISTERED TO SPF LEGHORNS

ESTUDIO DE LA COMPATIBILIDAD DE DOS VACUNAS VIVAS (*ESCHERICHIA COLI* Y *SALMONELLA TYPHIMURIUM*) PARA ADMINISTRARLAS EN CONJUNTO

Andres Montoya^A, Patricia Wakenell^B, and Kalen Cookson^C

^APoultry Diagnostic Research Center, Department of Population Health, University of Georgia

^BDepartment of Population Health and Reproduction, University of California, Davis

^CFort Dodge Animal Health, Overland Park, Kansas

RESUMEN

El propósito de este estudio fue determinar la seguridad y la eficacia de las vacunas vivas de *E. coli* y *Salmonella typhimurium* cuando se administran al mismo tiempo mediante aspersión por gota gruesa al día y/o a los 14 días de edad.

INTRODUCTION

Salmonella and *Escherichia coli* are bacteria that can infect birds, people, and other mammals. The two species of *Salmonella* most relevant to the table egg producer are *S. typhimurium* (ST) and *S. enteritidis* (SE). ST and SE are responsible for the majority of food poisoning incidents in humans that are traced

back to eggs. *E. coli* peritonitis is a leading cause of mortality in cage layers. Vaccinations using live ST and inactivated SE products and, more recently, a live *E. coli* vaccine have become effective tools to help control these diseases.

The purpose of this study was to determine the efficacy of a live *E. coli* and a live ST vaccine when they are given at the same time by coarse spray administration at either day-of-age or at 14 days of age. The selection of the various treatments was based upon the label recommendations for both Poulvac® ST (day of age vaccination followed by a booster at two weeks of age) and Poulvac® E. coli (day of age or later).

MATERIALS AND METHODS

Experimental rooms, shavings, feed, and water were sampled prior to placement of 320 Specific Pathogen Free (SPF) leghorn chicks. Chickens were divided into eight treatments with 40 birds per group. Birds were housed and cared for separately following strict biosecurity procedures. Birds were fed *ad libitum* non-medicated irradiated feed and non-chlorinated water. The live ST vaccine was administered by itself at a dose of 5.6×10^6 colony-forming units (CFU) per bird at day of age to groups 3, 7 and 8 and at day 14 of age to groups 3, 5 and 6. A mixture of the live ST and *E. coli* vaccines was administered at a total dose of 1.1×10^7 colony-forming units (CFU) per bird at day of age to groups 5 and 6 and at day 14 of age to groups 7 and 8 only. Live *E. coli* vaccine was administered by itself at a dose of 4.4×10^6 colony-forming units (CFU) per bird at day of age to group 3. The ST challenge strain DT-104 was administered at a dose of 3.3×10^6 CFU per bird at 42 days of age by oral gavage to groups 2, 3, 5 and 7. The *E. coli* challenge strain was administered at a dose of 1.0×10^{10} CFU per bird at 42

days of age by intratracheal inoculation to groups 1, 4, 6 and 8. Organ pools, intestinal pools and cecal pouches were cultured at 49 days of age to assess the efficacy of the live ST vaccine when administered either alone or in combination with live *E. coli* vaccine. Live *E. coli* vaccine efficacy was assessed by *E. coli* associated lesions and/or mortality. Airsacculitis lesions were scored using a 3-point scale from no lesions to severe. Significance between groups was established by a P-value ≤ 0.05 using Fisher's exact test.

RESULTS

All experimental rooms were negative for *Salmonella* prior to placement of the chicks at day of age. The DT-104 challenge yielded a high incidence of colonization in the challenge controls (97-100%), while all ST vaccinated groups showed significant reductions in reisolation of the challenge strain. There also were no differences based on the co-administration of the live *E. coli* vaccine. Table 1 shows the percentage of birds' tissues that were Group B *Salmonella* (DT-104) positive. Similarly, there was a high "take" rate in the *E. coli* challenge controls as 97% showed lesions of colibacillosis. In contrast, the incidence of *E. coli* lesions was significantly lower in all *E. coli* vaccine treatments, including those that were co-vaccinated with live ST (Table 2).

CONCLUSIONS

Administration of the two live vaccines Poulvac® ST and Poulvac® E. coli at the same time at either day of age or 14 days of age did not result in any reduction in efficacy of either product.

Table 1. Percentage of reisolations from birds 7 days post challenge with virulent DT-104.

| Group (D ^B 1/D14/D42) | PERCENTAGE (%) POSITIVE | | |
|--|-------------------------|-------------------|------------------|
| | Organ Pool | Intestine Pool | Cecal Pool |
| 2 (none/none/ST ^C challenge) | 100% ^a | 100% ^a | 97% ^a |
| 3 (ST vax/ST vax/STchallenge) | 20% ^b | 13% ^b | 10% ^b |
| 5 (combvax ^D /ST vax/STchallenge) | 13% ^b | 17% ^b | 20% ^b |
| 7 (STvax/combvax/STchallenge) | 20% ^b | 23% ^b | 20% ^b |

^AValues within a column followed by a common superscript are not significantly different (p<0.05)

^BD= Day of treatment

^CST= *Salmonella typhimurium*

^Dcombvax= Poulvac ST®+Poulvac EC® vaccine

Table 2. Incidence of disease in birds 7 days post challenge with virulent *E. coli*.

| Group (D ^B 1/D14/D42) | PERCENTAGE (%) | | | |
|--|------------------|------------------|------------------|------------------|
| | Mortality | Airsac >1 | Total Airsac | Colisepticemia |
| 1 (none/none/EC ^C challenge) | 10% ^a | 33% ^a | 93% ^a | 97% ^a |
| 4 (EC vax/none/ECchallenge) | 0% ^a | 0% ^b | 13% ^b | 30% ^b |
| 6 (combvax ^D /ST vax/ECchallenge) | 3% ^a | 0% ^b | 20% ^b | 33% ^b |
| 8 (ST ^E vax/combvax/ECchallenge) | 0% ^a | 0% ^b | 13% ^b | 17% ^c |

^AValues within a column followed by a common superscript are not significantly different (p<0.05)

^BD= Day of treatment

^CEC= *E. coli*

^Dcombvax= Poulvac ST®+Poulvac EC® vaccine

^EST= *Salmonella typhimurium*

**PROTECTION AFTER CHALLENGE WITH A LOW
PATHOGENICITY AVIAN INFLUENZA VIRUS IN BIRDS
VACCINATED WITH A WATER- SOLUTION VACCINE
ADMINISTERED BY AEROSOL ROUTE COMBINED WITH AN
EMULSION VACCINE COMPARED WITH A GROUP
VACCINATED WITH EMULSION VACCINE ONLY**

**PROTECCIÓN DESPUÉS DEL DESAFÍO CON UN VIRUS DE INFLUENZA AVIAR
DE BAJA PATOGENICIDAD EN AVES INMUNIZADAS CON UNA VACUNA EN
SOLUCIÓN ACUOSA ADMINISTRADA POR AEROSOL Y COMBINADA CON UNA
VACUNA EMULSIONADA, EN COMPARACIÓN CON UN GRUPO QUE RECIBIÓ
SÓLO LA VACUNA EMULSIONADA**

Andres Morales Garzon, Donaji Garcia Lopez, Raul Montalvo Ramirez, and Eduardo Lucio Decanini

Investigación Aplicada S.A.DE C.V., 7 Norte 416 Tehuacan Puelba, Mexico 75700

RESUMEN

Se inmunizó un grupo de 15 aves tipo Leghorn con una vacuna inactivada de influenza aviar en solución acuosa a las 12 días de edad, por aspersión. Dos días después las mismas aves recibieron una dosis de una vacuna en emulsión oleosa por la vía subcutánea. Un segundo grupo de aves recibió solamente una dosis de una vacuna emulsionada a los 14 días de edad. Se utilizó un tercer grupo como testigo no tratado. Todas las aves se desafiaron con un virus de la influenza aviar de baja patogenicidad a las tres semanas después de la vacunación. Cinco días después del desafío se tomaron improntas traqueales individualmente para intentar el reaislamiento viral. Presentaremos los resultados.

ABSTRACT

Thirty 7 days old light breeder chickens were divided in three groups and maintained in Horseshoe Bauer units. All birds were vaccinated with a dose of live Newcastle by ocular route. One group received a dose (0.5 mL) of a water killed LAI vaccine (avian influenza H5N2) by spray route five days after NDV vaccine and a dose of a killed emulsified LAI vaccine at 14 days of age. A second group was only vaccinated with an oil emulsion AI vaccine at 14 days of age and a third group did not have vaccination program (Control Group) All birds were challenged at 35 days of age with 250,000 EID of a low pathogenic avian influenza strain (H5N2) by ocular route. After three days PI all birds were euthanized and a tracheal washing sample was taken to real PCR and virus reisolation.

Group vaccinated with a water killed AI vaccine plus oil emulsion decrease the amount of virus in trachea in 2.19 log 10. Group received only oil emulsion vaccine had an difference of 1.68 log 10 compared with positive control. Viral isolation revealed a protection of 90% of the birds in group A, 80% protection for group B and 10% protection for group C.

INTRODUCTION

Since avian influenza (AI) virus appeared in Mexico in 1995 killed vaccines had been a good tool in the eradication program against outbreaks of highly pathogenic AI. Nevertheless, we still have circulation of low pathogenic virus in the field. Therefore, efforts to decrease the circulation of the AI virus have been tried and put in practice, such as detection of the best vaccinal strain to achieve the best reduction in viral shedding based on HA homology and quarantine and movement control of infected birds and products.

Because of is impossible to use live vaccines against AI as a method to reduce viral shedding from vaccinated birds is necessary to found news control methods such as killed vaccine containing adjuvants for the mucosa. In Mexico is possible to found some products has proven to be a satisfactory to obtain protection against Infectious Bronchitis when administered by fine aerosol (Aerovac IB). In this trial a similar vaccine was formulated using killed AI virus and added with an Oil emulsion program to compare the protection with an Oil emulsion schedule by viral isolation and PCR.

MATERIALS AND METHODS

Experimental design. Thirty seven-day-old light breed chickens were divided in three groups and placed in Horsfal Bauer isolation units. All chickens at this time were vaccinated with a live Newcastle La Sota vaccine by ocular route (Biovac ND, IASA, Mexico). Group A received a vaccination at 12 days of age by aerosol with a killed vaccine containing adjuvants for the mucosa (Aerovac AI[®]) at a dose of 0.5 mL, using a

device that forms droplets of less than 20 microns (Biofogger) and applying the vaccine during a period of five minutes. At 14 days of age the same group received a vaccination with a killed emulsified vaccine (Emulmax AI, IASA, Mexico) at a 0.5 mL dose applied subcutaneously. Group B received at 14 days of age a vaccination with a killed emulsified vaccine at a 0.5 mL dose applied by subcutaneous route. Group C received a similar application as Group A, but using only distilled water, and served as the control group

Challenge. At 35 days of age all birds were challenged with 250,000 EID of a low pathogenicity Avian influenza virus (H5N2) by ocular route. After 5 DPI all birds were euthanized and an individual sample of tracheal washing was taken from each bird to reisolate challenge virus in SPF embryos and quantify the amount of virus by Real time PCR

Isolation of challenge virus. Each traqueal washing were collected and 0.2 mL were inoculated by allantoic fluid route in 5 9-11 days old SPF embryos. Every day all embryos were candled and mortality was recording. After three days post-inoculation a sample of 25 µL of allantoic fluid were mixed with 25 µL 1% chicken red blood.

RESULTS AND DISCUSION

The aim of this trial was to show if a combined schedule of vaccination using a water-killed avian influenza vaccine (Aerovac AI) and an oil emulsion vaccine given a protection against a low pathogenic avian influenza virus (LPAIV) H5N2 measured by PCR and virus reisolation compared with an oil emulsion vaccine schedule. Table 1 shows final results

with Real time PCR and reisolation of challenge virus in all groups. As it can show Group vaccinated with a water killed AI vaccine plus Oil Emulsion decrease the amount of virus in trachea in 2.19 log 10. Group received only Oil emulsion vaccine had a difference of 1.68 log 10 compared with positive control. Viral isolation revealed a protection of 90% of the birds in group A, 80% protection for group B and 10% protection for group C.

Table 1. Results of Real Time PCR to Influenza and virus reisolation in SPF embryos.

| Group | Identification | PCR (Real time) | | Viral Reisolation |
|-------|--|-----------------|--------|-------------------|
| | | Average | Log 10 | |
| A | Water Killed AI Vaccine+ Oil Emulsion AI Vaccine | 4196 | 3.62 | 10 % |
| B | Emulsion AI vaccine | 13620 | 4.13 | 20 % |
| C | Control | 648940 | 5.81 | 90 % |

LAS LIMITANTES PARA LA INCLUSIÓN DE LOS DDGS DE MAÍZ

LIMITING FACTORS FOR FEEDING CORN DDGS

J. Muñoz, J. C. Medina, R. Pérez, y J. Altamirano

Nutek S.A. de C.V.

SUMMARY

The purpose of this presentation is to review currently available information about corn dry distillers' grains with solubles (DDGs) in terms of total protein, fat, minerals, total amino acids and estimated amino acid digestibility. Mycotoxin levels detected in DDGs as compared to those in corn will be discussed, under the criteria that DDGs components are concentrated two to three times as compared with corn grain, leading people to believe that this is a limiting factor for the inclusion of DDGs in feeds, due to the potential risk in the event that this assumption is correct. DDGs have been traditionally used as a supplementary protein source for cattle. Today, supply exceeds cattle demand, rendering DDGs available for poultry and swine.

INTRODUCCIÓN

Los granos secos de destilería con solubles (DDGS, por sus siglas en Inglés) son un ingrediente de gran valor para la elaboración de alimentos balanceados que es a su vez un subproducto de la producción de etanol con molienda seca a partir de los granos. En la producción de etanol, el almidón se fermenta para obtener alcohol etílico, pero los componentes restantes (endospermo, germen), conservan mucho del valor nutritivo. El uso de los DDGS en las dietas para aves históricamente ha sido alrededor de una tasa de inclusión del 5%, debido a las limitaciones como la oferta y la demanda; y a la variabilidad en contenido y digestibilidad de nutrientes. Estos productos pueden proporcionar una cantidad significativa de energía, proteína y fósforo principalmente, a las dietas para aves, reemplazando

parcialmente al maíz, pasta de soya y suplementos de fósforo en los alimentos. Sin embargo, se ha demostrado que las características físicas y químicas varían entre y dentro de las plantas de fermentación y pueden influir sobre el contenido nutricional de los DDGS, debido a muchos factores, entre uno de ellos es que los parámetros a controlar son para la producción óptima de etanol y no para los DDGS. El criterio que se sigue con respecto a los componentes de estos productos es que se concentran de 2 a 3 veces con relación al contenido de los mismos en el maíz, debido a la transformación de los azúcares a alcohol, este mismo criterio lo han considerado para el contenido de micotoxinas, haciendo referencia que estas toxinas se van a concentrar tres veces en comparación con el nivel inicial encontrado en el maíz, omitiendo que las micotoxinas no son parte de la base de cálculo de los nutrientes. Por ello, el objetivo de este trabajo es reportar el contenido nutricional de los DDGS, así como los niveles de contaminación por micotoxinas detectados en los mismos.

MATERIAL Y MÉTODOS

A 24 y 20 muestras de DDGS obtenidos de productores de alimento balanceado, se les determino su composición nutricional y contenido de micotoxinas respectivamente, los análisis fueron realizados en las instalaciones del laboratorio de química de la empresa Nutek SA de CV. Todas las muestras fueron obtenidas de plantas de alimentos que se encontraban usando esas materias primas. Los componentes nutricionales fueron analizados por métodos oficiales AOAC, aflatoxinas, ocratoxina A, zearalenona y fumonisina por HPLC de fase reversa; tricotecenos por CG-MS.

RESULTADOS

Tabla 1. Promedios e intervalos en la composición de nutrientes (100% en base seca) entre las 24 fuentes de DDGS.

| Nutriente | Promedio | Intervalo |
|--------------------|----------|-------------|
| Proteína cruda (%) | 28.7 | 25.3 – 30.9 |
| Grasa cruda (%) | 10.6 | 8.6 – 12.3 |
| Fibra cruda (%) | 7.6 | 5.8 – 10.7 |
| Cenizas (%) | 6.0 | 3.1 – 9.8 |
| Fósforo (%) | 0.58 | 0.44 – 0.98 |

Tabla 2. Niveles de micotoxinas en muestras analizadas durante el año 2007.

| Micotoxina | n | Muestras positivas | Valor máximo detectado (ppb) | Rango (ppb) |
|--------------|----|--------------------|------------------------------|-------------|
| Aflatoxinas | 14 | ND | -- | -- |
| Ocratoxina A | 10 | ND | -- | -- |
| Zearalenona | 8 | ND | -- | -- |
| Fumonisina | 18 | 12 | 2120 | 415 - 2120 |
| Tricotecenos | 16 | 16 | 340 | 45 - 340 |

CONCLUSIONES

La variabilidad del contenido de nutrientes es muy amplia, esta variación probablemente se deba a que las muestras proceden de diferentes fuentes y plantas procesadoras de DDGS. Los niveles de micotoxinas detectados son similares o inferiores a los detectados en el maíz, que contradice la idea que éstas se deben concentrar 3 veces con respecto al grano, lo que probablemente si sucede es que la toxina se pueda encontrar de forma homogénea en todo el lote, debido al proceso de molienda y fermentación para obtener el alcohol.

REFERENCIAS

1. Evaluation of Analytical Methods for Analysis of Dried Distillers Grains with Solubles. AFIA. February 2007.
2. Manual del Usuario de Granos Secos de Destilería con Solubles. Consejo de Granos de Estados Unidos (USGC).
3. Parsons, C. *et al.* Poultr. Sci. 62:2445-2451. 1983.

EVALUACIÓN *IN VITRO* DE DOS DESINFECTANTES SOBRE LA VIABILIDAD DE *EIMERIA* SPP.

IN VITRO EVALUATION OF TWO DISINFECTANTS ON THE VIABILITY *EIMERIA* SPP.

O. O. García^A, V. X. Hernández^A, M. B. Fuente^B, G. R. Tejeda^C, y V. A. Jasso^C

^ADepartamento de Producción Animal: Aves, FMVZ., Universidad Nacional Autónoma de México, 04500. México, DF. E mail: xochitl_h@yahoo.com

^BCentro de Enseñanza, Investigación y Extensión Avícola, FMVZ., Universidad Nacional Autónoma de México.

^CBayer de México, SA. de CV. E mail: antonio.jasso.aj@bayer.com.mx

SUMMARY

Coccidiosis is caused by organisms extremely resistant to common disinfectants. Three treatments (five replicates each) were used to evaluate the *in vitro* coccidial effect of two disinfectants: T1) Disinfectant A; T2) Disinfectant B; and T3) Control. The per-replicate inoculum was standardized to 488,000 sporulated oocysts of non-modified vaccine strains of *Eimeria tenella*, *E. maxima*, *E. acervulina* and *E. mivati*. T1 (disinfectant A) oocysts showed damaged or ruptured walls with statistically lower ($P<0.05$) oocyst counts as compared to the other groups. Results suggest the usefulness of using a

specific coccidial disinfectant as a complement to anticoccidial vaccine-based control programs.

RESUMEN

La coccidiosis aviar es una enfermedad parasitaria común entre las especies domésticas, que ocasiona grandes gastos a nivel nacional (5) e internacional (4), siendo de las principales causas de productividad y pigmentación deficiente (2). Los ooquistes son altamente resistentes al ambiente y a los desinfectantes comunes (1); de ahí, el reciente surgimiento de desinfectantes más potentes y específicos contra coccidias, esto a su vez deriva en la necesidad de

evaluar su desempeño tanto *in vitro* como en campo. El objetivo de este trabajo fue evaluar la viabilidad de *Eimeria acervulina*, *E. tenella* y *E. maxima* *in vitro* 4 horas después del tratamiento con un desinfectante coccidicida y un desinfectante general. Las pruebas se llevaron a cabo, en el área de parasitología del laboratorio de diagnóstico del Departamento de Producción Animal: Aves (DPA: Aves), de la FMVZ de la UNAM. El desinfectante específico contra coccidias se compone principalmente por: o-cresol, propan-1-ol, clorocresol, propan-2-ol, ácido salicílico y sal sódica de alcano sulfonato, mientras que el desinfectante general está elaborado a base de ácidos orgánicos y ácido ascórbico. El inóculo de *Eimeria* se tituló en cámara de Neubauer (3) y estuvo compuesto de cepas vacunales no modificadas de las especies *E. tenella*, *E. maxima* y *E. acervulina* en un porcentaje de 24, 19 y 57% respectivamente. Para la evaluación de la viabilidad de las eimerias después del contacto con los dos desinfectantes, se colocaron 488,000 ooquistes esporulados en cajas de petri, las cuales se asignaron en 3 grupos con 5 réplicas cada uno; A (tratado con el desinfectante específico), B (tratado con el desinfectante general), y C (agua destilada como testigo). Los resultados obtenidos mostraron que el grupo tratado con el producto específico contra coccidias dañó la pared del ooquiste y en él se contó una cantidad estadísticamente menor ($p < 0.05$) de ooquistes viables en comparación con el resto de los grupos (Cuadro 1). Lo anterior sugiere una acción eficaz del producto sobre *Eimeria* spp, lo que se

relaciona a un menor desafío, a una mejor salud intestinal y por lo tanto se puede reflejar en una buena pigmentación cutánea.

REFERENCIAS

1. Belli, I.S., C.N. Smith, and J.P.D. Ferguson. The coccidian oocyst: a tough nut to crack! Trends in Parasitol 22(9):416-423. 2006.
2. Juárez, M.A. Evaluación de parámetros productivos y grado de pigmentación en pollos de engorda vacunados contra coccidiosis y medicados con salinomicina. Memorias de la XXVII convención anual de la ANECA; 2002 mayo 1-4; Puerto Vallarta (Jalisco) México. México (DF): Asociación Nacional de Especialistas en Ciencias Avícolas de México, AC, 2002.
3. Kao, T and L.P. Ungar. Comparison of sequential, random and hemacytometer methods for counting *Cryptosporidium* oocysts. J Parasitol 80:816-819. 1994.
4. McDougal, L.R. Coccidiosis. In: Saif YM, Barnes HJ, Glisson JR, Fadly AM, McDougald LR, Swayne DE, editors. Disease of Poultry. Ames Iowa: Iowa State University Press, 974-990. 2003.
5. Serrano, P.D.J. Cuanto cuesta un brote de coccidia. Memorias del II Simposium de Integridad Intestinal y 3er encuentro AMVEAV; 2004 junio 25. Guadalajara (Jalisco) México. México (DF): AVECA-G, AECAS, AMVEAV y U of A, AC, 80-92. 2004.

Cuadro 1. Efecto de dos desinfectantes sobre la viabilidad de *Eimeria* spp 4 horas postratamiento *in vitro*.

| Grupo | | Promedio de ooquistes/mL | | | | | |
|-------|-----|--------------------------|--------|--------|--------|----------------------|-------------------------------|
| A | I | 380000 | 280000 | 260000 | 340000 | 300000 | 312000 |
| | II | 320000 | 320000 | 420000 | 300000 | 160000 | 304000 |
| | III | 280000 | 60000 | 200000 | 120000 | 300000 | 192000 |
| | IV | 220000 | 180000 | 160000 | 240000 | 60000 | 172000 |
| | V | 140000 | 80000 | 340000 | 180000 | 360000 | 220000 |
| | | Total | | | | | |
| | | | | | | Promedio (DS) | 240000 (± 20428.74) *C |
| B | I | 400000 | 200000 | 140000 | 240000 | 280000 | 252000 |
| | II | 360000 | 560000 | 500000 | 340000 | 300000 | 412000 |
| | III | 280000 | 340000 | 260000 | 460000 | 200000 | 308000 |
| | IV | 500000 | 520000 | 360000 | 260000 | 360000 | 400000 |
| | V | 300000 | 380000 | 300000 | 420000 | 300000 | 340000 |
| | | Total | | | | | |
| | | | | | | Promedio (DS) | 342400 (± 21395.33) B |
| C | I | 560000 | 320000 | 760000 | 800000 | 560000 | 600000 |
| | II | 420000 | 400000 | 340000 | 580000 | 400000 | 428000 |
| | III | 380000 | 360000 | 520000 | 400000 | 360000 | 404000 |
| | IV | 560000 | 460000 | 320000 | 380000 | 500000 | 444000 |
| | V | 380000 | 500000 | 780000 | 400000 | 400000 | 492000 |
| | | Total | | | | | |
| | | | | | | Promedio (DS) | 473600 (± 27897.91) A |

*Literales distintas entre grupos denotan diferencia estadística significativa ($P < 0.05$).

EL ABP EN LA ENSEÑANZA CLÍNICA AVÍCOLA (APRENDIZAJE A BASE DE PROBLEMAS)

PROBLEM-BASED LEARNING (PBL) IN POULTRY MEDICINE EDUCATION

Ariel Ortiz Muñiz y Fernando Ingalls Herrera

Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán, UNAM

SUMMARY

The purpose of this paper is to share our experiences in implementing a part of the poultry medicine course, based on PBL (*ABP* in Spanish) for veterinary/animal husbandry professional education. PBL aids to add significance to the educational program contents. The strategy of PBL is taking real professional problems for the student to construct his/her own knowledge. PBL was used in 4 groups of poultry medicine students. Cases were presented on a per-etiology basis for student teams to resolve them. Team results were presented for discussion and feedback. Qualitative results have been obtained so far, and significant elements include: collaborative attitude,

working motivation, improved understanding, learning retention, information source management, and analysis/synthesis ability.

RESUMEN

El presente reporte tiene como finalidad dar a conocer las experiencias que se han tenido al implementar parte del contenido del cursos de Clínica de Aves, basándose en el método Aprendizaje a Base de Problemas (ABP) en la licenciatura de Medicina Veterinaria y Zootecnia, de la Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán, UNAM (3). El ABP es un modelo de enseñanza, que tiene como objetivo hacer

significativos los contenidos de un programa educativo, utilizando como estrategia de enseñanza-aprendizaje el planteamiento de problemas tomados del ejercicio profesional, para que el alumno construya su propio conocimiento a partir del proceso que implica encontrar soluciones a los problemas clínicos planteados (1,3). Se empleo el PBL en 4 grupos de clínica de aves a lo largo de un ciclo escolar, se presentaron casos clínicos por etiología y los alumnos los resolvieron en equipos y los resultados fueron expuestos al grupo para su discusión y retroalimentación por parte del tutor. Los resultados que se tienen son cualitativos, observando como elementos significativos: actitud colaborativa, motivación al trabajo, mayor comprensión y retención de los contenidos, manejo de diversas fuentes de información, y mayor capacidad de análisis y síntesis (3). Por lo tanto, creemos que el ABP es una alternativa adecuada a la enseñanza clínica veterinaria, como se ha comprobado en la medicina humana y otras áreas del conocimiento donde se ha empleado (1,2). En conclusión el ABP es un modelo que al enfrentar al

alumno con problemas de su ejercicio profesional, lo entrena para construir su propio conocimiento de manera significativa y le da herramientas para enfrentar los problemas futuros de su ejercicio profesional cuando se integre al mercado de trabajo.

REFERENCIAS

1. Albanese, M.A. and S. Mitchell. Problem based learning (PBL). A review of literature on its outcomes and implementation. *Academic Medicine*; 17: 52-81. 1993.
2. Dirección de Investigación y Desarrollo Educativo (s/f) El aprendizaje Basado en Problemas como técnica didáctica. Vicerectoria Académica, Instituto Tecnológico y de Estudios Superiores de Monterrey. <http://www.sistema.itesm.mx/>. 2005.
3. Ingalls, H.F, A.M Ortiz, y B.V. Velázquez Componentes Básicos del Aprendizaje Basado en Problemas (ABP) AGROPECUS, Revista de Ciencia, Biodiversidad y Tecnología Agropecuaria. Año III, Volumen II, Número 6:65-69, Julio-Diciembre 2006.

APLICACIÓN DE LAS TÉCNICAS DE PCR EN EL DIAGNÓSTICO DE ENFERMEDADES DE LAS AVES

PCR TECHNIQUES IN POULTRY DISEASE DIAGNOSIS

R. Ortega, E. Zepeda, B. Contreras, y J. Chapa

SUMMARY

Nucleic acid amplification techniques have allowed for tremendous progress in the detection of pathogens that can potentially be spread to the environment or susceptible populations. These techniques are much more sensitive than traditional culture procedures and they allow for the detection of specific organism nucleic acid portions in different clinical samples. Our purpose is to report the results of using PCR techniques in poultry disease diagnosis, including Newcastle disease, infectious laryngotracheitis, avian influenza, mycoplasmosis, and chicken anemia. End point, real time polymerase chain reaction (PCR), and reverse transcriptase PCR (RT-PCR) were applied to organ swabs and to serum, vaccine, fluid, and organ samples for the amplification and quantification of one selected genome segment of each agent. The diagnostic results and application of these techniques will be reported.

INTRODUCCIÓN

Actualmente la biología molecular desempeña un papel importante en el diagnóstico de enfermedades que afectan al aparato respiratorio de las aves. Las técnicas de reacción en cadena de la polimerasa (PCR) en el diagnóstico clínico, han sido un gran avance para la detección de microorganismos patógenos con potencial diseminación en el medio ambiente o en las poblaciones susceptibles, ya que tienen mayor sensibilidad comparadas con los métodos tradicionales de cultivo y permiten detectar porciones de ácidos nucleicos específicos de cada microorganismo en diferentes materiales. Las infecciones por virus de enfermedad de Newcastle (ENC), virus de la bronquitis infecciosa (IBV), virus de influenza aviar (AIV), virus de laryngotraqueitis (ILTV), *Mycoplasma* y otros agentes respiratorios importantes pueden causar pérdidas económicas muy importantes al avicultor. En otros casos, las enfermedades inmunosupresoras como la anemia del pollo (CAV) bursitis infecciosa (IBD), enfermedad de Marek (EM) y Micotoxicosis, pueden cursar o predisponer infecciones por los agentes

respiratorios antes mencionados y resultar una enfermedad grave para el ave.

El propósito de este trabajo es informar los resultados obtenidos con el uso de técnicas de PCR y su aplicación en el diagnóstico de enfermedades de las aves tales como ENC, IBV, ILTV, AIV, CAV y *Mycoplasma*.

MATERIAL Y MÉTODOS

Para este estudio se analizaron muestras tomadas de vacunas, sueros, fluidos, órganos e hisopos de órganos. Se empleó un Kit comercial QIAMP® Viral RNA para la extracción de RNA y QIAMP® DNA para la extracción de DNA de las muestras, utilizando una secuencia específica para cada región en particular de los virus a estudiar. La amplificación de la RT-PCR y PCR (1) se realizó en un equipo de punto final y en un equipo de tiempo real que consistió en 3 etapas: a) Desnaturalización, b) hibridación y c) elongación para el DNA y cDNA. Los fragmentos de cDNA y de DNA amplificados para punto final fueron colocados en un gel de agarosa al 2% dentro de una cámara de

electroforesis para su corrimiento y después observados a través de luz ultravioleta.

Las fracciones amplificadas para los virus y *Mycoplasma* detectados se encuentran en la tabla 1.

RESULTADOS

Los resultados obtenidos se resumen en la Tabla 1.

CONCLUSIÓN

De acuerdo a los resultados obtenidos podemos decir que la prueba de PCR es una herramienta muy valiosa para obtener un resultado en menos tiempo comparado con los aislamientos que en algunos casos son difícil de obtener.

REFERENCIAS

1. Luque, J. and A. Herraiz. Biología Molecular e Ingeniería Genética 15:187-196. 2001.

Tabla 1. Técnicas empleadas y resultados obtenidos.

| Enfermedad | Ensayo | Fracción amplificada | | |
|-------------------|--------|----------------------|-------------------------|-----------|
| | | Punto final | tiempo real | Positivos |
| IBV | RT-PCR | Glicoproteína S1 | - | 9/27 |
| ENC | RT-PCR | Proteína F | Genotipo, proteína F, M | 9/28 |
| AIV | RT-PCR | Hemoaglutinina(HA) | Fenotipo H5, H7 | 45/119 |
| ILTV | PCR | Glicoproteína C | Glicoproteína C | 8/22 |
| CAV | PCR | VP1, VP3 | VP1, VP2, VP3 | 65/435 |
| <i>Mycoplasma</i> | PCR | 16S, 16sR | 16S, MGA0319, 16SRNA | 17/423 |

NEW TECHNOLOGY OF BURSAL DISEASE BY AN IMMUNE COMPLEX VACCINE

NUEVA TECNOLOGÍA PARA LA ENFERMEDAD DE GUMBORO COMPLEJO INMUNE VACUNAL

V. Palya^A, K. Forgách^A, T. Süveges^A, M. Kelemen^A, J. Mészáros^B, and J. Benyeda^C

^ACEVA-PHYLAXIA Veterinary Biologicals Co. Ltd, Budapest Hungary

^BVeterinary Medical Research Institute of the Hungarian Academy of Sciences, Budapest, Hungary

^CPROPHYL Ltd., Mohács, Hungary

RESUMEN

La presencia del virus de la enfermedad infecciosa de la Bolsa de Fabricio en la industria avícola es un problema constante. Esto ha generado la necesidad del desarrollo de una vacuna capaz de dar protección en presencia de altos y o bajos niveles de anticuerpos maternos. Recientemente se desarrollo el complejo inmune vacunal preparado con una combinación de una cepa intermedia ligada a anticuerpos específicos para su protección de la acción de los anticuerpos maternos. Este complejo se aplica en OVO a los 18 días de desarrollo embrionario o vía subcutánea al día de edad en la incubadora. La efectividad de la vacuna fue comprobada con pruebas de serología y desafíos a diferentes edades post vacúnales.

INTRODUCTION

Infectious bursal disease (IBD) has been a constant problem for the commercial chicken industry since its discovery in the late 1950s. The only effective way of providing protection against this harmful virus is vaccination of receptive animals at the right time. In young chicks normally variable, but high levels of maternal antibodies persist, that in most cases prevents the traditional live vaccines from inducing active protection after single or even repeated applications. The recently developed IBDV immune complex vaccine prepared by combining live vaccine virus with specific antibody to IBDV (3) may be applied *in ovo* or at day old. A great advantage of this type of vaccine that – depending on the maternal antibody level of each vaccinated animal – the vaccine virus starts to replicate at the most appropriate time to provide active immune response to the animals (3,4,5).

MATERIALS AND METHODS

Vaccine. Cevac Transmune IBD®, an immune complex vaccine that contains specific antiserum

mixed in the appropriate ratio with an intermedier plus (Winterfield 2512) IBDV vaccine strain.

Vaccination. Eighteen days old embryonated eggs and day-old broiler chicks possessing maternally derived antibodies to IBDV were used in this study.

Experiment 1. Groups each of 20,000 commercial broiler chickens were vaccinated on day 18 of incubation by *in ovo* route with 1 dose (0.05mL) of Cevac Transmune IBD vaccine or left non-vaccinated. After hatch each group placed into separate chicken houses.

Experiment 2. One day old commercial broiler chicks were divided into two groups of 20,000 each and either left non-vaccinated or vaccinated by subcutaneous route with one dose (0.1 mL/chicks) of Cevac Transmune IBD. The groups were housed in separate buildings.

Sampling. On day 0, twenty chicks were bled from each group of both experiments to determine the starting maternal antibody titer to IBDV.

On days 7, 14, 21, 28, 35, and 42, twenty chickens from each group of both experiments were bled, euthanized, weighed, necropsied and bursae removed and weighed to determine the bursa/body weight ratios (B/BW) for the calculation of bursa/body weight index (B:B index). Part of each bursa was fixed in buffered formalin and processed for histological examination (hematoxylin-eosin staining) to look for the onset of vaccine virus replication in the bursa.

Virus neutralization (VN) test. Antibody titer to IBDV was measured by VN test on chicken embryo fibroblast (CEF) cultures against 300-500 TCID₅₀ of a tissue culture adapted IBDV strain (GP82), B:B index was calculated according to Lucio formula (1).

Challenge. On days 14,21,28,35 and 42, chicken from each group (n=20 or 40/group) were removed to a separate isolation room and challenged with 1000 EID₅₀ vvIBDV, strain MOM-94 by per dose administration. Four days post challenge, 20 challenged birds from each group were euthanized, necropsied and bursae removed for histological

examination. During the necropsy, bursae were scored by gross observation as either susceptible to the challenge (edema and/or hemorrhage) or protected. In the challenge tests carried out at 21, 28, and 42 days of age on chicks from experiment 1, 20 birds per group were weighed individually at the time of challenge and 10 days later again. Assessment of protection was based on the results of the gross pathology and histology of the bursae four days post challenge and on the weight gain during the 10-day period following challenge.

RESULTS AND DISCUSSION

Chicks vaccinated *in ovo* with 1 dose of Cevac Transmune IBD hatched normally. The hatching rate of the *in ovo* vaccinated group (87.1%) did not differ significantly from the one obtained in the non-inoculated control group (86.6%)

There was no post hatch mortality exceeding the one occurred in the non-vaccinated group. The mortality during the growing period did not differ significantly between the vaccinated and non-vaccinated groups in either of the two experiments (data not shown).

Serology. The day-old chicks had maternal antibody to IBDV of 13.18 and 10.39 log₂ in experiment 1 and 2 respectively. Decline of maternal antibody to IBDV was seen during the first few weeks of post hatch reaching its minimum levels (7.45 log₂ in the *in ovo* and 6.62 log₂ in the s.c vaccinated group) between two and three weeks of age. It was followed by active humeral immune response demonstrated by the increase of the antibody titers to IBDV. In both experiments from three weeks of age the antibody levels in the vaccinated groups showed a steady increase while in the non-vaccinated controls the decay of maternal antibodies to IBDV. Chickens having a lower maternal antibody titer to IBDV at hatch (Exp. 2, s.c. vaccinated group) showed an earlier immune response than birds with higher maternal antibodies to IBDV at hatch (Exp. 1, *in-ovo* vaccinated group).

Histology and B:B index. In experiment 1, chickens vaccinated *in ovo* with Cevac Transmune IBD, bursa lesions characteristic of the vaccine virus were detected in 65% of the bursa samples at 21 days of age, while signs of regeneration were already observed by 28 days of age. The mean B:B index of vaccinates was not statistically different from those of non-vaccinates at day 14 of age, indicating that maternal antibody was still high enough to prevent the replication of vaccine virus. However, by three weeks of age the mean B:B index (0.52) of vaccinates was statistically lower than those non-vaccinates, indicating significant vaccine virus replication. By day 28, the mean B:B index reached its minimum and the bursal

atrophy in the vaccinated group was apparent. From this age both the bursa histology and the mean B:B index values indicated a progressive regeneration of the bursa. These data demonstrate that maternal immunity delays vaccine virus replication significantly and also reduces the severity bursal damage caused by it.

The data from experiment 2 indicated similar evolution of bursa lesions and atrophy (B:B index values) in the vaccinated animals to those recorded in experiment 1. The only significant difference observed was the earlier onset of vaccine virus replication as indicated by histological lesions and B:B index values. On day 14 of age 70% of the bursae displayed lesions characteristic of vaccine virus which ached 100% with signs of regeneration by day 21 of age. This was most probably due to the lower day-old starting maternal antibody level to IBDV. The bursae of the non-vaccinated groups in both experiments remained unaffected during the whole test period.

The serological and histological results allowed that the Transmune IBD vaccine was not inactivated by the maternal antibodies and resulted in an active immune response as evidenced by the elevated antibody titer to IBDV from 3 to 4 weeks of age onwards. These data demonstrate also that this vaccine can withstand even the neutralizing effect of high level maternal antibodies to IBDV.

Challenge. Chickens from each group of both experiments were challenged on each of days 14, 21, 28, 35 and 42 of age. Based on clinical symptoms and bursa pathology when challenge was carried out at 14 days of age, 60% of the *in ovo* and 70% of the subcutan vaccinated broilers demonstrated protection against challenge, while the corresponding non-vaccinated controls allowed 60% and 100% susceptibility already. At three weeks of age we found 80% of the *in ovo* and 100% of subcutaneous vaccinated broilers being protected from challenge, while 90% and 100% of the non-vaccinated corresponding controls were susceptible to the challenge. From four weeks of age onwards the vaccinated broilers in both experiments were fully protected from challenge, while all the non-vaccinated animals became fully susceptible.

Body weights were measured at the time of challenges and again 10 days later in the challenge experiments carried out at 3, 4, and 6 weeks of age. In the challenge test performed at three weeks of age the mean body weight gain of the vaccinated animals although exceeded, but were not statistically different from the one of the non-vaccinated controls. However, following challenge both at four weeks and six weeks of age the body weight gains of the vaccinated groups differed significantly ($p < 0.0019$ and $p < 0.001$, respectively) from the non-vaccinated controls.

The data presented here show that broilers with maternal antibodies to IBDV when receiving a single

vaccination either *in ovo* or subcutaneously at hatch produced active immune response and were fully protected by 3 to 4 weeks of age from challenge. Broilers with higher maternal antibody titers to IBDV at hatch had an active antibody response later than those with moderate levels of starting maternal immunity. The serological results also demonstrate that even very high level of maternal immunity (13.18 log₂) did not interfere with the effectiveness of Transmune IBD in provoking active immune response to IBDV. Both the serological and the bursa pathological (histology, B:B index) results indicate that Transmune IBD vaccine administered *in ovo* or s.c. begin to replicate and immunize the chickens before maternal immunity drops to low levels that allows field IBD infection and significant field virus replication. Thus, the use of Transmune IBD vaccine in the hatchery (either *in ovo* at hatch) as a single IBD vaccination will narrow the window of susceptibility that often occurs between the loss of maternal immunity and the beginning of active immunity induced by conventional IBD vaccines. The window of susceptibility was either absent or greatly reduced by Transmune IBD vaccine. Furthermore, the use of immune complex IBD vaccine can eliminate the problem of when to vaccinate chickens with different

levels of maternal antibody to IBDV and the problem of non-uniform administration of vaccine in the chicken house.

REFERENCES

1. Lucio, Benjamin and Stephen B. Hitchner. Infectious bursal disease emulsified vaccine: effect upon neutralizing-antibody levels in the dam. *Avian Diseases* 23: 466-478. 1979.
2. Sharma, J.M. Embryo vaccination with infectious bursal disease virus alone or in combination with Marek's disease vaccine. *Avian Diseases* 29:1155-1169. 1985.
3. Whitfill, C.E.I. Determination of optimum formulation of a novel infectious bursal disease virus (IBDV) vaccine constructed by mixing bursal disease antibody with IBDV. *Avian Diseases* 39: 687-699. 1995.
4. Haddad, E.E. Efficacy of a novel infectious bursal disease immune complex vaccine in broiler chicken. *Avian Diseases* 41: 882-889. 1997.
5. Kelemen, M. Pathological and immunological study of an *in ovo* complex against IBD. *Acta Veterinaria Hungarica* 48: 443-454. 2000.

OXÍGENO ADICIONAL EN INCUBACIÓN DEL POLLO DE ENGORDA

INCUBATING BROILER EGGS ADDING EXTRA OXYGEN

R. O. F. Prado^A, B. J. E. Morales^B, A. M. González^C, L. J. A. Quintana^D, y M. J. Arce^E

^AUniversidad de Colima. FMVZ. Autopista Colima-Manzanillo km 40. CP 28100. E-mail: omarpr@ucol.mx

^BUniversidad Autónoma Metropolitana, Unidad Xochimilco. FMVZ

^CUniversidad Autónoma de Chapingo, Departamento de Zootecnia

^DUniversidad Nacional Autónoma de México, FMVZ. Departamento de Aves.

^EUniversidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo, FMVZ

*HatchTech Incubation Technology, Gidstrom 25 P.O. Box 256 NI-3900 AG Venendaal, The Netherlands

SUMMARY

The purpose of this trial was to evaluate the effect of different oxygen (O₂) concentrations during the incubation process on broiler incubation parameters. Two egg setters (capacity: 4 800 ea) were used with two different O₂ concentrations (17.5 vs. 21%). Three hundred individually-weighed eggs were distributed at random between both machines. Moisture loss, hatchability, chick size/weight, blood glucose levels, packed cell volumes, and egg yolk weight were recorded. The higher O₂ concentration resulted in increased (2.13 %) hatchability, more efficient moisture loss, larger (0.44 cm) chicks, lower blood

glucose concentrations (-16.4 mg/dl), and increased packed cell volumes (25.75 ± 1.86%). The use of extra O₂ (21%) during incubation can increase hatchability, without compromising chick integrity.

RESUMEN

El objetivo fue evaluar el efecto de diferentes concentraciones de Oxígeno (O₂) durante el proceso de incubación sobre los parámetros de incubación del pollo de engorda. Se utilizaron dos máquinas incubadoras, con capacidad cada una de 4800, que trabajan con dos distintas concentraciones de O₂ (17.5

vs 21%) 300 huevos pesados los cuales se distribuyeron aleatoriamente en ambas máquinas. Se cuantificaron la pérdida de humedad, la incubabilidad, el peso y tamaño del pollo, nivel de glucemia, valor hematocrito y peso del vitelo. Con mayor concentración de O₂ la incubabilidad aumentó en 2.13 puntos, la pérdida de humedad fue más eficiente, y el tamaño del pollo fue mayor en 0.44 cm; la concentración de glucosa sanguínea se redujo (-16.4 mg/dl), se registró un mayor valor hematocrito (con 25.75±1.86%). La adición de O₂ en un 21%, durante la incubación incrementa la incubabilidad, sin comprometer la integridad de las aves.

INTRODUCCIÓN

Debido a que el 60% del incremento del consumo de oxígeno (O₂) del embrión se produce en el período que transcurre entre el inicio de la respiración pulmonar y el nacimiento, diferencias en la conductibilidad del cascarón y en los mismos parámetros técnicos del proceso de incubación pueden inducir cuadros de hipoxia, sobre todo en el intervalo de tiempo entre el inicio del picado interno de la cáscara y el momento del nacimiento, en el cual existe una demanda mayor de O₂. Este proceso de hipoxia puede desencadenar una serie de trastornos fisiológicos que pueden comprometer la vida y desempeño productivo de las aves (4,6,7). El objetivo del presente trabajo fue evaluar el efecto de diferentes concentraciones de O₂ durante el proceso de incubación, en máquinas de una sola etapa, sobre los parámetros de incubación del pollo de engorda.

MATERIAL Y MÉTODOS

Se utilizaron dos incubadoras comerciales de una sola etapa de la marca HatchTech Combi 4800*, con una capacidad cada una de 4800 huevos. Se formaron dos tratamientos de 150 huevos incubables cada uno, descartando los rotos, sucios, microfracturados, deformes, etc, procedentes de reproductoras de 33 semanas de edad del mismo lote y estirpe Cobb, los cuales se pesaron e identificaron, sometidos a dos concentraciones diferentes de O₂ (17.5 y 21%, que corresponden a 112 torr pO₂ y 134 torr pO₂). El flujo de O₂ se ajustó con un fluxómetro a 13.5 l/min. Las variables de respuesta fueron: Pérdida de humedad; la incubabilidad; el peso y tamaño del pollito, desde la punta del pico hasta el dedo medio sin considerar la uña, como indicadores de su calidad, niveles de glucosa sanguínea y peso del vitelo. Las medias obtenidas se compararon mediante la prueba de "T" de Student ($P<0.05$) (9).

RESULTADOS

Con el empleo de la mayor concentración de O₂ la incubabilidad aumentó significativamente ($P<0.05$); siendo la diferencia de 2.13 puntos porcentuales (Cuadro 1), así como la pérdida de humedad ($P<0.05$), en 2.28 puntos. La relación peso del huevo/peso del pollo no fue estadísticamente distinta ($P>0.05$) entre tratamientos. El peso de los pollitos tampoco varió significativamente ($P>0.05$) entre ambos tratamientos. Los pollos fueron de mayor tamaño cuando se les suplementó O₂, observándose una diferencia mayor a 0.44 cm. El peso del vitelo, no mostró diferencias estadísticamente significativas ($P>0.05$) (Cuadro 1).

DISCUSIÓN

La incubabilidad mejoró con la adición de O₂, lo cual indica que si los pollos pueden disponer de mayor cantidad de moléculas de O₂ no se deterioran fisiológicamente al momento del nacimiento. Christensen y Bagley (3); encontraron una mejora en el número de pavipollos nacidos con la adición de O₂ en máquinas incubadoras ubicadas en altitudes superiores a 2000 msnm, debido a que los pavipollos tuvieron mayor disponibilidad de O₂. La pérdida de humedad fue menor en el tratamiento sin adición de O₂, a pesar de lo cual, no se observaron alteraciones en los pollos que pusieran de manifiesto una insuficiente pérdida de humedad, como las indicadas por Phillips, *et al.* (8), (1,2). La relación entre el peso del huevo/peso del pollo al nacimiento debe estar en el rango de 28–33% (10). Aunque los valores obtenidos en el presente experimento se encuentran al margen y por debajo del límite inferior, los pollos se encontraron aparentemente normales. El tamaño de los pollos a los que se proporcionó el O₂ adicional fue significativamente mayor ($P<0.05$). Ello sugiere, que al disponer los embriones de pollo de más moléculas de O₂, el embrión utiliza sus reservas fisiológicas de energía para sus funciones metabólicas, optimizando así su desarrollo. En el presente trabajo se tomó como indicador de calidad el tamaño del pollito, y según este criterio los pollitos que tuvieron mayor disponibilidad de O₂ ambiental fueron de mayor calidad (5). El peso del vitelo no mostró diferencias significativas entre ambos tratamientos. Burnham, *et al.* (2) señalan que la humedad de la yema está fuertemente influida por la humedad relativa durante el proceso de incubación. Los niveles de glucosa sanguínea fueron significativamente mayores en las aves que no tuvieron O₂ adicional.

CONCLUSIONES

La adición de O₂ en un 21%, durante el periodo de incubación incrementa la incubabilidad, lo que sugiere un equilibrio entre la tolerancia a la hipoxia y la posibilidad de reducir la intensidad de la respiración por unidad de masa corporal, sin comprometer la integridad de las aves.

REFERENCIAS

1. Bruzual, J.J., S.D. Peak, J. Brake, and E.D. Peebles. Effects of relative humidity during incubation on hatchability and body weight of broiler chick from young breeder flocks. *Poult Sci.* 79(6):827-830. 2000.
2. Burnhan, M.R., E.D. Peebles., C.W. Gardner., J. Brake., J.J. Bruzual, and P.D. Gerard. Effects in incubator humidity and hen age on yolk composition in broiler hatching eggs from young breeders. *Poult Sci.* 80:1444-1450. 2001.
3. Christensen, V.L. and L.G. Bagley. Improved hatchability of turkey eggs at high altitudes due to added oxygen and increased incubation temperature. *Poult. Sci.*67:956-960.1988.

4. French, N.A. Modeling incubation temperature: The effects of incubator design, embryonic development, and egg size. *Poult Sci.* 76:124-133. 1997.
5. Hill, D. Chick length uniformity profiles as a field measurement of chick quality? *Avian Poult Biol Rev.*12:188. 2001.
6. Lourens, S. The importance of air velocity in incubation. *W. Poult.*17(3):29-30.2001.
7. Meijerhof R and S. Lourens. Embryo temperature is the key factor in incubation. *W. Poult.* 15(10):42-43. 1999.
8. Phillips, L., J. Brake, S. Ellner, and O. Rachel. A mathematical model for estimation of broiler egg weight loss from physical dimensions and air cell size during incubation. *Poult Sci.*71:625-630.1992.
9. Steel R.G.D. and J.H. Torrie. Principles and procedures of Statistix. A biometrical approach. 2nd Ed. Singapore: McGraw-Hill. 1990.
10. Wilson H.R. Interrelationship of egg size, chick size, post hatching growth and hatchability. *W Poult Sci J.*47:5-20. 1991.

Cuadro 1. Efecto de dos concentraciones O₂ durante el proceso de incubación sobre distintas variables fisiológicas.

| Tx | Incubabilidad (%) | Pérdida de humedad (%) | Relación huevo/pollo (%) | Peso del pollito (g) | Tamaño del pollito (cm) | Vitelo (g) | Glucosa (mg/dl) |
|--------------------|-------------------------|-------------------------|--------------------------|------------------------|-------------------------|------------------------|-------------------------|
| Sin O ₂ | 87.70±1.41 ^b | 9.16±1.77 ^a | 25.84±0.81 ^a | 44.90±2.7 ^a | 18.37±0.65 ^b | 6.24±1.75 ^a | 218.4±32.6 ^a |
| Con O ₂ | 89.83±1.83 ^a | 11.44±3.46 ^b | 28.06±0.98 ^a | 44.51±3.2 ^a | 18.81±0.44 ^a | 5.19±1.3 ^a | 202.0±1.37 ^b |
| Diferencia | 2.13 | 2.28 | 2.22 | -0.39 | 0.44 | -1.05 | -16.4 |

^{a,b} = Letras distintas en la misma columna indican diferencias estadísticamente significativas ($P < 0.05$).

PRIMER HALLAZGO EN MEXICO DE ÁCAROS DE LA FAMILIA SYRINGOBIIDAE = AUSCOURASCARIDAE HALLADOS EN EL CAÑÓN DE LA PLUMA DE ARATINGA CANICULARIS

FIRST REPORT IN MEXICO OF SYRINGOBIIDAE FAMILY MITES IN THE FEATHER SHAFTS OF ARATINGA CANICULARIS

M. M. T. Quintero^A, C. S. M. Gaxiola^B, T. C. Barraza^B, y V. G. Juárez^A

^ADepartamento de Parasitología, Sección de Entomología, Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia, U.N.A.M. México, D.F.

^BDepartamento de Parasitología Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia, Universidad Autónoma de Sinaloa

SUMMARY

Aratinga canicularis is a Psittacine commonly adopted as a pet. This practice has resulted in a major illegal market of these birds in Mexico. *A. canicularis* can be found living freely in the Mexican States of Nayarit, Sinaloa, and others. We had access to some of these birds condemned in Culiacán City, Sinaloa, and checked them for the presence of mites mostly in the feather shafts. Mites of different sizes were found in the shafts of a total of five feathers from two birds. Particularly, two large (1,500 u) mites were characterized as Syringobiidae family (two males and one female). The present first report of this mite in Mexico might attract the interest of veterinarians specializing in wild and ornamental birds.

RESUMEN

Aratinga canicularis es un ave de la familia Psittacidae que se ha adoptado como mascota y por lo mismo existe hoy un gran mercado ilegal de estas aves en México, en vida libre se les encuentra en diversos estados como Nayarit, Sinaloa, entre otros, por lo que se tuvo la oportunidad de revisar ácaros en un decomiso de estas aves en Culiacán, Sinaloa a donde se buscaron ácaros principalmente en el cañón de la pluma, al observar el interior del cañón, de un total de cinco plumas, tomadas de dos aves, se localizaron ácaros de diversos tamaños, pero en especial unos de gran tamaño aprox 1500u, se determinaron como ácaros de la familia Syringobiidae a la que actualmente se le conoce como Auscouracaridae, se obtuvieron dos machos y una hembra, por lo que se consideró de interés comunicar la presencia de estos ácaros por primera vez en México en esta ave, ya que actualmente hay médicos veterinarios especialistas en aves silvestres de ornato

INTRODUCCIÓN

Los ácaros de las plumas de las aves constituyen un sinnúmero de familias géneros y especies, tomando en cuenta que existen también un sinnúmero de aves, estos ácaros según Proctor 2003, pueden habitar sobre la superficie de las plumas, otros habitan sobre la piel, otros en el sistema respiratorio, señala esta autora que se les conoce como del orden Psoroptididae siendo de las superfamilias Analgoidea, Freyanoidea, y Pterolichoidea asimismo considera que aproximadamente 2000 especies de ácaros de las plumas son simbioses obligatorios y según el sitio a donde se les halle se les denomina como dermicolas, (sobre la piel), syringicolas (dentro de las quillas cañón de la pluma) plumícolas (en la superficie de las plumas).

En México se han realizado estudios sobre estos ácaros por Pérez *et al.* así como por diversos alumnos de la Dra Pérez, sobre aves del género *Aratinga* de diferentes especies, como antecedente del conocimiento de ácaros Syringobiidae (Actualmente Auscouracaridae) Quintero *et al.* comunicaron la presencia de ácaros *Gallilichus hiregoudari* hallados en el cañón de la pluma de gallinas de Tuxtepec Oaxaca, este hallazgo se comunicó en 1989.

MATERIAL Y MÉTODOS

El material consistió en aves muertas se piensa por asfixia, (un total de seis) que eran transportadas en una jaula en la que existían al menos 100 y 6 de ellas resultaron muertas, por lo que el material fue remitido al Departamento de Parasitología de la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia de la Universidad Autónoma de Sinaloa se observó que en las seis aves se habían cortado las plumas primarias del ala izquierda, al revisar la superficie corporal se separaron diversos ácaros, y ya en la sección de Entomología del Departamento de Parasitología de la F.M.V.Z., se observaron y cortaron los cañones de las plumas en los

que se halló a tres ácaros de gran tamaño a los que se pudo de inmediato determinar como de la familia Syringobiidae hoy Auscouracaridae al recurrir a la bibliografía más específica se determinó que se trataba de *Cystoidosoma psittacivora* de acuerdo con la descripción de Dabert 1992 estos ácaros se caracterizan por ser ácaros de gran tamaño a donde el gnatosoma en el macho mide 235u, idiosoma 1295u, poseen una gran paca en la porción anterior del cuerpo, según Proctor 1999 estos ácaros se alimentan de la medula esponjosa que está dentro de la quilla de la pluma.

DISCUSIÓN

Estos ácaros han sido encontrados casi al mismo tiempo sobre *Aratinga brevipes*, procedente de la Isla Socorro, por Montiel Parra G. 2007 quien encontró 20 ejemplares, asimismo en años anteriores se le había hallado sobre otros huéspedes. En conclusión La importancia de esta comunicación radica en el hecho de que se comunica por primera vez en México la presencia de ácaros Auscouracaridae sobre *Aratinga canicularis* dato que refleja la importancia de que cuando se aplique la Medicina Aviar en aves de ornato o compañía, o simplemente aves silvestres se tenga cuidado de enviar material de plumas de esas aves al especialista, ya que esto plantea la posibilidad de realizar un sinnúmero de hallazgos que hasta ahora han pasado desapercibidos para los veterinarios de esta

área, teniendo por lo tanto la posibilidad hasta de hallar especies nuevas para la ciencia.

REFERENCIAS

1. Proctor, H.C. Feather mites (Acari Astigmata) Ecology, Behavior, and Evolution Annu Re. Entomol, 48:105-209. 2003.
2. Pérez, T.M. and W.T. Atyeo. Site selection of the feathers and quill mites of Mexican parrots Acarology 6 ed D.A. Griffiths and C.E. Bowman. pp1:563-570 Chichester, U.K. United Kingdome Ellis Horwood. 1984.
3. Quintero, M.T. and H.A. Acevedo. *Gallilichus hiregoudari* Acari Syringobiidae Auscouracarinae on domestic fowl in Mexico. Abstracts of the VII International Congress of Parasitology. París. Del 20 al 24 de agosto de Pag. 738. 1990.
4. Dabert, J. and R. Ehrnsberger. Neue Arten bei der Federmilbenfamilie Ascouracaridae Gaud&Atyeo, 1976 Osnabrucker naturwiss. Milt 18: 109-150. 1992.
5. Proctor, H.C. *Gallilichus jonesi* sp. n Acari: Auscouracaridae a new species of feather mites from the quills of the Australian brush turkey (Aves Megapodiidae) Australian Journal of Entomology 38: 77-84. 1999.
6. Montiel, Parra G. Tesis de Maestría en Ciencias Biológicas (sistemática) Facultad de Ciencias U.N.A.M. Noviembre de 2007.

SOURCES OF MICROBIAL CONTAMINATION OF FEED AND ITS IMPACT ON ANIMAL PERFORMANCE

LAS FUENTES DE CONTAMINACIÓN DEL ALIMENTO Y SU IMPACTO SOBRE EL RENDIMIENTO ANIMAL

Kurt Richardson

Anitox Corp

RESUMEN

Microorganismos tales como hongos, levaduras y bacterias se encuentran comúnmente en los alimentos para animales, pudiendo afectar adversamente a los granjeros en los rubros de inocuidad alimentaria y productividad animal. La mayoría de la investigación sobre microbiología de los alimentos balanceados se ha enfocado a *Salmonella* debido a las presiones de los consumidores y a las legislaciones publicadas por los gobiernos. Otros patógenos de los alimentos para el humano que pueden estar presentes en las raciones de los animales son *Escherichia coli*, *Listeria* y

Clostridium. La presencia de microorganismos como hongos, levaduras y bacterias Gram positivas y Gram negativas en el alimento balanceado también pueden afectar la salud y la productividad de los animales. Muchos avicultores están desarrollando programas de Análisis de Riesgos y Puntos Críticos de Control (HACCP) con el objeto de reducir la incidencia y los niveles de hongos y bacterias en las raciones de sus aves. Estos programas incluyen al desarrollo de procedimientos para evaluar la calidad microbiológica de los ingredientes de nuevo ingreso, la identificación de los puntos críticos de control dentro de la planta de

alimentos, el uso de tratamientos químicos o térmicos para reducir el nivel de contaminación y la prevención de la recontaminación de las dietas durante su transporte y almacenamiento en la granja.

SUMMARY

Microorganisms commonly found in animal feed include mold, yeast and bacteria. These microorganisms can have a negative impact on animal performance and food safety. The major source for contamination of grains and oilseeds is dust generated when soil is disturbed by strong winds, rain and mechanical harvesting. Insects, rodents and wild birds can also contaminate grain before harvest, during transport and during In the case of animal protein meals, insufficient processing conditions (i.e. cooking time and temperature) and environmental contamination at the processing plant are the sources of final product contamination.

During storage, grain moisture levels, percent of cracked or damaged kernels and percent of fines are considered the most important factors in controlling mold growth. Jones (1987) reported that mold growth occurs more rapidly in kernels that contain higher moisture levels and five times more rapidly on damaged kernels than on intact kernels. Moisture is also considered one of the single most important factors for the multiplication of bacteria. It has been observed that cereal grains and feeds of high moisture content contain a higher than normal level of bacteria and mold.

In the mill, feed ingredients may be contaminated by microorganisms at the receiving area by cross contamination with prior shipments of other ingredients, dust, or pests (i.e. wild birds, rodents and insects). Dust contamination appears to be a major source of *Salmonella* contamination of feed within the feed mill. The incidence of *Salmonella* contamination in dust has been observed to range from 10–50%. Dust particles have a larger surface to weight ratio than feed or feed ingredients and are more likely to absorb moisture from the surrounding air. These high moisture dust particles support the growth/multiplication of *Salmonella*, other bacteria and mold.

There are many different methods to reduce or control the level of microbial contaminants in feed, including improving biosecurity programs in the mill, heat treatment of feed, irradiation of feed and the use of chemical preservatives. Heat treatment and irradiation do not exhibit residual activity and subsequent recontamination of feed can occur after treatment. Thus, many feed mills have adopted the use of chemical preservatives that prevent against recontamination.

In breeders, Mo and Na (1997) examined the effect of feed microbial quality on mortality in flocks experiencing fowl typhoid. During the 15-week trial, mortality in the group consuming “cleaner” feed was lower than the control group (2.57% versus 5.47%). Williams (2000) reported similar reductions in breeder mortality. In breeder farms experiencing high mortality, reducing bacteria levels in feed resulted in decreased mortality in male breeders (59.5-week mortality was reduced from 40.44% to 29.50%) and female breeders (mortality was reduced from 23.7% to 13.70%). Improvements in the number of eggs per hen housed and hatch of fertile eggs were observed in the breeders consuming “clean” feed.

In studies conducted with layers, pullets consuming feed with lower levels of microbial contamination had lower feed conversion (4-6 point improvement: No differences were reported in body weight gains or mortality). During production, hens consuming chemically treated mash feed with a lower level of bacteria produced four more eggs (274 versus 270) over the course of the 52 week trial. An improvement in egg size and quality was reported. No differences were observed for feed conversion or mortality. Current research with twelve breeds of laying hens indicates that brown egg layers exhibit better feed conversion than white egg layers, when consuming chemically treated pelleted feed with lower bacteria counts.

In the study conducted by van Harn, broilers consuming feed with lower level of bacterial contamination had lower mortality (4.2% versus 7.7%) but showed no difference in feed conversion efficiency or body weight gain. In more recent trials with broilers, Richardson and Doerr observed that controlling microbial contamination of feed improved feed conversion (1.63 versus 1.69), reduced mortality (2.56% versus 5.45%) and the improved the immune response to an IBD vaccine. In commercial trials with broilers, reducing the level of microbial contamination in feed resulted in similar performance gains.

The importance of feed microbial quality to the animal producer is becoming apparent due to the increased emphasis on pathogen reduction and the potential ban of growth promoting antibiotics. There are several areas in the feed manufacturing/storage process that can affect the level of microorganisms in feed. The first step to improving the microbial quality of feed is to establish a baseline value for each contaminant. Establishing a baseline of feed microbial quality will allow the producer to monitor changes in the feed manufacturing process and evaluate new technology designed to assist in pathogen reduction.

Table 1. Summary of commercial broiler trials evaluating the effect of feed contamination on performance.

| Trial | #Birds | Body Weight, kg | | Feed Conversion | | Mortality, % | |
|-------|-----------|-----------------|---------|-----------------|---------|--------------|---------|
| | | Control | Treated | Control | Treated | Control | Treated |
| 1 | 394,000 | 2.04 | 2.06 | 1.94 | 1.86 | 2.89 | 2.37 |
| 2 | 209,000 | 2.53 | 2.54 | 1.91 | 1.86 | 3.59 | 3.80 |
| 3 | 247,000 | 2.71 | 2.66 | 1.89 | 1.85 | 3.30 | 2.27 |
| 4 | 344,000 | 2.27 | 2.20 | 1.80 | 1.76 | 5.14 | 3.71 |
| 5 | 137,000 | 2.70 | 2.71 | 1.87 | 1.82 | 3.12 | 3.09 |
| 6 | 125,000 | 2.10 | 2.05 | 1.77 | 1.71 | 3.84 | 2.73 |
| 7 | 101,000 | 2.21 | 2.22 | 1.71 | 1.69 | 2.71 | 2.78 |
| 8 | 204,000 | 2.00 | 1.98 | 1.79 | 1.77 | 6.72 | 4.91 |
| 9 | 350,000 | 2.10 | 2.17 | 1.73 | 1.69 | 5.67 | 5.58 |
| 10 | 1,575,000 | 2.63 | 2.71 | 1.91 | 1.86 | 3.45 | 3.04 |
| Avg. | 3,686,000 | +10 g | | -5 points | | -0.58% | |

INFLUENCIA DE LA TEMPERATURA DE ALMACENAMIENTO SOBRE LOS HUEVOS FERTILES CONTAMINADOS

INFLUENCE OF STORAGE TEMPERATURE ON CONTAMINATED FERTILE EGGS

M. C. R. Rodríguez^A, B. O. Urquiza^A, P. G. Ponce^B, y L. J. A. Quintana^A

^ADepartamento de producción Animal: Aves, Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia,
Universidad Nacional Autónoma de México, 04510

^BGrupo Avícola el Peñón SA. de CV, Yecapixtla Mor., México

SUMMARY

Microorganisms enter floor eggs through the eggshell pores, resulting in the so called "exploding eggs." Ninety-six broiler breeder floor eggs were sprayed with a glutaraldehyde/quaternary ammonium commercial disinfectant, then stored for one week at two different temperatures, i.e., Group A, 48 eggs stored at 25°C and Group B, 48 eggs stored at 5°C. All eggs were then incubated in two Brisea[®] setters. At 18 days of incubation the numbers of contaminated eggs were recorded. Groups A and B had 4.16% and 20.8% exploding eggs, respectively. It is suggested that the cold temperature inhibited bacterial growth during storage, but it further promoted bacterial growth when the temperature was increased to 37.7°C.

RESUMEN

En el huevo fértil recolectado del suelo, los microorganismos penetran a través de los poros del cascarón, produciendo los denominados "huevos explosivos". Se incubaron 96 huevos de reproductoras pesadas recolectados del piso y desinfectados por aspersión con una fórmula comercial a base de glutaraldehido y cuaternarios de amonio, y posteriormente almacenados durante una semana a dos diferentes temperaturas. El grupo A, (48 huevos) fueron almacenados a temperatura ambiente a 25°C y el grupo B, (48 huevos) a temperatura de refrigeración (5°C). Se incubaron en dos máquinas incubadoras comerciales y se anotó el número de huevos contaminados a los 18 días de incubación. En el grupo A hubo 4.16% de huevos explosivos, mientras que en

el grupo B hubo 20.8% de huevos explosivos. Se sugiere que la temperatura de almacenamiento frío detiene el crecimiento bacteriano durante el almacenamiento pero favorece el posterior crecimiento bacteriano cuando aumenta a 37.7°C la temperatura.

INTRODUCCIÓN

Las bacterias y los hongos que pueden afectar a los huevos fértiles, se encuentran en todas las partes del ambiente en las naves, en el suelo, en el estiércol y hasta en las partículas de polvo en el aire. La manera más normal de que los huevos fértiles se contaminen es al ser puestos sobre una cama sucia de los nidales o en el piso de la caseta. Cuando existe una gran cantidad de bacterias sobre la superficie del cascaron del huevo aumenta las posibilidades de que estas penetren a través de los poros del cascaron produciendo los denominados "huevos explosivos". El almacenamiento de los huevos a incubar es una parte de la incubación comercial. Normalmente, el período de almacenamiento raramente sobrepasa los siete días, pero circunstancias comerciales hacen que algunas veces éste se alargue. El almacenamiento de los huevos para incubar produce una serie de efectos no deseables como reducción de la tasa de eclosión, prolongación del período de incubación, disminución de la calidad del pollito recién nacido, afecta negativamente al crecimiento posterior.

MATERIAL Y MÉTODOS

Se recolectaron del piso un total de 96 huevos de gallinas reproductoras pesadas. Posteriormente se

desinfectaron por medio de aspersión con un formula comercial base de glutaraldehido al 40% y cuaternarios de amonio al 6% a una dosis de 1mL/L de solución*. Se dividieron en dos grupos con 48 huevos cada uno y se almacenaron por una semana a dos temperaturas diferentes; el grupo A fue almacenado a temperatura ambiente (25°C) mientras que el grupo B fue almacenado a temperatura de refrigeración (5°C). Posteriormente fueron incubados en una incubadora comercial** donde se controló la temperatura y humedad.

Diseño del estudio. Los huevos fueron observados diariamente durante la incubación, eliminando los huevos contaminados para evitar posibles explosiones de los mismos y posteriores contaminaciones de otros huevos.

RESULTADOS

En el grupo A hubo dos huevos explosivos (4.16%), mientras que en el grupo B hubo 10 huevos explosivos (20.8%). Posiblemente la baja temperatura de almacenamiento detiene el crecimiento bacteriano durante el almacenamiento pero favorece el posterior crecimiento bacteriano cuando aumenta a 37.7°C la temperatura durante la incubación. Se sugiere realizar posteriores estudios para determinar las causas del incremento de huevos explosivos, así como determinar otras causas de mortalidad embrionaria y los parámetros de incubabilidad total.

*Multicide, AngloCorp SA de CV.

**Incubadora marca Brinsea.

EFICACIA DE LA DESINFECCIÓN DE HUEVOS FÉRTILES RECOLECTADOS DEL SUELO SOBRE LA INCUBACIÓN

THE EFFICACY OF DISINFECTING FLOOR EGGS ON INCUBATION

M. C. R. Rodríguez^A, B. O. Urquiza^A, P. G. Ponce^B, y L. J. A. Quintana^A

^ADepartamento de producción Animal: Aves, Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia, Universidad Nacional Autónoma de México, 04510

^BGrupo Avícola el Peñón SA de CV. Yecapixtla Mor. México

SUMMARY

The purpose of this study was to determine the benefits of incubating floor eggs and those of disinfecting nest eggs. A commercial glutaraldehyde-quaternary ammonium combination product was used. Three 24-hatching egg groups were incubated in Brinsea[®] setters at an altitude of 2,240 meters above

sea level. The following hatchability results were obtained: A) non-disinfected dirty eggs (controls): 45.85%; B) spray-disinfected dirty eggs: 70.83%; C) non-disinfected nest eggs: 66.66%. No exploding eggs or chicks with poorly healed navels were seen in any of the groups. Group C, however, had an abnormal smell at hatchery break out analysis. Performing replicate

trials to determine the benefits of incubating disinfected floor fertile eggs and discontinuing the disinfection of nest eggs from non-automated, non-environmentally controlled houses at lower altitudes is suggested.

RESUMEN

El objetivo fue determinar la conveniencia de incubar huevos de piso, así como la posibilidad de no desinfectar huevos del nido. Se utilizó una fórmula comercial de glutaraldehído y cuaternarios de amonio*. Se incubaron huevos fértiles divididos en 3 grupos de 24 huevos cada uno, en incubadoras comerciales** a una altitud de 2,240 msnm; obteniendo los siguientes resultados de incubabilidad; (A) testigo, huevos sucios sin desinfectar 45.85%, (B) huevos sucios desinfectados por aspersión 70.83%, (C) huevo de nido sin desinfección 66.66%. No hubo huevos explosivos, ni pollitos con mala cicatrización del ombligo en ningún tratamiento. Sin embargo un huevo del grupo C presentó un olor anormal en la embriodiagnósis. Se sugiere hacer pruebas con repeticiones para determinar la factibilidad de incubar huevos recolectados del suelo desinfectados y dejando de desinfectar huevos del nido, en casetas de ambiente natural sin automatización, a una altitud de menor.

INTRODUCCIÓN

La ovoposición en el piso de las gallinas reproductoras pesadas ocasiona grandes pérdidas en la avicultura nacional, debido a la baja producción de pollitos a partir de huevos incubables contaminados. Cuando hay un gran número de bacterias sobre la superficie del cascarón del huevo, aumentan las oportunidades de que las bacterias penetren a su interior. Estas utilizan los nutrientes del huevo para multiplicarse, quitando al embrión una fuente de nutrimentos crucial para su buen desarrollo, que puede ocasionar su muerte. Además, cerca del 2% de huevos contaminados dejan de ser incubados por ser un riesgo latente al desencadenar una serie de explosiones contaminando a otros huevos. Una fumigación eficaz

de los huevos para incubar es un medio probado de reducir el número de bacterias del cascarón. Esto ayuda a que no se contamine la sala de incubación con gérmenes patógenos potenciales, tales como salmonellas. El objetivo de este trabajo fue determinar si conviene incubar huevos de piso, así como si es posible dejar de desinfectar huevos del nido.

MATERIAL Y MÉTODOS

Se recolectaron huevos fértiles en una granja de reproductoras pesadas de nidos y los que son puestos en el piso. Se formaron tres grupos de 24 huevos cada uno. El grupo (A) testigo, huevos sucios sin desinfectar, (B) huevos sucios desinfectados por aspersión y (C) huevo de nido sin desinfección. Para desinfectar los huevos del grupo B se usó una fórmula comercial de glutaraldehído al 40% y cuaternarios de amonio al 6% a una dosis de 1ml/litro de solución*. Posteriormente se incubaron en incubadoras comerciales** a una altitud de 2,240 msnm en donde se controló la temperatura y humedad.

Diseño del estudio. Los huevos fueron revisados diariamente dos veces al día, para mantener la temperatura y humedad óptima. Así como para eliminar los huevos contaminados. A los 18 días de incubación se realizó la embriodiagnósis eliminando todos los huevos claros (infértiles) y con mortalidad embrionaria.

RESULTADOS

En el Cuadro 1 se observa el porcentaje de nacimiento en los diferentes tratamientos, así como la mortalidad embrionaria en sus diferentes fases.

No hubo huevos explosivos, ni pollitos con mala cicatrización del ombligo en ningún tratamiento. Sin embargo un huevo del grupo C presentó un olor anormal en la embriodiagnósis. Se sugiere hacer pruebas con repeticiones para determinar la factibilidad de incubar huevos recolectados del suelo desinfectados y dejando de desinfectar huevos del nido, en casetas de ambiente natural sin automatización, a una altitud menor.

Cuadro 1. Porcentaje de nacimiento en los diferentes tratamientos.

| Tratamiento | #huevos | Nac. | mortalidad embrionaria | | | | Contam. |
|-------------------------------|---------|-------------|------------------------|----|-----|---------|---------|
| | | | I | II | III | Infert. | |
| A)Huevo sucio | 24 | 11 (45.85%) | 2 | 2 | 4 | 2 | 0 |
| B)Huevo sucio desinfectado | 24 | 17 (70.83%) | | 1 | 2 | 1 | 0 |
| C)Huevo de nido s/desinfectar | 24 | 16 (66.6%) | 2 | 2 | 2 | 0 | 1 |

*Multicide, AngloCorp SA de CV. **Incubadora marca Brinsea.

CLASIFICACIÓN DE LOS VIRUS DE LARINGOTRAQUEÍTIS INFECCIOSA AISLADOS EN MÉXICO ENTRE 2005 Y 2007 MEDIANTE PCR Y RFLPS

PCR AND RFLP CLASSIFICATION OF INFECTIOUS LARYNGOTRACHEITIS VIRUSES ISOLATED IN MEXICO BETWEEN 2005 AND 2007

G. N. Romero^A, M. N. Ledesma^A, B. F. Layseca^B, y R. M. A. Marquez^A

^ADepartamento de Producción Animal: Aves FMVZ UNAM

^BLaboratorio de Investigación Pecuaria y Patología, SA de CV Tepatitlán Jalisco

SUMMARY

The purpose of this study was determining the molecular differences of infectious laryngotracheitis viruses (ILTV) isolated between 2005 and 2007, using both polymerase chain reaction (PCR) and restriction fragment length polymorphism (RFLP) techniques. Viral DNA was extracted from chorioallantoic membranes using the phenol: chloroform: isoamyl alcohol method. Two primer groups were used for nested PCR and they were selected from the sequence of a short region in the ILTV genome for the E glycoprotein. The first ones with the following sequence: 5'-GCTGGGTTCTGGGCTACACAAC-3' and 3'-TGCGCGTGACTIONCGGAGAG-5' amplified a 626 bp fragment, while the second ones with the following sequence:

5'-GACACCATCAAGCCGTCAGAG-3' and 3'-CCCAAGAATTCCGCCATCA-5', amplified a 296 bp fragment. The PCR-amplified products were subjected to RFLP analysis. Differences between the two isolates were found. These isolates should be further sequenced as to establish their differences and similarities.

RESUMEN

La laringotraqueítis infecciosa aviar (LTI) se ha convertido en un tema importante en el ambiente avícola de muchos países del continente americano. México no es la excepción. Después de muchos años de considerarse un padecimiento propio de gallinas ponedoras o reproductoras, es ahora una de las infecciones emergentes en las granjas de pollo de engorda.

Es una enfermedad viral de las vías respiratorias de pollos que puede resultar en pérdidas graves en la productividad debidas a mortalidad, menor producción

de huevo o ambas. Es una enfermedad aguda caracterizada por signos de depresión respiratoria, boqueo y expectoración de moco sanguinolento. La mucosa de la tráquea presenta edema, inflamación, erosión y hemorragias. Las inclusiones intranucleares están presentes en las etapas tempranas.

El objetivo del presente estudio fue determinar diferencias moleculares entre virus de laringotraqueítis infecciosa de 9 aislados del virus en el periodo comprendido entre 2005-2007 mediante PCR y RFLP's.

La extracción del ADN viral se realizó a partir de membranas corialantoideas con el método de fenol:cloroformo:alcohol isoamílico. Se utilizaron dos grupos de iniciadores para el PCR anidado, seleccionados de la secuencia de una región corta del genoma del ILTV para la glicoproteína E. Los primeros, con una secuencia

5'-GCTGGGTTCTGGGCTACACAAC-3' y 3'-TGCGCGTGACTIONCGGAGAG-5', amplificaron un fragmento de 626 pb; los segundos, con la secuencia 5'-GACACCATCAAGCCGTCAGAG-3' y 3'-CCCAAGAATTCCGCCATCA-5', amplificaron un fragmento de 296 pb.

A partir de los productos de PCR amplificados, se llevó a cabo el análisis de RFLP's encontrándose al menos dos patrones diferentes entre los aislados utilizando las enzimas *Dde I* y *Eae I*. Estas diferencias podrían estar involucradas con los cambios de comportamiento de virus observados en el campo, sin embargo, se requiere la secuenciación de éstos aislados para establecer diferencias y similitudes más precisas entre ellos.

(El trabajo completo forma parte de la tesis de maestría del primer autor y será presentado para su publicación en *Acta Veterinaria Hungarica*.)

THE USE OF PI 60/45 WATER TREATMENT IN THE PRODUCTION OF BROILERS WITHOUT THE USE OF ANTIBIOTICS

EL TRATAMIENTO DEL AGUA CON PI 60/45 MEJORA EL RENDIMIENTO DE LAS AVES SIN USAR ANTIBIÓTICOS

R. Saini^A, A. Carlson^B, J. Wells^B, and W. Dudley-Cash^C

^APreserve International, Turlock, CA, USA, ramsaini@preserveinc.com

^BCentral Coast Fryers, Santa Clara, CA, USA

^CWDCNutrition, Modesto, CA, USA, dudleycash@aspaq.com

RESUMEN

Las principales compañías avícolas están promoviendo entre los consumidores la carne de pollo producida sin el uso de antibióticos. Cuando se eliminan los antibióticos del programa de engorda es frecuente que se presenten problemas del rendimiento y elevada mortalidad. Realizamos una serie de pruebas de campo para evaluar la capacidad de diferentes tratamientos de controlar la mortalidad y mejorar el rendimiento en ausencia de antibióticos promotores del crecimiento. El experimento se realizó en una granja comercial con seis casetas de 23,500 pollos de engorda cada una. La edad promedio de mercado fue 49 días. Los tratamientos comparados fueron: PI 60/45, Manage, Poultry Water Treatment® (PWT) y una mezcla de Ultra Cop® (UCOP) con PWT. El PI 60/45 presentó el menor promedio de mortalidad en las semanas 6 y 7 (1.99%) y el mejor peso promedio al mercado (2.34 Kg). Los resultados sugieren que los tratamientos al agua mejoran la mortalidad y el peso al mercado del pollo de engorda cuando se eliminan los antibióticos del programa de crecimiento. Los mejores resultados se obtuvieron con PI 60/45.

INTRODUCTION

The production of broiler meat without the use of antibiotics is entering mainstream commerce. Major broiler companies throughout the world are producing and promoting broilers grown without the use of antibiotics for the consumer market, (even in the United States where it is not required). The primary challenge is to grow broilers without antibiotics economically. Water treatments are one of the approaches that have been used to help control the problems that frequently result in poor performance and elevated mortality when antibiotics are removed from the feed. A series of field experiments was conducted to assess the effectiveness of the commercial

water treatment PI 60/45, and compare it with other commercial water treatments.

EXPERIMENTAL DESIGN

The experimental facility was a commercial broiler farm located in the San Joaquin valley of central California, USA. The farm had six commercial curtain-sided broiler houses. The six houses were similar in construction and equipment. Each broiler house was approximately 20,000 ft² (1860 m²) in size and housed 23,500 broilers per brood, at a density of 0.85 ft² (790 cm²) per broiler. Rice hulls served as the bedding material, and were changed once per year. The feeding system consisted of pan feeders and the water system was nipple drinkers. Water treatments were administered through a water proportioner in each individual house, four to five days each week. Commercial broiler feeds (starter, grower, finisher) were fed at all times. The feed varied from time to time depending on ingredient availability and economics.

The general management practice was all-in and all-out with all of the six houses filled during about a six-day period of time and all six houses marketed within a six-day period of time. The average age of broilers marketed was 47-49 days. All birds received bursal vaccine and Newcastle/bronchitis vaccine. A coccidiostat (primarily ionophore coccidiostats monensin or salinomycin) was included in all feed, with the appropriate withdrawal before processing. Antibiotics were not included in the feed or water or otherwise administered to the birds.

The water treatments compared were:

- 1) PI 60/45 (1 oz/3 US gal. drinking water, 29.57 mL/11.355 L)
- 2) Manage®
- 3) Poultry Water Treatment® (PWT) (1 lb./512 gal. drinking water, 453 g/1937.9 L for 2003 and 2004)(1 lb./320 gal., 453 g/1211.2 L for 2005)

- 4) A mixture of Ultra Cop® (UCOP) with PWT (4 oz UCOP/128 gal + 1 lb. PWT/512 gal., 118.28 cc UCOP/1937.9 L + 453 g PWT/1937.9 L drinking water).

All six houses in each brood (approximately 141,000 chicks) received the same water treatment. There were five broods per year for the years 2003, 2004 and 2005 for a total of more than 2 million broilers.

RESULTS

Data for mortality and weight at marketing were the experimental variables measured. Broilers grown without the use of antibiotics frequently have a serious mortality problem, particularly at six to seven weeks of age. Data for mortality during the sixth and seventh week of grow-out were collected on a house-by-house basis and summarized by brood and treatment. Average market weight collected by brood/treatment was measured. The results for mortality, weight and condemn are shown in Tables 1, 2 and 3. The results for mortality, weight, and condemn by year are shown in charts 1 (2003), 2 (2004) and 3 (2005).

The water treatment PI 60/45 was the treatment applied to all of the houses in the first and second brood of the year 2003. Manage/H₂O was the treatment for all houses in the third brood. The combination of UCOP/PWT was the treatment for the fourth and fifth broods. In 2004 PWT was the treatment for the first and second broods, UCOP/PWT for the third brood and PI 60/45 for the fourth and fifth broods. PI 60/45 was the treatment for the first brood of 2005 and PWT was the treatment for the second, third, fourth, and fifth broods. The values given in Table 1 are the average for the 6 houses in a brood. The arithmetic average for all broods representing a specific water treatment are given at the bottom of the table.

The average 6 plus 7 week mortality for all three years (2003, 2004, 2005) was 1.99% when the water treatment was PI 60/45. The mortality was higher for all of the other water treatments (4.08% for PWT, 2.25% for UCOP/PWT and 5.75 for Manage).

PI 60/45 resulted in the best average weight with an average market weight of 5.14 lbs. for five broods. The combination water treatment, UCOP/PWT, (5.03 lbs., or 2.28 kg), had the second heaviest weight with the treatment PWT ranked third in average brood weight (4.90 lbs., or 2.22 kg). The brood that received Manage (4.38 lbs., or 1.99 kg) was the lightest in market weight; however, it did represent only one brood.

Again, PI 60/45 resulted in the lowest condemnation of all of the water treatments, 1.91% condemnation. PWT was second at 2.11%, UCOP/PWT third at 2.32% and Manage last at 7.33%.

ECONOMICS

The experimental design did not include a negative control (no water treatment). Previous experience has shown performance is unacceptable when antibiotics are removed from the growing program. Using the average performance values for the three years (2003, 2004, 2005) economic comparisons can be made between the water treatments tested.

Mortality. PI 60/45 had the best average 6 plus 7 week mortality at 1.99%, followed by the combination of UCOP/PWT at 2.25%, PWT with an average mortality of 4.08%, and Manage with a mortality of 5.75% measured on a single brood (Table 1). Based on a production flock of one million birds and an average mortality of 1.99% the PI 60/45 would result in 980,100 birds reaching market age. The PWT, with an average mortality of 4.08% would have resulted in 959,200 birds reaching market age (20,900 fewer than PI 60/45). The UCOP/PWT (2.25% mortality) would have 2,500 fewer birds reach market age, (977,500) and the Manage (5.75% mortality) would have 37,600 fewer birds reach market age, (942,500).

Condemn. PI 60/45 had the lowest average condemn at 1.91% (Table 3). PWT was next with a condemn of 2.11%. UCOP/PWT had an average condemn of 2.32% and Manage had a condemn of 7.33%.

With a condemn of 1.91%, and taking into account the mortality, PI 60/45 would have 961,380 birds accepted from a starting flock of 1-million birds. PWT, with a condemn of 2.11% would yield only 938,961 birds accepted. The combination of UCOP/PWT would have resulted in 954,822 birds after mortality and condemn. Manage, the poorest of the water treatments tested would have 873,415 birds remaining after mortality and condemn.

Weight. PI 60/45 also had the best average live weight (5.14 lb., or 2.33 kg) (Table 2). PWT at an average weight of 4.90 lb. (2.22 kg) was 0.24 lb. (109 g) lighter than the PI 60/45. UCOP/PWT had an average weight of 5.03 lb. (2.28 kg) (0.11 lb., or 50 g lighter) and Manage had an average weight of 4.38 lb. (1.99 kg) (0.76 lb., or 345 g lighter).

The total weight of chicken produced after mortality and condemn can be calculated by multiplying the average weight by the number of birds. For PI 60/45 the total weight produced after mortality and condemn was 4,941,493 lbs. (2,241,040 kg). PWT had a total weight produced of 4,600,909 lbs. (2,086,580 kg), UCOP/PWT had 4,802,755 lbs. (2,178,120 kg) and Manage only 3,825,558 lbs. (1,734,947 kg).

Accumulated value. The total live value of chicken produced can be calculated by multiplying the

weight produced from a beginning flock of one million birds (minus mortality and condemn) by an assumed live value of 40 cents per lb.

For PI 60/45 the calculated live value produced was \$1,976,597. The live value produced using PWT was \$1,840,364. The live value for the combination UCOP/PWT was \$1,921,102. For Manage the live value produce was only \$1,530,223.

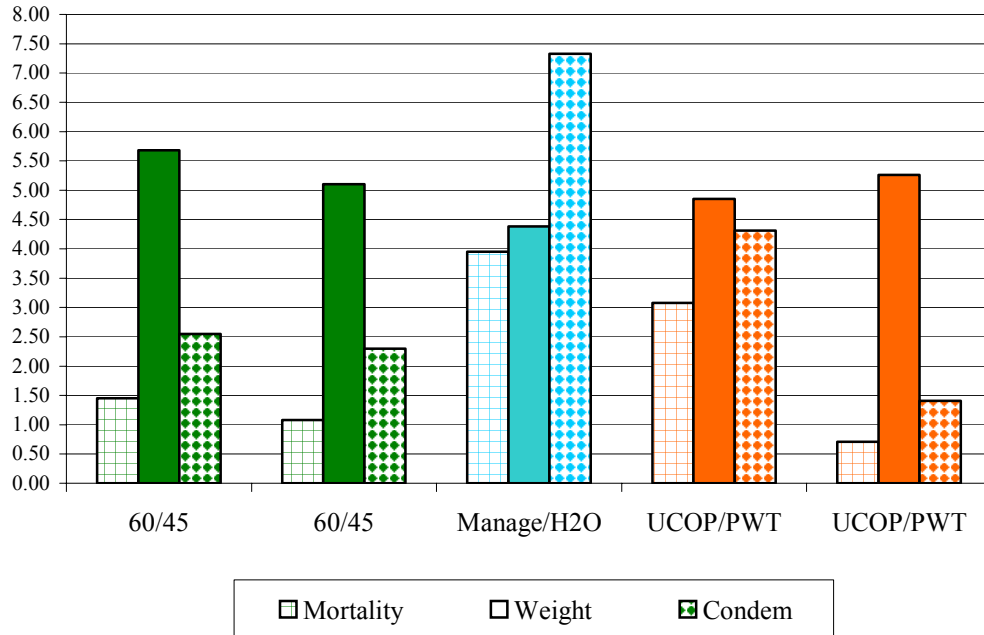
The PI 60/45 water treatment resulted in more production value than any of the other water treatments tested. Based on a starting flock of one million birds the difference was \$136,233 when PI 60/45 was compared with PWT. This is equivalent to 13.6 cents more income for each bird started. On a 5.0 lb. (2.27 kg) chicken that is 2.7 cents/lb. (5.9 cents/kg), a rather significant amount.

CONCLUSIONS

These results suggest that water treatments improve mortality, market weight and condemnation for broilers when antibiotics are removed from the growing program. Of the water treatments tested PI 60/45 consistently gave the best results. PI 60/45 resulted in the best mortality and market weight of all the water treatments tested. PI 60/45 also had the best condemnation when all of the broods were included.

Based on a starting flock of 1 million birds and a live market value of 40 cents/lb. (88 cents/kg) PI 60/45 resulted in the production of \$136,233 more chicken than PWT, \$55,495 more chicken than the combination of UCOP/PWT, and \$446,374 more chicken than Manage.

Chart 1. 7 Week Mortality, Weight and Condem
2003



| Economic Value of PI 60/45 | | | | |
|--|-----------------|-------------|-----------------|---------------|
| Effect Of | PI 60/45 | PWT | UCOP/PWT | Manage |
| Mortality, No. | 980,100 | 959,200 | 977,500 | 942,500 |
| Condem, No. | 961,380 | 938,961 | 954,822 | 873,415 |
| Weight, lbs | 4,941,493 | 4,600,909 | 4,802,755 | 3,825,558 |
| Total Value | \$1,976,597 | \$1,840,364 | \$1,921,102 | \$1,530,223 |
| Difference compared to PI 60/45 | | -\$136,233 | -\$55,495 | -\$446,374 |

EVIDENCIA DE ESPERMATECAS O NIDOS ESPERMÁTICOS EN UN LOTE DE GALLINAS REPRODUCTORAS AISLADAS DEL CEIEPAV-UNAM Y SU EFECTO SOBRE LA FERTILIDAD DEL HUEVO

EVIDENCE OF SPERMATHECAE (SPERM NESTS) IN AN ISOLATED BREEDER FLOCK AND THEIR EFFECT ON EGG FERTILITY

Ezequiel Sánchez Ramírez^A, Escobar López Ana Cecilia^B, Monroy Becerra Israel^B, Ortiz García Otilio^B, Ricardo González Israel Daniel^B, Zúñiga Muñoz Alejandra M.^B, y Elizabeth Posadas Hernández^A

^AUNAM FMVZ CEIEPAV

^BEstudiantes practica de Medicina y Zootecnia Avícola II Hemisemestre 2007-2

SUMMARY

Nineteen hens were taken from a breeder flock then individually caged away from males in CEIEPAV-FMVZ UNAM (Poultry Production Education, Research, and Extension Center, Faculty of Veterinary Medicine and Animal Husbandry, The National Autonomous University of Mexico). Eggs were collected daily. Fertility was tested in the field and at 24 hours of incubation by detecting the blastoderm on the yolk. Throughout the seven days when eggs were collected, 100% fertility was found both in the field and at 24 hours of incubation. This confirms that hens store sperm cells in the spermathecae used to fertilize the eggs in the absence of males.

RESUMEN

Se seleccionaron 19 gallinas del lote de reproductoras y se aislaron de los machos en jaulas individuales obteniendo diariamente el huevo producido. Se realizó la prueba de fertilidad en campo y a las 24 horas de incubación mediante la identificación del blastodermo en la yema. En los siete días en que se colectaron los huevos producidos por las gallinas seleccionadas se encontró un 100% de fertilidad tanto en campo como a las 24 horas de incubación, con lo que se comprueba hasta el momento que las gallinas almacenan espermatozoides en las espermatecas que son utilizados para fertilizar el huevo en la ausencia del macho.

INTRODUCCIÓN

Las espermatecas o nidos espermáticos son órganos especiales en donde se mantienen los gametos masculinos hasta el momento de la fecundación, inicialmente fueron descubiertos en por el danés

Tauber en 1875 y mucho tiempo después fueron redescubiertos por Van Drimmeln.

Los nidos espermáticos se encuentran en la región falopial caudal del infundíbulo y la porción caudal del mágnum, pero sobre todo en una banda de 3 a 4 centímetros localizada entre la porción caudal del útero y la porción craneal de la vagina, área comúnmente conocida como unión útero vaginal.

Histológicamente las espermatecas son glándulas tubulares no ramificadas de 70 μm de diámetro y de 250-500 μm aproximadamente con una terminación ciega y surgen como invaginaciones de la mucosa, su pared esta formada por una capa monocelular no ciliada que, sin embargo, fuera del cuello presentan unas microvellosidades que entran en contacto con los espermatozoides.

Las glándulas de la unión útero vaginal están aparentemente provistas de innervación y tejido contráctil, y poseen también un sistema vascular bien desarrollado.

Una vez depositado el semen en el oviducto de las gallinas, los espermatozoides desaparecen gradualmente del lumen del oviducto y se ubican en las espermatecas, donde se secretan nutrientes que permite a los espermatozoides mantenerse viables por un período de 7-14 días en el pollo y hasta por más de 21 días en el pavo, después de la ovoposición los espermatozoides son expulsados de esos túbulos por un mecanismo aún desconocido y migran al infundíbulo para fertilización del huevo.

Hay evidencia que sugiere que los espermatozoides llenan las espermatecas de manera secuencial sin mezclarse en sucesivas inseminaciones; el semen de la última inseminación es el más apto para fertilizar el óvulo.

Las espermatecas cobran vital importancia debido a que entre aproximadamente 150 millones de espermatozoides producto de la copula o inseminación

artificial permanecerán en las espermatecas, principalmente en la unión útero-vaginal que es el sitio mas importante de conservación de los espermatozoides.

La existencia de las espermatecas permite que los espermatozoides estén disponibles en el momento en que la gallina ovule.

MATERIAL Y MÉTODOS

Se colectó información necesaria para evidenciar la presencia de espermatecas en gallinas reproductoras

con más de 90 semanas de edad del CEIEPAv-UNAM. Se seleccionaron 19 gallinas del lote de reproductoras y se aislaron de los machos en jaulas individuales, se alimentaron con alimento para gallinas de postura.

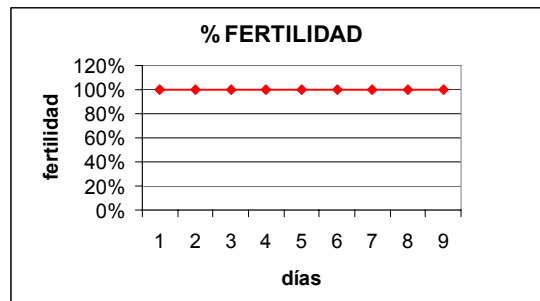
Se levantó diariamente el huevo producido por las gallinas seleccionadas, al 50% se le realizó la prueba de fertilidad en campo, la cual consistió en abrir el huevo por la cámara de aire y localizar el blastodermo. El otro 50% se desinfecto, se introdujo al cuarto frío por 24 horas para posteriormente se incubarlo por 24 horas, terminado este tiempo se procedió a evidenciar la presencia del blastodermo en la yema.

RESULTADOS

Tabla 1. Número de huevos y porcentaje de fertilidad del día 1 al 9.

| NUMERO DE HUEVOS | DIA | % FERTILIDAD |
|------------------|--------|--------------|
| 11 | Mar-01 | 100% |
| 7 | MIER 2 | 100% |
| 5 | JUE 3 | 100% |
| 6 | VIE 4 | 100% |
| 6 | SAB 5 | 100% |
| 6 | LUN 6 | 100% |
| 8 | MAR 7 | 100% |
| 12 | MIE 8 | 100% |
| 6 | JUE 9 | 100% |

Gráfico 1. Porcentaje de fertilidad.



DISCUSIÓN

Por medio del presente estudio se ha determinado, que el grupo de 19 gallinas seleccionadas después de nueve días sin copula siguen produciendo huevo fértil candidatos a incubación lo que demuestra la existencia de los nidos espermáticos en el aparato reproductor de las hembras.

CONCLUSIONES

Con los resultados obtenidos y la literatura consultada, se propone que se extienda el periodo de tiempo del estudio para obtener datos más exactos de cuanto tiempo permanecen viables los espermatozoides en el aparato reproductor de la hembra.



Figura 1. Izquierda huevo fértil de cero días de incubación, derecha: huevo fértil de 24 horas de incubación. Tomada por alumnos de rotación práctica de Medicina y Zootecnia Avícola II 2007-2.

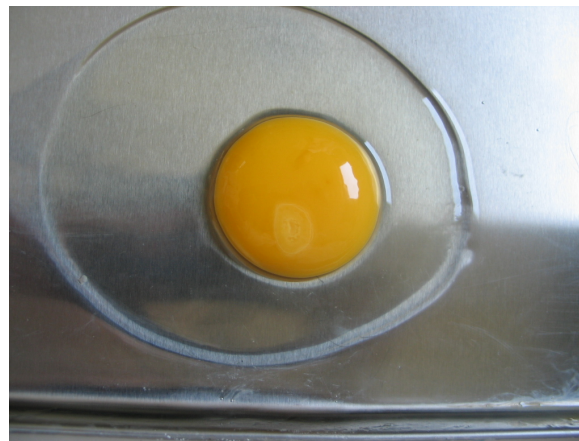


Figura 2. Huevo fértil de 24 horas de incubación. Tomada por alumnos de rotación práctica de Medicina y Zootecnia Avícola II 2007-2.

REFERENCIAS

1. Abad, J. y L.J. Castello. Reproducción e incubación en avicultura, Real Escuela de Avicultura, pp 42. 2003.
2. De Reviere, M. Reproducción de las aves, Ediciones Mundi-Prensa, pp 47. 1992.
3. Causey, W.G. Sturkie's Avian Physiology, Academia Press, pp 575. 2000.
4. Carbajo, G.E. Cría de avestruces, Real Escuela de Avicultura, 2ª edición. 1997.
5. Ceniceros, R.M. *Et al.* Examen general de calidad profesional Aves, capítulo 2, UNAM-CENEVAL, pp 155. 1997.
6. Kevin-Hessling, H. Inseminación artificial, volumen 24, Disponible en: www.worldpoultry.net Número 7, 2006.

LA IMPLEMENTACIÓN DE PERCHAS PARA DISMINUCIÓN DE ESTRÉS EN LA CRIANZA DE PAVOS

USING PERCHES TO DECREASE STRESS IN POULTS

H. I. Sánchez, H. E. Posadas, R. E. Sánchez, y M. A. Stanford

Centro de Enseñanza, Investigación y Extensión en Producción Avícola FMVZ-UNAM

SUMMARY

Pecking order allows turkeys to defend themselves against predators and assure feed in order to guarantee species preservation. Hierarchy is established especially among adult males expressing dominant attitudes over their flock mates. Young, three- to five-month-old poults, fight each other to establish dominance. Fights and stress-associated economic losses can be prevented using new environmental practices i.e. grazing or installing perches as resting sites. Perch placement was studied in CEIEPAv-FMVZ UNAM (Poultry Production Education, Research, and Extension Center, Faculty of Veterinary Medicine and Animal Husbandry, The National Autonomous University of Mexico) resulting in decreased male fights and decreased numbers of birds injured as a result of fighting.

RESUMEN

El orden social entre los pavos tiene como objetivos, la defensa contra depredadores y la seguridad de su alimentación, todo ello para garantizar la preservación de la especie.

La jerarquía se establece especialmente entre los machos adultos, manifestándose con actitudes de dominancia respecto a sus compañeros de grupo, las luchas de esta especie se producen entre los pavitos jóvenes de 3 a 5 meses de edad para marcar la dominancia entre ellos, estas se pueden prevenir buscando nuevas formas de enriquecimiento ambiental, uno de ellos es la de sacarlos a pastorear para disminuir el estrés o la implementación de sitios de descansos como son las perchas, con el fin de prevenir las peleas para evitar pérdidas económicas. Es por esto que en el CEIEPAv, se investigó la implementación de perchas, para reducir las peleas entre machos y disminuir el número de aves lastimadas por las peleas.

INTRODUCCION

Los estudios de conducta y bienestar animal en aves domesticas, se han desarrollado principalmente en gallinas de postura. La información sobre pavos es escasa; se conoce, que debido a las altas densidades de

población de y tipos de sistemas de producción, comprometen las necesidades de conducta de las aves relacionadas a la explotación, el mantenimiento del plumaje y el de perchar. La actividad de perchar está relacionada, con el descanso y la reducción del riesgo de depredación en la mayoría de las aves de hábitos diurnos. Debemos recordar que el uso de perchas, ayuda a evitar los apilamientos durante la noche, ayudan a controlar el problema de ampollas en la pechuga; así mismo, ayuda a fortalecer el aparato locomotor, para evitar el problema de patas.

MATERIAL Y METODOS

El experimento se realizó en el Centro de Enseñanza, Investigación y Extensión en Producción Avícola de la FMVZ-UNAM. Se utilizaron 300 pavos mixtos de la estirpe BUTA, de cinco semanas de edad y el experimento concluyó al cumplir los pavos 15 semanas de edad. Las aves fueron distribuidas completamente al azar en cuatro lotes con 75 aves en cada uno. Los cuales fueron alimentados a acceso libre con alimento de tipo comercial en forma de pellet. En un lote se implementó el uso de perchas, las cuales fueron hechas de material de palos de madera (4.5cm x 4.5cm), colocando la primer percha a una altura de 20cm por encima de la cama, cada percha subsecuente debe estar a 30cm. Las perchas fueron redondeadas en sus extremos para evitar lesiones en las patas. Los lotes contaban con cama de paja.

RESULTADOS

Los datos obtenidos (Cuadro 1), muestran una importante reducción en el número de animales lesionados.

DISCUSIÓN

Existen pocas investigaciones publicadas del uso de perchas en la producción actual de pavos, lo cual es importante debido a que permiten prevenir problemas de agresión y animales lesionados.

CONCLUSIONES

De la información obtenida, se concluye que en el lote experimental donde se implementó el uso de percha los animales no mostraron algún comportamiento de agresión, como se muestra en los cuadros en donde no se implementan perchas.

REFERENCIAS

1. Mercia. Método Moderno de crianza Avícola.

Editorial Continental S.A de C.V México. 5ta edición. 1991.

2. Marcelo MO, Edmundo GM. Caracterización de sitios de percha del guajolote silvestre (*Meleagris gallopavo mexicana*) en la Sierra Fría, Aguascalientes, México. Revista mexicana de Biodiversidad, 78:163-173. 2007.

3. Tejeda AP, Francisco GM. Efecto del enriquecimiento ambiental sobre la conducta, parámetros de producción y respuesta inmune en pollos de engorda. Veterinaria México, 33(2) 89-100. 2002.

Cuadro 1. Efecto de las perchas en aves lesionadas.

| Lote | Animales lesionados | Aves por lote | % animales lesionados |
|--------------|---------------------|---------------|-----------------------|
| 1 con percha | 0 | 75 | 0 |
| 2 sin percha | 3 | 75 | 4 |
| 3 sin percha | 5 | 75 | 7 |
| 4 sin percha | 4 | 75 | 5 |

ANÁLISIS COMPARATIVO DE DOS TIPOS DE COMEDEROS PARA PAVOS

COMPARISON OF TWO FEEDER TYPES FOR TURKEYS

H. I. Sánchez, H. E. Posadas, R.E. Sánchez, y M. A. Stanford

Centro de Enseñanza, Investigación y Extensión en Producción Avícola FMVZ-UNAM

SUMMARY

Profitable turkey production depends not only on feed production costs, but also on how feed is delivered. Therefore, producers require economically feasible feeding/management alternatives. Selecting a good feeder will reduce wastage thus leading to improved productive parameters. Hopper feeders were replaced by linear troughs (canoe type) for comparison with other turkey flocks using only hopper feeders. The study was carried out in CEIEPAv-FMVZ UNAM (Poultry Production Education, Research, and Extension Center, Faculty of Veterinary Medicine and Animal Husbandry, The National Autonomous University of Mexico). Results indicate important savings due to decreased feed wastage and lower feed conversion rates were obtained as compared with previous years.

RESUMEN

Para obtener rentabilidad en la crianza de pavos, se debe considerar no sólo los costos de producción del

alimento, sino la manera de alimentar a las aves, por esta razón se requieren formas alternativas de alimentación y de manejo que sean económicamente rentables para los productores. Es importante la selección de un buen comedero, lo cual permite un menor desperdicio de alimento, y de esta manera se lograrán obtener mejores parámetros productivos. Es por esto que se realizó el presente trabajo, sustituyendo los comederos tipo tolva por comederos de tipo canoa con el objeto de compararlo con otras parvadas de pavos cuya crianza se realizó empleando únicamente comederos de tolva, dichas pruebas se llevaron a cabo en el CEIEPAv-FMVZ-UNAM. Los resultados obtenidos en indican un importante ahorro en el desperdicio de alimento y mejor índice de conversión.

INTRODUCCIÓN

La alimentación es una de las partes más importantes en una producción pecuaria, ya que representa entre el 60 y 85% de los costos de

producción. Las mejoras en el ahorro que se logren en el área de la alimentación, se verá reflejado en el impacto en la eficiencia general de la explotación, en las ganancias económicas del productor y los precios de los productos de origen pecuario para el consumidor final. Es debido a esto que el diseño y selección de un buen comedero, puede bajar los costos de producción. Es por esto que el manejo adecuado de comederos, es muy importante para la disminución del desperdicio de alimento.

MATERIAL Y METODOS

El experimento se realizó en el Centro de Enseñanza, Investigación y Extensión en Producción Avícola de la FMVZ-UNAM. Se utilizaron 300 pavos de la estirpe BUTA, de cinco semanas de edad y el experimento concluyó al cumplir los pavos 15 semanas de edad. Las aves fueron distribuidas completamente al azar en cuatro cuadros con 75 aves en cada cuadro. Los cuales fueron alimentados a acceso libre con alimento de tipo comercial en forma de pellet, el cual fue servido en comederos tipo canoa de madera (2.5 m de largo x 48cm de ancho x 25 cm de profundidad), con una protección de metal en forma de arco a lo largo del comedero (15 cm altura en la parte del centro y una separación entre arco de 15 cm). Los lotes contaban con cama de paja y su comparación con otros lotes de pavos en que se emplearon comederos tipo tolva.

Cuadro 1. Resultados alternativos en parámetros productivos.

| Comederos | Ganancia de peso Kg | Consumo de alimento Kg | Índice de conversión |
|-----------|---------------------|------------------------|----------------------|
| Tolva | 10,129 | 25,880 | 2.55 |
| Canoa | 10,151 | 20,667 | 2.20 |

RESULTADOS

Los datos promedio obtenidos (Cuadro 1), muestran mejora en el consumo de alimento y conversión alimenticia; así como una reducción en el desperdicio de alimento.

DISCUSIÓN

Existen pocas investigaciones publicadas con el uso de este tipo de comedero de canoa en explotaciones de pavos; sin embargo, se ha demostrado una disminución en el desperdicio de alimento en todo el ciclo y esto nos lleva a una baja en la conversión alimenticia. Estos resultados confirman estudios previos al respecto del efecto benéfico del uso de este tipo de comederos de canoa en la producción de pavos en semi-libertad.

CONCLUSIONES

De la información obtenida, se concluye que el comedero de canoa es mejor que el comedero tipo tolva, debido a que permite un mayor costo en el desperdicio de alimento y resulta mejores parámetros productivos.

REFERENCIAS

1. Guidobono. El Pavo. Madrid, 1985.
2. Mercia. Método Moderno de crianza Avícola. Editorial Continental S.A de C.V México. 5^{ta} edición 1991.
3. Shimada. Nutrición animal, 1^a edición, México editorial Trillas. 2003.

EFFECTO DEL TIPO DE ILUMINACIÓN (FLUORESCENTE VS. INCANDESCENTE) SOBRE LOS PARÁMETROS PRODUCTIVOS EN REPRODUCTORAS PESADAS EN UNA EXPLOTACIÓN EN EL ESTADO DE COAHUILA DE LA SEMANA 25 A LA 34

THE EFFECT OF LIGHTING TYPE (FLUORESCENT VS. INCANDESCENT) ON BROILER BREEDER PERFORMANCE IN A COAHUILA FARM FROM WEEKS 25 TO 34

Elvia Lizeth Villalón Betancourt^A, Rosendo Espinoza Leija^A, Francisco Javier Picón Rubio^A, Héctor Fimbres Durazo^A, Luis Orlando Martínez Treviño^B, y Francisco Alberto Santoyo de Estefano^A

^AFacultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia Universidad Autónoma de Nuevo León., Av. Lázaro Cárdenas 4600 Unidad Mederos Monterrey Nuevo León, 64890 México

^BIncubadora Huinalá S. de R.L., de C.V. Pablo A. De la Garza No. 108 Col. Huinalá Apodaca, Nuevo León, México

SUMMARY

Lighting program manipulations allow for altering (either delaying or advancing) the onset of lay, resulting in improved egg production index, egg lay duration, eggshell quality, egg size, and feed efficiency. This study was performed in “El Barril” farm using Cobb broiler breeders for nine consecutive weeks (July 5 - August 13, 2006) at production peak. Houses 1 and 2 had fluorescent and incandescent lighting, respectively. Fluorescent light improved fertile egg production, commercial egg production, total egg production, percent lay, and total male feed intake. On the other hand, fluorescent light resulted in increased mortality.

RESUMEN

Manipulando adecuadamente los programas de iluminación se puede alterar (retrasar o adelantar) la aparición de la puesta, índice y duración de la misma, mejorando la calidad del cascarón, tamaño del huevo y la eficiencia alimenticia. El trabajo se realizó en la granja “El Barril”, dedicada a la producción de huevo fértil con aves reproductoras pesadas línea Cobb. El período estudiado fue de nueve semanas consecutivas del 5 de Julio al 13 de Agosto del 2006, durante el pico de máxima producción. Las caseta 1 equipada con luz de tipo fluorescente y la 2 con luz incandescente. En el presente estudio la luz fluorescente mejora la producción de huevo fértil, la producción de huevo comercial, la producción total de huevo, el porcentaje de postura, consumo de alimento total en los machos. También el uso de la luz fluorescente produce más mortalidad en la parvada o nave.

INTRODUCCIÓN

Cuando la gallina desarrolla la habilidad de distinguir entre el día de la noche, la diferencia en intensidad luminosa proporcionada por la luz natural comparada con la luz suplementaria en casetas abiertas no es crítica. Sin embargo, la reducción de diferencias de intensidad luminosa del periodo de luz utilizando la luz suplementaria mas brillante ha demostrado ser beneficioso para la industria (1). Manipulando adecuadamente los programas de iluminación se puede alterar (retrasar o adelantar) la aparición de la puesta, lo mismo que el índice y duración de la misma, y se puede mejorar la calidad de la cáscara, el tamaño del huevo y la eficiencia del alimento, pueden ser maximizadas (2). El rango visible varía de 3700 a 7500 Å, y es perceptible por el ojo. Esta es la categoría utilizada a menudo en los programas de foto estimulación de aves. Estas fuentes de luz son mas prolongadas en duración de ondas que en la luz ultravioleta, pero mas cortas que la luz infrarroja (3).

MATERIALES Y MÉTODOS

El trabajo se realizó en la granja el Barril, dedicada a la producción de huevo fértil y de comercio, de las aves reproductoras pesadas de la línea Cobbs 500, la granja está ubicada en el kilómetro 57, de la carretera Saltillo – Monclova, en el estado de Coahuila, México. La granja posee tres naves de un tamaño de 12 m de ancho x 120 m de largo, con una capacidad de 4600 aves reproductoras aproximadamente por caseta o 3.7 aves/m². Para los fines del presente estudio, las casetas fueron designadas como la caseta #1 y la caseta #2, que tienen focos de luz fluorescente de la marca Econo lite de 22 watts y focos de luz incandescente

blancos tradicionales de la marca Phillips de 60 watts la segunda.

RESULTADOS

La producción de huevo fértil fue mayor con el uso de luz fluorescente con un efecto significativo ($P=0.008$), que con el uso de luz incandescente. También la producción de huevo comercial fue mayor con el uso de la luz fluorescente. Pero en la prevalencia de huevo roto no se encontró ninguna diferencia al usar la luz fluorescente o la luz incandescente ($P>0.05$). Sin embargo, la producción total de huevo fue mayor con el uso de la luz fluorescente ($P<0.001$).

CONCLUSIONES

De acuerdo a las condiciones en que se realizó el estudio, se puede concluir: La luz fluorescente

mejora la producción de huevo fértil, la producción de huevo comercial, la producción total de huevo, el porcentaje de postura, consumo de alimento total en los machos. También el uso de la luz fluorescente produce más mortalidad en la parvada o nave.

REFERENCIAS

1. Etches, R.J. Reproducción aviar. Editorial Acribia S. A. Zaragoza, España. Cap 5 pag 113–131. Cap 10 pag 281–297. 1996.
2. Martins, P.C. La intensidad de la luz y su efecto en la latinoamérica. Tecnología Avipecuaria en Latinoamérica No 194. 2004.
3. Bermúdez, J.J. Estudio de campo sobre programa de intensidad lumínica. Volumen 3, No 6. 2005.

EFFECTO SOBRE LA INCUBABILIDAD DE HUEVO FÉRTIL CON DOS TIPOS DE ILUMINACIÓN (FLUORESCENTE VS. INCANDESCENTE) EN UNA EXPLOTACIÓN DE REPRODUCTORAS PESADAS DEL ESTADO DE COAHUILA DE LA 29 A LA 39 SEMANA

THE EFFECT OF LIGHTING TYPE (FLUORESCENT VS. INCANDESCENT) ON HATCHABILITY IN A COAHUILA BROILER BREEDER FARM FROM WEEKS 29 TO 39

Lizeth Moreno Briseño^A, Rosendo Espinoza Leija^A, Francisco Javier Picón Rubio^A, Héctor Fimbres Durazo^A, Luis Orlando Martínez Treviño^B, y Francisco Alberto Santoyo de Estefano^A

^AFacultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia UANL., Av. Lázaro Cárdenas 4600 Unidad Mederos Monterrey Nuevo León. 64890 México

^BIncubadora Huinalá S. de R.L., de C.V. Pablo A. De la Garza No. 108 Col. Huinalá Apodaca, Nuevo León. México

SUMMARY

Light is essential for poultry, not only for sight but it also plays an important role in the internal stimulation of bird cycles and triggering hormone release. This study was carried out in "Huinalá" hatchery during 10 consecutive weeks (August 7 - November 2, 2006) Cobb broiler breeder eggs from "El Barril" farm were used. Breeders were housed under wither fluorescent (House 1) or incandescent (House 2) lights. During this time period, samples of 14,580 eggs were taken per day, biweekly. The use of fluorescent light resulted in increased hen weight. Also, increased incidence of anatomical malformations (twisted legs,

twisted necks), anal impactation and navel hernia were observed.

RESUMEN

La luz es esencial en la avicultura, no solo facilita la vista, sino también juega un papel importante en la estimulación interna de los ciclos y en el comienzo de la liberación hormonal. El presente trabajo se realizó en la planta Incubadora "Huinalá", en un período de 10 semanas consecutivas, comprendidas del 7 de Agosto al 2 de Noviembre del 2006. Los huevos provenían de la Granja "El Barril" dedicada a la explotación de reproductoras pesadas de la línea Cobb. Estas aves

estuvieron distribuidas en 2 casetas, la 1 con luz fluorescente y la caseta 2 con luz incandescente. Durante este lapso, se tomaron muestras de 14,580 huevos por día dos veces a la semana. En el presente estudio con el uso de luz fluorescente se observó un aumento en el peso de las hembras. Hubo una mayor incidencia para las malformaciones de pierna torcida, cuello torcido, impactación anal y hernia umbilical.

INTRODUCCIÓN

La avicultura industrial para producción de carne y huevo comprende distintas etapas productivas: reproductores, planta de incubación, granja de pollo de engorda y gallina de postura (1).

En la actualidad la mayoría de los huevos son incubados artificialmente, y requieren de una persona para monitorear el medio ambiente en el interior de la incubadora para asegurarse que reciban calor, aire y humedad adecuados (2). Las plantas de incubación de pollo son modernos edificios que constan de una sala de almacenamiento del huevo fértil antes de ser incubado, una sala para clasificación y encharolado de los huevos, salas para la incubación y el nacimiento, y una sala para clasificación y mantenimiento del pollito (3).

MATERIALES Y MÉTODOS

El trabajo se realizó en una planta Incubadora dedicada a la producción de pollo de engorda, gallina de postura y producción de patos. La incubadora está ubicada en el estado de Nuevo León en el municipio de Apodaca, y el trabajo fue realizado en un periodo de 10 semanas consecutivas. La planta cuenta con una capacidad total de 622,000 huevos. Los huevos provienen de la granja "El barril", ubicada en la carretera Saltillo- Monclova Km. 57, dedicada a la explotación de reproductores pesados de la línea genética Cobb 500. Estas aves estuvieron distribuidas en 2 casetas con diferentes tipos de iluminación; las aves de las casetas 1 fueron estimuladas con luz fluorescente y las aves de la caseta 2 con luz incandescente. El tamaño de la muestra se determinó, eligiéndose cada semana 30 charolas por caseta.

RESULTADOS

Se observa el efecto del tipo de luz, donde la luz incandescente fue mejor ($P<0.001$) que la luz fluorescente en el nacimiento de pollitos. Así como también se observó que la luz incandescente influyó positivamente ($P<0.001$) en el porcentaje de los nacimientos. También se observó que el porcentaje de los pollitos no nacidos fue mayor con la luz incandescente ($P<0.001$) que con la luz fluorescente. una incidencia mayor para las malformaciones de pierna torcida, cuello torcido, compactación anal, hernia umbilical y aplastado con la luz fluorescente ($P<0.001$) que con la luz incandescente. En cuanto al cierre inadecuado del ombligo (onfalitis), fue mayor con el uso de la luz incandescente ($P<0.001$) que con la luz fluorescente.

CONCLUSIONES

De acuerdo a las condiciones en que se realizó el estudio, se puede concluir: Con el uso de luz fluorescente se observó un aumento en el peso de las hembras. Con la luz fluorescente hubo una incidencia para las malformaciones de: pierna torcida, cuello torcido, impactación anal y hernia umbilical, y así como también, para los problemas de cascarón estrellado y pollo aplastado en charola. La luz incandescente mejora los nacimientos y el porcentaje de nacimientos. Con la luz incandescente aumento el número y el porcentaje de no nacidos. Así como: cascarones no embrionados, pollos adheridos al cascarón y problemas de onfalitis.

REFERENCIAS

1. Sandoval, A., M. Yuño, M.L. Bakker, E. Rodríguez, y A. Beretta. Aplicación de la embriodiagnosia para evaluar la eficiencia de la planta de incubación de parrilleros en una empresa avícola en la Argentina. *Ria*, 34 (2): 75-89. Inta, Argentina. 2005.
2. McGuire, D.J and S.E. Scheideler. *Breeding & reproduction. Neb guide.* University of Nebraska – Lincoln extension, institute of agriculture and natural resources. 2004.
3. North, M.O. *Manual de producción avícola 2ª edición.* México, Df. Editorial manual moderno. Pág. 82. 1986.

USO DE LA PRUEBA DE RT-PCR ANIDADO PARA LA DETECCIÓN DE PARTÍCULAS DE RNA DEL VIRUS DE INFLUENZA AVIAR A PARTIR DE VACUNAS EMULSIONADAS COMERCIALES

USING A NESTED RT-PCR FOR THE DETECTION OF AVIAN INFLUENZA VIRUS RNA PARTICLES IN COMMERCIAL, OIL EMULSION VACCINES

Belem Huerta, Manuel Gay, Sandra Pérez, Edith Espino, Refugio Cortés, Bernardo Lozano, David Sarfati, y Ernesto Soto

Laboratorio AVI-MEX SA de CV. México, www.avimex.com.mx

SUMMARY

Several whole commercial, oil emulsion vaccines containing different antigens were used. Vaccines were subjected to a cool-down/heat-up process in order to break the emulsion into its oil and aqueous phases. Each sample was subjected to the Trizol method in order to obtain and purify the genetic material to be used in the identification of the avian influenza virus (AIV or IAV in Spanish) hemagglutinin by the reverse transcriptase - polymerase chain reaction (RT-PCR) technique. Results showed that the test is satisfactory for the identification of AIV genetic material in the aqueous phase of positive emulsions, while those emulsions containing other antigens yielded negative results.

INTRODUCCIÓN

La influenza aviar es una enfermedad viral que afecta a un amplio rango de especies aviares, entre ellas a las aves domésticas. En estas últimas puede ocasionar infecciones inaparentes, ligeros cuadros respiratorios o una severa enfermedad sistémica con cuadros de alta mortalidad (3).

El virus de la influenza aviar (VIA) pertenece a la Familia: *Orthomyxoviridae*, que es un virus RNA cuyo genoma está compuesto por 8 genes segmentados que codifican para 10 proteínas. Dentro de estas proteínas codificadas, dos glicoproteínas son utilizadas para el estudio epidemiológico del virus: La hemagglutinina y la neuraminidasa (1).

La presencia del virus de influenza puede ser diagnosticada mediante el uso de la prueba RT-PCR (Transcriptasa Reversa – Reacción en Cadena de la Polimerasa) que tienen la ventaja de ser más rápida que las pruebas convencionales de serología (2).

El objetivo de este trabajo fue reportar un método sensible y rápido para detectar partículas de RNA del VIA a partir de vacunas emulsionadas comerciales.

Este método utiliza la amplificación de un segmento interno del gen de la hemagglutinina perteneciente al subtipo HA5 del VIA mediante PCR anidado.

MATERIALES Y MÉTODOS

Se utilizaron diferentes emulsiones comerciales completas, las cuales contenían diversos antígenos. Las emulsiones fueron sometidas a un proceso de enfriamiento y calentamiento para el rompimiento en fases oleosa y acuosa. La obtención y purificación del material genético se realizó por el método de Trizol.

El RNA obtenido junto con oligonucleótidos específicos para la región de la hemagglutinina del VIA fue utilizado en la prueba de RT-PCR. Posteriormente, el producto amplificado fue utilizado como templado para realizar un PCR anidado y amplificar un fragmento interno de la hemagglutinina.

RESULTADOS

Los resultados indican que la prueba de RT-PCR anidado identifica adecuadamente el material genético del VIA de las emulsiones que lo contienen, mientras que en emulsiones que contienen otros antígenos diferentes al VIA las pruebas resultan negativas.

DISCUSIÓN

El PCR anidado es una prueba de mayor sensibilidad que permite identificar pequeñas cantidades de material genético que en muchas ocasiones el PCR convencional no lo permite.

Esta prueba resultó útil para constatar vacunas emulsionadas comerciales como positivas o negativas a la presencia de material genético del VIA, facilitando de esta forma el control de calidad de las vacunas.

CONCLUSIÓN

La prueba de RT-PCR anidado montada en nuestro laboratorio es satisfactoria para detectar una mínima cantidad de partículas de RNA del VIA contenido en vacunas emulsionadas comerciales.

REFERENCIAS

1. Berinstein, A., S. Bruce and Suarez, D.L. Heteroduplex Mobility Assay for Detection of New

Avian Influenza Virus Variants. *Avian Dis.* 46:393-400. 2002.

2. Horimoto, T. and Kawaoka Y. Direct reverse transcriptase PCR to determine virulence potential of influenza A viruses in birds. *J. Clin. Microbiol.* 33:748-750.1995.

3. Starick, E., A. Romer-Oberdorfer and Werner, O. Type- and Subtype Specific RT-PCR Assays for Avian Influenza A Viruses (AIV). *J. Vet. Med.* 47:295-301. 2000.

TRACE MINERAL LEVELS AND EGG SHELL QUALITY

LOS NIVELES DE MINERALES TRAZA Y LA CALIDAD DEL CASCARÓN

A. E. (Ted) Sefton^A, M. Daley^B, and S. Leeson^B

^AAlltech Inc. Guelph, Canada, ^BUniversity of Guelph, Guelph, Canada

RESUMEN

La investigación en la que se basan los requerimientos de minerales traza publicados por el Consejo Nacional de Investigación (NRC) de EE.UU. se realizó con minerales inorgánicos de transición y con dietas purificadas y semipurificadas. Sin embargo, la investigación con minerales traza orgánicos y raciones estándar ha demostrado que los requerimientos son muy inferiores a los establecidos por el NRC, debido a la mayor disponibilidad de estos minerales orgánicos. Más aún, no todos los minerales orgánicos son iguales. Se utilizaron ponedoras de 38 a 70 semanas de edad que recibieron una dieta con minerales inorgánicos convencionales a los niveles habituales y otras con niveles reducidos de minerales traza, ya sea inorgánicos u orgánicos (Bioplex y Sel-Plex, Alltech, Inc. Lexington, KY). Se investigaron los defectos del cascarón usando amplificación óptica y electrónica, observando influencias del nivel, la fuente y la naturaleza orgánica o inorgánica de los minerales sobre la calidad del cascarón. El número de huevos moteados no se vio influenciado por la fuente ni por el nivel de los minerales, mientras que este parámetro disminuyó cuando se utilizaron minerales orgánicos. El número de huevos con quebraduras o cuarteaduras muy finas no se vio influenciado por el nivel ni por la fuente de los minerales.

ABSTRACT

Research on which NRC trace mineral requirements are based was done with inorganic transitional minerals and purified and semi-purified

diets. Research with organic trace minerals and standard rations have demonstrated that requirements are much lower than the levels set by NRC, due to the greater availability of these organic minerals. Further, not all organic minerals are the same. Layers, 38 to 70 weeks of age were fed a diet with conventional inorganic minerals at conventional levels; reduced trace mineral, either as inorganic trace mineral or organic trace minerals (Bioplex[®] and Sel-Plex[®], Alltech, Inc. Lexington, KY). Shell defects, were investigated using optical and electron microscopy. Both level and source, organic vs. inorganic influenced shell quality. The number of mottled eggs was not influenced by mineral source or level, while the degree of mottling decreased when organic minerals were used. Streaked eggs (very fine crack-like defects) were not influenced by level or source of minerals.

INTRODUCTION

Many of the references quoted in the latest National Research Council (1) trace mineral recommendations for poultry were over 30 years old. These were all based on inorganic mineral sources, not organic mineral sources. Broiler performance was not negatively affected when proteinated trace mineral levels were much below levels used for supplementation with inorganic minerals (2). Furthermore, manure mineral levels of zinc and manganese were greatly reduced when these low levels were fed; a positive outcome in this time of environmental pollution concerns.

A trial was designed to determine the influence feeding low levels of organic and inorganic trace minerals to layers. The affect on shell quality only will be presented in this paper.

METHODS AND MATERIALS

Seven hundred and sixty-eight, day of age, commercial Shaver White pullets were allocated to one of three diet treatment groups involving different mineral sources. Diet treatment 1 was formulated with inorganic minerals at regular levels. Diet 2 was formulated with Bioplex and Sel-Plex (Alltech, Inc., Nicholasville, KY) minerals at 10% and diet 3 was formulated with 10% inorganic minerals. A starter diet was fed from 0-56 days and a grower diet from 56-133 days. Birds were offered feed and water *ad lib*.

The layer trial was a continuation of the pullet growing trial. Birds of similar weight were selected at 19 weeks of age and allocated to multi-bird cages. Birds were allocated to one of three treatments replicated 24 times (including upper and lower cages) with 8 birds in each replicate and so there were a total of 576 birds in the trial. Diet treatment 1 was formulated with Inorganic minerals, diet 2 was formulated with Bioplex and Sel-Plex minerals at 10% of the conventional level and diet 3 was formulated with 10% inorganic minerals at the same level as treatment 2. Birds were offered feed and water *ad lib* throughout the trial. Temperature was at the birds' comfort level and lighting schedule 14 hours of light and 10 hours of dark per day. At 36 weeks of age 184 eggs were collected from each treatment. They were stored overnight at 7°C. The next day they were candled, the side of the egg with either the largest streak or the most mottling was identified and marked. It was then photographed. The eggs were then returned to the cooler for 14 and 21 days. At this time the same side of each egg was again photographed. Each egg was classified for streaking and mottling; none,

moderate or severe, by two observers. The degree of streaking and mottling was analyzed by chi square test for k independent samples (Siegel, 1956). Electron micrographs were taken of cross sections of the shell both at streaks and mottles, as well as intact shells.

RESULTS

The electron micrographs showed that both streaks and mottles were a disruption of the shell matrix, and thus both were a loss of shell integrity. Further investigation is needed to determine the cause, at this point it is speculated that they are caused during initial shell deposition.

Mottling or streaks on individual eggs did not change over time. Neither, source nor level of supplemental mineral influenced the percent mottled eggs. However, eggs produced by hens supplemented with low of Bioplex minerals produced eggs with less mottling than those supplemented with either low or high levels of inorganic minerals. The percent of eggs with streaks or the severity of streaks was not influenced by either the source nor level of supplemental minerals provided to the hens that laid the eggs.

Shell integrity is improved by lowering the level of supplemental trace minerals, with low levels of Bioplex trace minerals being more affective than inorganic trace minerals.

REFERENCES

1. National Research Council. Nutrient Requirements of Poultry. 9th Rev. Ed. NAS-NRS, Washington, D.C. 1994.
2. Leeson, S. and J.D. Summers, Commercial Poultry Nutrition, 3rd Ed., University Books, Guelph, Canada, 2005.
3. Seigel, S. Nonparametric Statistics For The Behavioral Sciences. McGraw-Hill, New-York. 1956.

DEVELOPMENT OF A SUSPENSION MICROARRAY ASSAY FOR ANTIBODIES TO MAREK'S DISEASE VIRUS IN CHICKEN SERUM

DESARROLLO DE UN ENSAYO SEROLÓGICO BASADO EN MICROESFERAS PARA LA DETECCIÓN DE ANTICUERPOS CONTRA EL VIRUS DE LA ENFERMEDAD DE MAREK EN SUERO DE POLLO

Elena Seletskai^A, Rebecca Rigden^A, Nhu Thao Le^A, Theodore Girshick^B, Rajeev Dhawan^A, and William Shek^A

^ACharles River Laboratories, 251 Ballardvale Street, Wilmington, MA 01887

^BCharles River Laboratories, 67 Baxter Road, Storrs, CT 06268

RESUMEN

El virus de la enfermedad de Marek es uno de los agentes importantes para los que se emplea la vigilancia serológica en parvadas de pollos libres de patógenos específicos (SPF). En este estudio desarrollamos un inmunoensayo fluorométrico basado en microesferas para detectar anticuerpos contra este virus en muestras de suero de pollos utilizando como antígeno a la cepa Rispens propagada *in vitro* y purificada con gradientes de sucrosa. El antígeno se unió de manera covalente a perlas recubiertas con un colorante de poliestireno 5.6 u y la reacción con los anticuerpos séricos se detectó mediante incubación con IgY de conejo biotinilada antipollo, seguida de una incubación con un conjugado de estreptavidina con ficoeritrina. Se demostró que este ensayo con el virus de la enfermedad de Marek es altamente selectivo pues arrojó resultados positivos con el suero inmune homólogo estándar y resultados negativos con sueros inmunes y no inmunes heterólogos estándar. Se utilizaron sueros conocidos positivos y conocidos negativos además de las muestras de suero recolectadas a diferentes tiempos a partir de pollos inoculados experimentalmente, para la evaluación de la especificidad y la sensibilidad diagnósticas de este ensayo. Los anticuerpos específicos contra el virus de la enfermedad de Marek se detectaron a partir de los 11 días postinoculación. Las microesferas acopladas al virus de la enfermedad de Marek se utilizarán en un inmunoensayo fluorométrico multiplexos (MFIA) como parte de un panel de diagnóstico avícola para el monitoreo serológico de pollos SPF en el laboratorio CRL.

INTRODUCTION

Marek's disease virus (MDV) is an alphaherpesvirus that causes contagious malignant T-cell lymphoma in chickens (1). Early detection of adventitious infections with MDV and other avian pathogens is critical when monitoring specific-

pathogen-free (SPF) chicken flocks that supply embryonated eggs for vaccine production and research. The agar gel precipitin test (AGP), the current test method for MDV serosurveillance, is not amenable to automation and hence, is cumbersome for the high-volume testing of SPF chicken flocks that is mandated by regulatory agencies. To facilitate and expedite this high-volume testing, we have been using Luminex's xMAP[®] suspension microarray technology (Luminex, Austin, TX) to develop multiplexed fluorometric immunoassays (MFIA) for serum antibodies to a panel of avian pathogens including MDV. Key advantages of this multiplexed format vis-à-vis traditional singleplex methods like AGP include that it is more efficient, requires less sample per assay and generates less waste. In addition, corresponding species IgG and anti-IgG bead sets can be included into the multiplex as internal controls to verify system and sample suitability. In the present study, the analytical and diagnostic performances of the MDV MFIA, AGP test, and an indirect immunofluorescence assay (IFA) were compared by testing sera from SPF, vaccinated and experimentally infected birds.

MATERIALS AND METHODS

Antigens. For MFIA, Rispens strain of MDV serotype 1 was propagated in chicken embryo fibroblasts (CEF) cultures prepared from SPF eggs. Culture medium collected from infected CEF after five days of incubation was centrifuged at 30,000 rpm (70409 X g) for three hours. The resultant pellets were resuspended in PBS and loaded on a 30-50% sucrose step gradient which was centrifuged overnight at 25000 rpm (82705 X g). A band of purified virus was collected at the interface of the 30% and 50% sucrose, diluted with phosphate-buffered saline (PBS) and pelleted by centrifugation at 25000 rpm for three hours. The pellet was resuspended in PBS with 0.1% sarkosyl. This purified MDV antigen preparation was examined by electron microscopy and covalently coupled to a

color-coded bead set according to the manufacturer's protocol with some optimization. For IFA, suspended Rispens MDV-infected CEF were dried onto 18-well Teflon-coated glass slides and acetone-fixed to the slide wells. The AGP antigen was a concentrate from MDV-infected CEF.

Sera. Standard monospecific antisera were collected from chickens 1-2 months after they were inoculated with MDV or one of 18 other agents (i.e., IBDV, IBV, *M. gallisepticum*, *M. synoviae*, NDV, AIV, fowlpox, reovirus, adenovirus group 1, EDS, AEV, AMPV-c, ILTV, REV, ALV A and B, PMV-2, or *Salmonella pullorum*). Known-negative (KN) and known-positive (KP) serum sets were prepared from SPF chickens 7 to 62 weeks of age or from vaccinated commercial layers, respectively. Sera were collected temporally from five chickens inoculated with MDV on 4, 7, 11, 14, 21, 28, and 37 days post inoculation (DPI).

Assays. The MFIA was performed in 96-well filter-bottom plate wells as follows. A pooled suspension of assay and control bead sets was added to each assay well, incubated with test or control serum, and then incubated with biotinylated rabbit anti-chicken IgY followed by streptavidin-phycoerythrin conjugate. The intensity, i.e., median fluorescence index (MFI), of each reaction was read with a BioPlex array reader system (Bio-Rad). Net scores were calculated using the assay, tissue control and assay cutoff MFI values and were classified as positive, negative or equivocal if they were ≥ 2.5 , < 1.5 , or ≥ 1.5 and < 2.5 , respectively (provided that the tissue control score was < 2.0). For IFA, control or test serum was incubated in an assay well followed by incubation with FITC-labeled goat IgG anti-chicken IgY, after which assay wells were examined under a fluorescence microscope. For AGP, test MDV antigen and serum samples were added to the wells of AGP slides. After 18-24 hours incubation, slides were observed for the presence of white precipitating bands of identity between the serum and the antigen.

RESULTS

Analytical performance. The MDV MFIA was shown to be selective as it gave a score with MDV immune serum of six, whereas as the mean MFIA score for 18 heterologous antisera was 0 and the score for non-immune (SPF) serum was 0. The MFIA endpoint titer with standard MDV antiserum MFIA was 320.

Diagnostic performance. The MDV MFIA had a diagnostic specificity of 100% as net scores for all 169 KN sera (from SPF birds from 7 to 62 weeks of age) were negative (i.e., < 1.5). Of the 30 KP sera (from vaccinated commercial layers), all were MDV seropositive by MFIA as well as IFA, whereas three of the sera were MDV seronegative by the AGP test. The mean MFIA score for these sera was 9.3. Of the five chickens that were temporally sampled after MDV inoculation, all were MFIA seropositive by 11 DPI. The results corresponded to those by IFA and AGP.

CONCLUSION

An MDV MFIA was compared to the traditional AGP test and an IFA. The selectivity of the MFIA was satisfactory, as MDV antiserum was MFIA positive, while standard nonimmune serum and heterologous immune sera were MFIA negative. The MFIA limit of detection with MDV antibodies corresponded to those of IFA. MFIA diagnostic specificity and sensitivity were perfect in tests performed on KN sera from SPF flocks and KP sera from vaccinated layers. MDV seroconversion by experimentally infected birds was detected at the same DPI by MFIA as it was by AGP and IFA. Thus the MDV MFIA is suitable for serosurveillance of SPF flocks.

REFERENCE

1. Calnek, B. W. Pathogenesis of Marek's disease virus infection. *Curr Top Microbiol Immunol* 255:25-55. 2001.

UTILIZACIÓN DE NUCLEOTIDOS EN GALLINAS PRODUCTORAS DE HUEVO

USING NUCLEOTIDES IN BREEDERS

M. A. Stanford[^], R. E. Sánchez[^], A. J. M. Arrieta, H. E. Posadas[^], y G. E. Ávila[^]

[^]Centro de Enseñanza, Investigación y Extensión en Producción Avícola FMVZ-UNAM

SUMMARY

The demand of potentially toxic-residue-free food has started to limit the use of growth-promoting antibiotics. Therefore, producers are looking for alternatives with similar effects, such as nucleotides. Nucleotides have shown benefits in animal production including health and performance, and improved intestinal development and ecology. This study was performed in Centro de Enseñanza, Investigación y Extensión en Producción Avícola (C.E.I.E.P.Av-FMVZ-UNAM, Poultry Production Education, Research and Extension Center, The Faculty of Veterinary Medicine and Animal Husbandry, National Autonomous University of Mexico). Using 240 95-week-old lightweight breeders divided in two treatments with unbalanced repetitions. This 10-week experiment showed improved results with the nucleotide-added diet. It was concluded that feeding nucleotides to breeders results in improved productive parameters.

RESUMEN

Recientemente han aparecido en el mercado aditivos para la alimentación para un mejor aprovechamiento de nutrientes, como los nucleótidos compuestos por bases nitrogenadas que han mejorado la respuesta en cerdos. Razón por la cual se realizó el presente estudio, utilizando 240 gallinas Bovans blancas con 95 semanas de edad, divididas en dos tratamientos con tres repeticiones (con y sin adición de 2 kg/ ton de nucleótidos). Los resultados obtenidos en 10 semanas de experimentación, mostraron mejor postura (79b y 89a%), peso del huevo (62.5b y 67.5bg), masa de huevo (49.5b y 59.7bg), consumo de alimento (128.5 b y 125.8 a) y conversión alimenticia (2.60a y 2.17b), con la adición de nucleótidos esto confirma su beneficio para aprovechar mejor los nutrientes de la dieta.

INTRODUCCIÓN

En los últimos años se ha buscado hacer más eficiente la producción, buscando la sustitución de antibióticos en la alimentación animal sin causar

perjuicio a la productividad, la sanidad y la calidad de los animales se ha vuelto, por lo tanto, una necesidad. Un grupo de nutrientes que puede utilizarse como alternativa a los antibióticos y a las proteínas de origen animal son los nucleótidos. Los cuales son compuestos químicos de bajo peso molecular, entre 300 y 350 Da. Están formados por la unión de un azúcar de 5 átomos de carbono, una base nitrogenada derivada de purina o pirimidina y de 1 a 3 moléculas de fosfato. Todos los tipos de células contienen una gran variedad de nucleótidos y sus derivados. Sus principales funciones metabólicas son:

- Ejercen un papel en el metabolismo energético.
- Unidad monomérica de los ácidos nucleicos.
- Componentes de coenzimas.
- Efectores alostéricos.

Son esenciales para la multiplicación celular, han sido estudiados como promotores del crecimiento e inmunoestimulantes en mamíferos y en peces. Administrados como suplemento alimenticio en las dietas de animales y humanos han producido importantes efectos inmunoestimulantes y en ganancia de peso, presentándose como una alternativa preventiva y una herramienta eficiente para la producción.

Aunque son sustancias necesarias para el funcionamiento normal del organismo son considerados nutrientes no esenciales al ser sintetizados por el organismo, existen publicaciones que demuestran que una dieta sin nucleótidos perjudica al hígado, al corazón, al intestino y al sistema inmunológico principalmente, bajo ciertas circunstancias puede existir una demanda elevada y resulta económicamente ventajoso proveerlos

MATERIAL Y MÉTODOS

El experimento se realizó en el Centro de Enseñanza, Investigación y Extensión en Producción Avícola de la FMVZ-UNAM. Se utilizaron 240 gallinas blancas ligeras de la estirpe Bovans blanca de 95 semanas de edad. Se empleó un diseño completamente al azar con dos tratamientos, cada uno con tres réplicas con 40 gallinas alojadas en lotes de

caseta de ambiente natural. A las aves se les proporcionó un fotoperiodo de 16 hrs luz por día. La alimentación y el agua se proporcionaron *ad libitum* durante todo el experimento. Se llevaron registros semanales durante 10 semanas, de porcentaje de postura, peso promedio de huevo, masa del huevo, consumo de alimento y conversión alimenticia. Los tratamientos o dietas en las aves fueron con base en sorgo + pasta de soya como se señala a continuación. Tratamiento 1) Dieta testigo; Tratamiento 2) Como T1+ nucleótido en 20kg/ton. A las variables en estudio, se les realizó un análisis de varianza conforme a un diseño completamente al azar con mediciones repetidas en el tiempo.

RESULTADOS

Los datos promedio obtenidos (Cuadro 1), muestran mejora en el porcentaje de postura, peso de huevo, consumo de alimento y conversión alimenticia.

DISCUSIÓN

Aunque no existe mucha información en cuanto al empleo de nucleótidos en las dietas de aves, ya que solo se han visto efectos benéficos en estudios para mamíferos y peces, el presente estudio reveló que el uso de estos productos en gallinas ligeras al final de su ciclo de producción mejora los parámetros productivos, por lo cual se sugieren más estudios empleando este tipo de aditivos en las aves en diferentes etapas de producción.

CONCLUSIONES

De la información obtenida se concluye, que los nucleótidos en gallinas Bovans de 95 semanas de edad mejora el comportamiento productivo. El empleo de nucleótidos, a dosis de 20 kg/ton en dietas de gallinas viejas mejora la producción.

REFERENCIAS

1. Art. Publicado en Periódico Mundo Acuícola, aportado por Gonzalo Marambio M.V. Gerente Técnico-Nutriuservice Acuicultura y Pedro Navarrete M.V. Asistencia Técnica-Nutriservice Aquaculture. Nucleótidos y su aporte en la nutrición. Disponible desde: <http://www.mundoacuatico.cl/pma/articulos.php?ver=1&id=38>
2. Berg, J.M. Bioquímica 5ta edición. Ed. Reverté. España 693-711. 2003.
3. Boyer, R. Conceptos de bioquímica. Ed International Thomson Editores. Impreso en México 622-629. 2000.
4. Millán, J.A. Alimentación infantil, Papel de los nucleótidos en la alimentación del lactante. Artículo publicado el viernes 2 Septiembre 2005. Volumen Monog.3 - Número 1 p.34-42. Disponible desde: <http://db.doyma.es/cgi-bin/wdbcgi.exe/doyma/mrevista.resumen?piden=13081719>.
5. Rudolph, F.B. The biochemistry and physiology of nucleotides. J Nutr. 124: 124-127. 1994.
6. Mroz, Z. Acidificantes, fitasas y sus interacciones en la alimentación de cerdos y pollos. Producción animal, ISSN 1578-1526, Vol. 20, N°. 208, pags. 38-52. 2005.

Cuadro 1. Datos promedio de experimentación en gallinas de postura de 95 semanas de edad.

| Tx | Porcentaje de postura* | Peso del huevo(g)* | Masa de huevo (g)* | Consumo de alimento (g)* | Índice de conversión* |
|----|------------------------|--------------------|--------------------|--------------------------|-----------------------|
| 1 | 79 ^b | 62.5 ^b | 49.5 ^b | 128.5 ^b | 2.6 ^a |
| 2 | 89 ^a | 67.5 ^a | 59.7 ^a | 125.8 ^a | 2.17 ^b |

*Valores con distinta letra son diferentes ($P < 0.05$).

ANÁLISIS DE LOS RESULTADOS DE SENSIBILIDAD ANTIMICROBIANA REALIZADOS EN AISLAMIENTOS BACTERIANOS DE AVES DURANTE EL PERIODO 2005 A 2006

ANTIMICROBIAL SENSITIVITY OF BACTERIA ISOLATED IN 2005 - 2006

Edgar Tapia^A, Ernesto Soto^B, David Sarfati^B, y Bernardo Lozano^B

^ADiagnósticos Clínicos Veterinarios SA de CV. México

^BLaboratorio AVI-MEX SA de CV. México

SUMMARY

Four hundred (400) purified bacterial isolates from clinical cases occurring in 2005 and 2006 were subjected to the antimicrobial sensitivity test using National Committee for Clinical Laboratory Standards-approved/standardized discs and techniques. The antimicrobials tested include enrofloxacin, amoxicillin, florfenicol, sodium sulfachloropyridine/trimetoprim, fosfomicin, and neomycin. Tremendous resistance was detected among major *Escherichia coli*, *Enterococcus*, *Alcaligenes* spp. and *Pseudomonas aeruginosa* to amoxicillin, enrofloxacin, and florfenicol. *Enterococcus* spp. and *Staphylococcus* spp. were resistant to enrofloxacin and florfenicol. *Proteus* spp. were resistant to neomycin. *Ornithobacterium rhinotracheale* was resistant to enrofloxacin. On the other hand, bacteria such as *Pasteurella multocida*, *Avibacterium paragallinarum*, *Enterobacter* spp., and *Klebsiella* spp. were sensitive to all of the antimicrobials tested.

INTRODUCCIÓN

La realización de pruebas de sensibilidad antimicrobiana a los aislamientos bacterianos de casos clínicos de los animales resulta en una excelente herramienta para conocer la resistencia que desarrollan los microorganismos hacia los diferentes antimicrobianos utilizados en el campo, por lo que el objetivo de este trabajo es presentar los resultados de sensibilidad antimicrobiana de los aislamientos bacterianos realizados en el laboratorio de Diagnósticos Clínicos Veterinarios en el periodo 2005 y 2006.

MATERIALES Y MÉTODOS

La prueba de susceptibilidad antimicrobiana se realizó por el método de difusión con disco, bajo los lineamientos y directrices del National Committee for Clinical Laboratory Standards.

Las cepas utilizadas en este estudio corresponden a aislamientos obtenidos a partir de aves enfermas que

llegan de toda la República Mexicana al Laboratorio de Diagnósticos Clínicos Veterinarios. Las bacterias fueron aisladas de forma pura e identificadas por pruebas bioquímicas, reacciones enzimáticas o pruebas de PCR.

Los antimicrobianos utilizados fueron amoxicilina (Amoxi); enrofloxacin (Enro); florfenicol (Flor); fosfomicina (Fosfo); furaltadona (Fura); gentamicina combinada con ácido nalidíxico (Genta+Naldix); neomicina (Neo); norfloxacin (Nor); sulfaclopiridazina sódica combinada con trimetoprim (SCP+TMP). Se consideró sensible al antimicrobiano a las cepas con un diámetro del halo inhibitorio de 8 mm en adelante. El porcentaje de sensibilidad anual se consideró bajo con menos de 33% de cepas sensibles, medio entre 33 y 66% y alto con más del 66%.

RESULTADOS

2005:

- 41 cepas de *E. coli*, las cuales resultaron sensibles en 29% a Amoxi, 71% a Enro, 78% a Flor, 85% a Fosfo, 90% a Fura, 100% a la combinación Genta + Naldix, 100% a Neo, 67% a Nor y solo 13% a la combinación SCP + TMP.
- 7 cepas de *Edwardsiella* spp, las cuales resultaron sensibles en 29% a Amoxi, 86% a Enro, 86% a Flor, 71% a Fosfo, 57% a Fura, 50% a la combinación Genta + Naldix y 86% a Neo.
- 3 cepas de *Enterobacter* spp, las cuales resultaron sensibles en 33% a Amoxi, 33% a Enro, 100% a Flor, 100% a Fosfo, 33% a Fura, 100% a la combinación Genta + Naldix y 100% a Neo.
- 2 cepas de *Klebsiella* spp y 2 cepas de *Pasteurella multocida*, las cuales resultaron sensibles al 50% a Amoxi y a Fura, y al 100% al resto de los antimicrobianos.
- 15 cepas de *Pseudomonas* spp, las cuales resultaron sensibles en 13% a Amoxi, 47% a

Enro, 60% a Flor, 80% a Fosfo, 7% a Fura, 85% a la combinación Genta + Naldix, 93% a Neo, 57% a Nor y 100% a la combinación SCP + TMP.

- 22 cepas de *Staphylococcus aureus*, las cuales resultaron sensibles en 77% a Amoxi, 82% a Enro, 90% a Flor, 82% a Fosfo, 91% a Fura, 94% a la combinación Genta + Naldix, 95% a Neo, 50% a Nor y 90% a la combinación SCP + TMP.
- 1 cepa de *Streptococcus* spp, 1 cepa para *Enterococcus* spp y 2 cepas de *Erwinia* spp, las cuales resultaron sensibles al 100% a todos los antimicrobianos.

2006:

- 16 cepas de *Alcaligenes faecalis*, las cuales resultaron sensibles en 0% a Amoxi, 6% a Enro, 69% a Flor, 85% a Fosfo, 25% a Fura, 6 a la combinación Genta + Naldix, 56% a Neo, 0% a Nor y 38% a la combinación SCP + TMP.
- 38 cepas de *E. coli*, las cuales resultaron sensibles en 42% a Amoxi, 79% a Enro, 68% a Flor, 88% a Fosfo, 100% a Fura, 87% a la combinación Genta + Naldix, 97% a Neo, 65% a Nor y 40% a la combinación SCP + TMP.
- 9 cepas de *Enterobacter* spp, las cuales resultaron sensibles en 33% a Amoxi, 78% a Enro, 78% a Flor, 71% a Fosfo, 100% a Fura, 100% a la combinación Genta + Naldix, 100% a Neo, 20% a Nor y 67% a la combinación SCP + TMP.
- 31 cepas de *Enterococcus* spp, las cuales resultaron sensibles en 100% a Amoxi, 81% a Enro, 90% a Flor, 87% a Fosfo, 62% a Fura, 42% a la combinación Genta + Naldix, 65% a Neo, 67% a Nor y 80% a la combinación SCP + TMP.
- 2 cepas de *Avibacterium paragallinarum*, 1 cepa de *Erwinia* spp y 3 cepas de *Klebsiella* spp, las cuales resultaron sensibles al 100% a todos los antimicrobianos.
- 2 cepas de *Ornithobacterium rhinotracheale*, las cuales resultaron sensibles en 100% a Amoxi, 50% a Enro, 100% a Flor, 100% a Fosfo, 100% a Fura, 100% a la combinación Genta + Naldix, 50% a Neo, 100% a Nor y 50% a la combinación SCP + TMP.
- 5 cepas de *Pasteurella multocida*, las cuales fueron sensibles al 100% para todos los antimicrobianos, excepto para la combinación

SCP + TMP a la cual resultaron sensibles en un 67%.

- 129 cepas de *Pseudomonas* spp, las cuales resultaron sensibles en 8% a Amoxi, 77% a Enro, 44% a Flor, 77% a Fosfo, 14% a Fura, 68% a la combinación Genta + Naldix, 96% a Neo, 88% a Nor y 32% a la combinación SCP + TMP.
- 38 cepas de *Staphylococcus aureus*, las cuales resultaron sensibles en 95% a Amoxi, 74% a Enro, 97% a Flor, 85% a Fosfo, 83% a Fura, 84% a la combinación Genta + Naldix, 97% a Neo, 65% a Nor y 74% a la combinación SCP + TMP.
- 8 cepas de *Proteus* spp, las cuales resultaron sensibles en 100% a Amoxi, 100% a Enro, 100% a Flor, 100% a Fosfo, 88% a Fura, 88% a la combinación Genta + Naldix, 75% a Neo, 88% a Nor y 88% a la combinación SCP + TMP.

CONCLUSIONES

Para el 2005, la única bacteria que resultó con una sensibilidad anual baja fue *Pseudomas* spp. Con una sensibilidad anual media fueron *E. coli*, *Edwarsiella* spp. y *Enterococcus* spp. El resto de las bacterias se considera con una sensibilidad anual alta.

Para el 2006, las bacterias que resultaron con una sensibilidad anual baja fueron *Pseudomas* spp. y *Alcaligenes faecalis*. Con una sensibilidad anual media fueron *E. coli*, *Enterobacter* spp., *Enterococcus* spp. El resto de las bacterias se considera con una sensibilidad anual alta.

REFERENCIAS

1. Woods, Gail L. and 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., M.J. Ferraro, W.A. Craig, G.V. Doren, S.M. Finegold, J. Fung-Tomc, S.L. Hansen, J. Hindler, L.B. Reller, J.M. Swenson, F.C. Tenover, R.T. Testa, and 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. 6th ed. 1997.

EVALUACIÓN BACTERIOLÓGICA DE HUEVO DE REPRODUCTORAS PESADAS RECOLECTADO DE PISO PREVIAMENTE DESINFECTADO

BACTERIOLOGICAL EVALUATION OF PREVIOUSLY-DISINFECTED BROILER BREEDER FLOOR EGGS

R. I. Trujano, B. I. Monroy, L. J. A. Quintana, P. G. Ponce, y B. O. Urquiza

Departamento de producción Animal: Aves, Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia, Universidad Nacional Autónoma de México, 04510

SUMMARY

The purpose of this study was to determine the bacteriological load of eggshells and the inner/outer eggshell membranes of eggs disinfected with a commercial solution. Five 7-egg treatment groups (T) were used, i.e., T1) non-disinfected floor eggs; T2) spray-disinfected floor eggs; T3) Deep-disinfected floor eggs; T4) non-disinfected nest eggs; and T5) disinfected nest eggs. All eggs were individually subjected to a quantitative bacteriological test. Overall T1 eggshell bacterial count was $1,500 \times 10^5$ and that of eggshell membranes was up to $1,133 \times 10^5$ colony-forming units (CFUs)/egg. T4 eggshells had up to $14,883 \times 10^3$ CFU/egg and eggshell membranes ranged from 0 to 833×10^3 CFU/egg. Gram negative bacterial growth prevailed in both treatment groups. No significant bacterial growth was observed in T2, T3, or T5. Results suggest that floor eggs can be incubated as long as they are previously subjected to effective disinfection.

RESUMEN

El objetivo fue determinar la carga microbiológica del cascarón y de membranas externa e interna de huevos desinfectados con una solución comercial. Se llevaron a cabo cinco tratamientos (T) de siete huevos cada uno: T1: huevo de piso sin desinfección; T2: huevo de piso desinfectado por aspersión; T3: huevo de piso desinfectado por inmersión; T4: huevo de nido sin desinfección; T5: huevo de nido con desinfección. Todos los huevos fueron analizados individualmente mediante una prueba bacteriológica cuantitativa. La cuenta general de los cascarones del T1, fue 1500×10^5 y las membranas hasta 1133×10^5 ufc/huevo. En el T4, el cascarón tuvo hasta 14883×10^3 ufc/huevo y las membranas desde 0 hasta 833×10^3 ufc/huevo, en ambos tratamientos predominó el crecimiento de bacterias gram positivas. En los tratamientos 2, 3, y 5 no se observó crecimiento bacteriano significativo. Los

resultados sugieren la posibilidad de incubar huevos de piso, siempre y cuando exista efectiva desinfección previa.

INTRODUCCIÓN

Se ha observado recientemente que algunas estirpes de reproductoras pesadas tienden a poner huevos en cualquier sitio de la caseta, provocando que se aumente la cantidad común de huevos de piso, mismos que no se sugiere incubarlos debido a la alta cantidad de microorganismos presentes en el cascarón y que a su vez contaminan su interior, provocando severas pérdidas económicas por muerte embrionaria y la explosión de huevos que contaminan a su vez otros huevos dentro de la incubadora ocasionando contaminación dentro de la incubadora.

Tomando como ejemplo el 2% de 10,000 huevos de una caseta de aves de reproductoras pesadas (200 huevos) que no son incubables, si éstos se desinfectan y se incuban, posiblemente se tendrían al final 200 pollitos diarios que generarían mejores ganancias para el productor. Por lo antes expuesto, el objetivo del presente trabajo fue determinar la carga microbiológica del cascarón y de membranas externa e interna de huevos de reproductoras pesadas puestos en piso previamente desinfectados por aspersión y por inmersión para su incubación.

MATERIAL Y MÉTODOS

Se analizaron 35 huevos de gallinas reproductoras pesadas, procedentes de una granja ubicada en el estado de Morelos, México. Cada huevo fue colectado individualmente en bolsas de plástico estériles, formándose 5 tratamientos de 7 huevos cada uno. Tratamiento (T)1: huevo sucio, (huevo puesto en piso); T2: huevo sucio desinfectado por aspersión*; T3: huevo sucio desinfectado por inmersión*; T4: huevo de nido sin desinfección y T5; huevo de nido con desinfección.

Diseño del estudio. Los huevos de todos los tratamientos se analizaron mediante una prueba cuantitativa para la obtención de microorganismos del exterior del cascarón y de las membranas testáceas.

Muestreo externo. Cada huevo fue lavado con una solución amortiguadora de fosfatos (PBS) estéril, teniendo una relación 1:10 para iniciar las diluciones décuples. Los cascarones de los huevos fueron frotados con las paredes internas de la bolsa con el PBS para suspender en el líquido todas las partículas presentes que existían en la superficie del huevo. Posteriormente se tomó una muestra de esta suspensión para continuar realizando las diluciones décuples (hasta 10^{-6}) y 3 gotas de 20µl de cada dilución fue sembrada en Agar de: Soya tripticasa, MaC Conkey, Sal y Manitol y Sabouraud. Todas las cajas de todas las diluciones de cada huevo fueron incubadas a 37°C por 18 a 24 horas para finalmente realizar el conteo bacteriano. Las cajas conteniendo Agar de Sabouraud después de esas 24 horas, se incubaron a temperatura ambiente durante 10 días.

Muestreo de membranas testáceas. Una vez terminado el proceso anterior, los huevos se sacaron de las bolsas y se frotaron con algodón y una solución de alcohol yodo al 2.5% para su desinfección. A la vez, el contenido de cada huevo fue descartado para muestrear las membranas testáceas mediante el macerado del

cascarón con las membranas testáceas, agregando PBS estéril en relación 1:10 y llevar a cabo diluciones décuples y sembrado en agares como lo anteriormente descrito en el muestro externo.

*Multicide Anglocorp, S.A. de C.V. - glutaraldehído al 40%, cuaternarios de amonio al 6% (1 mL/1Lt).

RESULTADOS

En el Cuadro 1 se muestran los resultados obtenidos de los huevos en estudio, donde se observa que en la cuenta general de los cascarones de los huevos del T1, tuvieron desde 1166×10^4 hasta 1500×10^5 UFC/huevo y las membranas desde 733×10^3 hasta 1133×10^5 UFC/huevo. En el T4, el cascarón tuvo desde 0 UFC/huevo hasta 14883×10^3 UFC/huevo y las membranas desde 0 UFC/huevo hasta 833×10^3 UFC/huevo, además en ambos tratamientos predominó el crecimiento de bacterias gram positivas y no así las gram negativas. En los tratamientos 2, 3, y 5 no se observó crecimiento bacteriano significativo. Los resultados anteriores muestran la posibilidad de incubar huevos de piso siempre y cuando exista desinfección previa.

Cuadro 1. Resultados de los tratamientos 1 al 5 de los huevos en estudio.

| Huevo | | T1 | T1 | T2 | T2 | T3 | T3 | T4 | T4 | T5 | T5 |
|-------|----------|--------------------|---------------------|------------------|------------------|------------------|-----|---------------------|-------------------|-----|-----|
| | | Ca | M | Ca | M | Ca | M | Ca | M | Ca | M |
| 1 | Cta Gral | 467×10^5 | 800×10^3 | S/C | S/C | S/C | S/C | 1766×10^2 | S/C | S/C | S/C |
| | G (+) | 110×10^5 | 683×10^3 | S/C | S/C | S/C | S/C | 1716×10^2 | 16×10^2 | S/C | S/C |
| | G (-) | S/C | S/C | S/C | S/C | S/C | S/C | S/C | S/C | S/C | S/C |
| 2 | Cta Gral | S/C | 716×10^5 | S/C | 16×10^2 | S/C | S/C | 1600×10^4 | 833×10^3 | S/C | S/C |
| | G (+) | 683×10^4 | 666×10^5 | S/C | S/C | S/C | S/C | 1533×10^4 | 233×10^3 | S/C | S/C |
| | G (-) | S/C | S/C | S/C | S/C | S/C | S/C | S/C | S/C | S/C | S/C |
| 3 | Cta Gral | 1300×10^4 | 966.6×10^3 | S/C | S/C | S/C | S/C | 1650×10^2 | 433×10^2 | S/C | S/C |
| | G (+) | 1116×10^4 | 750×10^3 | S/C | S/C | S/C | S/C | 1483×10^2 | 50×10^2 | S/C | S/C |
| | G (-) | S/C | S/C | S/C | S/C | S/C | S/C | S/C | 133×10^4 | S/C | S/C |
| 4 | Cta Gral | 416×10^5 | 2133×10^4 | S/C | 16×10^2 | 16×10^5 | S/C | S/C | S/C | S/C | S/C |
| | G (+) | 163×10^5 | 2216×10^4 | S/C | S/C | S/C | S/C | S/C | S/C | S/C | S/C |
| | G (-) | S/C | S/C | S/C | S/C | S/C | S/C | S/C | S/C | S/C | S/C |
| 5 | Cta Gral | 1333×10^5 | 733×10^3 | S/C | S/C | S/C | S/C | 14883×10^3 | 433×10^3 | S/C | S/C |
| | G (+) | 283×10^5 | 716×10^3 | S/C | S/C | S/C | S/C | 2050×10^3 | 313×10^3 | S/C | S/C |
| | G (-) | S/C | S/C | S/C | S/C | S/C | S/C | S/C | S/C | S/C | S/C |
| 6 | Cta Gral | 1500×10^5 | 1133×10^5 | S/C | 66×10^2 | S/C | S/C | 366×10^2 | S/C | S/C | S/C |
| | G (+) | 1216×10^5 | 350×10^5 | S/C | S/C | S/C | S/C | S/C | S/C | S/C | S/C |
| | G (-) | S/C | S/C | S/C | S/C | S/C | S/C | S/C | S/C | S/C | S/C |
| 7 | Cta Gral | 1166×10^4 | 1166×10^2 | 16×10^2 | S/C | S/C | S/C | 1233×10^2 | S/C | S/C | S/C |
| | G (+) | 1100×10^4 | 1100×10^2 | S/C | S/C | S/C | S/C | 733×10^3 | S/C | S/C | S/C |
| | G (-) | S/C | S/C | S/C | S/C | S/C | S/C | S/C | S/C | S/C | S/C |

T1.- huevo sucio; T2.- huevo sucio desinfectado por aspersión; T3.- huevo sucio desinfectado por inmersión; T4.- huevo de nido sin desinfección; T5.- huevo de nido con desinfección; Ca.- Cascarón; M.- Membranas testáceas; S/C.- sin crecimiento.

NEPHRITIS ASSOCIATED WITH INFECTIOUS BRONCHITIS VIRUS INFECTION IN YOUNG LAYER CHICKENS

NEFRITIS ASOCIADA CON EL VIRUS DE LA BRONQUITIS INFECCIOSA EN PONEDORAS JÓVENES

P. R. Woolcock^A, C. J. Cardona^B, A. Bickford^C, B. Charlton^C, and G. Cooper^C

California Animal Health and Food Safety Laboratory System,

^AFresno Branch, ^CTurlock Branch,

^BVeterinary Medicine Extension, Surge III, Room 1383
University of California, Davis

RESUMEN

En las aves jóvenes la bronquitis infecciosa por lo general se asocia con infecciones respiratorias. En California ha venido circulando un aislamiento designado como CA1737 en los pollos de engorda desde 2004 y se le ha asociado con patología clínica respiratoria. Resulta interesante el hecho de que este virus también se ha asociado con nefritis en pollas de cuatro a seis semanas de edad, destinadas a la postura. Estos casos se observaron en 2004, 2006 y 2007. A la necropsia se observan los riñones aumentados de volumen, pálidos y con presencia de uratos en los uréteres. La histopatología reveló nefritis uniforme severa linfocítica intersticial y áreas focales de necrosis. La caracterización molecular de la región hipervariable del gen S1 del aislamiento CA1737 demostró que se trata de un virus distinto y no relacionado con ningún otro virus de la bronquitis infecciosa, encontrando el parentesco más cercano, investigando el banco de genes GenBank, con un

aislamiento de Corea, con el cual se detectó sólo una similitud del 72%.

SUMMARY

Infectious bronchitis in young chickens is usually associated with respiratory infections. In California an isolate designated CA1737 has been circulating in broiler chickens since 2004, and has been associated with respiratory clinical pathology. Interestingly this virus has also been associated with nephritis in four- to six-week old layer chickens. Cases have been observed in 2004, 2006, and 2007. Grossly kidneys were enlarged and pale and urates were present in the ureters. Histopathology revealed a uniform severe lymphocytic interstitial nephritis and focal areas of necrosis. Molecular characterization of the hypervariable region of the S1 gene of CA1737 has shown that this is a distinct virus with no close relationship to other IBVs the closest relationship, when searched in GenBank, was to an isolate from Korea, but this was only 72% similar.

EFFECTS OF FEED-BORNE *FUSARIUM* MYCOTOXINS ON HEALTH AND REPRODUCTIVE PERFORMANCE OF BROILER BREEDERS

EFFECTO DE LAS MICOTOXINAS DE *FUSARIUM* EN EL ALIMENTO SOBRE LA SALUD Y EL RENDIMIENTO REPRODUCTIVO DE LAS HEMBRAS REPRODUCTORAS PESADAS

M. Yegani^A, C. K. Girish^A, T. K. Smith^A, and A. E. Sefton^B

^ADepartment of Animal and Poultry Science, University of Guelph, Guelph, Ontario N1G 2W1, Canada

^BAlltech Biotechnology Center, Nicholasville, Kentucky 40356

RESUMEN

Se realizó un estudio para investigar los efectos de la utilización de granos contaminados naturalmente con micotoxinas de *Fusarium* en la ración, sobre el rendimiento y el metabolismo de las reproductoras pesadas. Se utilizaron 42 gallinas reproductoras pesadas de 26 semanas de edad y 9 gallos de 26 semanas de edad, que recibieron las siguientes dietas: 1) testigo, 2) granos contaminados, 3) granos contaminados + 0.2% de glucomanano polimérico adsorbente de micotoxinas (GMA; Mycosorb, Alltech, Inc., Nicholasville, KY, EE.UU.) durante 12 semanas. La administración de los granos contaminados tendió a reducir la producción de huevo. Se observó una disminución significativa en el grosor del cascarón y un aumento significativo en la mortalidad embrionaria temprana después de administrar durante 4 semanas la dieta experimental contaminada, pero la inclusión de GMA previno estos efectos. Las dietas no afectaron las características del semen de los gallos. La utilización en el alimento de los granos contaminados disminuyó los títulos de anticuerpos contra el virus de la bronquitis infecciosa al final de las 12 semanas, pero la inclusión de GMA previno este efecto. Se concluyó que el consumo de granos contaminados con micotoxinas de *Fusarium* puede reducir la eficiencia productiva de las reproductoras pesadas.

INTRODUCTION

Dietary inclusion of glucomannan mycotoxin adsorbent (GMA) (Mycosorb, Alltech Inc, Nicholasville, KY), cell wall extract from yeast of a specific strain, reduces the adverse effects of *Fusarium* mycotoxins in broilers (1) and laying hens (2). The current study was to determine the effects of grains naturally contaminated with *Fusarium* mycotoxins on health and reproductive performance of broiler breeders and to possible preventative effect of GMA.

MATERIALS AND METHODS

Forty-two 26-wk-old Ross 308 hens and nine Ross 308 roosters were weighed and randomly assigned to individual cages, in 14 and 3 replicates, for each of the 3 treatment groups. The treatments were corn: control, contaminated grains, and contaminated grains + 0.2% GMA all on similar wheat and soybean meal-based standard breeder diets. A restricted daily feeding regimen, with unlimited access to water from individual nipple drinkers, was applied throughout the experiment. The birds were vaccinated at the time of placement (26 wk old) with a killed Newcastle bronchitis vaccine (Intervet Canada Ltd). Diets were analyzed for 19 mycotoxins and contaminated diets contained 12.6ppm DON, 0.6ppm zearalenone and 1ppm 15-acetyl-DON. Egg production, egg shell quality, hatchability, embryonic mortality, and antibody titres were evaluated. Data were analyzed by ANOVA using the GLM procedure of SAS.

RESULTS AND DISCUSSION

Eggshell thickness was reduced in birds fed contaminated grains (Table 1), in contrast to studies of laying hens (3). There were no changes in other egg parameters, which is in agreement with previous studies. The reduction in early embryonic mortality in eggs from birds fed contaminated grains likely related to the eggshell thickness reduction. Eggshell thickness can affect moisture loss during incubation, and hatchability can be reduced (4). Similarly, developmental anomalies were reported when laying hens were fed diets containing oats contaminated with 4.9 ppm DON (5). The significant decrease in IBV antibody titres in birds fed contaminated grains indicates the well-defined effect of trichothecene mycotoxins on the humoral immune system. Immunosuppression is a common but under reported effect of mycotoxins in poultry. GMA ameliorated the negative effects of naturally contaminated grains with

broiler breeders, similar to previously reported studies with broilers and layers (2,3,4).

REFERENCES

1. Swamy, H.V.L.N., T.K. Smith, P.F. Cotter, H.J. Boermans, and A.E. Sefton. Effects of feeding blends of grains naturally contaminated with *Fusarium* mycotoxins on production and metabolism in broilers. *Poult. Sci.* 81:966-975. 2002.
2. Chowdhury, S.R., T.K. Smith, H.J. Boermans, A.E. Sefton, R. Downey, and B. Woodward. Effects of feeding blends of grains naturally contaminated with *Fusarium* mycotoxins on

performance, metabolism, haematology and immunocompetence of ducklings. *Poult. Sci.* 84:1179-1185. 2005.

3. Chowdhury, S.R. and T.K. Smith. Effects of feeding blends of grains naturally contaminated with *Fusarium* mycotoxins on performance and metabolism of laying hens. *Poult. Sci.* 83:1849-1856. 2004.

4. Leeson, S. and J.D. Summers. *Broiler Breeder Production*. Univ. Books, Guelph, Ontario, Canada. 2000.

5. Bergsjø, B., O. Herstad, and I. Nafstad. Effects of feeding deoxynivalenol-contaminated oats on reproductive performance in White Leghorn hens. *Br. Poult. Sci.* 34:147-159. 1993.

Table 1. Effect of dietary *Fusarium* mycotoxins on egg shell thickness^A, embryonic mortality^A and serum antibody titers against infectious bronchitis virus (IBV^B).

| Diet | Egg shell thickness (µm) - Wk 4 | Early Embryonic Mortality (%) - wk 4 | IBV antibody titres- Wk 12 |
|-----------------------------------|---------------------------------|--------------------------------------|----------------------------|
| Control | 32.08 | 5.42 | 12,653 |
| Contaminated | 30.18 | 21.52 | 8,012 |
| Contaminated + GMA ^C | 31.56 | 2.38 | 9,339 |
| SEM | ≤0.55 | ≤4.77 | ≤1,028 |
| Control vs Contaminated | 0.04 | 0.03 | 0.02 |
| Contaminated vs Contaminated +GMA | NS ^D | NS | NS |

^AValues are least square means, n=14;

^BValues are least square means, n=4;

^CPolymeric glucomannan mycotoxin adsorbent;

^DP>0.05.

MICROENCAPSULATION OF LYSOZYME, A NATURAL ANTIMICROBIAL FOR CONTROLLING NECROTIC ENTERITIS BY RADIANT ENERGY UNDER VACUUM (REV) TECHNOLOGY

MICROENCAPSULAMIENTO DE LA LISOZIMA, ANTIMICROBIANO NATURAL, PARA EL CONTROL DE LA ENTERITIS NECRÓTICA, UTILIZANDO LA TECNOLOGÍA DE ENERGÍA RADIANTE AL VACÍO (REV)

Guopeng Zhang, Parastoo Yaghmaee, and Tim Durance

RESUMEN

Se ha observado que el proceso de peletización destruye a la lisozima, principal ingrediente activo de Inovapure 222, producto natural efectivo para el control de la enteritis necrótica. Cuando no se protegió la lisozima en el alimento durante el proceso de peleteado se presentó más del 50% de pérdida de la actividad de la enzima. El objetivo del presente estudio fue ver si la tecnología REV utilizando quitosán

hidrosoluble como espumante, podría generar una matriz deshidratada capaz de encapsular y proteger a la lisozima, en comparación con grasa vegetal hidrogenada. La mezcla de lisozima y quitosán en proporción 1:3 p/p se disolvió en agua para formar pastas con diferentes niveles de contenido de sólidos. Estas pastas se secaron en un horno de microondas al vacío a razón de 300 W de potencia y 30 Torr de presión absoluta, durante 10 minutos. Se determinó el

contenido de humedad de las muestras secas y su actividad de lisozima. La estabilidad térmica de las muestras se analizó usando un calorímetro de escaneo diferencial. Los resultados mostraron que el proceso REV no afecta la actividad de la lisozima y que el producto expandido tiene mejor estabilidad térmica que la lisozima original.

SUMMARY

Feed pelleting process was found destructive against lysozyme, the main active ingredient in Inovapure 222, an effective natural product for controlling broiler necrotic enteritis. There was more than 50% activity loss when lysozyme was not protected in the feed during pelleting. The aim of the

present study was to see whether the REV technology, using water-soluble chitosan as the foaming material, would yield a dehydrated matrix that offer better encapsulation protection to lysozyme compared to hydrogenated vegetable fat. Lysozyme and chitosan at a 1:3 weight ratio were dissolved in water to form pastes with different solid content levels. The pastes were dried in a microwave vacuum dryer at 300 W power and 30 Torr absolute pressure for 10 minutes. The dried samples were tested for moisture content and lysozyme activity. The samples were also analyzed by a differential scanning calorimeter for thermal stability. The results showed that the REV process did not affect lysozyme's activity and the expanded product had superior thermal stability over native lysozyme.

INTERESTING CASES FROM THE POULTRY LABORATORY

Jose A. Linares

Texas Veterinary Medical Diagnostic Laboratory

SUMMARY

As a veterinary student, resident, technical service veterinarian and now a diagnostic laboratory director I have always enjoyed looking at gross lesions and coming up with differential diagnoses. Digital photography has made it easier to take, incorporate and/or exchange pictures as part of my work. In the excitement generated by advances in molecular diagnostics I started to miss “old fashioned” case reports and basic pathology presentations. This presentation is an attempt to

remember the good old days. I will present various cases with case histories, gross lesions and, after a brief period of discussion, the diagnoses. The format will allow interaction with the audience. Given this format I cannot write a lengthy manuscript without giving some of the answers away. Once again the intent is to provide a change of pace from basic research with some “old-fashioned” diagnostics.

(This paper was presented at the Fifth-Sixth Western Poultry Disease Conference, March 26-29, 2007.)