

**PROCEEDINGS OF THE SIXTY-THIRD
WESTERN POULTRY DISEASE CONFERENCE**

April 1 to 5, 2014

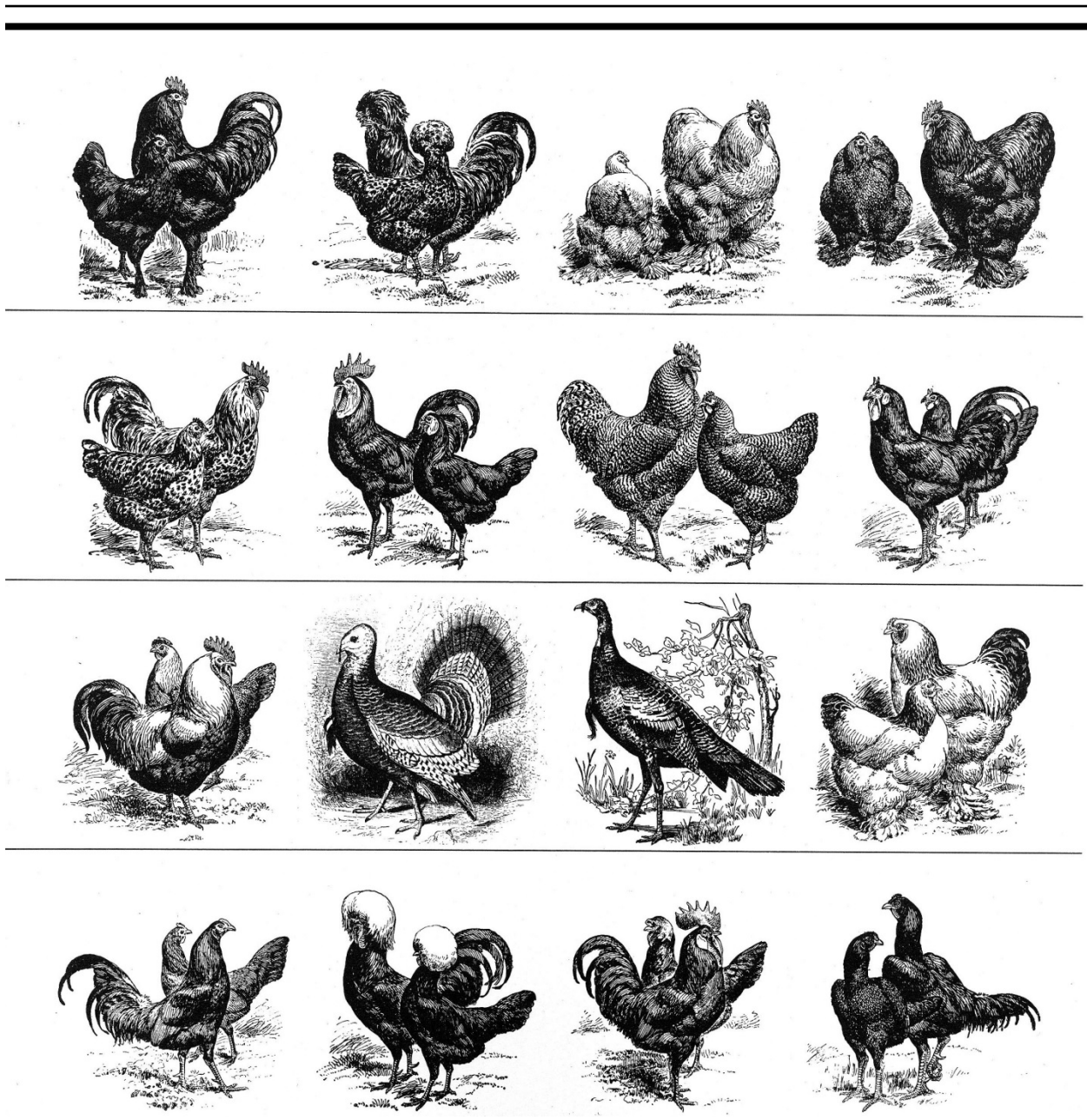
Puerto Vallarta, Jalisco, Mexico



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

1 al 5 de abril de 2014

Puerto Vallarta, Jalisco, México



**PROCEEDINGS OF THE SIXTY-THIRD
WESTERN POULTRY DISEASE CONFERENCE
APRIL 1 TO 5, 2014
PUERTO VALLARTA, JALISCO, MEXICO**



**MEMORIAS DE LA XXXIX CONVENCION ANUAL ANECA
1 AL 5 DE ABRIL DE 2014
PUERTO VALLARTA, JALISCO, MÉXICO**

XXXIX CONVENCION ANUAL DE LA ASOCIACION NACIONAL DE ESPECIALISTAS EN CIENCIAS AVICOLAS

63rd WESTERN POULTRY DISEASE CONFERENCE

BENJAMÍN LUCIO MARTÍNEZ 1942-2013



Con gran admiración, respeto, aprecio y gratitud, esta Convención es dedicada a la memoria del Dr. Benjamín Lucio Martínez, promotor, fundador y primer Presidente de la ANECA durante los años 1970 a 1972. Los estatutos de esta naciente Asociación fueron firmados por los Dres. Benjamín Lucio Martínez, Armando Antillón Rionda, Hugo Funes Cataño, Miguel Ángel Márquez Ruiz, José Villaseñor Michel, Alejandro Cuadra Germán y Jesús Estudillo López (q.e.p.d.).

En la Ciudad de México, D.F., un día 1° de Febrero de 1942 nace Benjamín Lucio Martínez, quien desde muy joven mostró interés por la Avicultura, criando algunas gallinas en la casa paterna y luego, durante algunos años, en una pequeña caseta avícola, junto con su hermano Sergio (q.e.p.d.). En 1964 Benjamín Lucio termina sus estudios en la entonces Escuela Nacional de Medicina Veterinaria y Zootecnia (E.N.M.V.Z.) de la Universidad Nacional Autónoma de México (U.N.A.M.). La historia profesional y su formación familiar comienzan simultáneamente en 1966, cuando se titula como Médico Veterinario Zootecnista y a los pocos días se une en matrimonio con su novia y compañera de estudios, Dra. Eglantina Zavaleta Beckler constituyendo una ejemplar unión conyugal para toda la vida. Al año siguiente (1967) ambos se hacen acreedores a una beca para realizar estudios en la Escuela de Graduados de la Universidad de Cornell. En 1969 Benjamín Lucio obtiene el grado de Master of Science en el Departamento de Enfermedades de las Aves, Colegio de Veterinaria del Estado de Nueva York, E.U.A. Regresa a México en abril de 1969, lleno de entusiasmo y conocimientos actualizados acerca de las enfermedades de las aves, integrándose al equipo de trabajo de la E.N.M.V.Z., primero como Profesor Adjunto, y mediante una fructífera carrera curricular alcanza la máxima categoría académica como Profesor Titular C, con la cual se retiró de la U.N.A.M. en el año de 1986.

Durante esa primera etapa como Profesor en la U.N.A.M. (1969-1977), el Dr. Lucio contribuye a modernizar los elementos de diagnóstico avícola con que contaba el prestigiado Laboratorio de Patología Aviar, que en aquel tiempo funcionaba bajo la dirección del Dr. Alejandro Cuadra Germán, y donde los avicultores y colegas acudían desde años atrás con aves o muestras para recibir apoyo de diagnóstico y asesoría técnica.

Poniendo al servicio del Laboratorio de Patología Aviar su capacidad, y con la invaluable participación de los Dres. Armando Antillón Rionda (quien casi al mismo tiempo regresaba también de sus estudios de Maestría en la Universidad de Connecticut, E.U.A.) y el propio Dr. Cuadra, lograron la transformación del mencionado laboratorio, que pasó a ser el Departamento de Producción Animal: Aves. Los esfuerzos y el interés del Dr. Lucio y los colegas mencionados por elevar el nivel de la educación en materia de patología aviar fueron mucho más allá, al promover y fijar las bases académicas para la creación de estudios de post-grado, contando por supuesto con el apoyo de distinguidos profesores de la E.N.M.V.Z. y su Director, Dr. Pablo Zierold Reyes, poniéndose en práctica como primer escalón la Especialidad en Patología Avícola a principios de los años 70's, hecho que permitió la transformación de Escuela a Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia. La Especialidad en Patología Avícola, posteriormente evolucionó a Especialidad en Producción Animal: Aves, y pronto cobró una reconocida importancia en México y el extranjero, por lo que no pocos de sus estudiantes provenían de países de Centro y Sudamérica, varios de los cuales al regresar a sus lugares de origen fueron piezas fundamentales para el desarrollo de una medicina aviar de mayor actualidad y sustento. El Dr. Lucio desempeñó de manera por demás relevante desde 1973 hasta 1975 el puesto de Jefe del Departamento de Producción Animal: Aves, incorporando nuevos profesores y diversificando las áreas y técnicas de diagnóstico, con lo que el contacto con la Avicultura nacional se incrementó notablemente, aprovechando las bases sentadas por los anteriores Jefes del antiguo Laboratorio de Patología Aviar. Dentro de sus grandes méritos durante la jefatura en el Depto. de Producción Animal: Aves está la de haber invitado a grandes investigadores como profesores invitados, destacando las figuras de los Dres. P. P. Levine y Henry E. Adler, entre otros, quienes dejaron conocimientos y disciplina de trabajo, contribuyendo en muchos aspectos a mejorar la calidad de la docencia, investigación y diagnóstico.

Benjamín Lucio fungió como Jefe de la División de Estudios Superiores de la F.M.V.Z. (1976), promovió la constante revisión y adecuación de los planes de estudio de post-grado de la Facultad, estimulando la investigación y divulgación de los conocimientos mediante publicaciones en revistas especializadas y la organización de conferencias y cursos.

Corría el año de 1977 cuando el matrimonio formado por Benjamín y Eglantina consiguieron ser becados nuevamente, pero esta vez por la Universidad de Cornell, para proseguir estudios de doctorado. Durante las dos estancias como estudiante de post-grado en Cornell, Benjamín realizó trabajos de investigación y tesis bajo la experimentada dirección del afamado científico avícola Stephen B. Hitchner, abarcando el estudio de algunas infecciones virales. Una vez cumplidos los requisitos académicos para alcanzar el grado de Doctor en Filosofía (PhD), a principio del año de 1980 el matrimonio Lucio-Zavaleta se reintegra a la F.M.V.Z. de la U.N.A.M. continuando sus labores como profesores e investigadores de tiempo completo.

El interés del Dr. Lucio por abrir nuevos caminos que facilitaran la actualización de conocimientos a los profesionales de la Avicultura se manifiesta de nueva cuenta al contribuir en la planeación, organización y puesta en marcha de la Especialidad en Producción Animal: Aves bajo el Sistema de Universidad Abierta, con el apoyo y entusiasta colaboración del grupo de profesores del Departamento de Producción Animal: Aves. Pronto, otras áreas de la Facultad desarrollaron planes de estudio bajo ese novedoso método de enseñanza tomando como punto de partida la metodología implementada por el grupo de profesores citado.

Durante los años de 1969 a 1976, y 1980 a 1986 (primero y segundo periodo de trabajo en la U.N.A.M.), el Dr. Lucio fue profesor de Clínica de Aves en el nivel de licenciatura, y de Enfermedades de las Aves en los cursos de post-grado, contribuyendo a la formación de numerosos especialistas en Medicina Aviar, muchos de los cuales se integraron como maestros e investigadores a diversas universidades en México y el extranjero, mientras que otros fueron aprovechados por las industrias avícola y químico-farmacéutica para cubrir puestos de responsabilidad.

Reconocido desde un principio como profesor e investigador en la U.N.A.M., Benjamín se abocó al estudio de las principales enfermedades virales de las aves domésticas, siendo el primero en confirmar la presencia de varios padecimientos en nuestro país, como la infección de la bolsa de Fabricio, hepatitis con cuerpos de inclusión, síndrome de baja de postura, enfermedad de Newcastle altamente patógena (forma viscerotrópica) ocasionada por cepas inusualmente virulentas, como la cepa Chimalhuacán. Abarcó muchos otros temas de importancia para la Avicultura, y fue co-autor de varios libros sobre enfermedades de las aves.

En el año de 1986, Benjamín decide renunciar de manera permanente a su trabajo en la U.N.A.M., aceptando la propuesta de la Universidad de Cornell para ocupar una posición como Profesor Visitante. Un año después es nombrado Investigador Asociado II (Senior Research Associate II) en el Departamento de Medicina Aviar y Acuática de la Universidad de Cornell, y para 1989 ya es Profesor Asociado, con el encargo de investigar acerca de enfermedades significativas de las aves.

Durante los últimos años como profesor en la U.N.A.M., Benjamín lideró un equipo de trabajo integrado por los profesores del Depto. de Producción Animal: Aves de aquellos tiempos, con la finalidad de desarrollar un plan para descentralizar las funciones de diagnóstico e investigación de esa institución, las cuales –se pensaba– deberían quedar a cargo de un Centro de Investigaciones Avícolas, construido en algún lugar fuera de la Ciudad de México, y cerca de alguna zona avícola. Este fue seguramente el proyecto más ambicioso del Dr. Benjamín Lucio, quien ya percibía las limitaciones económicas y administrativas de la institución para llevar a cabo estudios de investigación de alto nivel. Lamentablemente, este proyecto, a pesar de su viabilidad, y de la necesidad de investigación que demandaba (y demanda) la situación zoonosológica de la Avicultura, no recibió la comprensión y apoyo indispensables, quedando finalmente, y hasta la fecha, en el olvido. La visión y el talento de Benjamín en este caso, fue completamente desaprovechada, pero en cambio, inició una larga carrera de éxitos como profesor e investigador en su segunda “Alma Mater”, la Universidad de Cornell.

Ahí pudo continuar con investigaciones relevantes sobre infecciones como anemia infecciosa, *Salmonella* Enteritidis, viruela del Canario, viruela de los Loros, infección por virus Herpes en Tragopan, y otras, cuyos frutos los compartió con los colegas de varios países mediante sus interesantes conferencias y publicaciones en revistas especializadas de alto nivel.

Desde el mes de septiembre de 1998 hasta su jubilación oficial en marzo del 2010 ocupó el cargo de Director de Servicios de Diagnóstico y Extensionismo Avícola, en el Laboratorio de Diagnóstico de Salud Animal del Colegio de Medicina Veterinaria de la Universidad de Cornell, puesto que le permitió una estrecha relación con los avicultores del Estado de Nueva York, E.U.A.

Durante su vida, Benjamín Lucio fue objeto de numerosos y bien merecidos reconocimientos a su labor, destacando la dedicatoria de la XIV Convención de la ANECA, en abril de 1989, hace exactamente 25 años, aquí también, en Puerto Vallarta, Jal. Otras prestigiadas organizaciones profesionales, como la American Association of Avian Pathologists y la Western Poultry Disease Conference también le brindaron reconocimientos. Su contribución a la Avicultura mexicana y Latinoamericana es innegable y de gran impacto.

Tal como lo mencionan los reconocidos investigadores, Dres. Bruce Calnek y Ton Schat, grandes amigos de Benjamín, en el obituario que publicaron en la revista Avian Pathology: “Una muestra verdadera de su estatura internacional es su inclusión por la World Veterinary Poultry Association como miembro inaugural de su recientemente establecido Salón de Honor (Hall of Honor)”.

Benjamín siempre estuvo cerca de la ANECA, ya sea como uno de sus directivos, consejero, conferencista, asistente, y también como miembro del Consejo de Expresidentes. Siempre fomentó la armonía y superación de nuestra Asociación, creando vínculos con otras Asociaciones de carácter internacional. Su firmeza de carácter, su honestidad a toda prueba, la congruencia de sus convicciones, su inteligencia, extensa y admirable vida de trabajo y su bonhomía, le caracterizaron siempre como el gran maestro y el gran amigo que fue.

La fraternal relación maestro-alumno fomentada por el Dr. Lucio invariablemente contribuyó a desarrollar sinceros vínculos de amistad y cooperación, y esta es una de las razones tal vez más significativas por las cuales es recordado con un profundo afecto por muchos distinguidos colegas avipatólogos.

Resulta imposible mencionar en detalle tantos aspectos interesantes de la vida de Benjamín Lucio Martínez, cuyo prestigio como maestro, compañero y amigo caminan a la par de su intachable imagen como esposo, padre y abuelo. Benjamín es, sin lugar a dudas, un ejemplo a seguir y motivo para reflexionar acerca de las razones por las cuales personas tan valiosas como él solo pueden expresar todo su potencial en países distintos del nuestro.

Desde su traslado a los E.U.A. Benjamín vivió en la Ciudad de Ithaca, N.Y., donde él y su esposa tuvieron la dicha de estar en cercana convivencia con sus hijas y nietos, a quienes adoraba.

El Dr. Lucio fallece de manera inesperada y súbita el 15 de junio del 2013, en la sala de urgencias del Centro Médico de Cayuga, en Ithaca, N.Y. Le sobreviven su amada esposa Eglantina Zavaleta de Lucio, sus hijas Eglantina y Araceli y sus nietos, familia que orgullosamente encabezó y apoyó hasta el último día de su vida.

XXXIX CONVENCION ANUAL DE LA ASOCIACION NACIONAL DE ESPECIALISTAS EN CIENCIAS AVICOLAS

63rd WESTERN POULTRY DISEASE CONFERENCE

BENJAMÍN LUCIO MARTÍNEZ 1942-2013



It is with great admiration, respect, appreciation, and gratitude that this Conference is dedicated to the memory of Dr. Benjamin Lucio Martínez, promoter, founder, and first President of ANECA from 1970 to 1972.

The statutes of this rising Association were signed by Drs. Benjamin Lucio Martínez, Armando Antillón Rionda, Hugo Funes Cataño, Miguel Ángel Márquez Ruiz, José Villaseñor Michel, Alejandro Cuadra Germán and Jesús Estudillo López (RIP).

Benjamin Lucio Martínez was born February 1, 1942 in Mexico City. From a very early age he showed interest in poultry production, raising some hens at his father's house, and later for several years, in a small henhouse with his brother Sergio (RIP). In 1964 Benjamin Lucio completed his bachelor's degree at the National School of Veterinary Medicine and Husbandry (ENMVZ) of the National Autonomous University of Mexico (UNAM). Both his professional and family history started simultaneously in 1966 when he earned his DVM degree and few days later, married his girlfriend Dr. Eglantina Zavala Beckler, establishing an exemplary marriage that lasted a lifetime. A year later (1967) they both earned scholarships to study at the Cornell Graduate School at Cornell University. In 1969, Benjamin completed his MSc degree in the Poultry Diseases Department of the Veterinary College of the State of New York, USA. He returned to Mexico in April 1969 full of enthusiasm and up-to-date knowledge of poultry diseases, joining the ENMVZ team; first as an Assistant Professor and through a productive CV, reaching the maximum academic category as Professor Type C until he retired from the UNAM in 1986.

During his first stage as Professor at the UNAM (1967-1977), Dr. Lucio contributed to the modernization of the avian diagnostic elements available in the Avian Pathology Laboratory, whose director was Dr Alejandro Cuadra German, where poultry farmers and veterinarians received diagnostic and technical support.

Dr. Lucio, along with Dr. Armando Antillon Rionda (who had recently returned from completing his MSc degree at the University of Connecticut, USA) and Dr. Cuadra, transformed the laboratory into the Poultry Production Department. Dr. Lucio's and the other Drs. efforts to increase the avian pathology education level went beyond when they promoted and established the academic principles to create post-graduate degrees with the support of distinguished professors of the ENMVZ and its Dean, Dr. Pablo Zierold Reyes. The first post graduate degree established was the Avian Pathology Specialty in the beginning of the 70s. This fact transformed the Veterinary Medicine and Husbandry School. After that, the Avian Pathology Specialty evolved into the Animal Production Specialty: Poultry, and soon was greatly acknowledged in Mexico and overseas, receiving students from Central and South America, several of which, when they returned back home, became fundamental pieces for the development of a more modern, developed, and sustainable avian medicine program. From 1973 to 1975, Dr. Lucio's contribution became even more relevant when he was head of the Animal Production Department: Poultry, incorporating new professors, diversifying the technical diagnosis areas, and taking advantage of the basis established by the previous heads of the Department, which greatly increased the contact with the national poultry sector.

One of the great contributions of Dr. Lucio to the Animal Production Department: Poultry was inviting great international researchers such as Drs. P.P. Levine and Henry E. Adler. Both contributed knowledge and discipline, which in turn helped to improve the quality of teaching, research, and diagnosis.

Benjamin Lucio was also head of the Postgraduate Studies Division of the FMVZ (1976). He promoted the constant review and update of the postgraduate study programs, stimulating research and scientific knowledge by disseminating it through scientific journals publications and the organization of courses and conferences.

In 1977 Dr. Lucio and his wife Eglantina earned another scholarship from Cornell University to continue their postgraduate studies. During his two periods as a postgraduate student at Cornell, Dr. Lucio carried out research on various viruses working under the experienced guidance of the famous poultry researcher Stephen B. Hitchner. Once completing their PhD studies, Dr. Lucio and Eglantina rejoined the FMVZ of the UNAM as full time professors and researchers in early 1980.

Dr. Lucio's interest in updating the knowledge of poultry professionals led to the planning, organization, and creation of the Poultry Production Specialty through the Open University System with the support of the group of professors of the Animal Production Department: Poultry. Soon other areas of the FMVZ developed study plans under that novel teaching method. During 1969-1976 and 1980-1986 (first and second periods Dr. Lucio worked at the UNAM) Dr. Lucio worked as undergraduate professor of Poultry Clinics and as a postgraduate professor of Poultry Diseases, contributing to the education of numerous specialists in Poultry Medicine, several of which became professors and researchers in a number of universities in Mexico and overseas while others worked in the poultry and pharmacology industries.

Dr. Lucio studied the main viral diseases of domestic poultry, and was the first researcher to confirm the presence of several diseases in Mexico, such as infectious bursal disease, inclusion body hepatitis, egg drop syndrome, and viscerotropic velogenic Newcastle Disease caused by unusually virulent strains such as the Chimlhuacan strain. He worked in many other important poultry topics and was co-author of several poultry disease books.

In 1986 he quit his job at the UNAM and started working at Cornell University as a visiting professor. A year later he became Senior Research Associate II in the Department of Avian and Aquatic Animal Medicine, and in 1989 became Associate Professor, investigating significant poultry diseases.

During his last years as professor at the UNAM, he was the head of a work team formed by the professors of the Animal Production Department: Poultry, which had the objective of developing a plan to decentralize diagnostic and research functions of the Department, which, they thought, had to be in charge of a Poultry Research Center established somewhere outside Mexico City and close to a poultry production area. This was certainly the most ambitious project Dr. Lucio had, but he already faced some economic and administrative limitations of the Institution to carry out high level research studies.

Unfortunately, this project in spite of its viability and the need of research that the animal health situation the poultry production demanded, did not have the support needed, which led to its suspension. Dr. Lucio's vision and talent were completely wasted. However, he began a successful career in his second "Alma Mater," Cornell University, where he was able to continue important research of infectious diseases

such as *Salmonella* Enteritidis, canary pox, parrot pox, Tragopan Herpesvirus, etc. Dr. Lucio shared all the knowledge he acquired in this research through interesting conferences and publications in scientific journals and specialized magazines.

From September 1980 until his retirement in March 2010 he was the Poultry Diagnostic and Extension Services Director of the Animal Health Diagnostic Laboratory in the College of Veterinary Medicine at Cornell University, which allowed him to have a close relationship with the poultry producers of the State of New York.

During his life Benjamin Lucio received several awards and distinctions for his work; one of the most important being the ANECA dedicatory in its XIV Convention in April 1989 in Puerto Vallarta, Jalisco, Mexico, exactly 25 years ago. Other prestigious professional organizations such as the American Association of Avian Pathologists and the Western Poultry Disease Conference have also recognized him for his accomplishments. His contributions to the Mexican and Latin American poultry production are undeniable and of great impact. As Dr. Bruce Calnek and Ton Schat, important researchers and great friends of Dr. Lucio, mentioned in the obituary published in the *Journal of Avian Pathology*, "A real illustration of his international importance is his inclusion as an inaugural member of the World Veterinary Poultry Association's recently established Hall of Honor."

Benjamin was always close to ANECA as part of the Board of Directors or as counselor, lecturer, assistant, and as a member of the Former Presidents Board. He always promoted harmony and improvement of our association, creating bonds with other international associations. His strong personality, honesty, strength of conviction, intelligence, long and remarkable work life, and kind heart always characterized him as the great teacher and the great friend he was.

The fraternal student-teacher relationship Dr. Lucio promoted, contributed without a doubt to the development of honest bonds of friendship and cooperation, being this one of the main reasons why he is remembered with deep affection by many distinguished avian pathologist colleagues.

It is impossible to mention with great detail all the interesting aspects in the life of Benjamin Lucio Martinez, whose prestige as teacher, colleague, and friend parallel his impeccable image as husband, father and grandfather.

Undoubtedly, Benjamin is an example and a reason to think about why people as valuable as him can only express all their potential in a country different from Mexico. Since he moved to the U.S., Benjamin lived in Ithaca, N.Y. where he and his wife were close to their daughters and beloved grandchildren.

Dr. Lucio died unexpectedly June 15, 2013 in the emergency room of the Cayuga Medical Center in Ithaca, N.Y. He is survived by his beloved wife Eglantina Zavaleta de Lucio, his daughters Eglantina and Araceli, and his grandchildren. He was a proud part of this family, which he led and supported until the last day of his life.

SIXTY-THIRD WESTERN POULTRY DISEASE CONFERENCE MEETING DEDICATION

HUGO MEDINA



Dr. Hugo Medina was born and raised in Mexico City. He obtained his Doctor of Veterinary Medicine at National University of Mexico and Master at University of Minnesota and became board certified Diplomat of American College of Poultry Veterinarians.

Dr. Medina began his poultry veterinary career as Production Manager-Veterinarian for San Antonio Farms in Mexico then Technical Service Veterinarian for Central Soya, Veterinarian-Manager Health Services for Foster Farms, Director of Veterinary Services for Jennio-O, Veterinarian Health Services for Sparboe and finally Director of Animal Health for Center Fresh Egg Farms. His contributions to the poultry industry included: implementing vaccination, biosecurity and hatchery practices to reduce APV incidence; AI Preparedness Manual and reduction of Peritonitis in Table Egg Layers. He published/presented numerous papers at WPDC and ANECA, AAAP-AVMA, Minnesota Turkey Growers Conference, Midwest Poultry Federation Convention and in Avian Diseases. He was Founder and Chair of State of California Biosecurity Committee, Program Chair of 1994 WPDC - ACPV workshop on Poultry Mycoplasma, President of 1995 WPDC - Program Chair ACPV workshop on Infectious Bronchitis in chickens, Program Chair ACPV workshop on Environmental Effects on Production, President of the Board ACPV and Chair of Minnesota Turkey Growers Association's Avian Pneumovirus Committee.

Dr. Hugo Medina of Plymouth, Minnesota, died from a rare type of anaplastic thyroid cancer on November 30, 2012 at age 66. He is survived by his wife of 36 years, Cindy Hawker-Medina; his brother Roldolfo; sisters Alicia Palero and Patricia Killian; and nine nieces and nephews, all from Mexico.

Center Fresh Egg Group established a \$25,000 "Dr. Hugo Medina Scholarship Fund for Veterinary Medicine" at Iowa State University. Memorials can be sent to that fund c/o Center Fresh Group, 241 Saint Andrews Way, Sioux Center, Iowa 51250.

Dr. Hugo Medina's passion for food production and animal care remained inspirational throughout his career. Hugo Medina was a valued friend and colleague. Hugo was a heck of a nice guy. He left us too soon and will be sorely missed.

63rd WESTERN POULTRY DISEASE CONFERENCE DEDICATORIA

HUGO MEDINA



El Dr. Hugo Medina nació y creció en la Ciudad de México. Realizó sus estudios de medicina veterinaria en la UNAM y una maestría en la Universidad de Minnesota. Llegó a ser un diplomático certificado del Consejo del Colegio Americano de Veterinarios Especialistas en Aves.

El Dr. Medina comenzó su carrera en la avicultura veterinaria como Gerente de Producción en las Granjas San Antonio en México. Posteriormente ejerció como MVZ en el área Técnica de Central Soya, Gerente de Servicios de Salud en Foster Farms, Director de Servicios Veterinarios en Servicios Veterinarios de Salud de Jennio-O, MVZ de Servicios de Salud en Sparboe y finalmente Director de Salud Animal en Center Fresh Egg Farms. Sus contribuciones a la industria avícola incluyen: implementación de vacunación, bioseguridad y prácticas en la incubadora para reducir la incidencia de pneumovirus aviar; un manual para la preparación de IA en aves y la reducción de peritonitis en huevo para consumo. Publicó y presentó un gran número de artículos en WPDC y ANECA, AAAP-AVMA, Conferencia de Productores de Pavo en Minnesota, Convención de la Federación Avícola del Medio Oeste y en Enfermedades Aviares. Fue fundador y presidente del Comité de Bioseguridad del Estado de California, Director de Programa del seminario de Mycoplasma Aviar, Presidente del WPDC en 1995, Presidente del Programa del Seminario de Bronquitis Infecciosa Aviar de ACPV, Presidente del Programa del Seminario Sobre los Efectos del Medio Ambiente en la Producción de ACPV, Presidente del consejo de ACPV y Presidente del Comité del Pneumovirus Aviar de la Asociación de Criadores de Pavo.

El Dr. Hugo Medina, de Plymouth, Minnesota, murió de un raro tipo de cáncer tiroidal anaplásico el 30 de noviembre del 2012 a la edad de 66 años. Le sobreviven su esposa por 36 años, Cindy Hawker-Medina, su hermano Rodolfo, sus hermanas Alicia Palero y Patricia Killian y nueve sobrinos, todos en México.

El Center Fresh Egg Group estableció la “Beca de la Fundación Dr. Hugo Medina Para Medicina Veterinaria” en la Universidad Iowa State. Memoriales pueden ser enviados a dicha fundación o al Center Fresh Group, 241 Saint Andrews Way, Sioux Center, Iowa 51250.

La pasión del Dr. Hugo Medina por la producción de alimentos y el cuidado animal fueron de inspiración durante toda su carrera. Hugo Medina fue valorado como amigo y colega. Era una persona extremadamente agradable. Nos dejó muy pronto y será profundamente extrañado.

SPECIAL ACKNOWLEDGMENTS

The 63rd 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 30 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.

Once again, the WPDC is forever grateful to our distinguished contributors and supports of the conference who are vital in making the conference a success. All our contributors and supporters are listed on the following pages. We greatly appreciate their generosity and sincerely thank them and their representatives for supporting this year's joint meeting of WPDC and ANECA.

We thank Dr. Ernesto Soto for his enthusiastic willingness to accept the position of Program Chair for this joint meeting of the 63rd WPDC and XXXIX ANECA. He would like to thank Rocio Crespo, Richard P. Chin, Nestor Ledesma, Julio Arellano, and David Frame for their extraordinary support.

Many have provided special services that contribute to the continued success of this conference. For this year's joint meeting, the WPDC and ANECA have contracted Grupo Destinos (Mexico) for providing accommodation and registration support as well as the web site for the conference. We would like to thank Ms. Anabel Jiménez for her exceptional work with our conference.

We thank Dr. David Frame for editing and producing another outstanding Proceedings of this meeting. Dr. Frame is indebted to Mr. Dana Frame for his meticulous proofreading and formatting of the Proceedings for publication. We acknowledge Bruce Patrick (Graphic Communications, Brigham Young University) for providing the illustrations appearing on the opening page. We express our gratitude to all authors who submitted manuscripts, and are especially appreciative of those who submitted their manuscripts on time.

63rd WPDC CONTRIBUTORS LIST

(As of February 21, 2014)

SUPER SPONSORS

CEVA Animal Health

Libourne, France

BENEFACTORS

American Association of Avian Pathologists

Jacksonville, FL

PATRONS

Alltech

Lexington, KY

Bayer Healthcare LLC

Shawnee Mission, KS

Cobb Vantress

Siloam Springs, AR

Foster Poultry Farms, LLC

Livingston, CA

Huvepharma, Inc.

New Oxford, PA

Hygieia Biological Laboratories

Woodland, CA

IDEXX Laboratories, Inc.

Westbrook, ME

Merial Select Inc.

Gainesville, GA

Zoetis - Diagnostics

Madison, NJ

DONORS

Aviagen North America, Inc.
Huntsville, AL

California Poultry Federation, Inc.
Modesto, CA

Charles River
Storrs, CT

Chr. Hansen, Inc.
Milwaukee, WI

Cutler Associates International
Moorpark, CA

Dr. G. Yan Ghazikhanian, DVM, PhD, DACPV
Sonoma, CA

Hy-Line International
Dallas Center, IA

Merck Animal Health
Millsboro, DE

Phibro Animal Health
Fairfield, NJ

Poultry Health Services, Ltd.
Airdrie, AB, Canada

Sunrise Farms
Catskill, NY

Vega Farms
Davis, CA

Veterinary Service, Inc.
Salida, CA

SUSTAINING MEMBERS

Animal Health International
Ceres, CA

Arthur A. Bickford, VMD, PhD
Turlock, CA

BioChek USA Corporation
Scarborough, ME

Masakazu Matsumoto, DVM, PhD
Corvallis, OR

Preserve International
Turlock, CA

FRIENDS OF THE CONFERENCE

Canadian Poultry Consultants, Ltd.
Abbotsford, BC, Canada

Demler Enterprises
Wasco, CA

Dr. Marion A. Hammarlund, DVM
Riverside, CA

J.S. West Milling Company
Modesto, CA

Merrill's Poultry Farm, Inc.
Paul, ID

Richard Yamamoto, PhD
Davis, CA

63rd WESTERN POULTRY DISEASE CONFERENCE OFFICERS

President

Dr. Portia Cortes
USDA APHIS VS
10365 Old Placerville Rd, Ste.210
Sacramento, CA 95827

Program Chair

Dr. Ernesto Soto-Priante
Laboratorio Avi-Mex, SA de CV
Durango 136 Int. 301-B
Colonia Roma
Mexico, D.F. 06700, Mexico

Program Chair-elect

Dr. Shahbaz Haq
Lakeside Poultry Veterinary Services Inc
Unit-A, 240 Graff Avenue
Stratford, ON N5A 6Y2
Canada

Meeting Support Chair

Dr. Yan Ghazikhanian

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 - Tulare
18830 Road 112
Tulare, CA 93274-9042
rpchin@ucdavis.edu

63rd WPDC PROCEEDINGS

*The **Proceedings** of the 63rd 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 63rd WPDC Proceedings are available in electronic format only.*

Copies of these Proceedings are available from: Dr. R. P. Chin
CAHFS-Tulare
University of California, Davis
18830 Road 112
Tulare, CA 93274-9042
rpchin@ucdavis.edu

Price per copy (includes shipping & handling): Electronic format only
US\$25.00 for USA shipment.
US\$22.00 for AAAP members and orders of 5 or more for USA.
US\$28.00 for Canada and Mexico.
US\$30.00 for all other countries.

WESTERN POULTRY DISEASE CONFERENCE (WPDC) HISTORY

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

<u>YEAR</u>	<u>PRESIDENT</u>	<u>PROGRAM CHAIR</u>	<u>DEDICATION</u>	<u>RECOGNITION</u>
36th WPDC – 1987	D. A. McMartin	Marcus M. Jensen		
37th WPDC – 1988	M. M. Jensen	Barry Kelly	A. S. Rosenwald	
38th WPDC – 1989	B. Kelly	Masakazu Matsumoto	Louise Williams	
39th WPDC – 1990	M. Matsumoto	Jeanne M. Smith	Dean Young	
40th WPDC – 1991	J. M. Smith	Richard P. Chin	A. S. Rosenwald	
16th ANECA	Martha Silva M.	David Sarfati M.	A. S. Rosenwald	
41st WPDC – 1992	R. P. Chin	Rocky J. Terry	Marcus Jensen	Henry E. Adler* R. A. Bankowski C. E. Whiteman Royal A. Bagley
42nd WPDC – 1993	R. J. Terry	A. S. Dhillon	W. W. Sadler	
43rd WPDC – 1994	A. S. Dhillon	Hugo A. Medina	G. B. E. West	
44th WPDC – 1995	H. A. Medina	David D. Frame	W. M. Dungan*	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 McMartin
45th WPDC – 1996	D. D. Frame	Mark Bland	Don Zander	
21st ANECA	R. Salado C.	G. Tellez I.	M. A. Marquez	
46th WPDC – 1997	Mark Bland	James Andreasen, Jr.	Bryan Mayeda	
47th WPDC – 1998	J. Andreasen, Jr.	H. L. Shivaprasad	W. J. Mathey	
48th WPDC – 1999	H. L. Shivaprasad	R. Keith McMillan		
49th WPDC – 2000	R. K. McMillan	Patricia Wakenell	R. P. Chin	Ralph Cooper Robert Tarbell Don Bell Art Bickford
50th WPDC – 2001	P. Wakenell	Ken Takeshita		
51st WPDC – 2002	K. Takeshita	Barbara Daft	Hiram Lasher	Bachoco S.A. de C.V. Productos Toledano S.A.
27 ANECA	J. Carillo V.	Ernesto P. Soto		
52nd WPDC – 2003	B. Daft	David H. Willoughby		Roland C. Hartman
53rd WPDC – 2004	D. H. Willoughby	Joan Schrader		G. Yan Ghazikhanian
54th WPDC – 2005	J. Schrader	Stewart J. Ritchie	W.D. Woodward	R. Keith McMillan
55th WPDC – 2006	S. J. Ritchie	Peter R. Woolcock		M. Hammarlund
56th WPDC – 2007	P.R. Woolcock	Bruce Charlton	R. Keith McMillan	M. Matsumoto
57th WPDC – 2008	B. Charlton	Rocio Crespo	A. S. Rosenwald*	B. Daft
33rd ANECA	M. A. Rebollo F.	Maritza Tamayo S.	A. S. Rosenwald*	Ernesto Ávila G.
58th WPDC – 2009	R. Crespo	Victoria Bowes		G.L. Cooper
59th WPDC - 2010	V. Bowes	Nancy Reimers		
60th WPDC - 2011	N. Reimers	Larry Allen		John Robinson
61st WPDC - 2012	L. Allen	Vern Christensen		
62nd WPDC - 2013	V. Christensen	Portia Cortes	Víctor Manuel Mireles M.*	A. Singh Dhillon
63rd WPDC – 2014	P. Cortez	Ernesto Soto P.		
39th ANECA	Néstor Ledezma M.	Ernesto Soto P.		
64 th WPDC – 2015	E. Soto	Shahbaz Haq		

*posthumous

MINUTES OF THE 62ND WPDC ANNUAL BUSINESS MEETING

President Christensen called the meeting to order on Monday, March 25, 2013, at 5:08 PM, at the Holiday Inn Capitol Plaza, Sacramento, CA. There were 23 people in attendance.

APPROVAL OF 61ST WPDC BUSINESS MEETING MINUTES

The minutes from the 61st WPDC business meeting were reviewed and a motion was carried to approve them as printed in the Proceedings of the 61st WPDC.

ANNOUNCEMENTS

Dr. Christensen acknowledged all the contributors; in particular, Ceva Animal Health and Zoetis, both of which contributed at the Super Sponsor level. In addition, Dr. Christensen acknowledged those at the Benefactor level, which included the American Association of Avian Pathologists and Merck Animal Health. He also thanked all the contributors for their generous donations. The efforts of the current WPDC officers were acknowledged for their work and participation in the organization of this year's meeting.

Dr. Christensen remembered those who passed away this year. This included Dr. Don Helfer, program chair in 1977 and given the Special Recognition award in 1997, Dr. Hiram Lasher, to whom the 2002 conference was dedicated, and Dr. Hugo Medina, the program chair in 1994.

Dr. Patricia Wakenell gave an update on Dr. George West who has Lewy body dementia.

REPORT OF THE SECRETARY-TREASURER

Dr. R. Chin presented the Secretary-Treasurer report. The 61st WPDC in Scottsdale, AZ, turned out to be a good one. Although there were only 165 registrants, there were contributions of \$36,200 with an overall income of \$77,355. We were able to keep the expenses to \$56,098, thus leaving a net gain of \$21,247. With this additional revenue, currently, WPDC has \$98,710 in savings.

Contributions for this year's meeting (62nd WPDC) are the most we have had for a regular meeting at \$39,150. With this outstanding amount of contribution, Dr. Chin predicts that we should come out about even. One issue, WPDC did not meet its hotel guestroom block, thus incurring an additional \$5017 for meeting room rental. Dr. Chin will negotiate a lower guestroom block next time we meet in Sacramento.

REPORT OF THE PROCEEDINGS EDITOR

Dr. David Frame presented the Proceedings Editor report. The proceedings book this year is obviously thinner than previous years with a total of 50 papers in the proceedings. Cost was about the same as last year. As in previous years, the flash drives were sponsored by Zoetis.

FUTURE MEETINGS

It was agreed to continue with the current rotation for meeting venues, with three different locations, i.e., Mexico, Canada, and probably Arizona. The meeting will continue to return to Sacramento every other year.

In 2014, the 63rd WPDC will be in Puerto Vallarta, Jalisco, Mexico, at the Sheraton Baganvillas, April 2-5, 2014. ACPV will probably sponsor a workshop on Tuesday, April 1, 2014. (Ed. The WPDC Executive Committee met with ANECA and began organizing next year's meeting. A preliminary budget was developed making sure that we would not lose money. The proceedings will be provided only in electronic format.)

In 2015, the 64th WPDC and ACPV workshop will be back in Sacramento, March 22-25, 2015.

In 2016, the 65th WPDC and ACPV workshop are tentatively scheduled to return to Vancouver, BC, Canada in late April.

WPDC EXECUTIVE COMMITTEE

Dr. Christensen reported that the WPDC Executive Committee nominated Dr. Shahbaz Haq for Program Chair for the 64th WPDC in 2015. There were no other nominations and Dr. Shahbaz was elected unanimously as program chair-elect. Dr. Christensen nominated the following officers for 2013-2014:

Program Chair: Dr. Ernesto Soto

President: Dr. Portia Cortes

Past-President: Dr. Vern Christensen

Contributions Chair: Dr. Yan Ghazikhanian

Proceedings Editor: Dr. David Frame

Secretary-Treasurer: Dr. Richard Chin

Program Chair-elect: Dr. Shahbaz Haq

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

NEW BUSINESS

Dr. Shivaprasad made a motion to rename the meeting to “The A.S. Rosenwald Western Poultry Disease Conference.” The motion died due to lack of a second.

Dr. Reimers moved that we establish the A.S. Rosenwald Extension Lecture position with details to be worked out by the WPDC Executive Committee. This motion was seconded and approved unanimously. It was decided that the program chair would recommend the person for the lecture to the WPDC Executive Committee for approval.

Dr. Christensen stated that CE credits will be emailed to everyone by the AAAP/ACPV office. There were no additional items for discussion.

Dr. Christensen turned the presidency over to Dr. Portia Cortes who acknowledged those who helped her organize this year’s meeting. She then adjourned the annual business meeting at 5:47 PM.

AGRADECIMIENTOS

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

AGRADECEMOS TAMBIÉN A NUESTROS LEALES PATROCINADORES

- Alltech de México S.A de C.V.
- Anglo Corp. S.A. de C.V.
- AVEPSA S.A. de C.V.
- Alta Tecnología Industrial para la Salud Animal S.A. de C.V.
- Bayer de México S.A. de C.V.
- Boehringer Ingelheim Vetmédica S.A. de C.V.
- B.M. Editores
- CEVA S.A. de C.V.
- GSI Cumberland de Mexico S. de R.L. de C.V.
- Diamond V de México S. de R.L. de C.V.
- Eli Lilly y Compañía de México, S.A. de C.V.
- Investigación Aplicada S.A. de C.V.
- Laboratorios Sanfer S.A. de C.V.
- Laboratorio Avi-Mex S.A. de C.V.
- Lapisa S.A. de C.V.
- Los Avicultores y su Entorno S.A. de C.V.
- Lubing Mesoamericana S.A de C.V.
- MSD Animal Health
- Merial México S.A. de C.V.
- BFI Innovations Mexico S.A. de C.V.
- Pisa Agropecuaria S.A. de C.V.
- Premezclas de México S.A. de C.V.
- Secretaría de Agricultura, Ganadería, Desarrollo Rural, Pesca y Alimentación (SAGARPA)
- Sistemas Agropecuarios JAT S.A. de C.V.
- Zoetis México S. de R.L. de C.V.
- Zinpro Nutricion Animal S. de R.L. de C.V.

XXXIX CONVENCÓN ANUAL DE LA ASOCIACIÓN NACIONAL DE ESPECIALISTAS EN CIENCIAS AVÍCOLAS A.C. (ANCA)

PRESIDENTE

Nestor Ledesma Martínez

VICEPRESIDENTE

Pilar Castañeda Serrano

VOCAL

Roberto Señas Cuesta

Margarita Arreguin Nava

TESORERO

Otilio Ortiz García

SECRETARIO

Odette Urquiza Bravo

GERENTE ADMINISTRATIVO

Julio Arellano Rodríguez

COMITÉ TÉCNICO

Maritza Tamayo Salmorán

Cecilia Rosario Cortés

Rubén Merino Guzmán

RELACIONES COMERCIALES

Juan Manuel Bustos Flores

Ramón Morales Bello

COORDINADOR DE ASOCIACIONES REGIONALES

Luis Arturo Suazo Orozco

COORDINADOR EXPRESIDENTES

Luis Arturo Suazo Orozco

COORDINADOR CONVENCÓN ANCA & WPDC 2014

Ernesto Soto Priante

HISTORIA DE LA ASOCIACIÓN NACIONAL DE ESPECIALISTAS EN CIENCIAS AVÍCOLAS, A.C. (ANECA)

CONVENCIÓN	PRESIDENTE	PERIODO	COORDINADOR DEL PROGRAMA	DEDICACIÓN
	Benjamín Lucio Martínez	1970-1972		
	Jose A. Villaseñor Michel	1972-1973		
I	Alejandro Cuadra Germán	1973-1974	Alejandro Cuadra	
II	Miguel A. Márquez Ruiz	1974-1976	Miguel A. Márquez	
III	Antonio Berna Santos	1976-1977	Antonio Berna	
IV	Jorge Basurto Bello	1977-1979	Jorge Basurto	
V & 29th WPDC	Angel Mosqueda Taylor	1979-1980	Angel Mosqueda	
VI	Miguel A. Márquez Ruiz	1980-1981	Miguel A. Márquez	Alejandro Cuadra Germán
VII	Luis Villaseñor Michel	1981-1982	Luis Villaseñor	
VIII	Carlos López Coello	1982-1983	Carlos López Coello	
IX	Francisco J. Aranda Torres	1983-1984	Francisco J. Aranda	
X	Jorge Basurto Bello	1984-1985	Jorge Basurto	
XI & 35th WPDC	Jorge Basurto Bello	1985-1986	Mario Padrón	Alfredo Téllez Girón Rode
XII	Bernardo Lozano Dubernard	1986-1987	Bernardo Lozano	Martin Bächtod Gómez
XIII	Manuel Golzarri Moreno	1987-1988	Manuel Golzarri	Felipe Flores Romero
XIV	David Sarfati Mizrahi	1988-1989	David Sarfati	Benjamín Lucio Martinez
XV	Manuel Venegas Vilchis	1989-1990	Manuel Venegas	Jorge Basurto Bello
XVI & 40th WPDC	Martha Silva Maldonado	1990-1991	David Sarfati	Arnold S. Rosenwald
XVII	Jose A. Varona Beascochea	1991-1992	Jose A. Varona	Ernesto Cortes Miranda
XVIII	Eduardo Lucio Decanini	1992-1993	Eduardo Lucio	Armando Antillón Rionda
XIX	Francisco Baez Medina	1993-1994	Francisco Baez	Jesus Estudillo Lopez
XX	Hugo Galicia Becerril	1994-1995	Hugo Galicia	Fernando Galindo Ramirez
XXI & 45th WPDC	Ricardo Salado Carvajal	1995-1996	Guillermo Téllez	Miguel A. Márquez Ruiz

XXII	Jose A. Varona Beascochea	1996-1997	José A. Varona	Fabián Uviña Luna
XXIII	Guillermo Tellez Isaías	1997-1998	Guillermo Téllez	Carlos Lopez Coello
XXIV	Agustin Torres Islas	1998-1999	Agustín Torres	Carlos Barrañón Jaled
XXV	Guillermo Luna Ortiz.	1999-2000	Guillermo Luna	Expresidentes ANECA
XXVI	Maritza Tamayo Salmorán	2000-2001	Maritza Tamayo	Guadalupe Tijerina Garza
				Jorge Zurita Deja
				Ernesto Bächtod Gómez
XXVII	Julián Carrillo Valadéz	2001-2002	Ernesto Soto	Carlos Sánchez Widman
XVIII	Fernando De La Colina Treviño	2002-2003	Fernando de la Colina	Ricardo Cuetos Collado
XIX	Sergio Higuera Bonfil	2003-2004	Sergio Higuera	Jose A. Quintana López
XXX	Víctor M. Petrone García	2004-2005	Victor M. Petrone	Guillermo Téllez Isaías
XXXI	Roberto Señas Cuesta	2005-2006	Roberto Señas	Bernardo Lozano Dubernard
XXXII	Roberto Santiago	2006-2007	Roberto Santiago	Alejandro Cuadra Germán
XXXIII & 57th WPDC	Marco Rebollo Franco	2007-2008	Ernesto Soto	Ernesto Ávila González
XXXIV	Maritza Tamayo Salmorán	2008-2009	Maritza Tamayo	Gabriel Uribe
XXXV	Luis Arturo Suazo Orozco	2009-2010	Miguel Angel Zamora	Susano Medina Jaramillo
XXXVI	Luis Arturo Suazo Orozco	2010-2011	Luis Arturo Suazo	Ramón Lopez Murguía
XXXVII	Luis Arturo Suazo Orozco	2011-2012	Luis Arturo Suazo	Angel Mosqueda Taylor
XXXVIII	Nestor Ledesma Martínez	2012-2013	Nestor Ledesma	Maritza Tamayo Salmorán
XXXIX & 63rd WPDC	Nestor Ledesma Martínez	2013-2014	Ernesto Soto	Benjamín Lucio Martínez

ANÁLISIS MOLECULAR DEL VIRUS DE INFLUENZA AVIAR H7N3 DE LOS BROTES PRESENTADOS EN LOS AÑOS 2012-2013

MOLECULAR ANALYSIS OF THE AVIAN INFLUENZA H7N3 FROM THE 2012-2013 OUTBREAK

A. Absalón^A, L. García-Barrera^A, D. Cortés-Espinosa^A, A. Toscano^B y E. Lucio-Decanini^B

^AInstituto Politécnico Nacional. CIBA Tlaxcala. Carr. Est. Santa Ines-Tecuecomac Km 1.5, Tepetitla, Tlaxcala, México. Tel. +52 (55) 5729 6000 Ext. 87813

^BInvestigación Aplicada S.A. de C.V. México

SUMMARY

Avian influenza virus has taken new significance worldwide because of continuous outbreaks of different varieties of the high pathogenicity viruses in several countries of Asia, Africa and America, corresponding to H5N1, H7N3, H7N9 subtypes that had been isolated from both humans and birds. In this work, a phylogenetic analysis is presented based on the HA gene from the strains of avian influenza H7N3 from the 2012 – 2013 outbreak. Also, we have analyzed at a bio-informatic level the main characteristics of the HA protein and compared it with the official vaccine strain. Based on this analysis we tried to give some explanations of the findings in the field about pathogenesis and antigenicity of the virus.

RESUMEN

El virus de la influenza aviar ha retomado importancia a nivel mundial por los continuos brotes de variedades virales de alta patogenicidad en diferentes países de Asia, Africa y America correspondientes a subtipos H5N1, H7N3, H7N9 que se han presentado en humanos y en aves. En este trabajo se presenta un análisis filogenético con base a la secuencias del gen HA de las cepas de influenza aviar H7N3 de los brotes que se presentaron en los años 2012 – 2013. Adicionalmente, se analizan a nivel bioinformático las características principales de la proteína HA y se compara con la cepa vacunal oficial. Con base en este análisis se trata de dar explicaciones a las observaciones de campo sobre la patogenicidad y antigenicidad del virus.

INTRODUCCIÓN

El virus de la influenza aviar ha retomado importancia a nivel mundial por los continuos brotes de variedades virales de alta patogenicidad en diferentes países de Asia, Africa y America correspondientes a subtipos H5N1, H7N3, H7N9 que se han presentado en humanos y en aves.

Particularmente en México en el área avícola, en las últimas dos décadas se han presentado dos brotes importantes de influenza de alta patogenicidad. En 1994 se presentó el primer brote de influenza de alta patogenicidad subtipo H5N2 con repercusiones severas para toda la avicultura nacional. El segundo caso severo de influenza de alta virulencia, se presentó el año pasado con un brote de influenza aviar del subtipo H7N3 que afectó a las principales zonas avícolas del país ocasionando cuantiosas pérdidas económicas. En el último tercio del 2012 la epidemia del brote de este virus fue controlada; no obstante, en 2013 un nuevo brote de influenza de alta virulencia del mismo subtipo H7N3 volvió a presentarse.

Adicionalmente, esta nueva variedad viral de influenza aviar tiene ligeros cambios antigénicos con respecto al virus del 2012 y con respecto al virus vacunal utilizado en la formulación de la vacuna. Esto le ha conferido la capacidad de evadir la respuesta inmune humoral que induce la vacuna oficial en el huésped; es decir, que los anticuerpos que induce la vacuna tienen menor capacidad de neutralizar al virus de campo de 2013. Por esta razón, se ha vuelto necesario el incremento a 4 dosis de vacuna en pollo de engorda para poder disminuir la mortalidad; lo cual representa el doble de la dosis que se aplica regularmente para proteger contra un brote de influenza aviar de alta virulencia.

RESULTADOS

Primeramente, se mencionan las características de los dos principales genes y proteínas analizadas. La hemaglutinina de HA-AV Jalisco tiene un tamaño de 568 aminoácidos codificados en un marco de lectura de 1707 incluido un codón de término no codificante. Por su parte, la hemaglutinina HA-BV CPA tiene un tamaño de 560 aminoácidos codificados en un marco de lectura de 1683 nucleótidos incluido un codón de término no codificante. Como notoriamente se observa, la diferencia en tamaño entre las dos cepas es de ocho aminoácidos (24 nucleótidos). Primeramente se realizó la comparación de la cepa HA-BV CPA con la cepa HA-AV Jalisco a nivel de nucleótidos y de aminoácidos. En el anexo 1 de este documento se muestra un alineamiento simple de las dos secuencias de nucleótidos realizados con la herramienta Blast disponible en línea en la web de NCBI.

El resultado de este análisis indica que el gen de la hemaglutinina HA-AV Jalisco tiene alta similitud con el gen de la hemaglutinina HA-BV CPA (94%). A nivel de aminoácidos, el % de similitud es de 96% entre estas cepas (Anexo 2). Sin embargo, aproximadamente la mitad de estas diferencias se deben a la inserción de los nucleótidos que posee el gen HA-AV de campo en la región localizada entre los nucleótidos 1013-1065.

En el análisis de antigenicidad de las HA's se encontraron notables similitudes de ambas entre HA-AV Jalisco y HA-BV CPA como se resume en la Tabla 1 de este documento. En esta tabla se muestran los 21 mayores sitios antigénicos de cada una de ellas, en ambos casos se trata de los mismos aminoácidos los que participan. Sin embargo resaltan dos sitios antigénicos, uno de ellos y el de mayor impacto es el sitio de ruptura de la proteína HA y que es el sitio determinante de virulencia. Este sitio es el que debe modificarse para obtener una de baja virulencia, pero este hecho disminuye ligeramente la antigenicidad del sitio. El otro sitio de importancia que se puede observar en las figuras 1A y 1B se encuentra alrededor del aminoácido 90 de ambas proteínas.

CONCLUSIONES

Las proteínas HA-BV CPA, HA-AV Jalisco y HA-BV Recombinante tienen altos porcentajes de similitud entre ellas y perfiles similares de antigenicidad.

Por otro lado, en este momento estoy trabajando en entender los extremos 5' y 3' del genoma viral. La razón de este estudio, se debe a que se ha reportado a que estos extremos son determinantes del nivel de expresión de lo mRNA virales, lo que se traduciría en un bajo nivel de expresión de proteínas virales. De igual forma estoy realizando la comparación de la neuraminidasa de la misma cepa.

REFERENCIAS

1. Rice, P., Longden, I. and Bleasby, A. (2000). The European Molecular Biology Open Software Suite Trends in Genetics. 16(6):276—277.
2. Altschul, S.F., Gish, W., Miller, W., Myers, E.W. & Lipman, D.J. (1990) "Basic local alignment search tool." J. Mol. Biol. 215:403-410.

EARLY VACCINATION FOR PROTECTION AGAINST *SALMONELLA* INFECTIONS OF POULTRY

LA VACUNACIÓN TEMPRANA EN LA PREVENCIÓN DE INFECCIÓN POR *SALMONELLA* EN LAS AVES

S. Ahle

Technical Manager, Lohmann Animal Health International, Inc.

RESUMEN

El buen manejo de incubadoras y la vacunación de las gallinas de postura y de las reproductoras son la base de un programa de prevención y control de *Salmonella*. La vacunación de las aves en las incubadoras se ha utilizado ampliamente como una intervención temprana para reducir la infección por salmonelas cuando los pollitos son más susceptibles. Muchos estudios han demostrado el beneficio de la vacunación temprana por medio de varios modos de acción, los cuales incluyen la estimulación de la inmunidad innata tan temprano como 12 horas después del nacimiento y los efectos de exclusión competitiva. Sin embargo, todas las intervenciones deben trabajar de manera eficiente junto con las prácticas y operaciones de cría actuales para que sean prácticas y económicas. Se discutirá información relativa a las ventajas e inquietudes acerca de la vacunación al día de edad en la incubadora con vacunas de *Salmonella*, las prácticas de incubación en la aplicación de una vacuna viva de *Salmonella* y el uso concomitante de vacunas vivas de *Salmonella* y productos para la salud de las aves.

SUMMARY

Good hatchery management and vaccination of layers and breeders are the bases of a *Salmonella* prevention and control program. Vaccination of poultry in the hatchery has been widely used as an early intervention to reduce infection by salmonellae when chicks are most susceptible. Many studies have shown the benefit of early vaccination by several modes of action including stimulation of innate immunity as early as 12 hours after hatch and competitive exclusion effects. However, all interventions must work efficiently with current hatchery practices and operations to be practical and economical. Information regarding advantages and concerns for day of age hatchery spray vaccination with *Salmonella* vaccines, hatchery practices in the application of a live *Salmonella* vaccine and concurrent use of live *Salmonella* vaccines and products for poultry health will be discussed.

Hatchlings are highly susceptible to *Salmonella* with infection by a few organisms resulting in rapid colonization of the intestinal tract (7). Infection of young birds results in heavier shedding of salmonellae and a longer duration than occurs in older birds. Resistance to *Salmonella* infection increases with age with older birds requiring a higher level of salmonellae to become infected (6). It is for these reasons that early vaccination of poultry, preferably at day of hatch, should be used as a critical intervention to reduce infection by salmonellae when chicks are most susceptible. Passive immunity to progeny chicks has been exploited as an intervention to break the chain of infection vertically against salmonellae by vaccinating breeders with a combination of both live and killed *Salmonella* vaccines (3,5,7).

Live *Salmonella* vaccines are strains of pathogenic bacteria that are weakened and, thus, no longer pathogenic. Vaccination with live vaccines is designed to stimulate maximal immunity and provide a first-line of defense that directly increases the level of resistance to *Salmonella* infection in the bird. The mechanism of resistance can be two-fold; one provided by the physical presence of the live vaccine organisms causing an exclusionary effect in the gut preventing colonization by other salmonellae, and the other provided by early activation of cell-mediated immune responses that serve to block pathogens at the gut's "portal of entry." Pathogen pattern recognition receptors play an important role with toll-like receptors in stimulating early immune responses (8,11). Van Immerseel et al (13) showed early vaccination of chicks with a live *Salmonella* vaccine stimulated innate immunity as early as 12 h after hatch. As a result of the combination of a competitive exclusion effect and early onset of

immunity, a reduction of *Salmonella* in intestinal colonization leads to reduced fecal shedding into the environment (2,9,10,12).

Vaccination with a live *Salmonella* vaccine at one d of age is the best opportunity for earliest colonization by the vaccine when done at the hatchery or at placement. Live vaccine organisms initially colonize the gut lining and prevent colonization by other *Salmonella* sp. Live *Salmonella* vaccines can be applied en masse using spray application either in a hatchery spray cabinet or with a backpack portable sprayer. Use of a food-grade dye in the vaccine water helps to visualize the spray pattern for full coverage of birds to ensure uniform administration of the vaccine. Water stabilizer products are commercially available that neutralize iron and chlorine, and contain dye that aids in spray or drinking water application of live vaccines. Bright lights provide an effective stimulus to encourage active preening and uptake of the vaccine.

Vaccination of breeders and good hatchery management is a critical component of a *Salmonella* prevention and control program. However, vaccination practices and resulting inherent immunity must work efficiently with current hatchery and medication practices to be practical and economical. Compatibility with other products used during the hatching of poultry to support the health of birds must be considered. Water stabilizers are often used in vaccine mixing water and in drinking water. Vaccines, such as those used to protect against Newcastle disease virus, infectious bronchitis virus, Marek's disease virus and coccidiosis, are administered either in ovo or soon after hatch. Antibiotics, such as gentamicin, are provided either in ovo or soon after hatch, for the prevention of early mortality associated with colibacillosis and paratyphoid bacteria. Concurrent use of live *Salmonella* vaccines and these types of products should be investigated for their interference effects or compatibility with live *Salmonella* vaccines prior to administration to birds in the hatchery or at placement in the house.

Vaccination with live *Salmonella* vaccines has been shown to be useful in reducing infections in poultry; however, there are limitations with their use. Live *Salmonella* vaccines have the capability of protecting against serogroups B and D, but cross protection against serogroups C and E is moderate (1,4). Combining a vaccination program with killed vaccines to target specific serotypes is needed for optimal protection against other serogroups, with live vaccines inducing mucosal and cellular immunity and killed vaccines providing long-lived systemic or humoral immunity. Including a live *Salmonella* vaccine in a primary breeder or layer prevention program should not interfere with bacteriological or serological monitoring programs. Live vaccines should be easily recognized and differentiated from wild-type salmonellae either biochemically or serologically. Live bacterial vaccines are susceptible to antimicrobial agents commonly used in poultry production and this can reduce or even eliminate their efficacy if antimicrobials are unintentionally left activated in vaccine water before spray or drinking water administration. Vaccination is not 100% effective; immune-compromised birds may become carriers and can persistently shed the vaccine or wild-type organisms. Additionally, a heavy burden of salmonellae in the environment can overcome the protective effects of vaccination.

A range of interventions should be implemented in addition to vaccination to control salmonellae in young poultry including biosecurity, pest and rodent control, judicious use of antibiotics and competitive exclusion with probiotics. These interventions, if practiced and monitored vigilantly, will effectively reduce the incidence and prevalence of salmonellae infections of poultry. Poultry are an important reservoir for *Salmonella* and shed and spread are the modus operandi for horizontal transmission of infection to flockmates through contact and environmental contamination. Use of a live *Salmonella* vaccine to prevent colonization of the gut early by wild-type salmonellae and to reduce shedding of the organisms will effectively control spread and the prevalence of salmonellae in poultry.

REFERENCES

1. Bailey, J. S., A. Rolon, C. L. Hofacre, P. S. Holt, J. L. Wilson, D. E. Cosby, L. J. Richardson, and N. A. Cox. Resistance to challenge of breeders and their progeny with and without competitive exclusion treatment to *Salmonella* vaccination programs in broiler breeders. *Int. J. Poult. Sci.* 6:386-392. 2007.
2. Berchieri, A. Jr., and P. A. Barrow. Further studies on the inhibition of colonization of the chicken alimentary tract with *Salmonella* Typhimurium by pre-colonization with an avirulent mutant strain. *Epidemiol. Infect.* 104(3): 427-441. 1990.
3. Dorea, F., D. J. Cole, C. Hofacre, K. Zamperini, D. Mathis, M. P. Doyle, M. D. Lee, and J. J. Maurer. Effect of *Salmonella* vaccination of chicken breeders on reducing carcass contamination of broiler chickens in integrated poultry operations. *Appl. Environ. Microbiol.* 76:7820-7825. 2010.
4. Hassan, J. O., and R. Curtiss III. Development and evaluation of oral vaccination program using live avirulent *Salmonella typhimurium* to protect vaccinated chickens against challenge with homologous and heterologous *Salmonella* serotypes. *Infect. Immun.* 62:5519-5527. 1994.

5. Hassan, J. O., and R. Curtiss III. Effect of vaccination of hens with an avirulent strain of *Salmonella typhimurium* on immunity of progeny challenged with wild-type *Salmonella* strains. *Infect. Immun.* 64:938-944. 1996.
6. Holt, P. S. Effect of induced molting on the susceptibility of white leghorn hens to a *Salmonella enteritidis* infection. *Avian Dis.* 37:412-417. 1993.
7. Inoue, A. Y., J. B. Paiva, E. V. Sterzo, A. Berchieri, Jr., and A. Bernardino. Passive immunity of progeny from broiler breeders vaccinated with oil-emulsion bacterin against *Salmonella* Enteritidis. *Avian Dis.* 52(4):567-571. 2008.
8. Keestra, A. M., M. R. de Zoete, R. A. van Aubel, and J. P. van Putten. Functional characterization of chicken TLR5 reveals species-specific recognition of flagellin. *Mol. Immunol.* 45:1298-1307. 2008.
9. McReynolds, J. L., R. W. Moore, A. P. McElroy, B. M. Hargis, and D. J. Caldwell. Evaluation of a competitive exclusion culture and Megan Vac1 on *Salmonella typhimurium* colonization in neonatal broiler chickens. *J Applied Poult. Res.* 16: 456-463. 2007.
10. Methner, U., A. Berndt, and G. Steinbach. Combination of competitive exclusion and immunization using an attenuated live *Salmonella* vaccine strain in chickens. *Avian Dis.* 45:631-638. 2001.
11. Ruan, W. K., Y. H. Wu, J. An, and S. J. Zheng. Polymorphisms of chicken Toll-like receptors 4, 15, and 21 in different breeds. *Poult. Sci.* 91:2512-2516. 2012.
12. Tellez, G., L. R. Bielke, and B. M. Hargis. *Alternative Strategies for Salmonella Control in Poultry, Salmonella - A Dangerous Foodborne Pathogen*, S. M. Mahmoud (Ed.), ISBN: 978-953-307-782-6, InTech. 2012.
13. Van Immerseel F., U. Methner, I. Rychlik, B. Nagy, P. Velge, G. Martin, N. Foster, R. Ducatelle, and P. A. Barrow. Vaccination and early protection against non host-specific *Salmonella* serotypes in poultry; exploitation of innate immunity and microbial activity. *Epidem. Infect.* 133(6):959-978. 2005.
14. Zhang-Barber, L., A. K. Turner, G. Martin, G. Frankel, G. Dougan, P. A. Barrow. Influence of genes encoding proton-translocating enzymes on suppression of *Salmonella typhimurium* growth and colonization. *J. Bacteriol.* 179:7186-7190. 1997.

CONTROL DE BROTES DE VIRUELA AVIAR EN PARVADAS DE AVES LIGERAS

REPORT OF CONTROL OF SMALL POX OUTBREAKS IN BREEDING FLOCKS

J. César, A. Camacho, E. Priante, M. Gutiérrez, D. Mizrahi, y B. Dubernard

Laboratorio Avi-Mex, S.A. de C.V., José I. Bartolache 1862 Piso 1,
Col. del Valle, C.P. 03100, México, D.F. México

SUMMARY

In several flocks of a breeding farm, typical signs of small pox (dry pox) were observed. Clinical signs were presented several times in different flocks during a time-span of four years, in hens between 12 and 16 wk old was causing delays in body weight and laying onset. Virological diagnosis confirmed the presence of the small pox virus. Despite having a complete vaccination schedule with five boosters, clinical signs were persistent. An auto-vaccine was elaborated from the isolates taken in order to substitute the commercial vaccine used. The vaccination schedule was also modified. Better results were observed. A year after the changes, clinical signs of small pox stopped and the productive performance was back to normal.

INTRODUCCIÓN

La viruela aviar (VA) es una enfermedad viral de las aves producida por un poxvirus (genero *Avipoxvirus*), cuya presentación clínica cutánea ó seca, se caracteriza por la aparición de lesiones proliferativas sobre la piel de la cresta, barbillas y otras áreas sin pluma. El virus causal de la VA tiende a persistir en el medio ambiente durante largos periodos y su control se basa fundamentalmente en medidas de bioseguridad (control de mosquitos) y la vacunación, existiendo en el mercado gran variedad de vacunas comerciales simples o combinadas. El presente reporte describe la manera como se llevó a cabo el control de brotes recurrentes de VA en una granja de aves ligeras mediante el uso de una vacuna autógena o autovacuna (AV), donde históricamente se presentaban brotes de VA seca, pese a las vacunas y programas de vacunación empleados.

MATERIALES Y MÉTODOS

El presente estudio se llevó a cabo en una granja de aves ligeras que presentaba brotes de VA seca de manera recurrente, en cualquier mes del año, principalmente en la época de mayor precipitación pluvial. Con la finalidad de evaluar la inocuidad y eficacia de una vacuna experimental autógena (AV) elaborada a partir de un aislamiento de gallinas que sufrieron brote de la enfermedad pese a estar debidamente vacunadas, se llevó a cabo el siguiente diseño experimental:

Prueba 1. Tres grupos de 100 aves sanas entre 5 y 15 semanas de edad sin lesiones de VA, fueron inmunizados con la AV con un título viral de $10^{4.2}$ DIEP₅₀/mL por punción en el pliegue del ala a razón de 0.01 mL/ave (Tabla 1). Los grupos tenían distinta edad al momento de la vacunación, así como diferente estatus inmunológico respecto a VA, ya que se emplearon en ellos hasta cinco marcas de vacunas comerciales diferentes para su inmunización, con títulos virales de $10^{4.5}$ a $10^{4.7}$ DIEP₅₀/mL. Con fines comparativos, para cada grupo vacunado con la AV se dejó un grupo control conformado por 100 aves, vacunadas con las vacunas comerciales tradicionalmente empleadas en la explotación. De 3 a 10 días después de la aplicación de la AV, las 100 aves vacunadas de cada grupo fueron revisadas para comprobar la evidencia de reacción inflamatoria delimitada en el sitio de aplicación que indicara una vacunación adecuada, así como la ausencia de efectos adversos atribuibles a la vacuna. Las aves en prueba fueron observadas diariamente hasta que las aves de los grupos control presentaran lesiones típicas de viruela aviar y hasta los 90 días post-vacunación (PV).

Después de 10 días de la aplicación de la AV, las 100 aves revisadas por grupo presentaron reacción inflamatoria en el sitio de aplicación, indicio de una adecuada vacunación. No se apreció ningún tipo de reacción adversa atribuible a la vacuna en ninguno de los grupos. En la Tabla 2 se muestra la incidencia de lesiones típicas de VA (porcentaje) en los grupos de aves vacunadas, así como de su respectivo grupo control.

Prueba 2. La AV fue aplicada a un total de 130,000 aves en crianza, bajo un nuevo programa de vacunación contra VA que constaba de 2 dosis de vacuna: al día de edad una vacuna comercial de VA + Marek aplicando en incubadora por vía subcutánea 0.2 mL/ave, y a la semana 7 de edad, la AV con un título de $10^{4.2}$ DIEP₅₀/mL, aplicada por punción en el pliegue del ala.

De 3 a 10 días posteriores a la aplicación de la AV, 100 aves vacunadas fueron seleccionadas al azar y revisadas para comprobar que la vacunación se hubiese realizado de forma adecuada, así como para verificar la ausencia de efectos adversos atribuibles a la vacuna. Se dejó un grupo de 100 aves sin vacunar con la AV (control), y todas las aves fueron observadas diariamente hasta que las aves del grupo control presentaran lesiones típicas de VA y hasta los 90 días PV.

Después de 10 días de la vacunación con la AV, las 100 aves revisadas al azar presentaron reacción inflamatoria en el sitio de aplicación, indicio de una adecuada vacunación. Después de los 90 días establecidos como periodo de observación, ningún ave inmunizada con AV mostró lesiones de viruela, a diferencia del grupo control en donde el 96% de las aves presentó lesiones de VA de moderadas a severas.

DISCUSIÓN

La recurrencia de los brotes de VA en la granja donde se llevó a cabo el presente estudio puso en evidencia la persistencia del virus causal en el medio ambiente y la ineficacia de las vacunas comerciales empleadas en esta explotación para su prevención y control, ya que a pesar de que se habían intensificado las medidas de bioseguridad y la aplicación de múltiples vacunas de viruela aviar comerciales (hasta cinco), los cuadros clínicos de VA seca continuaron presentes, por lo que se optó por utilizar el virus de campo aislado en uno de los brotes a partir de muestras de piel y crestas con lesiones en diferentes estadios, incluyendo costras, para la elaboración de una AV. Desde la primera prueba a pequeña escala realizada dentro de la granja, los resultados fueron satisfactorios. Los brotes cesaron tan pronto la vacuna autógena fue utilizada como pilar del programa de vacunación contra VA conteniendo un título viral de $10^{4.2}$ DIEP₅₀/mL. El programa de vacunación también fue modificado, reduciendo el número de aplicaciones durante la crianza a solo dos: la primera como vacuna comercial aplicada en la incubadora por la vía subcutánea junto con la vacuna de Marek, y la segunda como autovacuna aplicada por punción en el pliegue del ala a las 7 semanas de edad. A partir de entonces han pasado 12 parvadas completas sin que se haya presentado un nuevo brote de VA.

CONCLUSIONES Y SUGERENCIAS

De acuerdo con los resultados obtenidos en las pruebas realizadas, se considera que la aplicación de la vacuna autógena de VA de gallina por punción en el pliegue del ala con un título de $10^{4.2}$ DIEP₅₀/mL, es inocua y que es capaz de conferir protección a las aves contra la infección de campo ocasionada por el virus homólogo de VA, que durante años ocasionó la aparición de brotes en la granja. Se sugiere continuar investigando la eficacia de las vacunas comerciales empleadas en esta empresa, y la pertinencia de rediseñar las mismas para una mejor prevención de la viruela aviar en el área.

REFERENCIAS

1. Organización Mundial de Sanidad Animal. Viruela Aviar. Manual de las pruebas de diagnóstico y de las vacunas para los animales terrestres (mamíferos, aves y abejas). Office International des Epizooties. pp: 580-587. 2013.
2. Tripathy, D. N., and W. M. Reed. Pox. In: Diseases of Poultry, 12th ed. Saif, Y. M., A. M. Fadly, J. R. Glisson, L. R. McDougald, L. K. Nolan, and D. E. Swayne, ed. Blackwell Publishing, Ames, Iowa, USA. pp 291-307. 2008.
3. Tripathy, D. N. and W. M. Reed. Pox. In: A Laboratory Manual for the Isolation and Identification of Avian Pathogens, 4th ed. Swayne, D. E., J. R. Glisson, M. K. Jackwood, J. E. Pearson, and W. M. Reed, ed. The American Association of Avian Pathologists, Pennsylvania, USA. pp 137-140. 1998.

Tabla 1. Edad de las aves y vacunaciones previas contra VA.

Grupo	No. aves	Vacunas comerciales previas contra VA (edad a la aplicación)	Edad al recibir la AV
1	100	1 día; 3 semanas	5 semanas
2	100	1 día; 3, 5 y 8 semanas	10 semanas
3	100	1 día; 3, 5, 8 y 12 semanas	15 semanas

Tabla 2. Porcentaje de aves con lesiones de VA por grado y total.

Grupo	Edad al recibir la AV	Aves con lesiones de VA			
		Leve	Moderada	Severa	Total
1	5 semanas	1%	0%	0%	1%
Ctl-1	NA	45%	23%	27%	95%
2	10 semanas	2%	0%	0%	2%
Ctl-2	NA	35%	40%	23%	98%
3	15 semanas	2%	0%	0%	2%
Ctl-3	NA	37%	30%	30%	97%

NA= no aplica por no haberse vacunado

INDUSTRIAL PRODUCTION OF VACCINE H7N3 IN MEXICO

PRODUCCION INDUSTRIAL DE VACUNA IA H7N3 EN MEXICO

M. Arreguin-Nava, H. Flores y J. Delgadillo

DGSA SENASICA-SAGARPA

RESUMEN

Durante el brote de HPAI en México en 2012-2013, se tomaron dos decisiones principales: depoblar todas las granjas afectadas y vacunar todas las granjas avícolas dentro del área perifocal. Dado que no se tenía disponibilidad de la vacuna contra la influenza aviar H7N3 a nivel mundial, México produjo su propia vacuna. Se tenían dos opciones para el virus maestro: un virus de referencia de Canadá (LPAI H7N3) o un LPAI H7N3 aislado de un pato en Lerma, México en 2006. Después de probar ambos virus, se decidió utilizar el A/pato/2817/2006/H7N3 como el virus maestro. La vacuna se produjo de acuerdo a las regulaciones mexicanas como una vacuna emulsificada inactiva de agua en una base oleosa. La producción industrial de la vacuna se llevó a cabo en tres laboratorios comerciales seleccionados como apoyo para el Productor Nacional de Biológicos Veterinarios. La producción y el uso de la vacuna son controlados por los Servicios Veterinarios Oficiales Mexicanos (SENASICA).

SUMMARY

During the 2012-2013 outbreak of HPAI in Mexico, two main decisions were taken: to depopulate all affected farms, and vaccinate all the poultry farms within the perifocal area. Since there was no availability of H7N3 avian influenza vaccine worldwide, Mexico produced its own vaccine. There were two choices of master seed virus: a reference virus from Canada (LPAI H7N3) or a LPAI H7N3 isolated from a duck in Lerma México in 2006. After testing both viruses, it was decided to use the A/duck/2817/2006/H7N3 as the master seed virus. The vaccine was produced according to Mexican regulations as an inactivated and emulsified, water in oil based vaccine. The industrial production of the vaccine was manufactured by three selected commercial laboratories as support to the National Veterinary Biologics Producer. The production and use of the vaccine is controlled by the Mexican Official Veterinary Services (SENASICA).

Background. During the 2012-2013 outbreak of HPAI in Mexico, two main decisions were taken: to depopulate all affected farms and vaccinate all the poultry farms within the perifocal area. Since there was no availability of H7N3 avian influenza vaccine worldwide, Mexico produced its own vaccine in record time of 30 d. The production and use of the vaccine is controlled by the Mexican Official Veterinary Services (SENASICA). To date, more than 600 million doses have been produced.

Pilot batch. There were two choices of master seed virus (MSV), a LPAI H7N3 reference virus from Canada or a LPAI H7N3 isolated from a duck in Lerma, México, during active epidemiology surveillance in 2006. After testing both viruses, it was decided to use the A/duck/2817/2006/H7N3 as the MSV. Three concentrations (12%, 16% and 20%) were prepared as pilot batch for the vaccine from the MSV. The results were satisfactory for the 20% concentration vaccine at two and three weeks post-vaccination: 90% protection in vaccinated animals against HPAI field virus and 90% mortality in challenged controls.

The industrial production of the vaccine was manufactured by three selected commercial laboratories as support to the National Veterinary Biologics Producer (PRONABIVE).

Production parameters. 0.3 mL of WSV dilution was inoculated in 9-11 d old chicken embryos, incubated for 48 h. Mortality at 24 h post inoculation was measured, average of all batches were 9.3%. Harvest of allantoic fluid was done in sterile conditions. The average yield in 12 m production was 10.31 mL/ harvest embryo. Titration of allantoic fluid was established not to be less than $10^{9.0}$ DIEP50%/mL. The geometric mean of the batches produced during 12 m was $10^{9.8}$ DIEP50%/mL. BEI solution was used for inactivation, ensuring complete inactivation by embryo testing. Sterility test was carried out for all antigen batches.

The vaccine was produced according to Mexican regulations as an Inactivated and Emulsified, water in oil based vaccine. Formulation of emulsion was done in accordance with official protocols, 20% of antigen in total emulsion; blending, filling and labeling process was done under official supervision. All batches were satisfactory for sterility, potency and safety tests.

The Animal Health General Direction of SENASICA kept and analyzed all batch records in order to ensure a standardized production of H7N3 vaccines.

REGULACIÓN DE LA PRODUCCIÓN DE BIOPELÍCULA EN *SALMONELLA ENTERICA* SEROVARIEDADES ENTERITIDIS Y TYPHIMURIUM

REGULATION OF BIOFILM PRODUCTION IN *SALMONELLA ENTERICA* SEROVARS ENTERITIDIS AND TYPHIMURIUM

M. Aya Castañeda^A, S. Sarnacki^A, A. Guerra^A, M. Llana^A y M. Cerquetti^A

^AIMPaM-Instituto de Microbiología y Parasitología Médica. CONICET-Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas. Facultad de Medicina. Universidad de Buenos Aires

Correspondencia: MsC. María Del Rosario Aya, rosaritoaya@gmail.com

Paraguay 2155 piso 12. Ciudad Autónoma de Buenos Aires. Argentina. CP1121ABG

SUMMARY

Salmonella Enteritidis and Typhimurium are currently the most common serovars in human salmonellosis. The outbreaks are associated with consumption of different produce, but poultry products are the most frequently involved. At the present, it is known that the ecological success of *S. enterica* to survive in different niches is due to the ability to form biofilms. Here, we studied the involvement of *dam* gene in biofilm production in *S. Enteritidis* and *S. Typhimurium* strains. The ability to generate biofilms in wild type and mutant strains was analyzed. Also, were determined the expression of curli and cellulose and the expression of *csgA* and *csgD* genes by qPCR, in different culture conditions. Our results suggest that changes in gene expression required for biofilm production are finely regulated with the participation of *dam* gene. This study contributes to the understanding of the regulation of biofilm formation in *Salmonella* spp. as well as to the design of new strategies to prevent food contamination and humans and animals infections.

RESUMEN

Actualmente *Salmonella* Enteritidis y Typhimurium representan las serovariedades con mayor prevalencia e incidencia en las salmonelosis humanas. Los brotes involucran el consumo de diversos alimentos, pero los productos de origen avícola son los más frecuentemente implicados. El éxito ecológico de *S. enterica* para sobrevivir en diferentes nichos radica en su capacidad de formar biopelículas. En este trabajo estudiamos la participación del gen *dam* en la producción de biopelículas en cepas de *S. Enteritidis* y *S. Typhimurium*. Para esto, se estudió la capacidad de generar biopelículas, la expresión de *curli* y celulosa y se determinó el nivel de expresión de los genes *csgD* y *csgA* mediante qPCR, en cepas salvajes y mutantes en diferentes condiciones de cultivo. Nuestros resultados, sugieren que cambios en la expresión génica, necesarios para la producción de biopelículas, se regulan de manera fina con la participación del gen *dam*. Este trabajo contribuye al conocimiento de la regulación de la formación de biopelículas en *Salmonella* spp y al diseño de nuevas estrategias de prevención de contaminación de alimentos y de infecciones en animales y humanos.

INTRODUCCIÓN

Las serovariedades Enteritidis y Typhimurium de *Salmonella enterica* son agentes etiológicos de infecciones entéricas en humanos a nivel mundial. Parte del ciclo de vida de *Salmonella* spp. incluye la supervivencia en el medio ambiente, para luego ingresar al hospedador. Actualmente, se reconoce que parte del éxito ecológico de *S. enterica* para sobrevivir en gran variedad de condiciones ambientales radica en su capacidad de producir biopelículas (2,7).

Estas dos serovariedades de *S. enterica* se han reportado como contaminantes de productos avícolas (principalmente huevos) en el mundo entero. En la industria de producción avícola y alimentaria, las biopelículas pueden crear una fuente persistente de contaminación del producto, dando lugar a graves problemas de higiene y a pérdidas económicas (6,10). Interesantemente, en la actualidad se implementan nuevas estrategias para el control de infección serovar-específicos. Esto se debe a que *S. Enteritidis* (SE) y *S. Typhimurium* (ST), pueden encontrarse en diferentes nichos y su capacidad de colonización y permanencia aparentemente no es la misma (10). Conocer la regulación de la formación de estas comunidades bacterianas, en las distintas serovariedades, permitiría el diseño de nuevas estrategias de control.

Por otro lado, es ahora conocido que la regulación de diversos factores de virulencia bacterianos, incluyendo las biopelículas, están controlados por una intrincada red de genes en la que participan los denominados reguladores globales de genes, de éstos, el gen DNA adenina metilasa (*dam*) es uno de los exponentes (8). Previamente, cepas atenuadas mutantes *dam* de *Salmonella* spp. han sido propuestas como vacunas en aves y ganado, no obstante actualmente no se conoce con claridad el papel que desempeña este regulador global de genes en la producción de biopelículas.

En este estudio nos propusimos evaluar la participación de las metilaciones realizadas por Dam en la producción de biopelículas en SE y ST. Para ello realizamos caracterizaciones fenotípicas y determinamos la expresión relativa de dos genes; *csgD* principal regulador de la producción de biopelículas y *csgA* sub-unidad de la proteína más abundante de la matriz extracelular, *curli*. Previamente estos dos genes fueron descritos como determinantes para la producción de estas comunidades bacterianas (1,5).

MATERIALES Y MÉTODOS

Cepas. Se analizaron dos cepas salvajes de cada una de las serovariedades de *Salmonella*: SE 5694 y ST 14028 (cepas de colección); SE ArJEG y ST SIPE (provenientes de aislamientos clínicos). Mutantes carentes del gen *dam* (Δdam) fueron construidas a partir de las cepas salvajes mediante mutagénesis dirigida (3).

Formación de biopelícula. Se desarrolló un ensayo fenotípico para evaluar la habilidad de las cepas para formar biopelícula en la interfase aire-líquido (7) y se realizó el ensayo semi-cuantitativo de formación de biopelícula en placas de 96 pozos de policloruro de vinilo (PVC) (4). Los experimentos se realizaron en tres réplicas independientes.

Expresión de proteína *curli* y celulosa. Se analizó mediante el estudio del morfotipo de las colonias desarrolladas en agar conteniendo rojo congo y azul brillante de coomassie (1). La expresión relativa de la subunidad CsgA del *curli* también fue evaluada por PCR en tiempo real (qPCR).

Expresión relativa de genes *csgD* y *csgA*. ARN total se extrajo a partir de cultivos bacterianos en condiciones inductoras de biopelícula; caldo LB sin NaCl a 28°C, sin agitación durante 48 h. La extracción se realizó utilizando Trizol (Life Technologies Inc). La síntesis de cDNA a partir de ARN total y la qPCR se desarrolló y analizó como previamente se había estandarizado (9). Los cebadores usados se diseñaron de acuerdo con la información de las secuencias de ADN de SE str.P125109 y ST str.14028S de la base de datos del servidor BLAST (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov>), para los genes *ARNr16S*, *csgD* y *csgA*. Los resultados se expresaron como la media de tres experimentos independientes. Como control de inducción de biopelículas se realizó el mismo procedimiento en cultivos en estado de vida planctónica; agitación a 37°C durante 20 h en LB con NaCl.

Identificación de sitios potenciales de metilación por Dam. Los análisis *in silico* se desarrollaron con el software Vector NTI, para identificar sitios de metilación por la enzima Dam (GATC), en los operones *csgDEFG*, *csgBA* en los genes *bcsA* y *AdrA*. Los análisis se realizaron con las secuencias genómicas Refseq NC_011294 de SE y NC_016856.1 de S.T, disponibles en bases de datos del servidor BLAST.

RESULTADOS

La formación de biopelícula en la interfase aire-líquido se vio reducida o inhibida en las cepas carentes del gen *dam*, respecto de sus cepas parentales. Diferentes intensidades de formación de biopelículas fueron observadas en las cepas salvajes, siendo dicha capacidad mayor en las cepas provenientes de aislamientos clínicos respecto de las cepas de colección (Tabla 1, A). Similares resultados se obtuvieron mediante el ensayo semi-cuantitativo en placas de PVC, en donde las cepas Δdam mostraron una disminución de entre 50-60% de la capacidad de formar biopelícula comparada con su cepa parental. Nuevamente, las cepas provenientes de aislamientos clínicos mostraron mayor capacidad para formar biopelícula respecto de las cepas de colección (Tabla 1, B).

Los morfotipos observados en el agar rojo congo, evidenciaron que las cepas carentes del gen *dam* son deficientes en la producción de *curli* y celulosa. El morfotipo rojo, rugoso y seco (presencia de *curli* y celulosa) fue observado predominantemente en las cepas provenientes de aislamientos clínicos, entre tanto en las cepas de colección, aunque presentaban un morfotipo similar, el mismo era menos característico que el que exhibían las cepas clínicas. El morfotipo liso y blanco, que indica ausencia de *curli* y celulosa, fue observado claramente sólo en la cepa SE 5694 Δdam , las demás cepas Δdam disminuyeron en su rugosidad y perdieron parte del tono rojo, pero no se observó el fenotipo liso y blanco (Tabla 1, C).

Cuando se determinó mediante qPCR la expresión del gen central en la regulación de biopelícula, *csgD*, se evidenció una disminución de alrededor de 60% en las cepas Δdam . Las cepas provenientes de aislamientos clínicos expresaron 2 a 4 veces más el gen *csgD* en relación a las cepas de colección. La mutación del gen *dam* afectó la formación de biopelícula y la expresión de *csgD* incluso en cepas fuertemente formadoras de biopelícula, esto fue visto en SEArJEG Δdam en donde *csgD* se redujo a más de la mitad. Resultados similares

fueron observados para el gen *csgA*, en donde se observó una drástica disminución en todas las cepas mutantes evaluadas (Tabla 1, D).

Análisis bioinformáticos revelaron sitios potenciales de metilación por la enzima Dam en genes altamente relacionados con la producción de biopelículas. Se analizaron los operones *csgDEFG* y *csgBA* en los cuales se encontraron ocho y tres sitios GATC respectivamente, en la región codificante y 24 más en el contexto genético (tanto río arriba como río abajo de la ubicación de los operones). También se analizó la secuencia codificante de dos de los principales genes relacionados con la producción de celulosa, *bcsA* y *adrA*, en los cuales se encontraron 10 y 6 sitios respectivamente (Tabla 1, E).

CONCLUSIONES

Este estudio se constituye en la primera evidencia de la participación de la proteína Dam, en la regulación de la formación de biopelículas en *S. enterica*. Hasta lo estudiado aquí, la regulación parece ser común en las serovariedades Enteritidis y Typhimurium. El efecto se estaría generando posiblemente mediante regulación directa del gen *csgD* o su operón, lo cual tendría repercusión en la expresión de genes como *csgA* y otros genes relacionados con la producción de celulosa y biopelículas. Estos resultados contribuyen a la descripción de las vías de regulación en la producción de biopelículas, lo cual está directamente relacionado con la capacidad de virulencia, la expresión de factores de patogenicidad y la persistencia en diferentes nichos ecológicos de SE y ST. Las cepas atenuadas mutantes *dam* de *Salmonella*, propuestas como vacunas en modelos aviares y bovinos, con deficiente producción de biopelículas persistirían menor tiempo en el ambiente y serían más susceptibles al efecto de antibióticos y desinfectantes. Dam parece ser un nuevo foco de estudio para modelos de erradicación e ingeniería de biopelículas.

REFERENCIAS

1. Barnhart M y Chapman MR. Curli Biogenesis and Function. *Annu Rev Microbiol.* 60:131–147. 2006
2. Costerton JW, Stewart PS y Greenberg EP. Bacterial biofilms: a common cause of persistent infections. *Science* 284:1318-1322. 1999.
3. Datsenko KA y Wanner BL. One-step inactivation of chromosomal genes in *Escherichia coli* K-12 using PCR products. *Proc Natl Acad Sci U S A* 97: 6640–6645. 2000.
4. Genevaux P, Muller S y Bauda P. A rapid screening procedure to identify mini-Tn10 insertion mutants of *Escherichia coli* K-12 with altered adhesion properties. *FEMS Microbiol Lett.* Aug 15;142(1):27-30. 1996.
5. Gerstel U y Römling U. The *csgD* promoter, a control unit for biofilm formation in *Salmonella typhimurium*. *Res Microbiol.* Dec;154(10):659-67. 2003.
6. Kumar CG and Anand SK. Significance of microbial biofilms in food industry: a review. *Int J Food Microbiol.* Jun 30;42(1-2):9-27. 1998.
7. Latasa C y col. *Salmonella* biofilm development depends on the phosphorylation status of RcsB. *J Bacteriol.* Jul;194(14):3708-3722. 2012.
8. Low DA, Weyand NJ y Mahan MJ. Roles of DNA adenine methylation in regulating gene expression and virulence. *Infect Immun* 69: 7197–7204. 2001.
9. Sarnacki SH y col. Dam Methylation Participates in the Regulation of PmrA/PmrB and RcsC/RcsD/RcsB Two Component Regulatory Systems in *Salmonella enterica* Serovar Enteritidis. *PLoS ONE* 8(2): e56474. 2013.
10. Wales y Davies. A critical review of *Salmonella Typhimurium* infection in laying hens. *Avian Pathol.* 40:5, 429-436. 2011.

(El artículo completo será enviado a publicación en la revista *Food Microbiology*.)
(The full-length article will be published in *Food Microbiology*.)

Tabla 1. Resumen de resultados.

Cepas	A. Biopelícula interfase Aire- líquido (Escala 0-4)	B. Ensayo semi- cuantitativo placas PVC (%)	C. Morfotipo en rojo congo (presencia/ausencia)		D. Expresión relativa de genes (%)		E. Potenciales sitios de metilación por Dam (cantidad de sitios)			
			<i>curli</i>	celulosa	<i>csgD</i>	<i>csgA</i>	operón <i>csgDEFG</i>	operón <i>csgBA</i>	gen <i>bcsA</i>	gen <i>adrA</i>
S. Enteritidis										
5694	2	100	+	+	100	100	8	3	10	6
5694 Δdam	0	36	-	-	38	6				
ArJEG	4	154	++	++	475	290				
ArJEG Δdam	1	79	-	+/-	127	43				
S. Typhimurium										
14028	3	100	+	+	100	100	8	3	10	6
14028 Δdam	0	49	-	+/-	39	62				
SIpE	4	137	++	++	177	150				

Cepas. Se estudiaron 7 cepas: SE 5694 y ST 14028 cepas salvajes de colección; SE ArJEG y ST SIpE salvajes provenientes de aislamientos clínicos y sus respectivas mutantes carentes del gen *dam*. **A.** Se estableció una escala numérica de acuerdo con la intensidad de formación de la monocapa aire-líquido, siendo 0 no formación y 4 formación fuerte de biopelícula. **B.** Los valores se expresan como la relación entre la densidad óptica del desarrollo bacteriano medida antes de la coloración y la densidad óptica medida luego de la coloración con cristal violeta (biopelícula). Se normalizó a la cepa salvaje de colección a la cual se le asignó un valor de 100%. **C.** Se indica la presencia (+ ó ++ en caso de morfolo tipo muy marcado) o ausencia (-) de *curli* y celulosa de acuerdo con los morfotipos visualizados en agar rojo congo. Cuando el morfolo tipo no es totalmente característico se indica +/- . **D.** La expresión relativa del gen se informa en porcentaje normalizado a la cepa salvaje de colección, a la cual se le asignó un valor de 100%. **E.** Se indica el número de secuencias GATC (sitio blanco de metilación por Dam), en la secuencia codificante de los operones y genes estudiados.

EFFECTO DE UN PROBIÓTICO Y UN COMPLEJO ENZIMÁTICO EN LAS VARIABLES PRODUCTIVAS, VELLASIDADES INTESTINALES Y CONTEOS DE COLIFORMES EN ÍLEON DE POLLOS DE ENGORDA ALIMENTADOS CON DIETAS SORGO – SOYA

EFFECT OF A PROBIOTIC AND ENZYME COMPLEX IN PRODUCTION VARIABLES, VILLI AND COLIFORM COUNTS IN ILEUM OF BROILERS FED SORGHUM – SOYBEAN DIETS

B. Bautista^A, A. López^B, V. Gómez^C, G. Del Río^D, C. Rosario^C y G. Ávila^A

^ACentro de Enseñanza, Investigación y Extensión en Producción Avícola, UNAM, C.P. 13300, Ciudad de México

^BDupont Animal Nutrition, C.P. 02300, Ciudad de México

^CDepartamento de Medicina y Zootecnia de Aves, UNAM, Ciudad Universitaria C.P. 04510, Ciudad de México

^DFacultad de Estudios Superiores Cuautitlán, UNAM San Sebastián Xhala C.P. 54714

Dirección de contacto: zacnitec1@hotmail.com

SUMMARY

The purpose of this study was to evaluate the effect of a probiotic (*Bacillus subtilis*) and an enzymatic complex (xylanase, protease and amylase) in the productive performance, villi and total coliform in ileum. The following experiment was planned. 780 chicks were distributed in a completely randomized design with 2x3 factorial arrangement (5 replicates / treatment, 26 birds / replicate). The factors were two sorghum – soy based diets and the addition or not of the enzyme complex and probiotic. Performance parameters were evaluated weekly. Samples were taken from the descending duodenal loop and the villi length, and lamina propria and mucosa thickness and crypt size were measured. Total coliforms ileal content were quantified. Under handling conditions used, improvements in weight gain and body weight as well as reduced total coliforms in the ileum with the inclusion of probiotic and enzymes in diets for broilers were observed.

RESUMEN

Se realizó un estudio con 780 pollos de engorda distribuidos en un diseño completamente al azar, con un arreglo factorial 2x3; los factores fueron las dietas y la adición o no del probiótico y probiótico+enzimas. Las variables productivas se evaluaron semanalmente. Se tomaron muestras de duodeno y se realizó el conteo de coliformes totales en íleon. Se observó mayor ($p<0.05$) peso corporal, ganancia de peso, índice de conversión y rendimiento en canal en los animales que consumieron la dieta basal positiva; se observó mayor ($p<0.05$) peso corporal y ganancia de peso en los pollos de los tratamientos suplementados con los aditivos. Se observó diferencia estadística ($p<0.05$) en el análisis histológico, con efectos positivos en los pollos que consumieron la dieta basal positiva y en los suplementados con probióticos y probióticos+ enzimas. Se observaron menores ($p<0.05$) conteos de coliformes totales en los pollos que consumieron la dieta basal negativa y aditivos.

INTRODUCCIÓN

El rendimiento productivo de los animales depende de la digestibilidad de los nutrientes contenidos en los alimentos, así como del grado de absorción y utilización de los mismos, por lo que es necesario incrementar el aprovechamiento de los nutrientes por el animal con el propósito de maximizar dicho rendimiento. El objetivo del presente estudio, fue examinar la respuesta de los pollos de engorda alimentados con dietas en base a sorgo – soya y suplementados con un complejo enzimático y un probiótico, en el comportamiento productivo, integridad intestinal y microbiota intestinal.

MATERIAL Y MÉTODOS

Se utilizaron dos dietas basales con sorgo – soya como ingredientes principales, ambas bajas en energía metabolizable. La dieta basal positiva fue una dieta tipo comercial con nutrientes que cubrieron las necesidades de las aves; la dieta basal negativa fue reducida en los nutrientes aportados por la matriz enzimática (-85 Kcal de EM y algunos aminoácidos esenciales). Se emplearon dos productos comerciales, un complejo enzimático basado en xilanasas, proteasas y amilasas y un producto probiótico basado en tres cepas de *Bacillus subtilis*. Se utilizaron 780 pollitos Ross 308 de un día de edad en un diseño completamente al azar, con un arreglo factorial 2x3. Los factores son las dietas (basal positiva y basal negativa) y la adición o no del complejo enzimático y probiótico. Se tuvieron 6 tratamientos, con 5 réplicas por tratamiento de 26 animales cada una. Los tratamientos fueron los siguientes:

- 1) basal positiva
- 2) como 1 + probiótico
- 3) como 2 + complejo enzimático
- 4) basal negativa
- 5) como 4 + probiótico
- 6) como 5 + enzimas

Los parámetros productivos se evaluaron semanalmente, al día 42 se determinó el rendimiento en canal. A los días 21 y 42 se tomaron muestras de dos cm del asa descendente de duodeno, las cuales se procesaron con técnicas histológicas de rutina; se midió la longitud de vellosidades, espesor de lámina propia, espesor de mucosa y tamaño de criptas. Al día 42 se tomaron muestras del contenido ileal, para realizar el conteo de coliformes totales. Las variables se analizaron conforme al modelo descrito y la comparación de medias por la prueba de Tukey, con una significancia del 0.05.

RESULTADOS

No se observó diferencia ($p>0.05$) estadística en las variables productivas al día 21; al día 42, en el factor dietas se encontró diferencia estadística ($p<0.05$), siendo la dieta testigo positivo donde se observó mayor peso corporal (2481^a vs 2603^b), ganancia de peso (2436^a vs 2559^b), índice de conversión (1.9^b vs 1.81^a) y rendimiento en canal (1975^a vs 2118^b). En el factor aditivos se encontró diferencia estadística ($p<0.05$) entre el tratamiento testigo respecto a los tratamientos probióticos y probióticos+ enzimas en las variables peso corporal (2508^a vs 2549^b, 2568^b) y ganancia de peso (2464^a vs 2505^b, 2524^b). En la revisión histológica de duodeno al día 21 se observó diferencia estadística ($p<0.05$) al factor dieta y aditivos. En la dieta testigo positivo se presentaron mayores valores en las variables longitud de vellosidad (2137.173^b vs 1998.757^a), espesor de mucosa (2382.897^b vs 2262.548^a) y tamaño de criptas (144.758^b vs 131.296^a); en el factor aditivos se observó mayor espesor de lámina propia en el tratamiento testigo (300.797^b vs 228.264^a, 2301.646^a). En el muestreo realizado al día 42 se observó diferencia estadística ($p<0.05$) en el factor dieta y aditivos. En el factor dieta, el espesor de lámina propia fue mayor en la dieta testigo negativo (298.954^a vs 331.161^b) y el tamaño de criptas fue mayor en la dieta testigo positivo (144.314^b vs 117.774^a). En el factor aditivos se encontró diferencia en el tamaño de criptas, siendo el tratamiento probióticos quien presentó mayor tamaño respecto al tratamiento testigo y probiótico+enzimas (143.758^b vs 126.389^a, 122.983^a). En el conteo de coliformes totales se encontró diferencia estadística ($p<0.05$) al factor dieta, siendo la dieta testigo positivo la que presentó conteos más altos de coliformes totales (6.1655^a vs 6.0594^b). Se observó diferencia estadística al factor aditivos ($p<0.05$), siendo los tratamientos suplementados con probióticos o probióticos + enzimas quienes presentaron menores conteos de coliformes totales (7.1444^b vs 6.2014^a, 5.9672^a).

DISCUSIÓN

En el factor dietas en los días 21 y 42 de edad, la diferencia observada en el peso corporal, ganancia de peso y rendimiento en canal entre los animales alimentados con las dietas basales positiva y negativa coincide con lo reportado por diversos autores, quienes reportaron mayores ganancias de peso conforme se aumentan los niveles de energía metabolizable en la dieta (1,2,3). En el factor aditivos, los resultados observados en el peso corporal y ganancia de peso al día 42 coinciden con lo señalado en trabajos anteriores, en donde encontraron que los pollos de engorda que fueron suplementados con esporas de *Bacillus subtilis* en la dieta presentaron mejor desempeño productivo comparado con los tratamientos testigo (4,5,6). Recientemente se publicó un trabajo del efecto complementario entre el uso de *Bacillus subtilis* como probiótico y complejos enzimáticos conteniendo amilasa, xilanasas y proteasa, que se vio reflejado en un mejor desempeño productivo en los pollos suplementados con ambos aditivos (7). En el factor aditivos, en duodeno al día 21 se observó menor espesor de lámina propia en los

tratamientos Probiótico y Probiótico+ enzimas, Algunos autores (8) mencionan que el adelgazamiento puede deberse a una disminución en el tejido conectivo, lo que puede conllevar un efecto benéfico al mejorar la absorción de nutrientes. Otros autores mencionan que la microbiota intestinal disminuye la absorción de nutrientes al incrementar el grosor del tracto intestinal (10,11). Tomando en cuenta que el tiempo de permanencia del quimo en el duodeno es corto, de aproximadamente 10 min, un menor espesor de lámina propia contribuye a una mayor absorción de nutrientes en duodeno (11). En el factor dietas, las diferencias observadas en los dos periodos de muestreo, coincide con diversos autores quienes señalan que la longitud de las vellosidades intestinales y la profundidad de las criptas intestinales depende de la cantidad de sustratos disponibles en el lumen intestinal (12,13). La reducción en el conteo de coliformes totales en los animales que consumieron la dieta basal negativa coincide con lo observado anteriormente en dietas suplementadas con xilanasas, donde las aves que fueron alimentadas con dietas reducidas en nutrientes presentaron bajos conteos de coliformes totales en íleon (14); lo observado en el factor aditivos concuerda con lo citado por diversos autores que han reportado una disminución en las ufc de coliformes y clostridium en contenido de íleon y ciegos con la inclusión de *Bacillus subtilis* a la dieta de pollos de engorda (4,5).

REFERENCIAS

1. Zorrilla F.F., Cuca G.M., Ávila G.E. Efecto de niveles de energía, lisina y proteína en dietas para pollos de engorda en iniciación. *Vet. Mex.* 24 (4): 311-316.1993.
2. Leeson S.L., Caston and Summers J.D. Broiler responses to diet energy. *Poult. Sci.* 75: 529-535.1996
3. Saleh E.A., Watkins S.E., Waldroup A.L. and Waldroup P.W. Effects of dietary nutrient density and energy feeding programs for growing large male broilers chickens. *Int. J. Poult. Sci.* 3 : 11-16.2004.
4. Teo A.Y., Tan H.M. Evaluation of the performance and intestinal gut microflora of broiler fed on corn-soy diets supplemented with *Bacillus subtilis* PB6 (CloSTAT). *J. Appl. Poult. Res.*16: 296-303.2007.
5. Sen S., Ingale S.L., Kim Y.W., Kim J.S., Kim K.H., Lohakare J.D., Kim E.K., Ryu M.H., Kwon I.K., Chae B.J. Effect of supplementation of *Bacillus subtilis* LS 1-2 to broiler diets on growth performance, nutrient retention, caecal microbiology and small intestinal morphology. *Res. Vet. Sci.* 93: 264-268.2012.
6. Walsh M.C., Romero L.F., Indrakumar S.E., Ravindran V. Influence Of Combinations Of A Direct-Fed Microbial And Exogenous Enzymes On The Growth Performance And Feed Efficiency Of Broilers. *Poult. Sci.* Poultry Science Association Annual Meeting, Metabolism And Nutrition: Feed Additives Ii. (Abstracts 169-179) Vol.92 (E- Suppl. 1).2013.
7. Romero L.F., Indrakumar S.E., And Ravindran V. Influence Of Combinations Of A Direct-Fed Microbial And Exogenous Enzymes On Nutrient Digestibility In Broilers At 11 And 21 Days Of Age. *Poult. Sci.* Poultry Science Association Annual Meeting, Metabolism And Nutrition: Feed Additives Ii. (Abstracts 169-179) Vol.92 (E- Suppl. 1).2013.
8. Dibner J.J., Kitchell M.L., Atwell C.A., Ivey F.J. The effect of dietary ingredients and age on the microscopic structure of the gastrointestinal tract in poultry. *J App Poult Res.* 5: 70-77.1996.
9. Ravindran V., Kornegay E.T., Webb K.E. Effects of fiber and virginamicyn on nutrient absorption, nutrient retention and rate of passage in growing swine. *J. Anim. Sci.* 59: 400-408.1984.
10. Apajalahti J., Kettunen A., Graham H. Characteristics of the gastrointestinal microbial communities, with special reference to the chicken. *World Poult. Sci. J.* 60: 223- 232.2004.
11. Denbow M. Chapter 12: Gastrointestinal anatomy and physiology: In Causey Whittow editor. *Sturkie's Avian Physiology* 5th edition, Academic Press 229-325.2000.
12. Shamoto K., Yamauchi K. Recovery responses of chick intestinal villus morphology to different refeeding procedures. *Poult. Sci.* 79: 718- 723.2000.
13. Yamauchi K. Review on chicken intestinal villus histological alterations related with intestinal function. *J Poult Sci* 39: 229-242.2002.
14. Nian F., Guo Y.M., Ru Y.J., Li F.D., Péron A. Effect of exogenous xylanase supplementation on the performance, net energy and gut microflora of broiler chickens fed wheat-based diets. *Asian-Aust. J. Anim. Sci.* 24(3): 400-406.2011.
15. Fritts C.A., Kersey J.H., Motl M.A., Kroger E.C., Yan F., Si J., Jiang Q., Campos M.M., Waldroup A.L., Waldroup P.W. *Bacillus subtilis* C-132 (calsporin) improves live performance and microbiological status of broiler chickens. *J App. Poult. Res.* 9: 149-155.2000.

EFFECTS OF DIAMOND V ORIGINAL XPC™ DURING *IN VITRO* AND *IN VIVO* CLOSTRIDIUM (NECROTIC ENTERITIS) CHALLENGES

EFFECTOS DE DIAMOND V ORIGINAL XPC EN DESAFÍOS *IN VITRO* E *IN VIVO* DE CLOSTRIDIUM (ENTERITIS NECRÓTICA)

J. Broomhead, V. Nsereko, E. Gingerich, and D. McIntyre

Diamond V, Cedar Rapids, Iowa, USA

RESUMEN

Se investigaron los efectos de XPC sobre el crecimiento de *Clostridium perfringens* (CP) en un modelo intestinal *in vitro* seguido de un desafío con enteritis necrótica (NE) en pollos de engorda. Para el estudio *in vitro* las excretas frescas de pollos de engorda (fuente de microbiota intestinal), con o sin adición de XPC, se desafiaron con CP y se incubaron durante 24 h. XPC aumentó la producción de ácidos grasos volátiles y redujo el pH y las concentraciones de CP ($P < 0,05$). A continuación, se llevó a cabo un desafío de pollos de engorda con NE, probando los efectos de la alimentación con XPC solo o combinado con la virginiamicina (VIR) o la bacitracina. Los pollos de engorda se desafiaron con CP en los d 19, 20, y 21 y luego se calificaron las lesiones de enteritis necrótica. Las calificaciones de las lesiones NE fueron menores y el rendimiento de los animales mejor en todos los grupos tratados en comparación ($P < 0,05$) a los controles desafiados. Se observaron beneficios acumulativos cuando se combinaron XPC y VIR. Los resultados sugieren que XPC puede cambiar la microbiota intestinal para suprimir el crecimiento de CP y lesiones de enteritis necrótica de manera preferente.

SUMMARY

The effects of XPC on *Clostridium perfringens* (CP) growth in an *in vitro* intestinal model followed by a necrotic enteritis (NE) broiler challenge were investigated. For the *in vitro* study, fresh broiler excreta (intestinal microbiota source), with or without XPC addition was challenged with CP and incubated for 24 h. XPC increased volatile fatty acid production and reduced pH and CP concentrations ($P < 0.05$). A broiler NE challenge was then conducted, testing the effects of feeding XPC alone or combined with virginiamycin (VIR) or bacitracin. Broilers were challenged with CP on d 19, 20, & 21 and then scored for NE lesions. NE lesion scores were lower and animal performance better in all treated groups compared ($P < 0.05$) to challenged controls. Additive benefits were observed when XPC and VIR were combined. Results suggest that XPC may shift the intestinal microbiota to preferentially suppress CP growth and NE lesions.

INTRODUCTION

In poultry, NE was first reported in 1961 in England. The pathogen responsible for this disease was reported to be *Clostridium perfringens* (CP), resulting in sudden death. The environment of a healthy gut does not typically support the growth of CP. However, when coccidial infections are present, the intestinal mucosa becomes damaged allowing establishment and proliferation of CP. The subclinical effects are less noticeable but will reduce growth and performance of the birds and cause increased condemnations at processing. Two antibiotic drugs commonly used to combat NE are virginiamycin & bacitracin. Feeding Original XPC has been shown to improve health and performance under several pathogen challenges in poultry, such as *Salmonella* (1) and coccidia (*E. maxima*; 2). With the benefits of Original XPC improving gut health and balancing the immunity, it was hypothesized that improvements should also be seen during a CP (necrotic enteritis) challenge induced by a mild coccidiosis challenge.

MATERIALS AND METHODS

***In vitro* assay.** The CP utilized was an avian strain isolated from a bird diagnosed with necrotic enteritis. Fresh excreta from six wk old broilers birds fed an organic diet (free from feed additive) was used as the source of intestinal microorganisms. Fresh excreta was combined with a mineral salts medium (6 g/L), homogenized and filtered; this filtrate was used as the fecal inoculum for the *in vitro* model. Under anaerobic conditions, 0.3 g of a predigested poultry diet (10 replicates) was combined with 30 mL of fecal inoculum and 0.15 g of treatments (XPC or control grain) in a Falcon tube. Tubes were then challenged with approximately 4.43 log cfu/mL of CP, final concentration. Tubes were incubated for 24 h at 39°C, after which the contents were analyzed for VFA by gas chromatography. For enumeration of CP, serial dilutions of the tube contents were plated onto a CP selective medium consisting of an agar base, and the selective supplement. Plates were incubated at 37°C, under strict anaerobic conditions (90% N₂; 5% H₂; 5% CO₂).

***In vivo* study.** Four hundred and forty eight d old male broiler chicks (Cobb x Cobb 500) were separated into seven treatment groups with eight replicate pens of eight chicks each. Birds were raised in brooder cages and provided dietary treatments from 1 – 28 d of age. Treatments include a negative control (NC) group, fed no additives and not challenged with CP, and six groups orally inoculated with a broth culture containing 10⁸ CFU/mL of CP on 19, 20, & 21 d of age. The challenged groups were fed either no additives (PC), 1.25 kg/tonne XPC (XPC), 22 g/tonne virginiamycin (VIR), both XPC and VIR (XPC+VIR), 55 g/tonne Bacitracin Methylene Disalicylate (BMD), or combination of both XPC and BMD (XPC+BMD). To initiate the NE challenge birds all treatment groups were orally inoculated at 14 d with ~5000 oocysts of *E. maxima*. Six h after final CP challenge on d 21, three birds/pen were euthanized and NE lesions scoring was conducted. All mortalities through 28 d were necropsied with NE mortalities recorded. Replicate pen body weight and feed consumption was monitored.

RESULTS

In vitro study results can be found in Table 1. Inclusion of XPC into the fecal inoculum reduced ($P < 0.05$) pH and increased ($P < 0.05$) acetate, propionate, butyrate and total VFA concentrations. Inclusion of XPC also suppressed growth of CP ($P < 0.05$) by 0.65 of a log.

In vivo study results can be observed in Table 2. A significant increase ($P < 0.05$) in NE lesions and NE mortalities and reduction ($P < 0.05$) in performance were observed in PC group compared to NC group. Mortality in the XPC, VIR or BMD groups plus the combinations were not significantly different from the non-challenged controls (NC). The addition of XPC, VIR, or BMD into the diets resulted in a significant reduction ($P < 0.05$) in NE lesions and improved ($P < 0.05$) body weight gain and feed conversion during the challenge. The combination of XPC with either antibiotic also resulted in a significant decrease ($P < 0.05$) in lesion scores and improvement ($P < 0.05$) in performance. Additive responses were observed in lesion reduction and performance improvement when combining XPC with VIR. XPC+VIR treatment resulted in similar ($P > 0.05$) lesion score and body weight gain as compared to NC. Additive benefits of reduced mortality and feed conversion were also apparent when XPC was added to the BMD diet.

IMPLICATIONS

Results of this study demonstrate that Original XPC, virginiamycin, or BMD are beneficial in reducing the necrotic enteritis stress caused by CP. Results also suggest that Original XPC can be used in addition to antibiotic programs, particularly during a high challenge, with the potential of an additive response in reducing necrotic enteritis stress. The *in vitro* research provides mode of action direction, in that Original XPC may possess qualities that can shift the intestinal microbial population (demonstrated by VFA increase) to preferentially suppress CP growth.

REFERENCES

1. Ibukic, M., D. Trampel, T. Frana, C. M. Logue, and J. Broomhead. Evaluation of Diamond V Original XPC for reducing cecal colonization by *Salmonella* Enteritidis in layer pullets. In: Proceedings of the 93rd Conference of Research Workers in Animal Diseases. Chicago, IL. 2012.
2. Lensing, M., J. D. Van der Klis, I. Yoon, and D. T. Moore. Efficacy of *Saccharomyces cerevisiae* on intestinal health and productivity of coccidian-challenged laying hens. *Poult. Sci.* 91:1590-1597. 2012.

Table 1. Effects of Original XPC on volatile fatty acid (VFA) and *Clostridium perfringens* (CP) concentrations in a broiler *in vitro* gut model.

Parameter	Control	XPC	MSE
pH	6.59 ^a	6.55 ^b	0.005
Acetate (mM)	22.7 ^b	27.2 ^a	0.37
Propionate (mM)	13.5 ^b	15.4 ^a	0.19
Butyrate (mM)	3.02 ^b	4.36 ^a	0.07
Total VFA (mM)	39.9 ^b	47.7 ^a	0.60
CP (log ₁₀ CFU/ml)	5.73 ^a	5.08 ^b	0.14

^{ab} Means in the same row with different superscripts differ at $P < 0.05$

MSE = Mean squared error

Table 2. Effects of feeding Original XPC, virginiamycin (VIR), bacitracin (BMD) or combinations on necrotic enteritis (NE) lesions, mortality and animal performance during a *Clostridium perfringens* challenge.

Treatment	Intestinal NE Lesion Score ¹ (21d)	NE Mortality, % (19-28d)	Weight Gain, g (14-21d)	Feed Conversion (14-21d)
NC	0 ^c	0 ^b	222 ^a	1.65 ^e
PC	1.13 ^a	21.9 ^a	144 ^c	3.02 ^a
XPC	0.58 ^b	9.4 ^{ab}	188 ^b	2.43 ^b
VIR	0.54 ^b	6.3 ^{ab}	195 ^b	2.16 ^{cd}
XPC+VIR	0.33 ^{bc}	6.3 ^{ab}	201 ^{ab}	1.98 ^d
BMD	0.42 ^{bc}	12.5 ^{ab}	186 ^b	2.28 ^{bc}
XPC+BMD	0.42 ^{bc}	6.3 ^{ab}	188 ^b	2.15 ^{cd}
MSE	0.10	3.6	6	0.06

^{a-e} Means in the same column with different superscripts differ at $P < 0.0001$

¹ Lesion score is on a scale of 0-3; 1 = slight mucus covering and loss of tone

MSE = Mean squared error; NC = not challenged; PC = challenged, no additive fed

INTERACCIÓN DE LAS ENZIMAS XILANASA, PROTEASA Y FITASA-SUPERDOSIS SOBRE LOS PARÁMETROS PRODUCTIVOS, RENDIMIENTO EN CANAL Y TIEMPO DE TRÁNSITO DE LA DIGESTA EN POLLOS DE ENGORDA

INTERACTION OF XYLANASE, PROTEASE AND SUPERDOSE PHYTASE ENZYMES ON PRODUCTIVE PERFORMANCE, CARCASS YIELD AND TRANSIT TIME OF THE INGESTION OF BROILER CHICKENS

Tedeschi-Dos Santos T^A, Massey O'Neill HV^A, López-Coello C^B, Rubio AJ^C y Camacho-Fernández D*^C

^AAB Vista Feed Ingredients, 3 Woodstock Court, Blenheim Road, Marlborough Busines Park, Marlborough Wilts, SN8 4AN, UK

^BDepartamento de Producción Animal-Aves, Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia, Universidad Nacional Autónoma de México, Ciudad de México, Distrito Federal, 13209

^CAB Vista Feed Ingredients, México

Autor para correspondencia: Daniel Camacho Fernández. Dirección: Maravatío 311 Col. Clavería. C. P. 02080 México, D. F., correo electrónico: Daniel.Camacho@abmauri.com.mx

SUMMARY

Two thousand eight hundred Ross 308 chickens one day old were assigned to one of eight diets with seven repetitions of 50 animals. The treatments were: T1: Control; T2: Xylanase; T3: Protease; T4: Phytase superdose; T5: Xylanase + Protease; T6: Xylanase + Superdose; T7: Protease + Superdose; T8: Xylanase + Protease + Superdose. Productive performance and carcass yield were registered at 42 d of age. Transit time of the ingestion was registered at four periods. Xylanase, protease or superdose inclusion alone had very little effect on animal performance, but improved carcass yield and weight. When two enzymes were included together, carcass yield and weight as well as performance were improved. The best results were obtained when phytase superdose + xylanase were included. The inclusion of the three enzymes alone only had benefits on performance and carcass yield, compared to the inclusion of superdose + xylanase.

RESUMEN

Con más frecuencia en la industria del pollo de engorda, el uso de enzimas va convirtiéndose en una estrategia en la producción, para disminuir los costos de producción o aminorar el efecto nocivo de los factores antinutricionales de los macroingredientes. Se asignaron 2,800 pollitos Ross 308 de un día de edad a ocho dietas con siete repeticiones con 50 animales. Los tratamientos fueron: T1: Control; T2: Xilanasa; T3: Proteasa; T4: Superdosis de Fitasa; T5: Xilanasa + Proteasa; T6: Xilanasa + Superdosis; T7: Proteasa + Superdosis y T8: Xilanasa + Proteasa + Superdosis. A los 42 días de edad se registraron los parámetros productivos y el rendimiento en canal, y en 4 períodos el tránsito de la digesta. La inclusión de Xilanasa, Proteasa ó Superdosis cada una por separado, tuvo poco efecto sobre el desempeño del animal, pero tendió a mejorar el rendimiento y el peso de la canal. Cuando se incluyeron dos enzimas juntas, mejoró el rendimiento de la canal, el peso y el desempeño; los mejores resultados se obtuvieron cuando se incluyó la Superdosis de Fitasa + Xilanasa. La inclusión de las tres enzimas no tuvo más beneficios en el desempeño y el rendimiento de la canal, en comparación con el uso de la Superdosis de Fitasa + Xilanasa.

INTRODUCCIÓN

Las enzimas comercialmente disponibles se han utilizado en la nutrición de monogástricos desde finales de los años ochenta del siglo pasado, siendo usadas rutinariamente en el presente. Las enzimas exógenas mejoran el valor nutricional del maíz y en consecuencia de las dietas basadas en maíz y harina de soya por varios mecanismos potenciales (3). La enzima más común utilizada en las dietas ha sido la fitasa, con el objetivo de hidrolizar el fitato,

incrementando la absorción de fósforo y reduciendo así el uso del costoso fósforo orgánico o inorgánico. El uso de superdosis de fitasa ha mostrado mejorar el desempeño de los animales al destruir más rápidamente el fitato, reduciendo pérdidas endógenas e incrementando la absorción del inositol mejorando el estatus antioxidante de las aves. Los polisacáridos no almidón (NSP) (por sus siglas en inglés) se destacan como uno de los factores anti-nutricionales. El maíz, que se añade a la alimentación como fuente principal de energía, sólo contiene el 1% de NSP solubles, especialmente arabinoxilanos, en comparación con 24, 45 y 46% del trigo, cebada y centeno, respectivamente (1). Sin embargo, aunque el maíz es un ingrediente fácil de digerir, hay evidencia que sugiere la presencia de almidón resistente a la digestión, lo que puede limitar el valor de la energía de maíz y en consecuencia de la energía de la dieta (2). Se sabe que las enzimas pueden hidrolizar polisacáridos que impiden la digestión de los granos de almidón y proteínas, haciendo que estos compuestos sean disponibles para la digestión por la acción de enzimas endógenas (4). La xilanasas ha sido utilizada con éxito en dietas con base trigo, que tienen un alto contenido de arabinoxilanos, siendo efectiva en reducir la viscosidad del quimo y la degradación de la pared celular. Recientemente otras enzimas han sido desarrolladas tales como las proteasas. El valor más aceptado de la inclusión de proteasas exógenas en dietas de aves, es sobre la mejora en la digestibilidad de la proteína de los ingredientes de la dieta. La falta de comprensión de que los efectos de las proteasas solas o en combinación, tienen lugar sobre la digestibilidad de los aminoácidos individuales, puede acentuar aún más, el desequilibrio del perfil de aminoácidos proporcionado a la dieta (5). Comercialmente más de una enzima puede ser utilizada, siendo controversial el hecho de que el uso de una primera enzima puede tener un impacto en la respuesta de la inclusión de una segunda y así sucesivamente. Aunque cada enzima tiene una actividad enfocada en un diferente sustrato, la respuesta de las enzimas no se ha visto que tengan un efecto aditivo. Massey O'Neill (datos en trámite de publicación) propone que la forma de evaluar el impacto de diferentes enzimas adicionadas en la misma dieta, es mediante un diseño factorial donde cada enzima sea incluida por separado o conjuntamente.

El objetivo de este estudio fue evaluar el efecto de la inclusión de enzimas: fitasa (superdosis), xilanasas y proteasa; así como la combinación de ellas, sobre los parámetros productivos, rendimiento en canal y tiempo de tránsito de la digesta en pollos de engorda, mantenidos en producción hasta los 42 días de edad.

MATERIAL Y MÉTODOS

Se utilizaron un total de 2,800 pollitos Ross 308 de un día de edad, para ocho dietas, con siete repeticiones en 56 lotes, con 50 animales cada uno. La dieta control incluía fitasa ("Quantum Blue 5G"[®]) a 500 FTU/kg. Se incluyeron xilanasas: "Econase XT25"[®] (EXT-16,000 BXU/kg), superdosis de "Quantum Blue 5G" (SD - 1000 FTU/kg adicionales) y proteasa (PRO-15,000 PROT/kg) por separado ó en combinación. Los tratamientos consistieron de un diseño factorial 2x2x2 con y sin la inclusión de xilanasas, proteasa y fitasa en el concepto de superdosis para un total de ocho tratamientos y siete repeticiones por tratamiento. Los tratamientos fueron los siguientes: T1: Control; T2: Xilanasas (XIL) 100g/ton; T3: Proteasa (PRO) 200g/ton; T4: Superdosis de Fitasa (SD) 200g/ton; T5: Xilanasas + Proteasa (XIL + PRO) 100g/ton + 200g/ton; 6: Xilanasas + Superdosis (XIL + SD) 100g/ton + 200g/ton; T7: Proteasa + Superdosis (PRO + SD) 200g/ton + 200g/ton; T8: Xilanasas + Proteasa + Superdosis (XIL + PRO + SD) 100g/ton + 200g/ton + 200g/ton. Las dietas se ofrecieron a libre acceso al igual que el agua durante todo el experimento. ("Quantum Blue 5G" es una fitasa producida por el microorganismo *Escherichia coli*. "Econase XT25"[®] es una xilanasas producida por el microorganismo *Trichoderma reesei*.) Se emplearon dietas a base de sorgo+pasta de soya cubriendo los requerimientos que señala la estirpe (Cuadro 1) en tres fases alimenticias. En el Cuadro 1 aparece el análisis calculado de las dietas.

A los 42 días de edad se registró el consumo de alimento, ganancia de peso corporal, conversión alimenticia y mortalidad. A los 21 días de edad, se seleccionaron dos aves por repetición se aplicó eutanasia por dislocación cervical y se colectó la tibia izquierda para la determinación de cenizas en hueso. A los 42 días de edad dos machos por repetición fueron seleccionados y se procesaron en rastro para determinar el peso y rendimiento de la carne de pechuga y de la canal. Los resultados se analizaron por tratamiento y por el efecto de la inclusión de cada enzima. El tiempo de tránsito de la digesta fue medido a los días 21, 28, 35 y 42 días de edad. En cada caso se separaron cinco machos por repetición y colocados en jaulas independientes. Los animales fueron alimentados con las mismas dietas que la repetición de origen incluyendo 2kg/ton de óxido ferroso. El tiempo de tránsito fue determinado como el periodo comprendido entre el consumo de alimento con óxido ferroso, hasta el tiempo en que las heces cambiaron de color, de su color original café a rojo. Después de esta medición las aves se retornaron al lote de donde procedían.

Análisis estadístico. Los datos se sometieron a un procedimiento ANOVA usando el modelo GLM para un diseño completamente aleatorizado, proceso de Minitab y el tiempo de tránsito de la digesta fue analizado como réplicas en el tiempo. Cuando en los efectos fueron encontradas diferencias estadísticamente significativas, se aplicó la prueba de Tukey para las medias de los tratamientos. Se tomaron las diferencias estadísticas: $P < 0.05$ y $P < 0.10$.

RESULTADOS

Los resultados de los parámetros productivos y del rendimiento en canal se presentan en el Cuadro 2. Al aislar los efectos de cada enzima al día 42, la Superdosis de Fitasa aumentó el consumo de alimento y la ganancia de peso corporal ($P<0.15$), mientras que con Xilanasa mejoró la conversión alimenticia y tendió a aumentar la ganancia de peso corporal ($P<0.10$). Con el uso de la Superdosis aumentó el rendimiento de la canal y tendió a aumentar más cuando se utilizó junto con Xilanasa ($P<0.15$). En consecuencia, las aves alimentadas con Xilanasa presentaron canales más pesadas y las alimentadas con la Superdosis presentaron carne de pechuga más pesada y tendieron también a tener canales más pesadas. La inclusión de proteasa tuvo una tendencia a reducir el rendimiento de la pechuga.

Los resultados del tiempo de tránsito de la digesta incrementaron mientras los animales tuvieron más edad. No se encontraron diferencias estadísticamente significativas entre el grupo control y los grupos tratados a los días 21 y 28. Al día 35 la Superdosis ó la combinación de Xilanasa y Proteasa tuvieron menor tiempo de tránsito con respecto al grupo control. Al día 42 el grupo de Superdosis tuvo más tiempo de tránsito que el grupo control. En general, la inclusión de Superdosis aumentó el tiempo de tránsito cuando se incluye en una dieta que contiene xilanasa y ninguna mejora adicional fue obtenida cuando se le incluye con la proteasa.

La inclusión de las tres enzimas juntas tuvo impacto sobre el desempeño y rendimiento de la canal en pollos alimentados con una dieta de sorgo. Sin embargo, el desempeño fue óptimo cuando en la dieta se incluyeron dos enzimas, pero no hubo respuesta cuando se incluyó una tercera. Particularmente los pollos alimentados con Xilanasa en conjunto con la Superdosis de Fitasa, presentaron el mejor desempeño en la mayoría de los parámetros evaluados.

CONCLUSIONES

La inclusión de Xilanasa, Proteasa ó Superdosis de Fitasa cada una por separado, tuvo poco efecto sobre los parámetros productivos de los pollos, pero tendió a mejorar el rendimiento y el peso de la canal. Cuando se incluyeron dos enzimas juntas, mejoró el rendimiento de la canal, el peso y los parámetros productivos; los mejores resultados se obtuvieron cuando se incluyó la Superdosis de Fitasa + Xilanasa. La inclusión de las tres enzimas no tuvo más beneficios en los parámetros productivos y el rendimiento de la canal, en comparación con el uso de la Superdosis de Fitasa + Xilanasa.

REFERENCIAS

1. Choct, M. Feed polysaccharides: nutritional roles and effect of enzymes. In: Congreso Latinoamericano de Nutrición Animal. San Pedro, p.65-78. 2010.
2. Slominski, B. A. A new generation of enzymes for animal feeds. In: Western Nutrition Conference. Canada, P.1-29. 2001.
3. Cowieson, A. J. Factors that affect the nutritional value of maize for broilers. *Animal Feed Science and Technology*. 119:293-305. 2005.
4. Bedford, M. R. The effects of enzymes on digestion. *Journal of Applied Poultry Research*. 5:370-378. 1996.
5. Romero, L.F. and P. W. Plumstead. Bio-Efficacy of proteases in poultry and their interaction with other feed enzymes. *Aust. Poult. Sci. Symp*. 24: 23-30. 2013.

Cuadro 1. Composición y análisis calculado de las dietas testigo¹.

Ingredientes	Iniciador (0-21)	Crecimiento (22-35)	Finalizador (36-42)
Sorgo, %	64.0	65.6	69.3
Pasta de soya, %	30.9	27.9	22.9
Aceite de soya, %	1.53	2.90	4.10
Fosfato monocálcico, %	1.03	0.94	0.75
Piedra caliza, %	1.06	1.13	1.15
Sal, %	0.31	0.31	0.26
DL Metionina, %	0.29	0.22	0.23
Lisina HCl, %	0.36	0.21	0.32
L-Treonina, %	0.09	0.02	0.07
Bicarbonato de Sodio, %	0.10	0.10	0.10
Otros, % ²	0.33	0.67	0.82
Nutrientos			
EM, Kcal/Kg	3000	3100	3200
Proteína cruda, %	22.0	20.0	18.0
Lisina, %	1.25	1.05	1.00
M+C, %	0.87	0.76	0.72
Treonina, %	0.79	0.68	0.65
Calcio, %	0.90	0.90	0.85
Fósforo disponible, %	0.46	0.44	0.40
Sodio, %	0.20	0.20	0.18

¹ Tratamientos 2 -8 formulados con la inclusión de la enzima referente a la dieta

² Suplidos por kilogramo de dieta: Hierro (Sulfato Ferroso), 60 mg, Manganeseo (Sulfato y Óxido de Manganeseo), 120 mg; Zinc (Óxido de Zinc), 100 mg; Yodo (Yodato de Calcio), 1 mg; Cobre (Sulfato de Cobre), 8mg; Selenium (Selenito de Sodio), 0.3mg, Vitamina A, 9,600 IU; Vitamina D₃ 3,600 IU; Vitamina E, 18mg; Vitamina B₁₂, 15 mcg; Riboflavina, 10 mg; Niacina, 48 mg; Ácido d-pantoténico, 18 mg; Vitamina K, 2 mg; Ácido Fólico, 1.2 mg; Vitamin B₆, 4 mg; Tiamina, 3 mg; d-Biotina, 72 mcg

Cuadro 2. Resultados promedio de las variables productivas y del rendimiento en canal.

	Parámetros Productivos			Rendimiento en Canal			
	Consumo Alim., g	Peso Corporal g	Conversión Alime., g/g	Peso Canal, g	Porcentaje Canal, %	Peso Pech., g	Porcentaje Pech., %
Control	4467 ^{ab}	2506 ^B	1.783	2079 ^B	77.6 ^B	639	30.8
Xilanasa	4400 ^{ab}	2513 ^{AB}	1.751	2114 ^{AB}	78.1 ^{AB}	657	31.1
Proteasa	4393 ^b	2508 ^B	1.752	2112 ^{AB}	78.2 ^{AB}	650	30.7
Superdosis	4474 ^{ab}	2509 ^{AB}	1.784	2107 ^{AB}	78.3 ^{AB}	662	31.4
XIL+PRO	4430 ^{ab}	2512 ^{AB}	1.764	2119 ^{AB}	78.8 ^{AB}	643	30.3
XIL+SD	4479 ^{ab}	2549 ^{AB}	1.758	2150 ^A	79.4 ^A	685	31.9
PRO+SD	4495 ^a	2534 ^{AB}	1.774	2111 ^{AB}	79.0 ^{AB}	647	30.6
XIL+PRO+S							
D	4483 ^{ab}	2563 ^A	1.749	2149 ^A	79.2 ^{AB}	663	30.8
P							
Tratamientos	0.021	0.089	0.100	0.079	0.088	0.17	0.42
XIL	0.60	0.071	0.011	0.012	0.070	0.12	0.67
PRO	0.77	0.37	0.19	0.40	0.13	0.19	0.052
SD	0.001	0.011	0.58	0.055	0.019	0.039	0.14

^{AB}P<0.10 ^{a,b}P<0.05

EVALUACIÓN DE UN PROGRAMA CON VACUNA ACTIVA TERMOSENSIBLE CEPA MS-H, EN EL CONTROL DE *M. SYNOVIAE* EN REPRODUCTORAS PESADAS

EVALUATION OF A PROGRAM USING THE ACTIVE THERMO-SENSITIVE VACCINE (VAXSAFE® MS) FOR THE CONTROL OF *MYCOPLASMA SYNOVIAE* IN HEAVY BREEDERS

E. Camacho, M. Murillo, E. Soto, D. Sarfati y B. Lozano

Laboratorio Avimex, S.A. de C.V. J.I. Bartolache 1862. Colonia del Valle. Delegación Benito Juárez. 03100
México, D.F., México

SUMMARY

To establish an effective control of avian *Mycoplasma* in breeders is vital, as this can benefit their own productivity as well as that of their progeny. In Mexico, a high percentage of heavy breeders are positive to *Mycoplasma synoviae* (MS) and most of the companies have implemented immunization of flocks with live vaccines. After five years of continuously using an immunization program in breeders, an evaluation was done in four flocks and their progeny. Results indicated that MS was not detected in embryos. Only some of the flocks sero-converted, were positive to PCR and presented clinical problems, indicating a field MS contamination. The rest of the progeny did not present any problem. It is concluded that immunization with Vaxsafe® MS in a continuous breeder program is an excellent tool to avoid vertical transmission of MS.

RESUMEN

En reproductoras es fundamental establecer un control efectivo de la Micoplasmosis aviar ya que esto beneficia su propia productividad y la de su progenie. En México un alto porcentaje de las reproductoras pesadas se encuentran positivas a la presencia de MS y la mayoría de las empresas han implementado la inmunización de parvadas con vacunas vivas. Después de cinco años de uso continuo de un programa de inmunización en reproductoras, se realizó una evaluación de 4 parvadas así como de su progenie. Los resultados indican que el MS no fue detectado en la embriones. Solo algunas parvadas de la progenie sero-convirtieron, fueron positivas a PCR y presentaron problemas clínicos, indicando una contaminación con MS de campo. El resto de la progenie no presentó problema alguno. Se concluye que la inmunización con Vaxsafe® MS en programa continuo en reproductoras es una excelente herramienta para evitar la trasmisión vertical de MS.

INTRODUCCIÓN

Los programas de prevención y control de la micoplasmosis aviar con el uso de fármacos antimicoplásmicos han demostrado sus limitaciones a lo largo de más de 40 años en los que se han empleado por la avicultura mundial de manera intensiva, dando como resultado la perpetuación del problema y una incidencia alta de MS en parvadas de reproductoras, gallinas de postura y pollos de engorda en México.

En las parvadas de reproductoras pesadas (RP) es fundamental establecer programas efectivos de prevención de la micoplasmosis (MG y/o MS), ya que afectan su propia productividad y la de su progenie. En México, en un estudio realizado por Soto y col (4) se observó que el 80% de las reproductoras pesadas se encontraban serológicamente positivas a MS, por lo que la mayoría de las empresas implementaron la inmunización de sus parvadas con la vacuna Vaxsafe MS con la cepa Termosensible MS-H (Bioproperties, Pty. Ltd.) a los 21 d de edad para prevenir los daños económicos asociados con este microorganismo en sus operaciones.

Es importante enfatizar que la inmunización de parvadas con esta vacuna no impide que las aves se infecten posteriormente con cepas de campo, pero su importancia radica en que: Previene que las cepas de campo sean transmitidas verticalmente; previene la manifestación clínica en las reproductoras y en su progenie; previene los daños económicos asociados con este microorganismo

OBJETIVO

Presentar resultados serológicos y de pruebas de PCR de 4 distintas parvadas de reproductoras bajo programa de inmunización con la vacuna viva termosensible cepa MS-H contra *Mycoplasma synoviae*.

MATERIALES Y MÉTODOS

Para este estudio se valoraron 4 parvadas de reproductoras pesadas entre las 30 y las 45 semanas de edad, así como de su progenie.

De cada lote de reproductoras, así como de su progenie, se realizó un muestreo con la toma de 100 muestras de sueros y 100 hisopos estériles de tráquea de cada una de las aves muestreadas, así como 100 hisopos estériles en embriones picados no nacidos (EPNN) provenientes de esas mismas aves reproductoras. Las muestras de hisopos se enjuagaron en medio de cultivo de Frey 2X dentro de tubos de ensayo y fueron enviados al laboratorio clínico en un periodo no mayor de 48 h bajo conservación térmica entre 2°C y 8°C.

Se realizaron pruebas serológicas mediante las técnicas de ELISA, Inhibición de la Hemoaglutinación (HI) y de Aglutinación en Placa (AP) de todos los sueros, y se llevaron a cabo pruebas de PCR a partir de la muestras tomadas con hisopos traqueales, así como de los EPNN en la planta incubadora, provenientes de las mismas claves de reproductoras muestreadas.

RESULTADOS

Pruebas de ELISA. Los resultados obtenidos indican que los sueros provienen de aves vacunadas normalmente presentan niveles entre 600 y 1800. En este estudio se observa que las aves vacunadas presentaron además un desafío natural en el campo, ya que los títulos obtenidos en las parvadas se encontraron entre 1800 y 13500.

Prueba de HI. Los resultados obtenidos indican que los sueros provienen de aves vacunadas normalmente presentan niveles entre 1:20 y 1:80. En este estudio se observa que las aves vacunadas presentaron además un desafío natural en el campo, ya que los títulos obtenidos en las parvadas se encontraron entre 1:320 y 1:640. Prueba de AP. Los resultados obtenidos fueron 100% positivos. Resultados en la prueba de PCR. Las muestras provenientes de hisopos traqueales de las madres resultaron 100% positivas, mientras que las muestras provenientes de los hisopos obtenidos de los EPNN resultaron 100% negativas.

DISCUSIÓN

Mediante las técnicas serológicas empleadas se determinó que las cuatro claves de reproductoras vacunadas con Vaxsafe MS que fueron muestreadas entre las 30 y 45 semanas de edad, sufrieron desafío de campo con MS al juzgar por los altos títulos de anticuerpos circulantes encontrados. Así mismo, los resultados positivos de las pruebas de PCR de hisopos traqueales de esas mismas aves indican que las aves son positivas a la presencia de MS, ya sea cepa vacunal o cepa de campo. No obstante, en ninguna muestra tomada de los EPNN mediante hisopos estériles, se encontraron resultados positivos de PCR, lo cual confirma que la vacunación de las reproductoras con la vacuna viva elaborada con la cepa termosensible MS-H, previno la transmisión vertical del MS de campo, lo que previene las pérdidas económicas asociadas con este microorganismo en las aves.

CONCLUSIÓN

La inmunización oportuna de las aves reproductoras con la vacuna viva elaborada con la cepa termo-sensible MS-H, en programa continuo, es una herramienta para prevenir la transmisión vertical de MS a su progenie y con ello, propiciar una mejor productividad del pollo de engorda.

REFERENCIAS

1. Kleven, S. H. and N. Ferguson-Noel. *Mycoplasma synoviae* Infection. In "Diseases of Poultry". 12th edition. Edited by Y.M. Saif, A.M. Fadly, J.R. Glisson, L.R. McDougald, L.K. Nolan and D.E. Swayne. Iowa State University Press. pp 845-856. 2008.
2. Glisson, J. Interacciones de las enfermedades respiratorias, XXII Curso Avimex "Actualidades en Clínica Aviar". 2011.

3. Morrow, C. Control de la Micoplasmosis Aviar, XXII Curso Avimex “Actualidades en Clínica Aviar”. 2010.
4. Soto, E. Avances en el control de *M. synoviae* en México, XII Curso Avimex “Asumiendo en reto en la prevención y control de los Complejos Respiratorios de las aves en el nuevo milenio”. 2000.
5. Soto, E. Programa de control y erradicación de *M. synoviae* con el uso de Vaxsafe Ms, X Curso Avimex “Salud y productividad aviar”. 1998.
6. Scott, P.C. Desarrollo de una mutante termosensible de *M. synoviae* (MS-H) y su aplicación en campo como una vacuna activa atenuada, VIII Curso Avimex “Bronquitis Infecciosa y problemas respiratorios Emergentes”. 1996.

EFFECT OF GENOTYPE SPECIFIC LIVE RECOMBINANT NEWCASTLE DISEASE VACCINES ON MORTALITY AND VIRUS SHEDDING AFTER CHALLENGE

EFFECTO DE LAS VACUNAS VIVAS RECOMBINANTES DE GENOTIPO ESPECÍFICO CONTRA LA ENFERMEDAD DE NEWCASTLE EN LA MORTALIDAD Y LA ELIMINACIÓN DEL VIRUS DESPUÉS DEL DESAFÍO

S. Cárdenas García^{AB}, P. Miller^A, C. Brown^B, and C. Afonso^A

^ASouth East Poultry Research Laboratory, Athens, GA, USA

^BCollege of Veterinary Medicine, University of Georgia, Athens, GA, USA

RESUMEN

En este estudio, dos virus recombinantes lentogénicos se generaron mediante la substitución de los genes F y HN de la cadena principal de la vacuna LaSota (genotipo II) con los genes F y HN del Virus de la Enfermedad de Newcastle NDV virulento de genotipos VIIId (de África del Sur) y XIII (de Pakistán). Los virus recombinantes fueron atenuados por la mutación del sitio de escisión de la proteína de fusión y fueron bien caracterizados para confirmar su seguridad. Se vacunaron pollitos SPF de un día de edad, ya sea con uno de estos virus o con la vacuna La Sota y 14 d después de la vacunación fueron desafiados con sus respectivos virus homólogos virulentos (Sudáfrica o Pakistán). Los resultados demuestran que las vacunas experimentales otorgaron una supervivencia del 100%, previnieron los signos clínicos y disminuyeron la excreción del virus en la orofaringe en comparación con la cepa LaSota. Además, cuando se vacunaron pollos SPF de cuatro semanas de edad con la vacuna experimental que expresa las glicoproteínas F y HN del virus genotipo XIII o con la vacuna La Sota 10^3 , 10^4 , 10^5 or 10^6 , y se desafiaron con el virus virulento de Pakistán, la mortalidad después del desafío disminuyó en los grupos que recibieron la vacuna homóloga al virus de desafío, en comparación con la vacuna la Sota. En conclusión, los genes F y HN homólogos a NDV virulento circulante son suficientes para disminuir la diseminación del virus de desafío y para reducir la mortalidad de manera más efectiva que la vacuna LaSota.

SUMMARY

In the present study, two lentogenic recombinant viruses were generated by replacing the F and HN genes from the LaSota vaccine backbone (genotype II) with the F and HN genes from virulent NDV of genotypes VIIId (from South Africa) and XIII (from Pakistan). The recombinant viruses were attenuated by mutating the fusion protein cleavage site and thoroughly characterized to confirm their safety. One d old SPF chicks were either vaccinated with one of these viruses or the LaSota vaccine and 14 d after vaccination were challenged with their respective homologous virulent virus (South Africa or Pakistan). Results demonstrate that the experimental vaccines conferred 100% survival, prevented clinical signs, and decreased oropharyngeal virus shedding compared to the LaSota strain. Additionally, when four wk old SPF chickens were vaccinated with the experimental vaccine expressing the F and HN glycoproteins from the genotype XIII virus or with the LaSota vaccine at 10^3 , 10^4 , 10^5 or 10^6 , and challenged with the virulent virus form Pakistan, the mortality after challenge was decreased in those groups that received the vaccine homologous to the challenge virus, compared to the LaSota vaccine. In conclusion, the F and HN genes homologous to the circulating virulent NDV are sufficient to decrease virus shedding of the challenge virus and to reduce mortality more effectively than the LaSota vaccine.

ABSTRACT

Newcastle disease (ND) poses a severe threat to the poultry industry due to its great economic impact and world-wide distribution (1). One of the most important methods to control ND is vaccination (1), but current vaccines have not been able to prevent replication and virus shedding into the environment even though it has been demonstrated that these vaccines, when applied correctly and at the appropriate doses, can protect from disease (2).

The commercially available vaccines, such as LaSota and B1, belong to genotype II and some others such as Ulster and V4 belong to genotype I, while virulent Newcastle disease viruses (vNDV) currently circulating around the world belong to completely different genotypes such as V, VI, VII and XIII. Previous studies have demonstrated that vaccines genetically homologous to the challenge vNDV are able to reduce viral excretion into the environment (3,4). Data also demonstrated that a reduction in viral shedding after challenge, reduced transmission from bird to bird (5).

In the present study, two experimental vaccines were generated by replacing the F and HN genes from the LaSota vaccine backbone (genotype II) with the F and HN genes from vNDV of genotypes VII_d (from South Africa) and XIII (from Pakistan). These viruses were attenuated by mutating the fusion protein cleavage site and thoroughly characterized to confirm their safety. One d old SPF chickens were vaccinated with either one of these experimental vaccines or with the LaSota vaccine and 14 d after vaccination were challenged with either vNDV-VII or vNDV-XIII (heterologous to LaSota). Results demonstrate that the experimental vaccines conferred 100% survival, prevented clinical signs, and decreased oropharyngeal virus shedding compared to the LaSota vaccine.

Additionally, we tested the effect of homologous vaccines on clinical protection under suboptimal dosage in comparison with the LaSota vaccine. This “suboptimal” scenario presented here mimics the unfortunate environment that is found in the field in the countries that have endemic vNDV strains circulating. Here, four wk old SPF chickens were vaccinated with the experimental vaccine expressing the F and HN glycoproteins from vNDV-XIII virus or with the LaSota vaccine at 10^3 , 10^4 , 10^5 or 10^6 , and challenged with vNDV-XIII. Protection against the clinical outcome after challenge was better in those groups that received the vaccine homologous to the challenge virus when compared to the LaSota vaccine.

In conclusion, the F and HN genes homologous to the circulating vNDV are sufficient to decrease virus shedding of the challenge virus and increased clinical protection more effectively than the LaSota vaccine.

REFERENCES

1. Miller PJ, Koch G. 2013. Newcastle Disease, other Avian Paramyxoviruses and Avian Metapneumovirus infections, p. 89-138. *In* Swayne DE, Glisson JR, McDougal LR, Nolan LK, Suarez DL, Nair V (ed.), *Diseases of Poultry*, 13 th ed. Wiley-Blackwell Publishing, Ames, Iowa.
2. Dortmans JC, Peeters BP, Koch G. 2012. Newcastle disease virus outbreaks: vaccine mismatch or inadequate application? *Veterinary microbiology* 160:17-22.
3. Miller PJ, Estevez C, Yu Q, Suarez DL, King DJ. 2009. Comparison of viral shedding following vaccination with inactivated and live Newcastle disease vaccines formulated with wild-type and recombinant viruses. *Avian Dis* 53:39-49.
4. Miller PJ, King DJ, Afonso CL, Suarez DL. 2007. Antigenic differences among Newcastle disease virus strains of different genotypes used in vaccine formulation affect viral shedding after a virulent challenge. *Vaccine* 25:7238-7246.
5. Miller PJ, Afonso CL, El Attrache J, Dorsey KM, Courtney SC, Guo Z, Kapczynski DR. 2013. Effects of Newcastle disease virus vaccine antibodies on the shedding and transmission of challenge viruses. *Developmental and comparative immunology* 41:505-513.

EVALUACIÓN FÍSICA Y SEROLÓGICA DE HOMOGENEIDAD DE VACUNAS INACTIVADAS CONTRA LA ENFERMEDAD DE NEWCASTLE E INFLUENZA AVIAR MEZCLADAS POR TRES MÉTODOS DIFERENTES

PHYSICAL AND SEROLOGICAL EVALUATION OF THE UNIFORMITY OF INACTIVATED VACCINES AGAINST NEWCASTLE'S DISEASE AND AVIAN INFLUENZA MIXED USING THREE DIFFERENT METHODS

P. Cascante*, S. Madrigal, G. Rodríguez, L. García, V. Marrufo y D. Lucio

Investigación Aplicada S.A. de C.V.
7 Norte No. 416, Col. Centro, Tehuacán, Puebla, México. CP 75700.
*rcascante@grupoidisa.com

SUMMARY

The mixing uniformity of emulsified concentrated vaccines against Newcastle's disease (ND) and avian influenza (AI) was evaluated through physical and serological tests. Tests of microscopy, oily phase dispersion and stability in a bivalent ND+AI vaccine, in two monovalent vaccines against ND and AI and three mixtures of these vaccines (3 different methods) were done. Serological evaluation in seven SPF birds groups immunized with non-mixed and mixed vaccines was made. A lower emulsion vacuole size, and a higher uniformity, as well as a good stability, allow for a better contact surface to obtain rapid subcutaneous tissue absorption with a quicker seroconversion and the presence of protective antibodies titers at 14 d post-vaccination. The use of a bivalent vaccine ND+AI, alone, or with a mixture of two monovalent vaccines (mechanically mixed using an electric mixer), resulted in higher protective antibodies titers at 14 d post-vaccination ($P<0.05$) with a lower variation coefficient.

RESUMEN

Se evaluó la homogeneidad de mezclado de vacunas emulsionadas concentradas contra enfermedad de Newcastle (ENC) e influenza aviar (IA) mediante pruebas físicas y serológicas. Se realizaron pruebas de microscopía, dispersión de fase oleosa y estabilidad en una vacuna bivalente ENC+IA, dos vacunas monovalentes contra ENC y IA y tres mezclas de estas vacunas (tres métodos diferentes). Se realizó evaluación serológica en siete grupos de aves SPF inmunizadas con vacunas sin mezclar y mezcladas. Un menor tamaño en las vacuolas de emulsión, más homogéneas y una buena estabilidad permiten una mayor superficie de contacto para obtener una rápida absorción en el tejido subcutáneo con una seroconversión más rápida, títulos de anticuerpos protectivos a 14 d PV. Emplear una vacuna bivalente ENC+IA, sola o con una mezcla de dos vacunas monovalentes (mezcladas mecánicamente con batidora eléctrica), resultó en mayores títulos de anticuerpos protectivos a los 14 días PV (diferencia estadística significativa $p<0.05$), con menor coeficiente de variación.

INTRODUCCIÓN

En los últimos años en México es común que algunos productores de pollo de engorda, mezclen vacunas concentradas fabricadas por diferentes laboratorios contra diferentes antígenos como son virus de la enfermedad de Newcastle (ENC) y virus de influenza aviar (IA). Estas mezclas se realizan con la finalidad de obtener diversidad antigénica en una mayor cantidad de emulsión administrándola en una sola aplicación subcutánea, con una elevada respuesta inmune en los pollos. El objetivo de este estudio es evaluar la homogeneidad en el mezclado de vacunas emulsionadas concentradas contra ENC e IA por tres diferentes métodos de mezclado, a través de pruebas físicas y serológicas.

MATERIAL Y MÉTODOS

Se realizaron pruebas físicas de microscopía, prueba de dispersión de fase oleosa y prueba de estabilidad de la emulsión en una vacuna monovalente contra ENC (VmENC), una vacuna monovalente contra IA (VmIA) y una vacuna bivalente ENC+IA (VbENCIA), así como en tres mezclas por diferentes métodos de VmENC y VmIA: mezcla uno por agitación en botella (Vmix1), mezcla dos por agitación manual con cucharón (Vmix2) y mezcla tres por agitación mecánica con batidora eléctrica (Vmix3). Adicionalmente se vacunaron siete grupos de aves libres de patógenos específicos: A (VmENC), B (VmIA), C (Vmix1), D (Vmix2), E (Vmix3), F (VbENCIA) y G (VbENCIA + Vmix3) (Tabla 1).

Mezcla por agitación en botella. En una botella de vidrio graduada de uno L de capacidad con taparoca de plástico, se vertieron 500 mL de vacuna monovalente contra ENC y 500 mL de vacuna monovalente contra IA. Se agitó la botella cerrada de manera manual de forma vigorosa durante cinco m continuos.

Mezcla manual con cucharón. En un contenedor de plástico de dos L de capacidad sin tapa, se vertieron 500 mL de vacuna monovalente contra ENC y 500 mL de vacuna monovalente contra IA. Se mezcló de manera vigorosa empleando un cucharón de plástico durante cinco m continuos.

Mezcla mecánica con batidora. En un contenedor de plástico de dos L de capacidad sin tapa, se vertieron 500 mL de vacuna monovalente contra ENC y 500 mL de vacuna monovalente contra IA. Se mezcló empleando una batidora mecánica a 4000 rpm durante cinco m continuos.

Prueba de microscopía. Con la finalidad de determinar la homogeneidad así como el tamaño de gota de la emulsión, se realizaron pruebas de microscopía empleando un microscopio óptico convencional en muestras de 6 identificaciones de las vacunas emulsionadas y sus mezclas: A, B, C, D, E y F.

Prueba de estabilidad de la emulsión. Se realizó la prueba de ruptura y separación de la emulsión, sometiendo los biológicos empleados y sus mezclas a 37 °C, 4 °C, y cambios de temperatura de 37 °C a 4 °C y viceversa, de 4 °C a 37 °C, con la finalidad de determinar la estabilidad de cada biológico y sus mezclas.

Prueba serológica. Con la finalidad de determinar el nivel de anticuerpos que estimula la aplicación de los biológicos incluidos en el protocolo, se realizó la evaluación de títulos de anticuerpos conferidos por la administración de las vacunas y sus mezclas en aves de estirpe ligera libres de patógenos específicos (Tabla 1).

RESULTADOS

El tamaño de las vacuolas de emulsión es menor y su homogeneidad es mayor en las vacunas VmENC y VbENCIA sin mezclar; respecto a las vacunas mezcladas, la vacuna Vmix1 (mezclada manualmente por agitación en botella) tuvo las vacuolas de menor tamaño con formación de grumos más pequeños y con mayor homogeneidad respecto a Vmix2 y Vmix3. La prueba de dispersión de fase oleosa mostró que las tres vacunas sin mezclar son emulsiones agua en aceite, característica que se mantiene en las vacunas mezcladas. En la prueba de estabilidad las vacunas sin mezclar y las vacunas mezcladas tuvieron resultados satisfactorios a 37 y 4 °C (Tabla 2).

La prueba serológica para ambos antígenos mostró que el grupo G seguido del grupo F tuvieron los títulos de anticuerpos más altos con menor coeficiente de variación, siendo los únicos grupos con títulos protectivos para ambos antígenos desde los 14 días PV, con diferencia estadística significativa (Comparación múltiple de medias Tukey $p < 0.05$).

El menor tamaño de vacuolas de emulsión, su mayor homogeneidad, así como una buena estabilidad son características físicas que permiten tener una mayor superficie de contacto a fin de obtener una rápida absorción de las vacunas en el tejido subcutáneo con una seroconversión a títulos de anticuerpos protectivos más rápida (14 días PV). El uso de una vacuna concentrada bivalente ENC+IA permite obtener títulos de anticuerpos más altos, protectivos a los 14 días PV y con menor coeficiente de variación, empleándola sola o con una mezcla de dos vacunas monovalente.

REFERENCIAS

1. Calnek BW. Diseases of Poultry. México: El manual moderno, 1995.
2. Zavala G. Solid immune system essential for respiratory integrity. Word Poultry Elsevier Supplement. 14-16. 1998.
3. Swayne DE, Perdue LM, García M, Rivera-Cruz E, Brugh M. Pathogenicity and diagnosis of H5N2 Mexican avian influenza viruses in chickens. Avian Diseases. 41:335-346. 1997.
4. García A, Johnson H, Srivastava DK, Jayawardene DA, Wehr DR, Webster RG. Efficacy of inactivated H5N2 influenza vaccines against lethal A/Chicken/Querétaro/19/95 infection. Avian Diseases. 42:248-256. 1998.

5. Lucio DE. Marrufo VD. González EME. Evaluación de vacunas inactivadas contra influenza aviar. Memorias de la XXVIII Convención Anual ANECA y Proceedings of the Fifty-First Western Poultry Disease Conference. Puerto Vallarta (Jalisco) México. México (DF): Asociación Nacional de Especialistas en Ciencias Avícolas; 2002: 338-341. 2002.

6. Lucio DE. Actualidades sobre influenza aviar en México. Memorias del IV Precongreso Científico Avícola IASA; 2004 abril; Ixtapa Zihuatanejo (Guerrero) México. Tehuacán (Puebla): Investigación Aplicada S.A. de C.V. y Asociación Nacional de Especialistas en Ciencias Avícolas. 2004.

7. Lucio E., Morales A., Ortega R., Rodríguez A., Absalón A. Características de los virus de la enfermedad de Newcastle que circulan en México y sus repercusiones en protección y persistencia en las zonas afectadas. Tehuacán, Pue., México Investigación Aplicada SA de CV e Instituto de Biotecnología del IPN, Tlaxcala, México.

Tabla 1. Diseño experimental.

Identificación de la Muestra		Método de mezclado vacunas A y B	Dosis
A	Vacuna monovalente ENC (VmENC)	-----	0.2 mL / ave
B	Vacuna monovalente IA (VmIA)	-----	0.2 mL / ave
C	VmENC + VmIA (Vmix1)	Agitación en botella	0.4 mL / ave
D	VmENC + VmIA (Vmix2)	Manual con cucharón	0.4 mL / ave
E	VmENC + VmIA (Vmix3)	Mecánico con batidora	0.4 mL / ave
F	Vacuna bivalente ENC-IA (VbENCIA)	-----	0.2 mL / ave
G	VbENCIA	-----	0.2 mL / ave
	Vmix3	Mecánico con batidora	0.4 mL / ave

Nota: El grupo G fue vacunado administrando VbENCIA (0.2 mL/ave) por separado de la mezcla Vmix3 (0.4 mL/ave)

Tabla 2. Resultados de la prueba de ruptura de la emulsión.

Identificación de la Muestra		De 37 °C a 4 °C	De 4 °C a 37 °C
A	Vacuna monovalente ENC (VmENC)	Negativo	Negativo
B	Vacuna monovalente IA (VmIA)	Negativo	Negativo
C	VmENC + VmIA (Vmix1)	Negativo	Negativo
D	VmENC + VmIA (Vmix2)	Negativo	Negativo
E	VmENC + VmIA (Vmix3)	Negativo	Negativo
F	Vacuna bivalente ENC-IA (VbENCIA)	Negativo	Negativo

REVISITING THE JOHNSON & REID INTESTINAL LESION SCORING METHOD FOR COCCIDIOSIS

REVISANDO EL MÉTODO JOHNSON & REID PARA LA CALIFICACIÓN DE LESIONES INTESTINALES PARA COCCIDIOSIS

H.M. Cervantes

Phibro Animal Health, Watkinsville, Georgia, USA

RESUMEN

En 1970 los investigadores de parasitología de aves J. Johnson y W.M. Reid de la Universidad de Georgia publicaron un método detallado para la calificación de lesiones diseñado para evaluar de manera más uniforme lesiones cecales e intestinales causadas por infecciones de una sola especie con seis especies de *Eimeria* de pollos en ambientes de laboratorio. Aunque su intención era estandarizar las técnicas de calificación de lesiones entre investigadores de parasitología de aves, los veterinarios que trabajan en la producción de aves y las industrias avícolas aliadas adoptaron rápidamente el método Johnson y Reid para el monitoreo rutinario de la coccidiosis en el campo. Sin embargo, la aplicación actual del método de la calificación de lesiones desarrollado por Johnson y Reid en 1970 difiere sustancialmente de la publicación original. Esta presentación destacará la necesidad de calificar las lesiones coccidiales de manera más uniforme a nivel de la industria avícola y se hará hincapié en las diferencias entre la publicación original y su aplicación actual.

SUMMARY

In 1970 University of Georgia poultry parasitology researchers J. Johnson and W.M. Reid published a detailed lesion scoring method designed to evaluate in a more uniform way intestinal and cecal lesions caused by single species infections with six *Eimeria* spp. of chickens in laboratory settings. Although their intention was to standardize lesion scoring techniques among poultry parasitology researchers, poultry veterinarians working for the production and allied poultry industries quickly adopted the Johnson and Reid Method for the routine monitoring of coccidiosis in the field. However, the current application of the lesion scoring method developed by Johnson and Reid in 1970 differs substantially from the original publication. This presentation will highlight the need to score coccidial lesions more uniformly at the poultry industry level and will emphasize the differences between the original publication and its current application.

INTRODUCTION

In 1970 poultry parasitology researchers J. Johnson and W.M. Reid from the University of Georgia Department of Poultry Science published a lesion scoring method designed to evaluate gross intestinal and cecal lesions induced by single species laboratory infections with *Eimeria* spp. of chickens (1). Although the intent of their publication was to standardize lesion scoring techniques among poultry parasitology researchers, veterinarians and parasitologists working for the production and allied poultry industries quickly adopted the technique for routine monitoring of coccidiosis. However, the current interpretation of the lesion scoring technique developed by Johnson and Reid in 1970 differs substantially from the original publication (2).

OBSERVATIONS FROM THE ORIGINAL PUBLICATION

The original publication provides descriptions for the different degrees of severity of lesions for six species of *Eimeria*, namely, *E. tenella*, *E. necatrix*, *E. acervulina*, *E. mivati*, *E. maxima*, and *E. brunetti*. However, the authors caution readers about the difficulty in scoring the last two species and indicate serious doubts in the usefulness of scoring those species in infections that are not at least moderately severe. Also, the authors did not produce a separate description of lesions for *E. mivati* indicating that the location and type of lesions are similar to those caused by *E. acervulina* except for a tendency for lesions to move in a caudal direction with the progression of the

infection. Other differences noted by the authors were that the lesions are more rounded and that severe congestion had not been observed.

The authors abandoned all attempts to score by species, and instead only recorded the degree of coccidiosis-induced damage to four regions of the intestinal tract; the regions being the upper, middle, and lower intestine and the ceca.

For *E. tenella* and *E. necatrix* lesions were scored on a five to seven post-inoculation in battery trials. *E. maxima* and *E. brunetti* lesions were scored six to seven d post-inoculation. No time-frame for scoring was given for *E. acervulina* or *E. mivati*. The authors noted that scoring lesions for *E. maxima* is very difficult because the degree of pathogenicity for this species does not always correlate with the severity of the lesions. The authors noted as well that *E. brunetti* was the most difficult species to score, in part because light infections do not produce lesions and severe infections are seldom seen in experimental infections.

The authors indicated that their lesion scoring technique requires a minimum of two but better three people. The authors recommend examining a minimum of five birds, or 5% of the total number of birds. They mention that the serosal surface of the intestines should be examined for lesions first throughout the length of the intestines under a strong light. They also indicated that a similar examination of the mucosal surface with collection of shallow and deep scrapings for microscopic examination should be conducted on only one or two birds and that the second or third person should examine them with the microscope under low and high power. The authors also recommended conducting the lesion scoring "blindly" by one person having no knowledge of the treatments.

Finally, the authors indicated that lesion scoring is time consuming and that the maximum number of birds that may be examined in a day by a team of three is 200.

INCONSISTENCIES

Although the authors stated that they did not include a +5 category for birds dying from the coccidial infection because these birds may have lesions less severe than those found in some of the surviving birds, in the description of lesions for *E. tenella*, *E. necatrix*, *E. acervulina*, *E. maxima*, and *E. brunetti* they stated that dead birds are scored as +4 (the highest lesion score by their method).

No specific mention is made by the authors about the importance of collecting mucosal scrapings from the mid-intestine from every bird to be examined microscopically for the presence of *E. maxima* oocysts. For *E. brunetti* the authors report that a +1 score produces no gross lesions and can easily be missed unless mucosal scrapings are collected and examined microscopically to identify the parasite.

OBSERVATIONS FROM EVALUATIONS IN THE FIELD

These observations are based on 18 years of experience by the author conducting lesion scorings for coccidial infections in broiler chickens in the field by the method of Johnson & Reid.

Most people conducting lesion scoring in the field tend to report findings in terms of species rather than regions of the intestine, for example, a +2 for *E. acervulina* instead of a +2 for the upper region, or a +1 for *E. maxima* instead of a +1 for the middle region. Most evaluators tend to increase the severity of the infections by one level, for example, a +2 *E. acervulina* infection is frequently scored as a +3 even by veterinarians with a good deal of clinical experience. In the author's opinion this may be due to the fact that very severe infections (in the +4 category) are seldom seen in the field due to the routine use of anticoccidials or vaccines designed to prevent clinical outbreaks of coccidiosis, if a +4 is never or very seldom found, then a +3 by Johnson & Reid soon becomes a +4; a +2 becomes a +3 and so on.

Most individuals conduct the lesion scoring and microscopic examination by themselves although in some instances teams of colleagues work together to assess coccidiosis control at an operation. In most cases the individuals conducting the lesion scoring session have knowledge of the anticoccidial program prior to the start. In most cases the individual conducting the lesion scoring session does not examine the serosal surface throughout the length of the intestines prior to examining the mucosal surface. Most reports provide the overall incidence of coccidiosis or the incidence of each coccidial species by age but very few provide the mean lesion score by flock and the average lesion score for the entire necropsy session. In addition, individuals that do not collect mucosal scrapings from the mid-intestinal region from every bird for microscopic examination have been noted.

Finally, the author has observed a well recognized contract-researcher lesion score up to 2,000 birds in a period of approximately three hours.

CONCLUSIONS

Few if any of us follow the method developed and published in 1970 by Johnson & Reid as originally described. This should be acknowledged when presenting work on coccidiosis involving lesion scoring "by the method of Johnson & Reid".

A recognition of this fact should prompt everyone conducting lesion scoring for coccidial infections in the field to study the original manuscript and attempt to adhere to the descriptions of lesions and scores provided for each of the various species of *Eimeria* spp. infecting broiler chickens.

REFERENCES

1. J. Johnson and W.M. Reid. Anticoccidial drugs: Lesion Scoring Techniques in Battery and Floor-pen Experiments with Chickens. *Experimental Parasitology* 28:30-36. 1970.
2. H.M. Cervantes. Revisiting Lesion Scoring Techniques for Coccidiosis. Proc. 150th Annual Meeting of the American Veterinary Medical Association and 56th Annual Meeting of the American Association of Avian Pathologists. 2013.

INTERPRETACIÓN DE RESULTADOS DE LA PRUEBA DE ELISA PARA DETECCIÓN DE ANTICUERPOS CONTRA VIRUS DE INFLUENZA A EN SUEROS DE POLLOS DE ENGORDA CON DIFERENTES PROGRAMAS DE VACUNACIÓN

INTERPRETATION OF ELISA RESULTS FOR THE DETECTION OF ANTIBODIES AGAINST INFLUENZA A VIRUS IN CHICKEN SERA FROM BROILERS VACCINATED WITH DIFFERENT PROGRAMS

J. Chapa^A, P. Muñoz^A, E. Guzmán^A, B. Bautista^A, S. Zimmerman^A, P. López^A y C. Gómez^B

^AInvestigación Aplicada S.A. de C.V. 7 norte 416, Colonia Centro, Tehuacán, Puebla, México, CP75700

^BIDEXX Livestock, Poultry and Dairy. One IDEXX Drive, Westbrook, ME 04092, USA

SUMMARY

Evaluation of the humoral immune response is performed by quantifying the levels of circulating antibodies. Serological methods are relatively easy procedures, rapid and reproducible, and provide a good estimate of the resistance of animal populations against some viruses and bacteria. In Mexico the detection of antibodies against the virus of avian influenza (AI) is routinely performed by testing hemagglutination inhibition subtype specific. The ELISA developed to measure antibodies against viruses type A has the advantage of detecting exposure and dissemination of virus in poultry populations and can be used in surveillance and eradication programs.

A study was conducted to determine the values of S / N in blocking ELISA with broilers serum samples of different ages and vaccination programs. Results are presented.

RESUMEN

Para evaluar la respuesta a la vacunación de pollos de engorda de cuatro, cinco y seis semanas de edad, con cuatro diferentes vacunas inactivadas de influenza aviar, elaboradas con el subtipo H7N3, se utilizaron las pruebas de ELISA indirecta y competitiva de influenza aviar, así como la prueba de HI. Una mayor sensibilidad y menor variación de los resultados se observaron en la prueba competitiva.

La evaluación de la respuesta inmune humoral se realiza mediante la cuantificación de los niveles de anticuerpos circulantes. Los métodos serológicos son procedimientos relativamente fáciles, rápidos y reproducibles, y proporcionan una buena estimación de la resistencia de una población de animales contra algunos virus y bacterias. En México, la detección de anticuerpos contra el virus de Influenza Aviar (IA) se realiza en forma rutinaria mediante la prueba de inhibición de la hemoaglutinación (HI), específica del subtipo, que es una prueba sensible y tiene aplicación en el monitoreo de parvadas, sin embargo es laboriosa y se requiere contar con los subtipos específicos. La prueba de inmunoensayo enzimático (ELISA) desarrollada para medir anticuerpos contra virus Tipo A, tiene la ventaja de detectar la exposición y diseminación de cualquier subtipo del virus en poblaciones avícolas, por lo que puede ser usada en programas de vigilancia y erradicación, así como en la evaluación de la respuesta a la vacunación. Productos comerciales de ELISA indirecta (iELISA) han sido desarrollados para el uso en aves domésticas y se ha reportado mayor sensibilidad que la prueba de precipitación en gel de agar (AGID). La ELISA de bloqueo (bELISA) usa un anticuerpo monoclonal que compete con los anticuerpos del suero para unirse con el antígeno marcado y puede ser usada en varias especies de aves (1). En México el virus de IA H5N2 de baja patogenicidad fue detectado por primera vez en 1994 en aves comerciales, y mediante la vacunación, que ha sido una de las estrategias de la campaña, se pudo erradicar al virus de alta patogenicidad en ese mismo año. Recientemente en 2012 debido los brotes de IA causados por el subtipo H7N3 de alta patogenicidad, se implementó la vacunación en algunas zonas del país como parte de las acciones para el control y la erradicación del virus. La prueba de bELISA Influenza A, es por lo tanto una herramienta de diagnóstico para el monitoreo y detección de la exposición de las aves en zonas libres y para la evaluación de la respuesta a la vacunación con uno o ambos subtipos.

El objetivo de este trabajo fue evaluar los resultados niveles de anticuerpos inducidos por diversas vacunas contra IA, con las pruebas de iELISA y bELISA, y determinar cuál producto o esquema de vacunación resultaría en mayor protección ante un eventual desafío con virus de campo.

MATERIALES Y MÉTODOS

Muestras de suero. Se obtuvieron 12 muestras de suero de cuatro grupos de pollos de engorda de cuatro, cinco y seis semanas de edad, sumando un total de 144 muestras. Cada grupo procedía de una parvada vacunada durante las dos primeras semanas de vida, con diferentes productos contra la IA, conteniendo el virus inactivado del subtipo H7N3 de baja patogenicidad. Los calendarios de vacunación y los productos utilizados no fueron revelados por el propietario.

Pruebas serológicas. Se realizaron las pruebas de ELISA para la detección de anticuerpos contra el virus de IA, por los métodos indirecto y de bloqueo (Influenza A) (IDEXX, Westbrook, ME) de acuerdo a las recomendaciones de manufactura. La prueba de HI se realizó con el antígeno H7N3 cepa oficial con cuatro UHA.

Análisis estadístico. Se obtuvieron los valores de estadística descriptiva en el programa XCheck IDEXX®. y se realizó la prueba de correlación con los resultados de la media geométrica de los valores S/P de la prueba indirecta y S/N de la prueba competitiva, obtenidos de cada grupo de sueros.

RESULTADOS

Los resultados de las pruebas se resumen en la tabla 1. El número de muestras positivas fue mayor en la prueba competitiva que en la prueba indirecta, 118 (81.94%) y 95 (65.97%), respectivamente. La variación de los resultados de acuerdo al coeficiente de variación fue mayor en la prueba indirecta (89.6%) que en la prueba competitiva (44.19%). Un coeficiente de correlación de $R^2 = .7594$ fue obtenido al comparar los valores S/P y S/N de las pruebas. El título de anticuerpos promedio de cada grupo obtenido con la prueba indirecta varió de 672 a 2120 en las aves de cuatro semanas de edad alrededor de dos semanas posteriores a la vacunación (PV), de 1040 a 3754 en las aves de cinco semanas (tres semanas PV) y de 1205 a 3463 en las aves de seis semanas (4 semanas PV). La mejor respuesta a la vacunación determinada por el mayor título de anticuerpos o valor S/P medido con la prueba indirecta, y el menor valor S/N en la prueba competitiva, fue observada en las aves del Grupo 1 de cinco semanas de edad y del Grupo 3 a las seis semanas. Para su comparación se incluyen los resultados de HI en la Tabla 1.

DISCUSIÓN

Las pruebas de iELISA y bELISA permiten la semi automatización y la rápida realización de un gran número de muestras, pero el resultado deberá de ser interpretado en forma grupal y no individual. Las pruebas indirectas son específicas de especie, aunque las pruebas comerciales disponibles detectan la respuesta serológica de pollos y pavos (2). La prueba competitiva puede ser usada para la detección de anticuerpos de diversas especies de aves y ha sido evaluada en forma experimental y con muestras de aves silvestres (1). En este trabajo se evaluó la respuesta serológica de aves vacunadas con el subtipo H7N3, obteniendo un mayor número de resultados positivos con menor coeficiente de variación en la prueba competitiva, comparados con los obtenidos en la prueba indirecta. La prueba de bELISA es una valiosa herramienta de diagnóstico serológico para la detección de aves expuestas al virus de IA en zonas libres y para evaluar la respuesta de la parvada a la vacunación con cualquier subtipo.

La ELISA indirecta ofrece los beneficios de medir los títulos vacúnales por parvada y por granja. La bELISA es una herramienta de monitoreo con la sensibilidad y especificidad suficientes para el seguimiento de parvadas en zonas libres de IA.

REFERENCIAS

1. Brown J., Lutell M., Berghaus R., Kistler W., Keeler S., Howey A., Wilcox B., Hall J., Niles L., Dey A., Kutsen G., Fritz K., and Stallknecht D. 2010. Prevalence of antibodies to type a Influenza virus in wild avian species using two serologic assays. *J. Wildlife Dis.* 46 (3): 896-911.
2. Swayne D., Senne D. and Suarez D. Avian Infuenza. In: A laboratory manual for the isolation, identification, and characterization of avian pathogens. 5th. Ed. Edited by D. Swayne, J. Glisson, J. Pearson, W. Reed, M. Jackwood and P. Woolcock, American Association of Avian Pathologist, Inc, Athens, GA, 2008.

Tabla 1. MG y número de muestras positivas en iELISA, bELISA y HI.*

Edad	Gpo. 1			Gpo. 2			Gpo. 3			Gpo. 4		
	S/P	S/N	Tit.	S/P	S/N	Tit.	S/P	S/N	Tit.	S/P	S/N	Tit.
4 sem.	0.654	0.336	8.0	0.325	0.480	10.0	0.932	0.392	5.0	0.655	0.418	13.0
	8	12	6	5	10	5	9	10	0	7	11	6
5 sem.	1.573	0.227	28.0	0.485	0.482	13.0	1.264	0.295	30.0	0.824	0.322	13.0
	10	12	10	6	7	6	10	9	9	9	9	6
6 sem.	0.555	0.373	7.0	0.721	0.426	18.0	1.461	0.244	48.0	1.054	0.386	42.0
	7	10	3	7	8	8	9	12	11	8	8	7

* Media Geométrica: valores S/P de iELISA, S/N de bELISA y Título Log10 de HI.

Resultados positivos: S/P > 0.5, S/N < 0.6 y HI > 5.

RESULTADOS DEL MONITOREO SEROLÓGICO CON LA PRUEBA DE ELISA PARA LA DETECCIÓN DE ANTICUERPOS CONTRA BRONQUITIS INFECCIOSA E INFECCIÓN DE LA BOLSA FABRICIO EN AVES REPRODUCTORAS – CONSTRUCCIÓN DE LÍNEAS BASE

MEXICAN SEROLOGICAL BASELINES AND ELISA RESULTS FOR THE DETECTION OF ANTIBODIES AGAINST INFECTIOUS BRONCHITIS AND INFECTIOUS BURSAL DISEASE FROM DIFFERENT MONITORING PROGRAMS IN MEXICAN BREEDERS

J. Chapa^A, E. Rodríguez^A, E. Guzmán^A, S. Zimmerman^B, P. López^B y C. Gómez^B

^AInvestigación Aplicada S.A. de C.V. 7 norte 416, Colonia Centro, Tehuacán, Puebla, México, CP75700

^BIDEXX Livestock, Poultry and Dairy. One IDEXX Drive, Westbrook, ME 04092, USA

SUMMARY

Infectious bronchitis (IB) and infectious bursal disease (IBD) are acute contagious viral diseases that typically affect young chickens. IBV infections primarily cause respiratory disease, but some strains cause kidney damage. Breeder hens affected commonly suffer losses in production and egg quality. IBD causes immunosuppression and in susceptible chickens decreases the response to vaccination and increases susceptibility to other infections. Immunization of breeders ensures passive immunity in their progeny to protect against early infections.

Serological tests may help to assess flock health by measuring antibody levels and establishing baselines that help monitor the prevalence and incidence of IB in breeder flocks, as well as antibody levels against IBD. Monitoring results are analyzed using the ELISA tests. Results are presented.

RESUMEN

Las pruebas serológicas permiten evaluar la salud de las parvadas por la medición de los niveles de anticuerpos. Con este fin, establecer líneas base, evaluar la prevalencia e incidencia de BI en parvadas de reproductoras, así como los niveles de anticuerpos contra la IBF, se analizaron los resultados del monitoreo serológico con las pruebas de ELISA de 46 parvadas alojadas en siete granjas durante los años 2012 y 2013. Se obtuvieron los valores promedio y su variación en diferentes edades, y se establecieron los parámetros o líneas base de referencia.

La bronquitis infecciosa (BI) y la infección de la bolsa de Fabricio (IBF) son enfermedades virales agudas y contagiosas que normalmente afectan a las aves jóvenes. Las infecciones primarias por virus de BI producen enfermedad respiratoria y algunas cepas causan lesiones en riñón. Las aves de postura y reproductoras comúnmente sufren pérdidas en la producción y en la calidad del huevo. La IBF en aves susceptibles causa inmunosupresión, disminuye la respuesta a la vacunación e incrementa la susceptibilidad a otras infecciones. Para ambas enfermedades, la inmunización de reproductoras asegura inmunidad pasiva en la progenie contra infecciones tempranas.

El diagnóstico serológico se basa en la detección de anticuerpos en el suero contra diversos agentes infecciosos. La prueba de inmunoensayo enzimático (ELISA) es rápida, práctica y sensible, permite analizar una gran cantidad de sueros, está disponible comercialmente y su costo es relativamente bajo. En el caso de BI e IBF es el método de elección para el monitoreo (1).

La razón más importante para examinar los títulos de anticuerpos en las aves es establecer un banco de datos, antecedentes o líneas base, de tal manera que se pueda detectar un problema temprano efectivamente. Es importante establecer la correlación entre los títulos de las pruebas serológicas y los problemas clínicos que presentan las aves. Se establece un banco de datos para los rangos normales y se comparan cuando las aves presentan un desafío por virus de campo. Cualquier cambio en los títulos normales puede ser la alerta de un problema potencial, cuando se

presenta un problema clínico es importante tomar muestras pareadas durante la fase aguda de la enfermedad y durante la fase de convalecencia, dos semanas después de la aparición del brote (1,2).

La línea base es el resumen promedio del comportamiento histórico de los mejores lotes productivamente para la cual se establece rangos, de tal manera que si se excede estos parámetros, en nuevos lotes evaluados, se tiene que revisar el programa sanitario. Se calculan los títulos normales para cada agente infeccioso, a determinada edad y por agente infeccioso, así mismo se determina si la parvada analizada, difiere de la media de la línea base. Los cuadros son referencias generales de acuerdo a la experiencia de campo y bajo condiciones de normales, además de procesos de enfermedad. En este caso la prueba de ELISA puede ayudar a orientar el diagnóstico (5).

Las pruebas serológicas permiten evaluar la salud de las parvadas por la medición de los niveles de anticuerpos. Con este fin, así como establecer líneas base y evaluar la prevalencia e incidencia de BI, y los niveles de anticuerpos contra la IBF en parvadas de reproductoras, se analizan los resultados del monitoreo serológico con las pruebas de ELISA.

MATERIALES Y MÉTODOS

Se reunieron los resultados obtenidos de muestras de suero analizados mediante la prueba indirecta de ELISA. Las muestras procedían de 46 parvadas de reproductoras ligeras de diferentes edades alojadas en siete granjas ubicadas en la zona del valle de Tehuacán, en el estado de Puebla, México, durante los años 2012 y 2013. El programa de monitoreo establecido por el productor incluye muestreos a partir del nacimiento de la parvada, a las 5, 10, 14 y 18 semanas de edad, y posteriormente cada seis semanas hasta el fin de su vida productiva.

Pruebas serológicas. Se realizaron las pruebas de ELISA indirecta para la detección de anticuerpos contra los virus de BI e IBF (IDEXX, Westbrook, ME) de acuerdo a las recomendaciones de manufactura y con el uso del programa XCheck de IDEXX®.

Análisis de los datos. Se utilizaron los valores de la media geométrica de los títulos de anticuerpos en el suero de las aves, obtenidos en cada resultado, y se construyó una tabla dinámica con el programa de Excel Microsoft®. Se incluyeron datos de la granja y parvada de procedencia, así como la edad de las aves, el año y el mes en que se tomaron las muestras. Se calcularon los valores de estadística descriptiva con los resultados de la media geométrica de las parvadas de cada granja en cada una de las etapas del monitoreo.

RESULTADOS

Los valores de la media y desviación estándar de los promedios obtenidos de cada granja con los resultados de las parvadas en cada monitoreo o edad se presentan en la Tabla 1. En el caso de BI los títulos promedio variaron entre 619 y 4472, siendo los valores individuales mínimos de 79 y 87 a las dos y cinco semanas de edad respectivamente, y los máximos superiores a 10,000 en una parvada entre las 24 y 36 semanas de edad. En el caso de IBF los títulos promedio variaron de 1567 a 6677, siendo el valor mínimo de 48 en aves de cinco semanas y el máximo de 9137 en aves de una semana de edad. En ambos casos una disminución en los títulos de anticuerpos se encontró en la segunda y quinta semana de edad.

DISCUSIÓN

Las pruebas serológicas son usadas rutinariamente para el monitoreo de la respuesta a la vacunación y para detectar incremento en el título de anticuerpos atribuible a la infección de campo. El diagnóstico serológico de la infección por virus de BI en aves comerciales es mejor realizado por la demostración de una respuesta ascendente de los anticuerpos en el suero usando la prueba de ELISA, que detecta anticuerpos comunes para todos los serotipos (3). No se observaron incrementos considerables en los títulos, sugestivos de un brote en la mayoría de las parvadas; únicamente, en dos de la misma granja presentaron títulos al menos el doble del promedio. Esto sugiere una probable exposición al virus de campo. Considerando también que las aves reciben varias vacunaciones durante el período de crianza.

La prueba de ELISA es la más comúnmente usada para la evaluación de anticuerpos contra el virus de IBF. Se puede establecer un perfil de anticuerpos en las reproductoras que indicará el nivel de inmunidad de la parvada y dará información para el desarrollo de programas propios de inmunización para las reproductoras y su progenie. El perfil de anticuerpos puede ser realizado con el suero colectado de las reproductoras o de su progenie al día de edad, siendo los títulos 60% a 80% menores que en las reproductoras. Los anticuerpos transmitidos de la gallina en la yema de huevo pueden proteger a los pollos contra infecciones tempranas con el virus de IBF. Las vacunas en emulsión de aceite pueden estimular la inmunidad materna adecuada para proteger a los pollos por cuatro a cinco semanas, y con

vacunas vivas por uno a tres semanas (4). El monitoreo provee información valiosa sobre el grado de protección de la progenie durante las primeras semanas de vida.

REFERENCIAS

1. Bolívar V. Bronquitis Infecciosa, soluciones prácticas. Lafavet Cía. Ltda.
2. Castro N., Sequeda L., Cortés S. Correlación entre la línea base serológica, histopatología, imagen de la bolsa, PCR y secuenciación viral para la enfermedad de Gumboro en fase de cría en ponedoras comerciales. Lebrija, Santander. Revista Spei, Domus. Núm. 6-7, 2007.
3. Gelb J. and Jackwood M. Infectious Bronchitis. In: A laboratory manual for the isolation, identification, and characterization of avian pathogens. 5th. Ed. Edited by D. Swayne, *et al.* AAAP, Inc, Athens, GA, 2008.
4. Luckert P. and Saif Y. Infectious bursal disease. In: Diseases of Poultry, 9th ed. B. Calnek, *et al* Eds. Iowa State University Press, Ames, Iowa. pp. 648-663. 1991.
5. Vasquez C. Algunas consideraciones para la interpretación serológica en ELISA. [http://engormix.com/MA avicultura/sanidad/articulos. 27/07/09](http://engormix.com/MA_avicultura/sanidad/articulos.27/07/09).

Tabla 1. Resultados de los títulos de anticuerpos contra los virus de BI e IBF obtenidos en la prueba de ELISA.

	Edad en semanas															
	1	2	5	10	14	18	24	30	36	42	48	54	60	66	72	78
BI																
Media	2,794	963	619	2,020	1,941	3,348	4,137	4,360	3,977	4,472	3,679	3,999	3,965	4,126	4,199	4,053
DS	1,956	1,075	208	878	1,233	2,323	1,092	1,662	907	840	1,743	1,180	718	1,744	2,215	2,026
IBF																
Media	6,677	3,081	1,567	2,539	2,512	2,821	5,316	5,237	4,926	4,945	3,247	4,209	3,806	5,734	3,943	5,444
DS	2,386	2,518	987	691	1,444	24	1,310	449	1,187	1,272	647	2,044	927	1,398	1,429	1,298

EFFECTO DE LA DISMINUCIÓN DE PROTEÍNA Y AMINOÁCIDOS ESENCIALES EN DIETAS SORGO + SOYA TIPO COMERCIAL SOBRE LOS PARÁMETROS PRODUCTIVOS EN PAVOS NICHOLAS DE 4 A 12 SEMANAS DE EDAD

EFFECT OF REDUCING PROTEIN AND ESSENTIAL AMINO ACIDS IN COMMERICAL SORGHUM+SOY DIETS ON PERFORMANCE OF NICHOLAS TURKEYS 4 TO 12 WEEKS OF AGE

V. Chávez^{A*}, H. Posadas^A, A. Candelo^B y R. Sánchez^B

^ACentro de Enseñanza, Investigación y Extensión en Producción Avícola Universidad Nacional Autónoma de México UNAM

^BFacultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia UNAM

*E-mail: erico_runy@hotmail.com

SUMMARY

Glutamine and glutamic acid are amino acids that have basic functions on the normal functions of the organism. The research objective was to evaluate the effect of productive parameters of Nicholas turkeys. The treatments were: T1- diet according to nutritional needs of Nicholas turkeys and T2- diet with a 10% reduction of protein and essential amino acids (lysine, methionine and threonine) and addition of 2 kg/ton of AminoGutMR (10% glutamine and 10% glutamic acid).

Statistical analysis results for weight gain and FCR showed significant ($P<0.05$) difference between treatments with a better performance for Group 1. No significant ($P>0.05$) difference was shown for feed intake and carcass yield. We conclude that reducing protein and essential amino acids 10% of the requirements for Nicholas turkeys affected their performance in weight gain and FCR from 4 to 12 wk of age.

RESUMEN

El objetivo de la investigación fue evaluar el efecto en los parámetros productivos de pavos Nicholas, alimentados con dietas sorgo + soya tipo comercial con una disminución del 10% de proteína y de los aminoácidos más limitantes (lisina, metionina y treonina) y la sustitución con 0.2% de Aminogut (glutamina y ac. Glutámico al 10%). Se utilizaron 324 pavos, de la estirpe Nicholas de cuatro semanas de edad, los cuales se distribuyeron conforme a un diseño completamente al azar en dos tratamientos con tres repeticiones de 54 pavos cada una. Los tratamientos fueron: T1.- Dieta según las recomendaciones nutricionales de la estirpe Nicholas y T2.- Dieta con reducción del 10% de proteína y aminoácidos esenciales (lisina, metionina y treonina) y adición de 2 Kg/Ton de AminoGut^{MR} (10% de glutamina y 10% de ac.glutámico) como fuente de nitrógeno. La dieta experimental, solo comprendió la etapa de desarrollo (semana 5 a 9). En la etapa de finalización, se empleó la misma dieta sorgo + soya tipo comercial para ambos tratamientos. Los resultados del análisis estadístico, para ganancia de peso y conversión alimenticia indicaron que existió diferencia significativa ($P<0.05$) entre tratamientos, con una mayor ganancia de peso y mejor conversión del Tratamiento 1. En el caso de consumo de alimento y rendimiento en canal, el análisis no presentó diferencia significativa ($P>0.05$) entre tratamientos.

INTRODUCCIÓN

El interés económico de la explotación actual del pavo, se apoya principalmente en su rendimiento en carne y la calidad nutritiva por el bajo contenido de grasa de su carne (4,5). La producción de carne de pavo, al igual que el resto de la producción avícola, sustenta la alimentación de las aves en granos forrajeros y dependiendo del nivel de tecnificación alcanzado en las explotaciones, éste puede ser proporcionado solamente quebrado y acondicionado con otras materias primas, o bien, a través de alimentos balanceados (3,11).

La anatomía y fisiología de los distintos órganos y tejidos, difieren entre pavos y pollos y algunas de estas diferencias deben tomarse en cuenta a la hora de formular raciones. Las estirpes actuales de pavos comerciales se caracterizan por su amplia pechuga y alto porcentaje de masas musculares, por lo que precisan que la relación proteína: energía, sea mayor que en los pollos durante las primeras semanas de vida (5,6). Como en todas las especies domésticas las necesidades en proteína y en aminoácidos esenciales dependen de la edad; Se estima que las necesidades en aminoácidos entre pavos y pollos son similares, aunque las necesidades de pavos son ligeramente superiores a las de los pollos en lisina y ligeramente inferiores en metionina (8,14).

Tanto la Glutamina como el Ácido Glutámico, son aminoácidos que cumplen funciones primordiales en el funcionamiento normal del organismo y son altamente requeridos en las dietas en períodos de grandes exigencias como el crecimiento y desarrollo inicial de las aves, es por esto que se considera un nutriente condicionalmente esencial por ser un compuesto producido usualmente en cantidades adecuadas por síntesis endógena, pero que se requiere de forma exógena bajo determinadas circunstancias para cubrir las necesidades fisiológicas de los animales (1,2,7). La glutamina presenta dos grupos amino, esta característica le confiere una función de importancia como es servir de fuente de nitrógeno para la síntesis de aminoácidos no esenciales y de otros compuestos nitrogenados (1, 9, 7,13). Es por lo anterior que el objetivo de la investigación fue evaluar el efecto en los parámetros productivos de pavos Nicholas, alimentados con dietas sorgo + soya tipo comercial con una disminución del 10% de proteína y de los aminoácidos más limitantes (lisina, metionina y treonina) y la sustitución con 0.2% de Aminogut (glutamina y ac. Glutámico al 10%).

MATERIALES Y MÉTODOS

La investigación se realizó en el Centro de Enseñanza, Investigación y Extensión en Producción Avícola (CEIEPAv) de la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia de la Universidad Nacional Autónoma de México. Se utilizaron 324 pavos, de la estirpe Nicholas de 4 semanas de edad. Los pavos fueron distribuidos al azar, en 6 lotes de 54 animales cada uno, tres lotes para cada uno de los tratamientos.

- Tratamiento 1. Dieta según las recomendaciones nutricionales de la estirpe Nicholas.
- Tratamiento 2. Dieta con reducción del 10% de proteína y aminoácidos esenciales (lisina, metionina y treonina) y adición de 2 kg/Ton de Aminogut^{MR} (10% de glutamina y 10% de ac.glutámico) en la etapa de desarrollo como fuente de nitrógeno.

Los datos de las variables ganancia de peso, consumo de alimento, conversión alimenticia y rendimiento en canal fueron sometidos a un análisis de varianza y comparados mediante pruebas de T de Student a un nivel de significancia de 5%, para lo cual se empleo el programa estadístico MENU (10).

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Los resultados obtenidos en las primeras cuatro semanas (5-9 de edad) de experimentación para las variables ganancia de peso e índice de conversión indicaron que existió diferencia significativa ($P < 0.05$) entre tratamientos, con una mayor ganancia de peso de 412g en los pavos alimentados de acuerdo a las recomendaciones de la estirpe, con respecto a los pavos que tenían restricción de proteína y aminoácidos y adición de Aminogut. La conversión alimenticia fue mejor de 1.47 en pavos alimentados según las recomendaciones comparados con los pavos, que tenían restricción de proteína y aminoácidos con adición de Aminogut con una conversión de 1.60.

El análisis estadístico de la semana 5 a 12 de edad mostró diferencias significativas ($P < 0.05$) entre tratamientos para las variables ganancia de peso, conversión alimenticia, consumo de alimento y rendimiento en canal.

Estos resultados presentados por Waibel et al. 2000 (12) y Miguel et al. 2007 (7) confirman lo ocurrido en el presente experimento, ya que, al disminuir proteína y aminoácidos en un 10%, la suplementación con L-glutamina y ácido glutámico no es suficiente para compensar la disminución de aminoácidos esenciales (Lisina, Metionina y Treonina). La glutamina y el ácido glutámico tienen diferentes papeles metabólicos durante el desarrollo, entre los que destacan, su papel como sustrato energético para la rápida proliferación de enterocitos, fuente de nitrógeno para la síntesis de nucleótidos y como reguladores de la demanda metabólica, incrementando la síntesis y disminuyendo la degradación de proteína en el músculo esquelético de pollos de engorde jóvenes.

REFERENCIAS

1. Ajinomoto. Aminogut[®]: Ciencia y practica en la nutrición de lechones: Funciones importantes de la Glutamina en la nutrición y en la producción animal. Pork world; 2007. Nov-Dic. P 7-9.

2. Buchman A. Glutamine: commercially essential or conditionally essential? A critical appraisal of the human data. *Am J Clin Nutr* 2001; 74 (1): 25-32.
3. Dirección General Adjunta de Planeación Estratégica y Análisis Sectorial. Monografía del guajolote o pavo. México: Dirección General Adjunta de Planeación Estratégica y Análisis Sectorial; Dic 2010.
4. Fundación de desarrollo agropecuario FDA, INC. Producción de pavos. Guía técnica 1997. Número 4. P 1-3.
5. Lázaro R, Mateos G, Latorre M. Nutrición y alimentación de pavos de engorde. XVIII Curso de especialización FEDNA; 2002 Nov 4-5; Barcelona, España.
6. Leeson S, Summers JD. Commercial poultry nutrition. 3rd ed. Guelph, Ontario Canada: University Books, 2005.
7. Miguel J, Cortes A, Martínez A Y Ávila E. Evaluación de diferentes niveles de inclusión de glutamina en dietas para pollos de engorda [Tesis de Licenciatura]. México: Universidad Nacional Autónoma de México; 2007.
8. Murakami A, Sakamoto M. Supplementation of glutamine and vitamin E on the morphometry of the intestinal mucosa in broiler chickens. *Poultry science* 2007; 86: 488-495.
9. Newsholme P, Lima M, Procopio J, Pitón Curi T, Doi S, Bazotte R, Curi R. Glutamina y glutamato en forma de metabolitos vitales. *Braz J Med Biol. Res* 2003; 36 (2): 153-163.
10. Olivares Se. Paquete estadístico de diseños experimentales FAUANL. 1994. Versión 2.5. Facultad de Agronomía. Universidad Autónoma de Nuevo León.
11. Secretaría de Agricultura, Ganadería, Desarrollo rural, Pesca y Alimentación SAGARPA. Situación actual y perspectiva de la producción de carne de guajolote (pavo) en México (2006). *Claridades Agropecuarias* 2007; (161): 3-37.
12. Waibel P, Carlson C, Brannon J, Noll S. Identification of limiting Amino Acids in Methionine and Lysine-Supplemented Low-Protein Diets for Turkeys. *Poultry Science* 2000; 79:1299-1305.
13. Wesley R, Adams R, Stadelman. Effects of Amino Acid restriction and age on weights and meat yields of Turkeys. *Poultry Science* 1981; 60: 1422-1428.
14. Yi F, Allee G, Knight C, Dibner J. Impact of Glutamine and Oasis hatchling supplement on growth performance, small intestinal morphology, and immune response of broilers vaccinated and challenged with *Eimeria maxima*. *Poultry Science* 2005; 84: 283-293.

RESCUE OF LENTOGENIC ASYMPTOMATIC PERUVIAN NEWCASTLE DISEASE VIRUS (NDV-PE18)

RESCATE DEL VIRUS LENTOGENICO ASINTOMÁTICO PERUANO DE LA ENFERMEDAD DE NEWCASTLE (RNDV-PE18)

A. Chumbe^A, R. Izquierdo-Lara^A, L. Tataje^A, F. Falconi-Agapito^B, M. Fernandez^{AB}, and V. Vakharia^C

^ALaboratory of Molecular Biotechnology and Genomics, FARVET. ICA, Peru

^BLaboratory of Microbiology, FARVET ICA, Peru

^CInstitute of Marine & Environmental Technology. University of Maryland Baltimore. County 701 East Pratt St. Baltimore, MD 21202 USA

RESUMEN

La enfermedad de Newcastle (NDV) es responsable de pérdidas significativas en granjas de crianza avícola. NDVs lentogénicos (ICPI de 0.4 a 0.7) son usados como vacunas vivas contra NDV, pero incluso estas cepas lentogénicas pueden ocasionar síntomas postvacunales indeseables en algunos casos. En 1984, un virus local de NDV fue aislado y atenuado mediante sucesivos pasajes en huevos libres de patógenos (ICPI actual de 0.42). Con la finalidad de producir un sistema de genética reversa para este aislado, amplificamos, clonamos y secuenciamos la secuencia completa de este aislado en siete pedazos. La secuencia completa de cDNA de rNDV-PE18 fue construida entre la ribozima autoclivable hammerhead y el antígenoma de la ribozima del Virus de la Hepatitis Delta en un vector pCI modificado (pCI/HDV). Los plásmidos de soporte fueron construidos a partir del plásmido prNDV-PE18, para probar la expresión de éstos un minigenoma de la proteína verde fluorescente mejorada. El virus rNDV-PE18 fue recuperado exitosamente a partir de células VERO y ha replicado eficientemente al menos por 10 pasajes. El test de Patogenicidad mostró que el virus rNDV-PE18 era completamente avirulento (IPIC=0). Así rNDV-PE18 es una promisorio candidata a vacuna, especialmente para pollos de engorde, y un potencial vector para llevar genes foráneos. Una versión completa de este trabajo será publicado en breve.

SUMMARY

Newcastle disease virus (NDV) is responsible for significant losses in poultry farms. Lentogenic NDVs (ICPI from 0.4 to 0.7) are used as live vaccines against NDV, but even these lentogenic strains may induce undesirable post vaccination symptoms in some cases. In 1984 a local NDV was isolated in Peru (NDV-PE) and attenuated by successive passages into SPF eggs (current ICPI of 0.42). With the aim to produce a reverse genetic system for this isolate, we amplified, cloned and sequenced the full sequence it into seven pieces. A full length cDNA clone of rNDV-PE18 was constructed between a self-cleaving hammer head ribozyme and hepatitis delta virus antigenome ribozyme into a pCI vector (pNDV/HDV). Supporting plasmids were constructed from prNDV-PE18; to prove expression of them an enhanced green fluoresce protein minigenome was generated. rNDV-PE18 virus was successfully recovered in VERO cells and replicated efficiently during at least 10 passages. Pathogenicity test showed rNDV-PE18 was completely avirulent (ICPI=0). Thus rNDV-PE18 is a promising vaccine candidate, especially for broilers, and a potential vector to delivery foreign genes. An extended version of this work will be published shortly.

INTRODUCTION

NDV is responsible for significant losses in poultry farms around the world (12,1). In South America, especially in Peru, where backyard husbandry is a common activity and there exist many informal poultry businesses with low levels of biosecurity (9). NDV genome organization and virulence factors are very well described (2), thanks to reverse genetics since 1999 when NDV was able to be genetically engineered (11,10). Several groups reported the capacity of NDV to transport exogenous genes and confer protection to the secondary pathogen (3,14).

NDV has been present in Peru since 1970. In the middle 80's our Laboratory of Microbiology (at FARVET) was able to retrieve an NDV (NDV-PE) isolate from the field, which had an intracerebral pathogenicity index (ICPI) of 0.42. Since then, this was propagated into SPF eggs several times and it has been continuously used as a live vaccine.

NDV vaccination is very well regulated and obligatory for poultry which include live vaccines (15). Due to our special farming conditions, the initiative of developing a NDV vehicle which could fulfill our needs was developed. With the aim of producing our own recombinant viruses based on this isolate, we developed a reverse genetic system for it.

MATERIAL AND METHODS

Virus culture. NDV-PE virus was obtained from FARVET live vaccine's master seed and amplified into nine d old embryonated, specific-pathogen-free (SPF) eggs.

Sequencing of NDV-PE. Viral RNA was extracted from infected allantoic fluid samples with QIAmp Minielute Virus-Spin-Kit (Qiagen).

Based on published primers for avirulent NDV LaSota strain (4), NDV-PE isolate was amplified into seven pieces by RT-PCR with a high fidelity Pfx(50) polymerase (Life technologies) with seven pairs of primers (Table 1). Each piece was cloned into pGemT-easy vector and sequenced with T7/SP6 primers.

Construction of cDNA encoding rNDV. A modify pCI vector which included a hepatitis delta virus (HDV) antigenome ribozyme (pCI/HDV) was used to construct a full length cDNA of rNDV-PE plasmid (prNDV-PE). A fragment of 1677 nucleotides flanked by SpeI and RsrII was synthesized and inserted into pCI/HDV between NheI and RsrII. This synthetic gene includes a self-cleaving hammer head ribozyme (HhRz) sequence, a partial leader region, a partial phosphoprotein gene and a partial matrix gene. Several restriction sites were included into this synthetic gene to construct prNDV-PE18 by seven subsequent subclonings (Figure 1). Also a RsrII site present into NDV-PE, was eliminated to ease the cloning of the first fragment of prNDV-PE18, this mutation was also used as a genetic marker to identify rNDV-PE18 virus. The 7F-7R product, the first piece to be inserted, was reamplified with 7F and 7R-Rsr primers to include a fragment of HDV antigenome ribozyme (Table 1).

Supporting plasmids pCI-N14, pCI-P15 and pCI-L4 were constructed from prNDV-PE18, with primers Nfor, Nrev, Pfor, Prev, Lfor and Lrev (Table1).

Minigenomic construction. To verify that our constructed rescue system works it was designed a minigenome between HhRz and HDV which was flanked by the 5' and 3' noncoding regions of NDV genome surround the ORF of EGFP, prNDV-Mini (5).

Transfection and recovery. Transfection was carried out as reported previously for NDV (6,11). Briefly, Vero cells were maintained with Minimal Essential Medium (MEM) supplemented with 5% of Fetal Bovine Serum (FBS). Vero cells grown to 80% confluency in 12 well plate dish were transfected with a total amount of 3.8ug DNA (2ug of prNDV-PE18, 1ug of pCI-N14, 0.6 ug of pCI-P15 and 0.2 of pCI-L4) using Lipofectamine LTX/optiMEM (Life technologies). One day after transfected cells were trypsinized and re-seeded into a flask. Five d later, supernatant was harvest and ultracentrifuge for 12 h at 28000 rpm. The rNDV-PE18 virus was resuspended in 1ml DMEM 5% and inoculated into eight- days SPF eggs. After one blind passage NDV-PE18 virus was recovered and propagated at least ten passages into nine d SPF's eggs.

Identify of genetic markers on rNDV-PE18. RT-PCR plus restriction endonuclease digestion were performed to identify a mutation made on rNDV-PE18. RTs were made with Transcriptor First Strand cDNA Synthesis Kit (Roche) with random hexamers and poly A primers. PCRs were made with Pfx(50) with Primers ForRsr and RevRsr (Table 1). Digestions were made with RsrII (NewEngland Biolabs).

HA and pathogenicity tests. Hemagglutination tests were performed with avian SPF red blood cells (8). The intracerebral pathogenicity index (ICPI) was determined in day-old chickens as described by Alexander (13).

RESULTS

NDV-PE sequence. NDV-PE sequence was very similar to other lentogenic NDV strains, only two aminoacid changes were not found in any NDV sequence.

Verification of helper plasmids. The correct expression of pCI-N14, pCI-P15 and pCI-L4 was verify by the co-expression of all of them with prNDV-Mini. Twenty-four h post transfection, the first green cells were observed. In contrast, no green fluorescent protein was seen when prNDV-Mini was transfected without pCI-L4 (Figure 2). These plasmids were also used to optimize our transfection protocol for recovery.

prNDV-PE18 construct. prNDV-PE18 was assembled from cDNA fragments as shown in Figure 1 between a self-cleaving hammer head ribozyme and hepatitis delta virus antigenome ribozyme. During its construction, seven point mutation were created by primers: SacII (2354), MluI (6294-95) and SnaBI (8352-54-55-57). Nine point mutations were introduced: four of them were to ease to clone the full length, eliminating one XhoI site (80G>T), replacing a second XhoI for SacI (100C>G, 105G>C) and destroying a RsrII (2665C>T); and five of them to create PacI (3071C>T, 3078C>A) and AscI (3270A>C, 3272T>C, 3276C>T) to use this NDV-PE as vector to introduce exogenous genes.

rNDV-PE18 identification. After one blind passage rNDV-PE18 virus was recovered and propagated several passages into nine d SPF's eggs. Analysis of the RT-PCR followed by restriction enzyme pattern revealed the absence of RsrII site in rNDV-PE, as calculated from the sizes of the bands, while RT-PCR products from wild-type NDV-PE were digested by RsrII (Fig. 2C).

Hemmagglutination and pathogenicity test. The allantoic fluid was harvested 5 days after inoculation and gave a positive HA titer from 32 to 128 HA units. ICPI showed NDV-PE18 was completely avirulent (ICPI=0). Different from NDV-PE, which has an ICPI of 0.42.

DISCUSSION

The rNDV-18 can be distinguished from the parental virus, since it possesses genetic tags that were introduced into the cDNA copy. Mutations made on it were identified by RT-PCR and enzyme digestion. A recombinant NDV, derived from the vaccine strain NDV-PE, was generated and successfully recovered in VERO cells using a polymerase II system, described previously by Li (7). NDV-PE18 virus was amplified and replicated efficiently during at least 10 passages. The rNDV-PE18 resulted to be lentogenic asymptomatic, with less ICPI than the parental virus. The low ICPI may be explained by the introduced mutations in the intergenic regions, nevertheless more studies are needed to determine the exact mutations that cause it. This feature might result in fewer side effects in chickens, making rNDV-PE a promising vaccine candidate for all poultry industry, especially for broilers which are very susceptible to post vaccination reactions. Besides that, rNDV-PE18, due to its characteristics could be a potential vector to delivery foreign genes. rNDV-PE18 was capable of replicating in embryonated eggs as good as the parental virus, yielding high titers with same cytopathic effects than NDV-PE virus.

In summary, this virus is the first NDV recovered in South America and, due to its low ICPI, can be used as a vaccine against NDV. Furthermore, rNDV-PE18 has the potential to be used as a vector for insertion of genes from different pathogens outbreaks leading to a better vaccination programs in the poultry industry to fulfill our needs.

REFERENCES

1. Alexander, D. J., E. W. Aldous, and C. M. Fuller. The long view: a selective review of 40 years of Newcastle disease research. *Avian Pathol. J. WVPA* 41: 329–335. 2012.
2. Dortmans, J. C. F. M., G. Koch, P. J. M. Rottier, and B. P. H. Peeters. Virulence of Newcastle disease virus: what is known so far? *Vet. Res.* 42: 122. 2011.
3. Huang, Z., S. Elankumaran, A. S. Yunus, and S. K. Samal. A recombinant Newcastle disease virus (NDV) expressing VP2 protein of infectious bursal disease virus (IBDV) protects against NDV and IBDV. *J. Virol.* 78: 10054–10063. 2004.
4. Huang, Z., S. Krishnamurthy, A. Panda, and S. K. Samal. High-level expression of a foreign gene from the most 3'-proximal locus of a recombinant Newcastle disease virus. *J. Gen. Virol.* 82: 1729–1736. 2001.
5. Jiang, Y., H. Liu, P. Liu, and X. Kong. Plasmids driven minigenome rescue system for Newcastle disease virus V4 strain. *Mol. Biol. Rep.* 36: 1909–1914. 2009.
6. Krishnamurthy, S., Z. Huang, and S. K. Samal. Recovery of a virulent strain of Newcastle disease virus from cloned cDNA: expression of a foreign gene results in growth retardation and attenuation. *Virology* 278: 168–182. 2000.
7. Li, B.-Y., X.-R. Li, X. Lan, X.-P. Yin, Z.-Y. Li, B. Yang, and J.-X. Liu. Rescue of Newcastle disease virus from cloned cDNA using an RNA polymerase II promoter. *Arch. Virol.* 156: 979–986. 2011.
8. McGinnes, L. W., H. Pantua, J. Reitter, and T. G. Morrison. Newcastle Disease Virus: Propagation, Quantification, and Storage. In: *Current Protocols in Microbiology*. John Wiley & Sons, Inc. 2005.
9. Ortiz, E. J., T. J. Kochel, A. W. Capuano, S. F. Setterquist, and G. C. Gray. Avian Influenza and Poultry Workers, Peru, 2006. *Influenza Other Respir. Viruses* 1: 65–69. 2007.
10. Peeters, B. P. H., O. S. de Leeuw, G. Koch, and A. L. J. Gielkens. Rescue of Newcastle Disease Virus from Cloned cDNA: Evidence that Cleavability of the Fusion Protein Is a Major Determinant for Virulence. *J. Virol.* 73: 5001–5009. 1999.
11. Römer-Oberdörfer, A., E. Mundt, T. Mebatsion, U. J. Buchholz, and T. C. Mettenleiter. Generation of recombinant lentogenic Newcastle disease virus from cDNA. *J. Gen. Virol.* 80 (Pt 11): 2987–2995. 1999.
12. Saif, Y. M., and A. M. Fadly. *Diseases of poultry*. Blackwell Pub., Ames, Iowa. 2008.
13. Swayne, D. E., and A. A. of A. Pathologists. *A Laboratory Manual for the Isolation and Identification of Avian Pathogens*. Copies available from American Association of Avian Pathologists, University of Pennsylvania. 1998.
14. Toro, H., W. Zhao, C. Breedlove, Z. Zhang, V. L. van Santen, and Q. Yu. Infectious Bronchitis Virus S2 Expressed from Recombinant Virus Confers Broad Protection against Challenge. *Avian Dis.* 2013.

15. REGLAMENTO DE CONTROL Y ERRADICACIÓN DE LA ENFERMEDAD DE NEWCASTLE. 2003.

Table 1. Primers used in this study. Restriction sites are underlined. Bold sequences are Kozak sequences. Position into NDV sequence are indicated. Capital letters are part of NDV sequences.

Primer name	Position	Sequence (5'→3')	Restriction site
1F	(1-24)	ACCAAACAGAGAATCCGTAAGTTA	-
1R	(2338-2363)	GTTT <u>CCGCGG</u> CTGGGTTGACTCCCCT	SacII
2F	(2343-2365)	AGTCAACCCAG <u>CCGCGG</u> AAACAG	SacII
2R	(4943-4964)	GAGCT <u>GCGGCCG</u> CTGTTATTTG	NotI
3F	(4948-4968)	AACAG <u>C</u> CGGCCG <u>C</u> AGCTCTGAT	NotI
3R	(6276-6301)	TACA <u>ACGCGT</u> AGTTTTTCTTAACTC	MluI
4F	(6288-6312)	AACT <u>ACGCGT</u> TGTAGATGACCAAAG	MluI
4R	(8351-8366)	GCACT <u>ACGTAT</u> TTTTGCCTTGTATCTC	SnaBI
5F:	(8358-8383)	CAA <u>AATACGTA</u> AATGGTAAATAATACGGGTAGGACATG	SnaBI
5R	(10024-10052)	TCAGCTTAG <u>CGAAG</u> ATCCGTCCATTA	BlpI
6F	(10039-10071)	CTTC <u>GCTAAG</u> CTGACAAAGAAGTTAAGGAACTG	BlpI
6R	(12817-12844)	GTCTAG <u>GCC</u> CTCTACTCTCAGGTAATAG	StuI
7F	(12833-12854)	AGAG <u>GCC</u> CTAGACAATATTGTCT	StuI
7R	(15159-15186)	ACCAAACAAAGATTTGGTGAATGACGAG	-
7R-Rsr	(15159- 15186)	<u>gatccggaccgcgaggaggtggagatgccatgccg</u> ACCCACCAAACAAA GATTTGGTGAATGACGAG	RsrII
T7	-	TAA TACGA CTCAC TATAG GG	-
SP6	-	TTC TATAG TGTCA CCTAA AT	-
Nfor	(122-140)	ggaattc gccacc ATGCTTCCGTATTTGATG	EcoRI
Nrev	(1591-1572)	<u>gcggccgc</u> TCAATACCCCCAGTCGGTGT	NotI
Pfor	(1887-1906)	tgaattc gccacc ATGGCCACCTTTACAGATGC	EcoRI
Prev	(3074-3057)	gcggccgcTTAGCCATTTAGAGCAAG	NotI
Lfor	(8381-8400)	tactagt gccacc ATGGCGAGCTCCGGTCCTGA	SpeI
Lrev	(14995-14976)	gcggccgcTTAAGAGTCACAGTTACTGT	NotI
ForRsr	(2491-2510)	gatcaaggcagagccaagac	-
RevRsr	(2736-2755)	gaaatgtggcacaaccggg	-

Figure 1. Schematic diagram of rNDV-PE subcloning strategy. Seven subsequent subclonings were made to construct rNDV-PE. A modified pCI (SnaBI and NotI site destroyed) was opened between NheI and RsrII to insert a ~1.6 Kb fragment which included several restriction sites and partial Phosphoprotein and Matrix protein. After that, first insertion was product from primers 7F and 7R-Rsr, between StuI and RsrII, since RsrII from NDV-PE was destroyed into the synthetic fragment. The second insertion was product from 6F and 6R primers, between StuI and BlnI. The third to seventh fragments inserted were products from 5F&5R, 4F&4R, 3F&3R, 2F&2R and 1F&1R primers, respectively, between sites specified on the scheme.

Self-cleaving hammer head ribozyme (HhRz) and hepatitis delta virus (HDV) antigenome ribozyme are represented as a dotted and solid squares. Leader and trailer regions are showed with vertical and horizontal lines, respectively. (not drawn to scale).

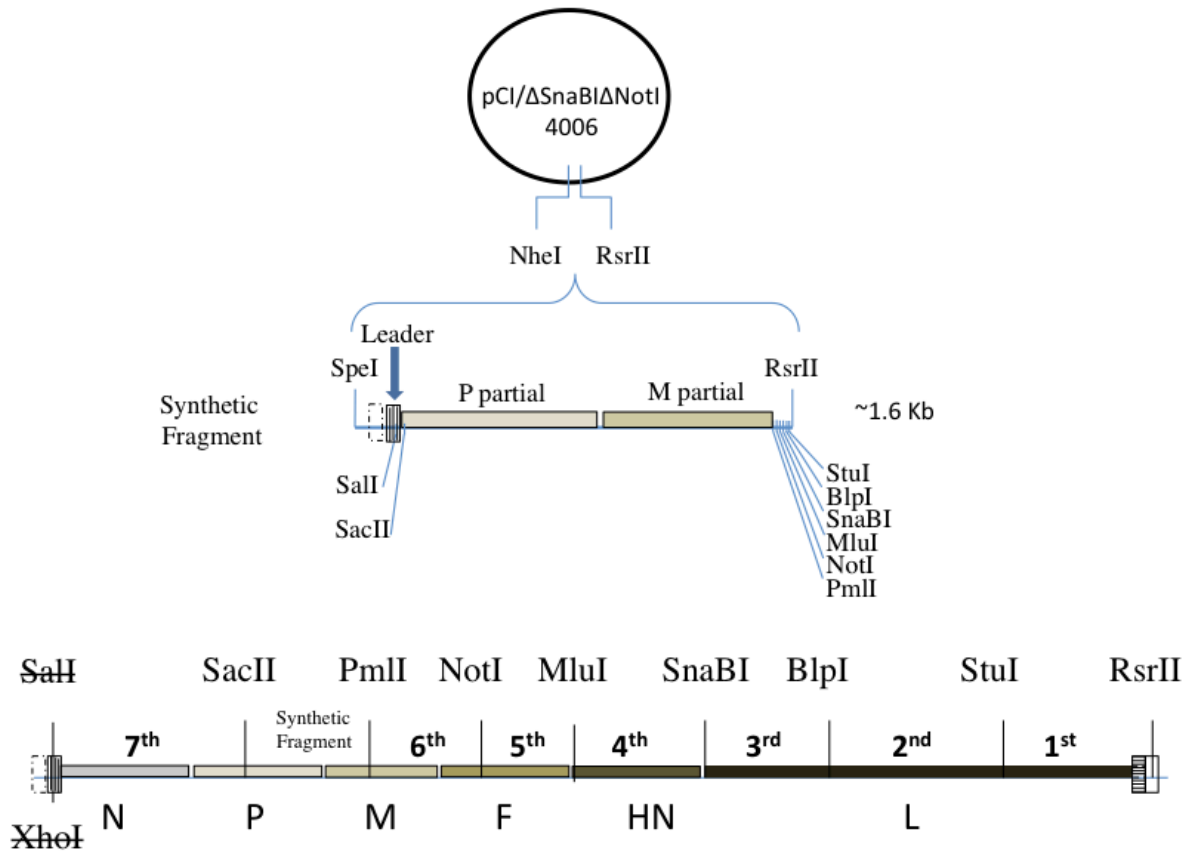
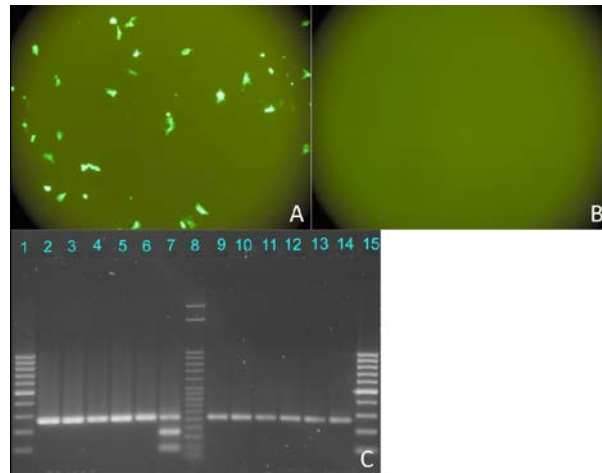


Figure 2. Fluorescence microscopy of VERO cells (200x) 36h post-transfection, co-transfected with plasmids prNDV-Mini, pCIneo-NP, pCIneo-P and pCIneo-L (A), whereas no fluorescence was detected in negative control without plasmid pCI-L4 (B). Product from RT-PCR with primers ForRsr and RevRsr, digested with RsrII (lane 2 to 7) and no digested (lane 9 to 14). Samples from lanes 2 to 6 are rNDV-PE18 virus samples recovered and lane 7 was NDV-PE. Lane 1 and 15, Fermentas 100pb marker. Line 8, Novagen 50pb marker (C).



A FOUR-CYCLE PEN STUDY COMPARING HISTOLOGICAL SCORES OF COCCIDIA VACCINATED BROILERS ON FEEDS WITH OR WITHOUT SUPPLEMENTATION OF BACITRACIN METHYLENE DISALICYLATE OR VIRGINIAMYCIN

UN ESTUDIO DE CORRALES DE CUATRO CICLOS COMPARANDO LAS CALIFICACIONES DE LESIONES HISTOLÓGICAS DE POLLOS DE ENGORDA VACUNADOS CONTRA COCCIDIA, CON ALIMENTOS CON O SIN SUPLEMENTACIÓN DE BACITRACINA SALICILATO DE METILO O VIRGINIAMICINA

K. Cookson^A, F. Hoer^B, S. Davis^C, D. Bade^D, J. Schaeffer^A, and M. LaVorgna^A

^A Zoetis Poultry, Durham, NC

^B Veterinary Diagnostic Pathology, LLC, Auburn, AL

^C Colorado Quality Research, Wellington, CO

^D Microbial Research, Inc. Fort Collins, CO

RESUMEN

Se vacunaron 540 pollos de engorda *in ovo* contra coccidia, fueron divididos en uno de tres corrales grandes adyacentes que representaban a diferentes tratamientos de alimentación hasta los 45 d de edad, para un total de cuatro ciclos de engorda. Las primeras parvadas se iniciaron en virutas de madera frescas y las parvadas siguientes se colocaron en la cama usada. A intervalos semanales comenzando en el d siete, se eliminaron al azar 10 aves de cada corral. El análisis histológico se realizó en las secciones del duodeno y el yeyuno de cada muestra intestinal, que se identificó a ciegas como tratamiento de alimentación 1, 2 o 3. Todos los alimentos del tratamiento 1 contenían 50g / T BMD, los alimentos del tratamiento 2 contenían 20 g / t de virginiamicina, mientras que los alimentos del tratamiento 3 no contenían ningún antibiótico. Las puntuaciones de las lesiones por coccidia se compararán entre los tratamientos y sobre los cuatro ciclos.

SUMMARY

Five hundred forty commercial broilers were vaccinated *in ovo* for coccidia then divided into one of three large adjoining pens, representing different feed treatments, to 45 d of age for a total of four growout cycles. The first flocks were started on fresh wood shavings, then subsequent flocks were placed on the used litter. At weekly intervals starting at d seven, ten birds were randomly removed from each pen. Histological analysis was performed on duodenum and jejunum sections of each intestinal sample, which was identified blindly as feed Treatment 1, 2 or 3. Treatment 1 feeds all contained 50g/T BMD, Treatment 2 feeds contained 20 g/T Virginiamycin while Treatment 3 feeds contained no antibiotic. Coccidia lesion scores will be compared between treatments and over all four cycles.

INTRODUCTION

Coccidia vaccination is used by some broiler operations as part of an overall coccidiosis management strategy. A study was undertaken to compare various intestinal health parameters of broilers vaccinated for coccidia and fed commercial diets with or without either Bacitracin Methylene Disalicylate (BMD) or Virginiamycin (Stafac) over four consecutive growout cycles (Master Study 7-12-7AMVG, Zoetis). The focus of this paper is on the relative coccidia cycling—based on histological evaluation—in birds on the different feed regimens and the potential impact this may have had on bird performance.

MATERIALS AND METHODS

A total of 540 Cobb 500 males were vaccinated *in ovo* with Inovocox® EM1 and placed into a room containing three large floor pens (15' x 6'). Each side-by-side pen was started on fresh wood shavings that were spray inoculated with a known pathogenic strain of *Clostridium perfringens* (CP) (CL-15). All birds received starter (0-17d), grower (17-30d) and finisher feeds (30-45d) and pens only differed by the following supplementation in each diet: BMD at 50g/ton, Stafac at 20g/ton or None. At weekly intervals, 10 birds were randomly removed from each pen and a one inch section of the bottom loop of duodenum and jejunum proximal and including Meckel's diverticulum were placed in formalin for later analysis. Birds were weighed and feed metered at termination of each cycle (45 d of age). After a two wk downtime, another group of 540 Cobb 500 males were EM1 vaccinated and placed in their respective pens on the built-up litter—for a total of four consecutive growout cycles.

A single section of each tissue was cut, processed and examined histologically. Scoring of *Eimeria* oocyst load of duodenum and jejunum was as follows. Individual samples were scored for the presence of *E. acervulina* or *E. maxima* using a 4-point lesion score system based on the pathologist's experience of clinical significance: Normal (1), Mild (2), Moderate (3) and Severe (4). *E. acervulina* scoring criteria were 1= no clusters; 2= 1-2 clusters; 3= 3-4 clusters; 4= 5 or more clusters. *E. maxima* scoring criteria were 1= 0-2 coccidia; 2= 3-30 coccidia; 3=31-100 coccidia; 4= >100. A group coccidia index score was also generated for each 10-bird sample by averaging the individual duodenum and jejunum scores, adding them together and subtracting 2. In this manner, a group of all normal or 1 scores will generate a total coccidia index baseline score of 0.

RESULTS

Statistical analysis was not applied to these results, so differences are descriptive only. Overall, there was very little coccidia activity above baseline levels prior to four wk of age. Over the 4-cycle period, oocyst production tended to be greatest at four and five wk (see Table 1). Numerically, Stafac birds tended to have the highest activity of coccidia lesions, followed by Controls and then BMD birds. This can be seen in average lesions scores, as well as in the percentage of birds that scored either three or four grade lesions. Because the *Eimeria* were speciated in both the duodenum and jejunum sections, the percentage of birds with *E. maxima* infections of both duodenum and jejunum could also be tabulated. Again, the incidence of both sites being infected was highest in Stafac birds followed by Controls and, finally, BMD treatments. Comparing total lesion scores and peak 3-4 scores by each cycle (see Table 2), Stafac birds tended to show the highest activity levels based on both total scores and percentage of birds with moderate to severe lesion scores. The greatest disparity between Stafac birds and the other two groups occurred in coccidia lesion scores in the second growout cycle. Here, the total coccidia index scores were 4.2 in Stafac birds (vs. 1.7 in Control and 1.1 in BMD groups) and peak 3-4 lesion scores reached as high as 70% (vs. 10% in Control and 20% BMD groups). This was also the only cycle where Stafac birds did not have at least 1 point lower FCR than the Controls.

DISCUSSION

It was somewhat surprising that such differences in coccidia vaccine load were seen between these three treatments—especially considering that neither BMD nor Stafac have any mechanism of action against coccidia. Therefore, we can only speculate that the differences between treatments were due to either subtle differences in the pen conditions and/or litter environments (pens were place side-by-side in the same building but there were no replicates) or perhaps differences in the intestinal environments. In fact, significant differences in gut microflora diversity were seen in this study (see Neumann et al paper in these same proceedings) based on PCR analysis. As for the lack of replication, accurately measuring performance was not a major goal of this four growout study but we did want to create a larger single living space in an attempt to more closely mimic commercial conditions for each treatment. Still, it is worth noting that Stafac and BMD flocks had at least 1 point lower FCR in each growout cycle—with one exception—and the differences were greatest on built-up litter (Cycles 3 and 4). The one exception where Stafac birds did not perform at least 1 point better on FCR vs. Controls was in the second growout—which also happens to be when coccidia lesions were the most severe in this or any group. While it may be possible for light infections to be missed by sampling only one section of duodenum or jejunum histologically, this scoring technique was able to demonstrate differences in severity of infections that may translate into performance differences. In this particular study, any intrinsic advantages of using Stafac vs. Controls may have been lost in Cycle 2 when coccidia cycling exceeded a particular threshold.

Table 1. 4-Cycle averages of key weekly histological *Eimeria* score criteria.

Treatment Group	Lesion Score (average of 4 growout cycles)			Percentage of birds with Moderate to Severe Lesion Scores (3-4)			Percentage of birds with <i>E.</i> <i>maxima</i> scores >1 in both Duodenum & Jejunum		
	4 wks	5 wks	6 wks	4 wks	5 wks	6 wks	4 wks	5 wks	6 wks
BMD	0.25	0.48	0.28	5	8	3	0	3	0
Stafac	1.45	1.15	0.35	30	15	0	25	20	10
Controls	0.88	0.75	0.28	10	10	3	8	5	5

Table 2. Key average histological *Eimeria* score criteria by growout cycle.

Treatment Group	Total Coccidia Index Lesion Score (sum of all weeks)				Peak Percentage of Moderate to Severe Lesion Scores (3-4)			
	Cycle 1	Cycle 2	Cycle 3	Cycle 4	Cycle 1	Cycle 2	Cycle 3	Cycle 4
BMD	1.2	1.1	1.4	0.4	10	20	10	10
Stafac	2.9	4.2	2.6	2.3	20	70	40	40
Controls	1.4	1.7	3.2	1.3	0	10	30	10

BIODISPONIBILIDAD DE FÓSFORO EN POLLOS DE ENGORDA ALIMENTADOS CON GRANOS SECOS DE DESTILERÍA CON SOLUBLES BAJOS EN ACEITE

BIOAVAILABILITY OF PHOSPHORUS IN BROILERS FED DISTILLERS DRIED GRAINS WITH SOLUBLES (DDGS) LOW IN OIL

C.A. Cortes^A, E.S. Ramírez^A, C.C. López^B, M.J. Arce^C y G.E. Avila^A

^ACentro de Enseñanza, Investigación y Extensión en Producción avícola, Facultad de Medicina veterinaria y Zootecnia, Universidad Nacional Autónoma de México

^BDepartamento de Producción Animal: Aves, Facultad de Medicina veterinaria y Zootecnia, Universidad Nacional Autónoma de México

^CUniversidad Michoacana de san Nicolás de Hidalgo FMVZ

Summary

In order to evaluate the bioavailability of phosphorus in two samples of low oil DDGS (A and B) with respect to a commercial Mono-phosphate (FMD) in chickens from 7 – 21 d of age, a study was conducted with 210 chickens distributed in seven treatments with three replicates of ten birds each. The bioavailability of phosphorus was estimated by the gradients comparison methodology. The results of ash in tibia and tibia resistance increased linearly ($P < 0.01$) as dietary phosphorus from FMD or from DDGS increased. By comparing the gradients of ash percentage in tibia and resistance in chickens fed DDGS A or B, with the gradient of FMD considered 100% available, phosphorus bioavailability were obtained from ash in tibia of 72% and 86% and for tibia resistance of 87% and 73% in DDGS A and B respectively.

RESUMEN

Actualmente, la gran mayoría de las plantas productoras de etanol, remueven el aceite a partir de los solubles de destilería condensados del maíz al final del proceso mediante centrifugación para la obtención de biodiesel, esto trae como consecuencia la generación de un nuevo co-producto llamados “DDGS extractados en aceite”. Este co-producto tiene menor contenido de grasa y ligeramente mayor concentración de proteína y otros nutrientes contenidos en los DDGS convencionales. Sin embargo, el conocimiento sobre la biodisponibilidad de fósforo de este nuevo ingrediente es escasa. Con la finalidad de estudiar la biodisponibilidad de fósforo (P_i) de dos muestras de DDGS (A y B) bajos en aceite (6.54 y 5.39%), en relación a un fosfato monodivalente (FMD), se realizó un experimento en pollos de engorda en crecimiento. Se utilizaron 210 pollos machos de 7 a 21 días de edad de la estirpe Ross 308, distribuidos aleatoriamente en 21 pisos con siete tratamientos de tres repeticiones con 10 aves cada uno. El contenido de fósforo de las muestras de DDGS A y B, se emplearon para el cálculo de la cantidad a utilizar de DDGS, para cubrir el porcentaje de fósforo empleado (0.05 y 0.10%) a partir de una dieta deficiente en fósforo (0.14%), las dietas experimentales fueron:

- 1) Dieta basal sorgo-pasta de soya con 0.14% de P_i
- 2) Como 1 + 0.05% de fósforo de FMD
- 3) Como 1 + 0.10% de fósforo FMD
- 4) Como 1 + 0.05% de fósforo a partir de DDGS A
- 5) Como 1 + 0.10% de fósforo a partir de DDGS A
- 6) Como 1 + 0.05% de fósforo a partir de DDGS B
- 7) Como 1 + 0.10% de fósforo a partir de DDGS B

Los resultados para ganancia de peso, consumo de alimento, conversión alimenticia y porcentaje de cenizas en tibias mejoraron linealmente ($P < 0.01$) con la suplementación de fósforo en la dieta de FMD o de DDGS A y B. Los porcentajes de cenizas en tibias y el consumo de fósforo se explicaron por medio de la ecuación $Y = 27.614 + 0.007x_1 + 0.005x_2 + 0.006x_3$; en donde X_1 correspondió a la suplementación de FMD como fuente de fósforo (T1, T2 y T3), X_2 a los DDGS A (T1, T4 y T5) y X_3 a los DDGS B (T1, T6 y T7). Al comparar las pendientes del porcentaje de cenizas de los DDGS A y B con los del FMD considerado como 100% disponible, se obtuvieron

biodisponibilidades de fósforo de 86% y 72% para los DDGS A y B respectivamente. Los resultados obtenidos en el presente estudio con dos muestras de DDGS bajos en aceite (A y B), con 0.85 y 0.94% de P total, indicaron una biodisponibilidad de fósforo del 86 y 72% respectivamente.

PATHOGENESIS OF TWO VARIANT REOVIRUSES FROM CLINICAL CASES OF TENOSYNOVITIS

PATOGÉNESIS DE DOS VARIANTES DE REOVIRUS DE CASOS CLÍNICOS DE TENOSINOVITIS

E. Dale, H. Sellers, and E. Linnemann

Poultry Diagnostic and Research Center, Department of Population Health, College of Veterinary Medicine, University of Georgia, 953 College Station Road, Athens, GA 30602-4875

RESUMEN

Dos aislamientos de campo de reovirus antigénicamente diferentes se evaluaron para la patogenicidad y la inmunosupresión. Los aislamientos procedían de casos de diagnóstico en el Sureste de Estados Unidos, y fueron antigénicamente distintos de las cepas vacunales y entre sí. El aislamiento de campo 94594 se propagó en células de hígado de embrión de pollo y se tituló a una dosis de desafío de 10^3 TCID₅₀/ave; posteriormente se inoculó a través del cojinete plantar en aves libres de patógenos específicos de un día de edad. Las aves se evaluaron para detectar signos clínicos, supresión del peso corporal y lesiones macroscópicas e histológicas. Se observaron lesiones macroscópicas e histológicas compatibles con reovirus. El aislamiento de campo 96139 se propagó en células de hígado de embrión de pollo y se tituló a una dosis de prueba de 10^3 TCID₅₀/ave; posteriormente se inoculó a través del cojinete plantar en pollos de engorda comerciales de un día de edad. La serología se realizó para evaluar la protección materna. Las aves se evaluaron para detectar signos clínicos, supresión del peso corporal y lesiones macroscópicas e histológicas. Se observaron supresión de peso y lesiones histológicas consistentes con reovirus.

SUMMARY

Two antigenically distinct reovirus field isolates were evaluated for pathogenicity and immunosuppression. Isolates were from diagnostic cases in the south eastern United States and were antigenically distinct from vaccine strains and each other. Field Isolate 94594 was propagated in chicken embryo liver cells and titrated to a challenge dose of 10^3 TCID₅₀/bird, then inoculated via foot pad into one d old specific pathogen free birds. Birds were evaluated for clinical signs, body weight suppression, gross and histological lesions. Gross and histological lesions consistent with reovirus were observed. Field Isolate 96139 was propagated in chicken embryo liver cells and titrated to a challenge dose of 10^3 TCID₅₀/bird, then inoculated via foot pad into one d old commercial broilers. Serology was performed to assess maternal protection. Birds were evaluated for clinical signs, body weight suppression, gross and histological lesions. Weight suppression and histological lesions consistent with reovirus were observed. The full length article will be published in *Avian Diseases*.

INTRODUCTION

Recognized in commercial poultry worldwide, avian reovirus, a non-enveloped double stranded RNA orthoreovirus, causes viral arthritis. It is also associated with many other disease syndromes although it may be found in both sick and healthy birds alike. Infection and clinical disease is highly dependent on host immunocompetency and age (young are more susceptible), route of infection, and pathotype of the virus (1,2). Birds may be infected horizontally via the fecal-oral route in contaminated environments and via vertical transmission.

In cases of viral arthritis, lameness is observed due to edema of the tarsal and metatarsal tendon sheaths, hock swelling due to exudate, severe arthritis, and occasionally tendon rupture. Epicardial petechiae, pericarditis and hydropericardium are also commonly observed. Although morbidity is high and mortality is generally low, stunted growth and poor uniformity continue to compromise flock performance even after recovery. In breeders, decreased egg production, hatchability, and fertility issues may be observed, in addition to transmission of the virus to progeny; all of which may cause considerable economic losses to producers (3,4).

Viral arthritis in chickens is typically controlled through vaccination of breeders with modified live or inactivated vaccines, most often with vaccines derived from the S1133 strain, to provide for transfer of maternal

derived antibodies to progeny (3). Although some cross protection between the numerous heterologous serotypes may exist, protection is not complete and antigenic variants may cause disease in progeny from vaccinated breeders, necessitating the use of autogenous vaccines for protection. The Sigma C protein, a minor outer capsid protein, encoded on the S1 gene, elicits neutralizing antibodies and is the target for genetic sequencing and genotyping of the virus (3).

Since 2011, a rise in clinical cases of tenosynovitis has occurred in the United States. Reoviruses were isolated from tendons, synovial fluid, livers and hearts in numerous clinical cases of viral arthritis. Characteristic cytopathic effect in primary chicken embryo liver cell cultures and lesions in specific pathogen free (SPF) embryos were observed. Reverse transcriptase-polymerase chain reaction (RT-PCR) amplification of Sigma C with subsequent sequencing followed by analysis revealed that the isolates grouped into two unique phylogenetic groups. Group 1 exhibited 48% similarity and Group 2 showed 80% amino acid similarity with vaccinal strains of reovirus. The two groups share only 50% amino acid similarity with each other. Serologic evaluation revealed no neutralization with vaccine strain S1133 antisera and no neutralization of Group 2 with Group 1 antisera. Given the novel nature of the isolates and the generally poor correlation between genotype and pathotypes, biological characterization of representative isolates from the two genotypes was pursued with *in vivo* pathogenicity studies.

MATERIALS AND METHODS

Group 1 pathogenicity and immunosuppression study. Isolate 94594 was selected as a representative isolate from Group 1, was propagated and titrated in primary chicken embryo liver cell cultures, and diluted to a challenge dose of 10^3 TCID50/bird. Twenty, one d old SPF chicks were divided into two groups of ten. One group, designated as the negative controls, was sham-inoculated subcutaneously with 0.05mL of sterile PBS in the left foot pad. The second group of ten SPF one d old chicks was inoculated subcutaneously with 0.05mL of 10^3 TCID50 isolate 94594 in the left foot pad. Footpad measurements were taken prior to inoculation and every four d for the duration of the study. Birds were observed daily for development of clinical signs and mortality. On d seven post challenge, five birds from each group were humanely euthanized and necropsied; footpad, hock, and weight measurements were taken along with heart, liver, spleen, duodenal loop, bursa, thymus, Harderian gland, and tendon samples for histological evaluation. Birds were carefully examined for the presence of macroscopic lesions and hocks were examined for swelling, hemorrhage and/or rupture. On d 12 post inoculation, the study was terminated and all remaining birds were humanely euthanized and necropsied following the same procedure.

Birds challenged with the Group 1 isolate 94594 exhibited a 13% weight suppression compared with the negative controls; however clinical signs of tenosynovitis were not observed. Upon necropsy, several challenged birds had pale hearts, hydropericardium, and discolored lesions in the foot pads. Mild to moderate histological changes consistent with reovirus were seen first in the epicardium five days post inoculation, and in the tendons and epicardium ten d post inoculation. Histological changes suggest mild disease, however evidence of immunosuppression was not observed during the 14 d duration of the study.

Group 2 pathogenicity and protection study. Isolate 96139 was selected as a representative isolate from Group 2, was propagated and titrated in primary chicken embryo liver cell cultures, and diluted to a challenge dose of 10^3 TCID50/bird. Thirty, d old commercial chicks from vaccinated breeders were divided into three groups of ten. Ten birds were bled for day of hatch serology with IDEXX ELISA to measure maternal antibody protection against reo virus. Ten chicks, designated as negative controls, were sham-inoculated subcutaneously with 0.05mL of sterile PBS in the left foot pad. Ten chicks were inoculated subcutaneously with 0.05mL of 10^3 TCID50 isolate 96139 in the left foot pad. Footpad measurements were taken prior to inoculation and every four d through completion of the study. Birds were observed daily for development of clinical signs and mortality. On d 14 post challenge all birds were humanely euthanized and necropsied; footpad, hock, and weight measurements were recorded along with heart, liver, and tendon samples taken for histological evaluation. Birds were examined also for any macroscopic lesions and hocks were examined for swelling, hemorrhage and/or rupture.

Day of hatch serology revealed highly variable (CV of 66.8%) and overall low levels (GMT of 385) of maternal antibody to reovirus. Birds challenged with the Group 2 isolate 96139 failed to develop any overt clinical signs during the course of the 14 d study. However, weight suppression was observed in challenged birds compared with the negative controls. Mild to moderate histological changes consistent with reovirus were observed in the tendons and epicardium of the challenged birds. Although the Group 2 reovirus isolate did not exhibit the expected level of pathogenicity in these relatively unprotected birds, the subtle changes seen histologically and in the growth of the birds may indicate development of subclinical disease.

REFERENCES

1. Jones, R. C. and K. Georgian. 1984. Reovirus-induced tenosynovitis in chickens: The influence of age at infection. *Avian Pathol* 13:441—457.
2. Roessler, D. E. and J. K. Rosenberger. 1989. In vitro and in vivo characterization of avian reoviruses. III. Host factors affecting virulence and persistence. *Avian Dis.* 33:555—565.
3. Jones, R.C. 2008. Viral arthritis. In *Diseases of Poultry, 12th ed.* A.M. Fadly, J.R. Glisson, L. R. McDougald, L.K. Nolan, D.E. Swayne, and Y. M. Saif, eds. Blackwell Publishing; Oxford, UK, 309-322.
4. Van der Heide, L. 2000. The history of avian reovirus. *Avian Dis.* 44:638—641.

EFEECTO DE LA DIFERENCIA DE TEMPERATURA AMBIENTAL Y DEL PISO SOBRE LA GANANCIA DE PESO CORPORAL Y MORTALIDAD EN POLLOS DE ENGORDA A LOS ONCE DÍAS

EFFECT OF ROOM AND FLOOR TEMPERATURE DIFFERENCE ON BODY WEIGHT GAIN AND MORTALITY IN 11-DAY-OLD BROILERS

M. Díaz y L. Quintana

Departamento de Medicina y Zootecnia de Aves, Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia,
Universidad Nacional Autónoma de México, México DF

SUMMARY

The present field study was carried out in a central state of Mexico during winter in a natural environment broiler chicken farm, in which 60,000 Ross 308 female chicken distributed in six sheds were housed. During a period of 11 d, minimum and maximum room and floor temperatures were registered every two hours using an environmental digital thermometer and a surface thermometer (laser). Chickens were weighed three times: at arrival and on d 7 and 11, and mortality in that period was also registered. The discussion is centered on the importance of measuring the floor temperature as an important parameter, which could be even more significant than room temperature and how temperature variations affect body weight gain and mortality in broiler chickens.

RESUMEN

Trabajo de campo realizado en un estado del centro de la República Mexicana, en el periodo de invierno; en una granja de ambiente natural en aparcería de pollo de engorda, en la cual se alojaron 60,000 hembras Ross 308 distribuidas en 6 casetas. Durante un periodo de 11 días se midieron las temperaturas máximas y mínimas ambientales y de piso, cada dos horas, utilizando como instrumento de medición un termómetro digital ambiental y un termómetro de superficie (laser). Se realizaron cuatro pesajes al pollo: al día de llegada, al quinto, séptimo y al onceavo día de edad y se hizo un registro de la mortalidad en ese periodo. La discusión se centra en la importancia de la medición de la temperatura de piso como parámetro fundamental pudiendo ser éste aún más significativo que la temperatura ambiental y como las variaciones de temperaturas afectan en la ganancia de peso corporal y mortalidad en el pollo de engorda.

INTRODUCCIÓN

Las gallinas son animales incapaces de regular su propia temperatura corporal durante los primeros 12 a 14 días de edad aproximadamente, por lo que esta primera etapa de adaptación del ave a su nueva morada es crítica, debe hacerse mucho énfasis en el control de las temperaturas y más en casetas de ambiente natural en zonas frías. Generalmente se lleva a cabo la medición de la temperatura ambiental, y se pasa por alto el monitoreo de la temperatura del piso, considerando que la crianza de pollo de engorda se realiza en suelo.

En la crianza de pollo de engorda, la ganancia de peso diario es de las metas más relevantes, de tal manera que, en algunos casos, se mide la ganancia de peso por hora y el índice de productividad (IP) de una parvada (6). Que hace años se propuso un valor de 300 puntos a la séptima semana, índice que fue visto como un imposible; mismo valor que en la actualidad ha quedado sobre estimado con respecto a los nuevos rendimientos obtenidos.

La mortalidad es un parámetro que diariamente se monitorea para ir evaluando el comportamiento de una parvada, sin considerar que no siempre una mortalidad baja es sinónimo de futuros buenos resultados.

OBJETIVO

Demostrar como la temperatura de piso no es siempre la misma que la temperatura ambiental; cuando aquella es menor, genera un enfriamiento del pollo, que repercute en la ganancia de peso.

MATERIALES Y MÉTODOS

El estudio se efectuó en una granja comercial de tipo aparcería, situada en el estado de San Luis Potosí, la cual aloja 60,000 pollos de engorda al ciclo (hembras) de la estirpe Ross 308, distribuidas en 6 casetas de ambiente natural.

El peso y la calidad del pollito son variables que no se pudieron controlar, por lo que se realizó un pesaje al día de recepción de 300 pollos por caseta, en el siguiente cuadro se muestra el promedio de peso por caseta (Cuadro 1).

Se evaluaron los pollos con el modelo de calificación de pollito recién nacido (6). Con el fin de constatar la calidad del pollito recibido, se calificaron 10 pollos por caseta y los resultados promedios se muestra en el siguiente cuadro (Cuadro 2).

La calificación fue de 180, que para algunos autores la calidad del pollo se encuentra dentro del límite inferior de “buena”.

Se contabilizó la mortalidad de cada caseta (Cuadro 3) y se realizaron necropsias para saber la causa de la muerte, las cuales fueron: deshidratación, ascitis, pisados, sin causa aparente, infección del saco vitelino y onfalitis.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

No se ha aprovechado al máximo el potencial genético de las aves, al contar con manejos obsoletos, falta de termómetros en casetas, altas densidades, mal uso de los fármacos y falta de aislamiento térmico (1), provocando un aumento considerable en el índice la conversión alimenticia (5).

Durante el experimento se efectuaron 4 pesajes, los cuales se realizaron: a la recepción, al quinto, noveno y onceavo día de edad, con el fin de llevar un control más confiable. Durante 10 días se monitoreó la temperatura de piso con un termómetro de superficie (láser) y la temperatura ambiental con un termómetro digital, se registraba las mediciones con intervalos de 2 horas. En el estudio (Cuadros 4, 5, 6 y 7) se identificaron los rangos máximos y mínimos, para comparar la relación de variaciones de temperatura con la falta de ganancia de peso en las aves (4).

El manual de producción (2) indica que la temperatura del piso de la caseta debe ser de 28 a 30° C al día de recepción, alrededor de 2° menos que la temperatura ambiental, se observa que el primer día (Cuadro 4), la caseta 3 tuvo una temperatura 5° por debajo de lo recomendado, sin embargo, no fue la caseta con mayor mortalidad al final del estudio (Cuadro 3); se debe considerar que las zonas más vulnerables al enfriamiento son la cara y las piernas del pollo (3).

A pesar del aislamiento al techo, no fue suficiente para controlar la variación de temperaturas ambientales y de piso (Cuadro 5), al no tener una cama apropiada; se observan temperaturas de hasta 15°C en el piso, mismas que enfriaron al pollo y provocaron un alto parámetro en el índice de conversión alimenticia (7).

Para el séptimo día, los pesos que se obtuvieron se encuentran por debajo del estándar (2), por ejemplo: la caseta 1 es la que contaba con los pollos más pesados al día de la recepción (Cuadro 4), por lo que se esperaba un peso de 160 gramos en promedio para esta caseta al séptimo día y no resultados de 129 gramos, y que presentó las temperaturas más bajas al quinto y séptimo día (Cuadro 5 y 6).

Al día once de edad (Cuadro 7) se tuvo un déficit de 40 gramos en promedio, lo que indicó que existe un retraso de 3 días con respecto a la ganancia de peso que establece el manual de la estirpe (2). Esta falta de ganancia de peso afecta el día en que se esperaba enviar al mercado a las aves, lo que implica un aumento en el consumo de alimento que directamente se reflejará en los costos.

Los resultados de mortalidad (Cuadro 3) para el día 11 indica que se esperaban buenos resultados al final del ciclo, al tener el 0.7% de mortalidad hasta ese momento; parámetro que se encuentra dentro del rango óptimo (2). Las casetas que tuvieron las menores temperaturas durante el estudio, reflejan los menores pesos (Cuadro 7), cuando al inicio eran las que tenían las parvadas más pesadas (Cuadro 4).

CONCLUSIONES

La temperatura del piso debe considerarse una herramienta más importante que la temperatura ambiental y no debería existir más de dos grados de diferencia entre ambas.

AGRADECIMIENTOS

Agradecemos al MVZ Óscar Flores Flores por su apoyo y asesoría en el desarrollo de este estudio de campo.

REFERENCIAS

1. Agrinews Equipos, 2014. La temperatura, esencial para el rendimiento en granjas avícolas. Dirección: URL: http://agrinews.es/2014/01/14/temperatura-esencial-rendimiento-avicola/?utm_source=Avicultura+General&utm_campaign=d1a20cb564-Calefacci_n_av cola_copy_02_1_15_2014&utm_medium=email&utm_term=0_e7b1ab2154-d1a20cb564-78403673.
2. Aviagen. Ross 308 Broiler Objetivos de rendimiento. 2012.
3. D. Shinder, M. Rusal, J. Tanny, S. Druyan, and S. Yahav, 2007. Thermoregulatory Responses of Chicks (*Gallus domesticus*) to Low Ambient Temperatures at an Early Age. *Br. Poultry Science* 86:2200–2209.
4. H. van den Brand ,I R. Molenaar , I. van der Star , and R. Meijerhof, 2010. Early feeding affects resistance against cold exposure in young broiler chickens. *Br. Poultry Science* 89 :716–720 doi: 10.3382/ps.2009-00432.
5. J. D. May2 and B. D. Lott, 2000. The Effect of Environmental Temperature on Growth and Feed Conversion of Broilers to 21 Days of Age. *Br. Poultry Science* 79:669–671.
6. Quintana J.A. Avitecnia manejo de las aves domésticas más comunes. 4ª ed. México: Trillas, 2011.
7. Rolvid Ramírez, Yngrid Oliveros, Rosanna Figueroa y Valentina Trujillo, 2005. Evaluación de algunos parámetros productivos en condiciones ambientales controladas y sistema convencional en una granja comercial de pollos de engorde. *Revista Científica*, febrero, año/vol. XV, número 001 Universidad del Zulia Maracaibo, Venezuela pp. 49-56.

Cuadro 1. Peso en gramos a la recepción de los pollos.

No. de Caseta	Peso al 1° día en g.
1	40
2	39
3	42
4	38
5	37
6	37
Promedio	38.8

Cuadro 2. Modelo de calificación de pollito recién nacido.

POLLOS	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	TOTAL
Ombligos	2	2	2	1	2	2	2	1	1	1	16
	Bien cerrado=2			Entreabierto=1			Abierto sin plumón =0				
Deshidratación	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	20
	Nula=2			Intermedia=1			Franca=0				
Peso Corporal	1	1	1	1	1	1	1	1	0	0	8
	>42g=2			38 a 42g=1			<38g=0				
Apariencia	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	20
	Vivo=2			Deprimido=1			Muy deprimido=0				
Patas	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	20
	Aceradas=2			Articulación rojiza=1			Enrojecidas=0				
Cloaca	2	2	1	2	1	2	2	2	2	2	18
	Limpia=2			Húmeda=1			Pastosa=0				
Ojos	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	20
	Abiertos, redondos=2			Entreabiertos=1			Alargados=0				
Patas y/o Dedos	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	20
	Normales=2			Ligeramente torcidos=1			Francamente torcidos=0				
Abdomen	2	2	1	2	1	2	2	2	2	2	18
	Suave y reducido=2			Medio Abultado=1			Abultado y duro=0				
Hora de llegada y pollitos muertos	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	20
	Programada y todos vivos=2			Ligeramente tarde y/o 50 muertos			Más de 3 horas tarde y/o >50 muertos				

Cuadro 3. Porcentaje de mortalidad acumula en los días 1, 5, 7 y 11, de las 6 casetas.

Caseta	% Mortalidad día1	% Mortalidad día5	% Mortalidad día 7	% Mortalidad día 11
1	.15	.24	.38	.98
2	.16	.25	.35	.46
3	.19	.32	.46	.57
4	.16	.25	.55	.71
5	.03	.08	.40	.50
6	.04	.09	.31	.43
% Total acumulad en granja	0.12	0.20	.40	.70

Cuadro 4. Pesos, temperaturas máximas, mínimas y sus diferenciales al primer día.

CASETA	DIA	PESO CORPORAL G.	TEMPERATURAS				DIFERENCIAL DE TEMPERATURAS			
			MAX. AMB.	MAX PISO	MIN AMB.	MIN PISO	MAX AMB-MAX PISO	MIN AMB-MIN PISO	MAX AMB-MIN AMB	MAX PISO-MIN PISO
1	1	40	32	29	29	26	3	3	3	3
2	1	39	33	30	27	27	3	0	6	3
3	1	42	31	29	25	23*	2	2	6	6
4	1	38	32	28	27	24	4	3	5	4
5	1	37	32	30	30	25	2	5	2	5
6	1	37	33	30	30	25	3	5	3	5

Cuadro 5. Pesos, temperaturas máximas, mínimas y sus diferenciales al quinto día.

CASETA	DIA	PESO	TEMPERATURAS				DIFERENCIAL DE TEMPERATURAS			
			MAX. AMB.	MAX PISO	MIN AMB.	MIN PISO	MAX AMB-MAX PISO	MIN AMB-MIN PISO	MAX AMB-MIN AMB	MAX PISO-MIN PISO
1	5	83	30	26	24	15*	4	9	6	11
2	5	92	30	26	25	16	4	9	5	10
3	5	92	29	26	21	17	3	4	8	9
4	5	87	28	25	22	18	3	4	6	7
5	5	91	30	27	25	20	3	5	5	7
6	5	90	28	25	23	20	3	3	5	5

Cuadro 6. Pesos, temperaturas máximas, mínimas y sus diferenciales al séptimo día.

CASETA	DIA	PESO	TEMPERATURAS				DIFERENCIAL DE TEMPERATURAS			
			MAX. AMB.	MAX PISO	MIN AMB.	MIN PISO	MAX AMB-MAX PISO	MIN AMB-MIN PISO	MAX AMB-MIN AMB	MAX PISO-MIN PISO
1	7	129	30	27	27	23*	3	4	3	4
2	7	143	29	29	27	24	0	3	2	5
3	7	149	30	30	28	25	0	3	2	5
4	7	168	31	30	25	24	1	1	6	6
5	7	137	31	30	27	24	1	3	4	6
6	7	132	30	27	28	26	3	2	2	1

Cuadro 7. Pesos, temperaturas máximas, mínimas y sus diferenciales al onceavo día.

CASETA	DIA	PESO	TEMPERATURAS				DIFERENCIAL DE TEMPERATURAS			
			MAX. AMB.	MAX PISO	MIN AMB.	MIN PISO	MAX AMB-MAX PISO	MIN AMB-MIN PISO	MAX AMB-MIN AMB	MAX PISO-MIN PISO
1	11	228	28	26	28	26	2	2	0	0
2	11	248	31	29	27	25	2	2	4	4
3	11	257	28	26	28	22	2	6	0	4
4	11	240	28	26	27	26	2	1	1	0
5	11	228	29	26	27	25	3	2	2	1
6	11	224	31	29	27	25	2	2	4	4

EXPERIMENTAL INDUCTION OF BACTERIAL CHONDROSIS AND OSTEOMYELITIS (BCO) IN COMMERCIAL BROILERS USING *MYCOPLASMA SYNOVIAE*

INDUCCIÓN EXPERIMENTAL DE CONDROSIS Y OSTEOMIELITIS BACTERIANA (COB) EN POLLOS DE ENGORDA COMERCIALES UTILIZANDO *MYCOPLASMA SYNOVIAE*

V. Durairaj and N. Ferguson-Noel

Poultry Diagnostic & Research Center, Department of Population Health,
The University of Georgia, USA

RESUMEN

Aunque la condrosis y la ostiomielitis bacteriana (COB) se ven comúnmente en pollos de engorda de crecimiento rápido, la COB asociada con *Mycoplasma synoviae*, aún no ha sido reportada. Se ha observado un aumento en los índices de COB en pollos infectados con MS y el objetivo de este estudio es investigar la patofisiología del MS asociado con COB. Se dividieron en dos grupos, pollos de 45 días de edad- A (n=20) y B (n=25), y criados separadamente en dos casetas. A las tres semanas de edad, se inoculó el Grupo B con MS (con gota ocular e Intranasal), así como se aplicó la Vacuna IBV+NDV (por gota ocular). A las seis semanas de edad, los pollos del Grupo B se reinfectaron con MS (vía endovenosa y pediluvios). Diez días después, se sacrificaron los pollos y se les practicó la necropsia. Se realizaron evaluaciones tanto morfológica como histológicamente de las cabezas femorales. Los pollos infectados con MS tuvieron una mayor incidencia de COB comparados con los controles. La MS fue aislada de las cabezas femorales de pollos inoculados.

SUMMARY

Although bacterial chondrosis and osteomyelitis (BCO) is commonly seen in rapidly growing broilers, BCO associated with *Mycoplasma synoviae* (MS) has, so far, not been reported. We observed increased incidences of BCO in MS infected chickens and the objective of this study was to investigate the pathophysiology of MS associated BCO. Forty-five day-old broilers were divided into two groups – Group A (n=20) and Group B (n=25)- and raised in separate colony houses. At three weeks of age, Group B chickens were inoculated with MS (eyedrop and intranasal), along with IBV+NDV vaccine (eyedrop). At six weeks of age, Group B chickens were boosted with MS (intravenous and footpad). Ten d later, the chickens were necropsied. Morphological and histological evaluation of the femoral heads was performed. The MS inoculated chickens had higher incidences of BCO compared to the controls. MS was isolated from the femoral heads of inoculated chickens.

ABSTRACT

BCO (formerly called femoral head necrosis) causes significant economic losses in the poultry industry and is a welfare issue. BCO is more commonly seen in rapidly growing broilers and is caused by many factors including stress, husbandry practices, metabolic problems and infectious pathogens. Several infectious pathogens have been reported to be associated with BCO although there are no previous reports of BCO associated with MS. In earlier studies, we observed increased incidences of BCO associated with MS and so the objective of this study was to investigate the pathophysiology of BCO induced by MS. Forty-five day-old broilers were divided into two groups - Group A (n=20) and Group B (n=25) - and raised in deep litter system in separate colony houses under biosecure conditions. Chickens were provided with *ad libitum* feed and water. At two weeks of age, the chickens were wing banded and tracheal and blood samples (n=10) were collected and screened for *Mycoplasma gallisepticum* (MG) and MS by serum plate agglutination, hemagglutination inhibition, ELISA, culture and real-time PCR tests (3). All chickens were found to be free from MS and MG infection at that time. At three weeks of age, the chickens in Group A were inoculated with 100 µL (50 µL by eye drop + 50 µL by intratracheal route) of MS (K1968 14p) along with infectious bronchitis virus (IBV) and Newcastle Disease Virus (NDV) by eye-drop. The titer of the MS culture was

1.2 x10⁹ color changing units/mL (CCU/mL). At six weeks of age, Group B chickens were boosted with MS (K1968 17p) by intravenous route and footpad injection. At eight weeks of age, the chickens were bled and humanely euthanized using CO₂. Gentle pressure was applied to the femoral bone to separate it from acetabulum and scores were given based on the appearance and lesions on the proximal head of the femur (1,2). Femoral head samples were collected in 10% buffered neutral formalin for histopathological evaluation. The MS inoculated chickens had severely eroded growth plates with hemorrhagic streaks. BCO femoral heads had few irregularly arranged chondrocytes in the prehypertrophic and proliferating zone. Higher numbers of BCO with severely damaged femoral head were seen in the MS inoculated group. All blood samples collected at the time of necropsy were serologically positive for MS. MS was isolated from the femoral heads of inoculated chickens. This is the first report on the isolation of MS from the femoral head in an experimental study. Based on these results, BCO can be induced in chickens by MS infection. Further studies need to be conducted to study mechanism of MS invading the femoral head and causing BCO.

REFERENCES

1. Durairaj, V., F. D. Clark, C.C. Coon, W. E. Huff, R. Okimoto, G. R. Huff, and N. C. Rath. Effects of high fat diets or prednisolone treatment on femoral head separation in chickens. *Br Poult Sci.* 53:198-203. 2012.
2. Durairaj, V., R. Okimoto, K. Rasaputra, F. D. Clark, and N. C. Rath Histopathology and serum clinical chemistry evaluation of broilers with femoral head separation disorder. *Avian Dis.* 42:21-25. 2009.
3. Kleven, S. H. Mycoplasmosis. In: A laboratory manual for the isolation, identification and characterization of avian pathogens, 5th ed. L. Dufour-Zavala, D. E. Swayne, J. R. Glisson, J. E. Pearson, W. M. Reed, M. W. Jackwood, and P. R. Woolcock, eds. American Association of Avian Pathologists, Jacksonville, FL. 59–64. 2008.

(The full length article will be published in *Avian Diseases*.)

FIELD INVESTIGATION OF *MYCOPLASMA SYNOVIAE* OUTBREAKS IN COMMERCIAL BROILER BREEDERS IN GEORGIA

INVESTIGACIÓN DE CAMPO DE BROTES DE *MYCOPLASMA SYNOVIAE* EN REPRODUCTORES DE POLLO DE ENGORDA COMERCIAL EN GEORGIA

V. Durairaj^A, R. Wooten^A, P. Black^A, L. Chapel^B, and N. Ferguson-Noel^A

^A Poultry Diagnostic and Research Center

^B Georgia Poultry Laboratory Network

The University of Georgia

RESUMEN

El *Mycoplasma synoviae* (MS) causa pérdidas económicas significativas en la industria avícola a nivel mundial. En este estudio se detallan las investigaciones de campo de MS que fueron conducidas en cuatro parvadas de reproductoras de pollo de engorda comercial en Georgia - Parvada 1 (34 semanas de edad SE), Parvada 2 (65 SE), Parvada 3 (35 SE) y Parvada 4 (44 SE). Estas parvadas fueron primero reportadas como positivas para MS, basadas en un análisis serológico conducido como es recomendado por el Plan Nacional de Mejoramiento Aviar (PNMA). Se colectaron hisopos traqueales y muestras de sangre para evaluación serológica y análisis molecular por medio del secuenciado de PCR y ADN de la porción del gen *vlha*. Basándose en los resultados, las cuatro parvadas se han confirmado como positivos a MS. El análisis del secuenciado reveló que estas parvadas fueron infectadas con cepas salvajes “S-6”, “S-49” y “S-48”. Investigaciones de campo epidemiológicas y moleculares se deben hacer con regularidad para comprender cuales cepas circulan en el campo.

SUMMARY

Mycoplasma synoviae (MS) causes significant economic losses to the poultry industry. MS causes synovitis and clinical/subclinical respiratory infections in chickens and is transmitted both horizontally and vertically. Vertical and horizontal transmission can be prevented by following strict biosecurity measures and periodic monitoring of flocks. Recommendations for mycoplasma monitoring and surveillance programs in the US are described by the National Poultry Improvement Program (NPIP). This field investigation was performed in four commercial broiler breeder flocks in Georgia. Four flocks - Flock 1 (34 wk of age-WOA), Flock 2 (65 WOA), Flock 3 (35 WOA) and Flock 4 (44 WOA) - were investigated in this study. All four flocks were reported to be positive for MS based on the serological analysis conducted according to NPIP regulations. In this field investigation study, samples were collected from both roosters and hens on a random basis. Tracheal swabs were collected for PCR and mycoplasma culture. Whole blood samples were collected and the serum separation was performed. Serum samples were tested by serological tests such as serum plate agglutination (SPA) test, hemagglutination inhibition (HI) test and ELISA (1). Tracheal swabs were cultured for isolation and identification of the organism by the direct immunofluorescence test. Molecular analysis was performed on the tracheal swabs by PCR amplification a portion of the MS *vlha* gene followed by sequencing. Based on the results, all four flocks were confirmed to be positive for MS. The sequence analysis revealed that Flocks 1 and 2 were infected with a wild-type designated “S-56”, and Flocks 3 and 4 were infected with “S-49” and “S-48” wild-type strains respectively. Epidemiological and molecular field investigations and studies should to be performed on regular basis to understand the circulating mycoplasma strains in the field.

REFERENCES

1. Kleven, S. H. Mycoplasmosis. In: A laboratory manual for the isolation, identification and characterization of avian pathogens, 5th ed. L. Dufour-Zavala, D. E. Swayne, J. R. Glisson, J. E. Pearson, W. M. Reed, M. W. Jackwood, and P. R. Woolcock, eds. American Association of Avian Pathologists, Jacksonville, FL. 59–64. 2008.

(The full length article will be published in *Journal of Applied Poultry Research*.)

IMPACT OF *MYCOPLASMA GALLISEPTICUM* ON THE REPRODUCTIVE ORGANS OF 14–WEEK OLD SPF CHICKENS

IMPACTO DEL *MYCOPLASMA GALLISEPTICUM* EN LOS ÓRGANOS REPRODUCTORES DE POLLOS SPF DE 14 SEMANAS DE EDAD

V. Durairaj, M. Franca, and N. Ferguson-Noel

Poultry Diagnostic & Research Center, Department of Population Health
The University of Georgia, USA

RESUMEN

El objetivo de este estudio fue evaluar el efecto de *Mycoplasma gallisepticum* (MG) en los ovarios y testículos de pollos SPF. Cien pollos SPF fueron separados al azar en dos grupos de 50 pollos por grupo. Los pollos fueron criados en casetas usando el programa estándar de luz para ponedoras. A las 14 semanas de edad se inoculó a uno de los grupos por aerosol con MG (cepa R), y el otro grupo se aplicó un placebo también por aerosol. A los diez días post- inoculación se sacrificaron y pesaron. Los testículos /ovarios se colectaron, pesaron y se preservaron muestras en formol neutro amortiguado al 10%. La relación testículo /peso corporal (TPC) y ovario / peso corporal (OPC) disminuyó en los pollos infectados con MG comparados con los controles. En los exámenes histológicos no mostraron ningún cambio significativo en los ovarios entre los dos grupos, aunque la espermatogénesis fue altamente afectada en el grupo infectado con MG.

SUMMARY

The objective of this study was to evaluate the effect of *Mycoplasma gallisepticum* (MG) on the ovaries and testicles of SPF chickens. One hundred SPF chickens (males and females) were randomly divided into two groups of 50 chickens per group. Chickens were raised in colony houses following a standard lighting program for layers. At 14 wk of age, one group of chickens was inoculated with MG (R strain) by aerosol and the other group was administered a placebo, also by aerosol. At 10 d post inoculation the chickens were euthanized and weighed. The testes/ovary was collected, weighed, and samples preserved in 10% buffered neutral formalin. The Testes/Body weight (TBW) ratio and Ovary/Body weight (OBW) ratio were decreased in MG challenged chickens as compared to the controls. On histological examination no differences were observed in ovaries between the two groups although spermatogenesis was severely affected in the MG challenged chickens.

ABSTRACT

MG causes chronic respiratory disease in chickens. MG can also affect ovaries of laying hens causing ovarian regression and severe drops in egg production (1). The effects of MG on testes have not yet been described. The long term objective of this research is to study the pathophysiological effect of MG on the reproductive organs (ovaries and testes) of broiler breeders. To achieve this goal, a preliminary study in 14 wk old SPF chickens was conducted to evaluate the pathophysiological effect of MG on the reproductive organs. One hundred SPF chickens (males and females) were randomly divided into two groups (Group A and B) of 50 chickens/group. Chickens were raised in deep litter colony houses with *ad libitum* feed and water following the standard lighting program for layers. At seven wk of age, all chickens were wing-banded and choanal-cleft swabs and blood samples were collected from five chickens per group for mycoplasma screening. The samples collected were tested by serum plate agglutination test (SPA), hemagglutination inhibition (HI) assay, ELISA, culture and real-time PCR. The chickens were found to be free from mycoplasma infections at that time. At 14 wk of age, the Group B chickens were inoculated with MG (R strain) by aerosol route and Group A received MG vaccine diluent as placebo. The titer of the inoculum was 7.1 color changing units/mL (CCU/mL). Ten days later the chickens were euthanized, weighed and necropsied. Air sac lesions were scored and the MG-inoculated chickens had higher air sac lesion scores than the controls. The testes or ovary was collected, weighed and samples were preserved in 10% buffered neutral formalin. OBW ratio was calculated by dividing the ovary weight by body weight of chickens. Similarly, testes were collected from cockerels, weighed and TBW ratio was calculated. Both OBW and TBW were decreased in MG-inoculated chickens as

compared to the controls. The upper third of trachea was collected in 10% neutral buffered formalin for histological evaluation. The tracheal mucosa thickness was severely increased with lymphocytic infiltration in the inoculated chickens (Group B). On histological evaluation of the ovary, normal follicular maturation was noticed and no differences were observed between the two groups. The majority of the testicles of the control group had variable spermatogenesis whereas the majority of the testicles of the MG-inoculated group had no spermatogenesis or had rare spermatids and spermatozoa. Based on this study, it can be inferred that the spermatogenesis process occurring in the cockerels was compromised due to MG infection. Further studies are needed to investigate the impact of MG on spermatogenesis in broiler breeder males.

REFERENCES

1. Ferguson-Noel, N., K. Cookson, V. A. Laibinis, and S. H. Kleven. The efficacy of three commercial *Mycoplasma gallisepticum* vaccines in laying hens. *Avian Dis.* 56:272-275. 2012.

(The full length article will be published in *Avian Diseases*.)

REPORTE DE LESIONES EN APARATO REPRODUCTOR DE GALLINAS PONEDORAS AFECTADAS POR INFLUENZA AVIAR DE ALTA PATOGENICIDAD (H7N3) DE MÉXICO

REPORT OF LESIONS IN REPRODUCTIVE SYSTEM OF LAYERS AFFECTED BY HIGH PATHOGENICITY (H7N3) AVIAN INFLUENZA IN MEXICO

M. Escorcía^A, JC Del Río^B, D Marrufo^A, E. Martínez^A, S. Comonfort-Díaz^A y GM Nava^C

^ADepartamento de Medicina y Zootecnia de Aves. Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia, UNAM

^BFacultad de Estudios Superiores Cuautitlán, UNAM

^CFacultad de Química, Universidad Autónoma de Querétaro, Querétaro, México

SUMMARY

In June 2012, an outbreak caused by a high pathogenicity avian influenza virus (IAAP), subtype H7N3 in heavy-type breeding hens farms first, and later in commercial layer farms in Tepatitlan and Acatic, Jalisco, Mexico alarmed poultry producers and sanitary authorities of the country, initiating monitoring in order to establish the sanitary situation of the region. In June 25 of the same year, 51 poultry commercial units had been sampled, having, in 14 of them, the presence of signs indicating IAAP; subsequently, the virus presence in this units is confirmed, as well as its dissemination into other poultry areas (OIE 2012 Update on highly pathogenic avian influenza in animals, type H5 and H7)(5).

Despite all the sanitary measures implemented by the Mexican authorities, this virus has not been eradicated from the country, bringing with it important production losses caused mainly by a decrease in the laying rate, rather than by the mortality it causes. The present work reports gross and microscopic lesions in reproductive system detected in one clinical case of a commercial layer flock which had an AIHP subtype H7N3 outbreak in Mexico.

RESUMEN

En junio de 2012, un brote provocado por un virus de influenza aviar de alta patogenicidad (IAAP), subtipo H7N3, en granjas de reproductoras pesadas primero, y posteriormente en granjas de postura comercial en las zonas de Tepatitlán y Acatic, Jalisco-México, da la voz de alarma a productores avícolas y a las autoridades sanitarias del país iniciándose con ello un monitoreo a fin de establecer la situación zoonosanitaria de la región. Para el 25 de junio de ese mismo año se habían muestreado 51 unidades avícolas comerciales, resultando, 14 de ellas, con signos clínicos susceptibles a IAAP, posteriormente se confirma la presencia del virus en estas unidades y su diseminación en otras zonas avícolas, trayendo consigo importantes pérdidas de producción. El presente trabajo reporta las lesiones macroscópicas y microscópicas a nivel de aparato reproductor detectadas en un caso clínico de una parvada de postura comercial que sufrió un brote de IAAP, subtipo H7N3 en México.

INTRODUCCIÓN

En junio de 2012, un virus de influenza aviar, subtipo H7N3 altamente patógeno (IAAP) fue identificado como la causa del brote de una enfermedad grave en granjas de ponedoras comerciales en el estado de Jalisco. Alrededor de 22.4 millones de aves resultaron muertas como consecuencia de la infección o bien por ser sacrificadas preventivamente en las granjas vecinas (5). El 26 de julio de 2012, una campaña de inmunización con una vacuna inactiva H7N3 fue implementada en granjas de gallinas ponedoras en la zona de control en conjunto con otras medidas [2,7]. De acuerdo a Kapczynski y col, y con base a las evaluaciones moleculares que realizaron, el virus causante de este brote presentó una homología del 97% con virus aislados de aves silvestres de Norteamérica en los 8 genes que lo conforman (4).

Pese a la inestabilidad antigénica que presenta el virus de IA, la vacunación puede ser una herramienta valiosa para el control de la enfermedad en el país, sin embargo, no proporciona una protección absoluta contra la infección en la mucosa del aparato reproductivo, como sucedió en el presente caso (8,9).

El objetivo del presente trabajo fue describir las lesiones macroscópicas y microscópicas observadas en tracto reproductor de aves de postura comercial provenientes de parvadas vacunadas y que sufrieron desafíos de campo con el virus de IAAP, subtipo H7N3.

IDENTIFICACIÓN DE CASOS

Los casos sospechosos de infección por el virus H7N3 fueron identificados a través del reporte del clínico responsable de granja en la zona en donde existía reporte y confirmación previa de casos. A partir del reporte oficial dado por las autoridades sanitarias, se mejoró la vigilancia clínica y se coordinó y evaluó el reporte de curvas de producción en granjas en riesgo. Se obtuvieron datos epidemiológicos como historias clínicas, fechas de brotes, identificación de signos clínicos y lesiones y curvas de producción.

RESULTADOS

Calidad interna y externa de los huevos producidos por las aves afectadas. Se apreciaron huevos de diferentes tamaños, cascarón frágil, ausencia de albúmina densa, huevos en fáfara, cascarones arrugados o granulados y yemas pequeñas.

Lesiones macroscópicas observadas. A la necropsia se observaron ovarios y oviductos atroficos, presencia de exudado caseoso en oviductos, falta de jerarquía folicular, folículos hemorrágicos, postura abdominal y peritonitis.

Lesiones microscópicas. Se tomaron muestras a nivel de útero para estudios histológicos las cuales fueron procesadas en el área de histopatología del Departamento de Medicina y Zootecnia de Aves de la FMVZ-UNAM, para su posterior interpretación.

Las lesiones más comúnmente observadas fueron infiltrado linfocitario difuso agudo severo, infiltrado heterofilico subepitelial difuso agudo moderado y atrofia glandular severa.

Conforme la infección fue evolucionando, y a pesar de que la mortalidad de las aves no superó el 0.4%, la curva de producción sufrió una caída del 17% (la parvada tenía un porcentaje de producción del 95.3% al momento del desafío y este porcentaje cayó hasta el 78%). Una vez superada la infección la curva de producción no se recuperó.

Dos semanas posteriores al inicio del brote, se realizó una segunda toma de muestra para estudios histopatológicos y los resultados revelaron que la mucosa de útero no se regeneró, por el contrario, esta fue revestida por tejido de cicatrización. La mala calidad del huevo, tanto interna como externa no se recuperó.

Uno de los principales problemas a los que se enfrentaron los clínicos y responsables de granja fue el manejo de selección debido a que las características físicas de las aves no nos permitían diferenciar entre una ave falsa ponedora y una verdadera ponedora, sumado a esto, dentro de las aves ponedoras persistían las que ponían huevos de mala calidad.

DISCUSIÓN

El que las vacunas contra IA no eviten la infección y la diseminación del virus de campo radica en el hecho de que la infección inicial se produce en las vías respiratorias, y las vacunas emulsionadas que se utilizan en México, al ser aplicadas parenteralmente, inducen principalmente una respuesta inmune humoral, y no la inmunidad local, tan valiosa en la neutralización del virus de desafío. La producción de inmunidad local, tiene como propósito que, ante la infección viral, ésta actúe como defensa inicial contra los patógenos invasores antes de que penetren en el plasma (1,3,6).

El estímulo antigénico en mucosa es un requisito muy importante, ya que la inmunidad local va asociada a un polipéptido llamado componente secretor que es derivado de células propias de las mucosas, con esto se entiende que haya la evasión, por parte del virus de IA de desafío en aves, a pesar de estar vacunadas y con ello se facilite su diseminación en el organismo del ave (1,3,6).

La vacunación parenteral no evita el desafío, por lo tanto, una vez que el virus de campo es inhalado o ingerido, y que no ha podido ser neutralizado, a pesar de que las aves sean vacunadas, la presencia de enzimas proteolíticas en las células epiteliales respiratorias e intestinales provocará que se lleve a cabo el corte de la proteína HA viral lo que permitirá su ingreso a la célula, en donde se llevarán a cabo múltiples ciclos de replicación y liberación de más virus infecciosos. Una vez que se llevó a cabo la replicación viral a nivel de mucosa respiratoria,

en el caso de los virus de alta patogenicidad (AP), éstos invadirán la submucosa de los capilares a nivel respiratorio. El virus replicará dentro de las células endoteliales e invadirá, a través de la red vascular o linfática, a todos aquellos tejidos que posean el receptor viral específico generando una infección sistémica (8).

REFERENCIAS

1. Abbas, A. K., Lichtman, A.H., Pillai, S. Mecanismos efectores de la inmunidad humoral. En: *Inmunología Celular y Molecular*. 6ª. ed. España: Elsevier España: 2008.
2. Acuerdo mediante el cual se activa, integra y opera el dispositivo nacional de emergencia en salud animal, en los términos del artículo 78 de la Ley Federal de Sanidad Animal, con objeto de diagnosticar, prevenir, controlar y erradicar el virus de la Influenza Aviar tipo A, subtipo H7N3. (www.senasica.gob.mx)
3. Bienenstock, J. Mucosal and other mechanisms of resistance in the respiratory tract: An overview. In: J. Mestecky, M.E. Lamm, W. Strober, J. Bienenstock, J.P. Mc Ghee, Ll. Mayer (eds) *Mucosal Immunology*. 3a. edic. Elsevier Academic Press, London: 2005.
4. Kapczynski, D. R., Patin-Jackwood, M., Guzmán, S. F., Ricardez, Y., Spackman, E., Bertran, K., Suarez, D.L., Swayne, D.E.. Characterization of the 2012 highly pathogenic avian influenza H7N3 virus isolated from poultry in an outbreak in Mexico: Pathobiology and vaccine protection. *J. Virol.* DOI:10.1128/JVI.00666-13
5. Organización Mundial de Sanidad Animal (OIE) 2012. Update on highly pathogenic avian influenza in animals (Type H5 and H7). [<http://www.oie.int/animal-health-in-the-world/update-on-avian-influenza/2012>).
6. Peppard, J. V., Kaetzel, C. S., Russell, M. V. Phylogeny and comparative physiology of Ig A. In: J. Mestecky, Me E. Lamm, W. Strober, J. Bienenstock, J. P. Mc Ghee, Ll. Mayer (eds) *Mucosal Immunology*. 3a. edic. Elsevier Academic Press, London: 2005.
7. Productora Nacional de Biológicos Veterinarios Junio 2012: <http://www.pronabive.gob.mx/informes/INFOR123.PDF>
8. Swayne D. E., Halvorson D. A.. Influenza. In: Y. M. Saif, H. J. Barnes, A. Fadly, J. R. Glisson, L. R. Mc Dougald, L. Nolan, D. E. Swayne (eds) *Diseases of Poultry*. 12a. edic. Iowa State University Press, Ames: 2008.
9. Swayne, S. E., Kapczynski, D. R (2008) Vaccines, Vaccination, and Immunology for Avian Influenza Viruses in Poultry. In: Swayne DR (ed) *Avian Influenza*. Blackwell Publishing, Ames: 2008.

(Este artículo será publicado en su integridad en la revista *Avian Pathology*.)

CONTROL OF AVIAN MYCOPLASMOSIS

N. Ferguson-Noel

Dept. of Population Health, Poultry Diagnostic and Research Center
College of Veterinary Medicine, University of Georgia, 953 College Station Rd.
Athens, GA 30602
(706) 542-3068
naolaf@uga.edu

The pathogenic avian *Mycoplasma* spp. (*M. gallisepticum*, *M. synoviae*, *M. meleagridis*, and *M. iowae*) have been negatively affecting commercial poultry production for many years. The poultry industry and scientific community have made great strides in increasing the knowledge of the biology of these bacteria (and hence their control) since they were first identified, but much is still to be revealed. Avian mycoplasma can evolve rapidly and strains can vary widely in virulence. Despite the current information and control options available, costly outbreaks of avian mycoplasmosis continue to occur throughout the world and the varied effects of mycoplasma on poultry production continue to be identified and described.

The current approaches to MG and MS control include continuous surveillance and quarantine, medication, vaccination and/or elimination of infected breeding flocks. To maintain mycoplasma-free flocks it is important to use only negative replacements, use single age farms (isolated if possible), depopulate and disinfect between flocks, maintain good biosecurity and set up monitoring program.

Elimination of a positive breeder flock is the surest way to eliminate the shed of MG or MS, but this is not always feasible. Positive flocks should be isolated as much as possible; the eggs and chicks should also be segregated. The presence of persistently infected populations (e.g. backyard birds) ensures that the biosecurity of surrounding flocks is continually challenged. In situations where negative flocks cannot be adequately isolated and positive flocks cannot be eliminated, medication and vaccination become options for mycoplasma control.

The development of antibiotic resistance, cost, regulations and feasibility limit the ability of producers to continuously apply antibiotics to prevent mycoplasma infection, reduce shed of the organisms (vertically and horizontally) and treat clinical signs. Vaccination has better prospects as a long-term control method in these situations.

So the question is - do mycoplasma vaccines work? And the answer – yes, no, or sometimes - depends on how success or failure is judged. It is important to understand the characteristics and limitations of the different vaccines and select the safest and/or most efficacious vaccine based on the specific situation and primary concerns – whether they be preventing clinical signs, protecting progeny, or avoiding vaccine transmission to neighboring flocks. Most of the currently available mycoplasma vaccines can prevent or reduce clinical signs (depending on the severity of challenge) (2,6). The vaccines do vary in their safety and efficacy (1,3). In the event of challenge with a very virulent field strain the most efficacious vaccine available would be necessary, whereas in a low challenge situation this vaccine may be excessive.

The general health of the birds is a factor in the choice of vaccine, especially in flocks that are under heavy challenge from virulent respiratory viruses or severely immunosuppressed, a safer vaccine would be preferable to a more efficacious vaccine with some reactivity.

Some vaccines can also prevent infection with and reduce transmission of a field strain (4,5). The vaccines vary in this ability and if the main goal of the vaccination program is to eventually displace and eliminate a virulent wild-type, then a more efficacious vaccine that prevents the field strain from continuing to circulate would be important.

Another aspect of vaccination that must be taken into consideration is handling and application – a vaccine cannot be expected to behave optimally if it is mishandled. It is difficult to estimate how many “vaccine failures” in the field are actually due to improper handling or application so that the birds do not receive a protective dose and are in fact never truly vaccinated.

REFERENCES

1. Abd-el-Motelib, T.Y., and S.H. Kleven. A comparative study of *Mycoplasma gallisepticum* vaccines in young chickens. *Avian Diseases* 37:981-987. 1993.

2. Evans, R.D., and Y.S. Hafez. Evaluation of a *Mycoplasma gallisepticum* strain exhibiting reduced virulence for prevention and control of poultry mycoplasmosis. *Avian Diseases* 36:197-201. 1992.
3. Ferguson-Noel, N., K. Cookson, V. Laibinis, and S.H. Kleven. The Efficacy of Three Commercial *Mycoplasma gallisepticum* Vaccines in Laying Hens. *Avian Diseases* 56:272-275. 2012.
4. Kleven, S.H., H.-H. Fan, and K.S. Turner. Pen trial studies on the use of live vaccines to displace virulent *Mycoplasma gallisepticum* in chickens. *Avian Diseases* 42:300-306. 1998.
5. Turner, K.S., and S.H. Kleven. Eradication of live F strain mycoplasma *gallisepticum* vaccine using live ts-11 on a multiage commercial layer farm. *Avian Diseases* 42:404-407. 1998.
6. Whithear, K.G., Soeripto, K.E. Harrigan, and E. Ghiocas. Immunogenicity of a temperature sensitive mutant *Mycoplasma gallisepticum* vaccine. *Aust Vet J* 67:168-174. 1990.

EVALUACIÓN DE UN ADSORBENTE DE TOXINA T-2 EN POLLO DE ENGORDA

EVALUATION OF A T-2 TOXIN ADSORBENT IN BROILER CHICKENS

J. Fierro^A, R. Zúñiga^A, O. Montalvo^A, S. Rosas^A, J. Medina^A y E. Rodríguez^B

^ANUTEK S.A. de C.V.

^BInvestigación aplicada S.A. de C.V.

7 Norte 416 Tehuacán, Puebla. México, 75700
jafierro@grupoidisa.com

SUMMARY

The effectiveness of a T-2 toxin adsorbent included in a 2kg/ton concentration in a chicken's diet was evaluated. Eighty four male one-day-old chickens distributed in three groups of seven birds with four repetitions were used. The feed was controlled, and the birds had *ad libitum* access to water from d 1 to 28, when they were slaughtered. T1: control; T2 1800 ppb T2; T3 1800 ppb T2 + 2 kg/ton adsorbent. Results obtained at 14 and 28 d of age present significant differences between treatments for weight gain and FCR. Effectiveness of the product based on weight gain is 74.6%. There were no significant differences found for feed intake. Also, severe lesions were found for T. Inclusion of the adsorbent to the contaminated diet statistically improves animals' weight. It is demonstrated that the adsorbent at a dose of 2 kg/ton is effective to prevent toxic effects of T2 in broiler chickens.

RESUMEN

Se evaluó la efectividad de un adsorbente de toxina T2, incorporado a una concentración de 2 kg/t, en dietas de pollos. 84 pollos machos de un día de edad, distribuidos en tres grupos de siete aves con cuatro repeticiones; el alimento fue controlado y agua *ad libitum* desde el primer día hasta el día 28 en que fueron sacrificados. T1 control; T2 1800 ppb de T2; T3 1800 ppb de T2 + 2 kg/t de adsorbente. Los resultados obtenidos a los 14 y 28 días de edad, presentan diferencias significativas entre los tratamientos en ganancia de peso y la conversión alimenticia. La efectividad del producto con base en la ganancia de peso es: 74.6%. No se encontraron diferencias significativas en consumo de alimento. Además se observaron lesiones severas en el T2. La inclusión del adsorbente a la dieta contaminada mejora estadísticamente el peso del animal. Se demuestra que el adsorbente a 2 kg/t, es efectivo para prevenir los efectos tóxicos de la T2 en pollo de engorda.

INTRODUCCIÓN

Los tricotecenos, son micotoxinas producidas por varios géneros de hongos, tales como *Fusarium*, *Trichoderma*, *Myrothecium*, *Stachybotrys*, *Cephalosporium*. Son una familia de aproximadamente 150 compuestos estructuralmente relacionados (Grove, 1988). Especies del genero *Fusarium* son las que más frecuentemente están relacionadas con la presencia de tricotecenos en cereales y sus derivados, pudiendo contaminar la planta y los granos durante el periodo de pre y post cosecha. La toxina T-2 provoca en aves disminución en el consumo de alimento y ganancia de peso, lesiones orales, necrosis de los tejidos linfoides, hematopoyético y la mucosa oral, diarrea, vómito, lesiones en el tracto digestivo, arritmias cardíacas, inmunosupresión, daños al sistema nervioso, reducción en la producción, peso y calidad de huevos, canibalismo, reducción en la producción de huevo en reproductoras, mayores índices de mortalidad embrionaria precoz en la incubación, e inhibición de la síntesis de DNA y proteínas (Morehouse, 1985). La interacción de los tricotecenos con agentes infecciosos ocurre, cuando los mecanismos de resistencia dependen de la inmunidad celular (Corrier, et al 1987). Los métodos químicos que se han utilizado para reducir la contaminación con micotoxinas no tienen efectos prácticos en la industria pecuaria. La Toxina T2 produce pérdidas importantes en el sector pecuario (CAST 2003), motivo por el cual el uso de aditivos antimicotoxinas es de mucha importancia, sin embargo la disminución de la biodisponibilidad de la Toxina T2 es limitada en los productos actuales. Se han desarrollado diferentes tratamientos para mejorar esta característica. El objetivo fue evaluar el

efecto protector de un adsorbente experimental del tipo organoaluminosilicato; contra los efectos adversos de 1,800 ppb de toxina T-2 en pollos de engorda en fase de crecimiento (días 1 a 28 de edad).

MATERIAL Y MÉTODOS

Se utilizaron 84 pollos de engorda machos de la estirpe comercial Ross, de un día de edad y se distribuyeron al azar en 3 tratamientos de 7 aves con 4 repeticiones, con alimentación controlada y agua *ad libitum* durante 28 días. Las dietas se identificaron como: 1) dieta control negativo, 2) dieta control positivo con 1,800 ppb de toxina T-2 y 3) dieta de desafío, con el adsorbente a razón de 2 kg/t y 1,800 ppb de toxina T-2. La Toxina T2 se obtuvo de una contaminación natural, con el hongo *Fusarium Sporotrichioides*. El alimento fue comercial para pollo de engorda. La concentración de Toxina T2 adicionada a este alimento se verificó en el laboratorio de Toxicología de Nutek y en Trilog Analytical Laboratory, Washington, MO; por CG/MS. Las aves se recibieron y se sometieron a un programa de vacunación, se pesaron y se registró el peso individual cada semana, hasta el final del experimento. La conversión alimenticia y la ganancia de peso se calculó semanalmente. Todos los días se realizó una inspección ocular de las condiciones ambientales y la salud de las aves. Los animales se sangraron y se sacrificaron el día 28 de experimentación; el hígado, riñón, timo, bazo, bolsa de Fabricio y molleja fueron retirados y se pesaron individualmente para obtener su peso relativo: Se obtuvieron muestras para ensayos histopatológicos. Se tomaron porciones del intestino delgado (duodeno, yeyuno e íleon) para medir las vellosidades. A las muestras de sangre completa, se les realizó la biometría hemática y del suero se cuantificó la concentración de xantofilas, vitamina A y inhibición de la hemoaglutinación para la enfermedad de Newcastle. Se retiraron las tibias izquierdas y se analizó: cenizas de la tibia, fósforo, calcio, manganeso y zinc. La información obtenida fue analizada por un ANOVA, utilizando el 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

Los resultados obtenidos a los 14, 21 y 28 días de edad, presentan diferencias estadísticamente significativas entre los tratamientos en ganancia de peso y la conversión alimenticia. La efectividad del producto con base en la ganancia de peso es: 74.6 %. Con respecto al consumo de alimento, no se observaron diferencias estadísticamente significativas; pero el error estándar fue menor en el tratamiento de desafío.

Tratamientos	Peso en g		Ganancia de peso	Conversión alimenticia	Consumo de alimento
	Inicial Medias ± error estándar	Final Medias ± error estándar	Medias ± error estándar	Medias ± error estándar	Medias ± error estándar
Negativo	43 ± 0.46 ^a	1556 ± 18.76 ^a	1513 ± 18.87 ^a	1.34 ± 0.017 ^a	2028 ± 20.5 ^a
Positivo	43 ± 0.43 ^a	1442 ± 29.49 ^b	1399 ± 29.46 ^b	1.45 ± 0.035 ^b	2035 ± 44.3 ^a
Desafío	43 ± 0.42 ^a	1527 ± 18.81 ^a	1484 ± 18.75 ^a	1.42 ± 0.018 ^{ab}	2101 ± 16.9 ^a

Medias con letras diferentes son estadísticamente significativas. P<0.05

Las lesiones por el consumo de la toxina T-2, se observaron a partir de la primera semana.

En el tratamiento negativo, se observaron 5 aves afectadas con úlceras, esto se debió al alimento utilizado en forma de harina (las lesiones se observan diferentes a las provocadas por el consumo de la toxina T-2). En el tratamiento positivo, se observaron todas las aves con lesiones orales y 10 de ellas con lesiones de graves a severas, en comparación con el tratamiento de desafío en donde se observaron 2 aves sin lesiones, 24 con lesiones leves y 2 con lesiones severas.

El peso relativo de los órganos no presentó diferencias estadísticamente significativas, solo numéricas. El bazo y timo del control positivo se vieron afectados, en comparación con los otros grupos. Control negativo 0.100% contra 0.094% del control positivo en el peso de Bazo y 0.318% contra 0.282% en el peso del timo.

El conteo de glóbulos blancos y linfocitos, en sangre completa y la concentración de vitamina A y xantofilas en suero; presentaron diferencias estadísticamente significativas. Además los pollos del tratamiento con adsorbente y la toxina, presentaron mejor respuesta vacunal, de acuerdo a los resultados de la prueba de HI para la enfermedad de Newcastle.

Tratamientos	Glóbulos blancos 10 ³ /μL	Linfocitos 10 ³ /μL	Xantofilas mg/L	Vitamina A UI/mL	IH de NC (18 días post vacunación) Log ₂
	Medias ± error estándar	Medias ± error estándar	Medias ± error estándar	Medias ± error estándar	Medias ± error estándar
Negativo	83.5 ± 5.06 ^a	72.1 ± 3.34 ^a	12.8 ± 0.47 ^a	31.8 ± 1.89 ^a	9.207 ± 0.30 ^{ab}
Positivo	65.10 ± 4.07 ^b	58.4 ± 3.32 ^b	8.92 ± 0.70 ^b	21.2 ± 2.17 ^b	8.717 ± 0.29 ^b
Desafío	75.1 ± 4.00 ^{ab}	66.2 ± 2.59 ^{ab}	12.7 ± 0.56 ^a	30.1 ± 0.65 ^a	9.709 ± 0.29 ^a

Medias con letras diferentes son estadísticamente significativas para ($p < 0.05$)

En los demás resultados del conteo celular solo se presentaron diferencias numéricas (monocitos, basófilos, eosinófilos, neutrófilos, glóbulos rojos, hemoglobina y hematocrito).

En los análisis de minerales en tibia izquierda, se presentaron diferencias estadísticas en el porcentaje de fósforo y calcio, al igual que en la ceniza, la concentración de manganeso y zinc no fueron afectados por el consumo de la toxina T-2.

La integridad intestinal se vio afectada, principalmente en la parte del duodeno y un poco en yeyuno. En los análisis histopatológicos, las aves del grupo con micotoxinas presentaron lesiones en lengua, laringe, proventrículo, molleja, hígado y riñón. A continuación se detallan los resultados:

En el grupo control negativo, no se observaron lesiones por micotoxinas. Las aves del grupo control positivo, presentaron en la lengua: estomatitis y glositis erosiva y necrótica con presencia de bacterias intralesionales y en laringes: Laringitis linfocítica moderada a grave difusa. En el proventrículo se observó una moderada hiperplasia del tejido linfoide asociado. En la molleja se presentó una ventriculitis ulcerativa moderada multifocal y erosiones discretas, multifocales.

El diagnóstico morfológico del hígado fue una colangiohepatitis linfocítica moderada, multifocal y una esteatosis de leve a moderada difusa.

El riñón presentó una glomerulopatía membrana proliferativa moderada difusa con nefritis intersticio linfocítica moderada multifocal.

En el grupo de desafío, 6 aves presentaron estomatitis y glositis erosiva y necrótica con presencia de bacterias intralesionales, además de laringitis linfocítica moderada a grave difusa. Solo un ave presentó en la zona glandular del proventrículo acumulo linfoide asociado. En el hígado de 2 aves, se diagnosticó colangiohepatitis linfocítica moderada, multifocal y en 5 aves esteatosis leve difusa.

La molleja de 4 aves presentó pérdida de continuidad úlcera entremezcladas con abundantes colonias bacterianas y moderado infiltrado heterofílico (Ventriculitis ulcerativa moderada multifocal y erosiones discretas, multifocales).

DISCUSIÓN

Las adsorbentes de micotoxinas deben ser evaluadas “in vivo” para demostrar que son efectivos. Además de proteger los órganos blanco y sistemas de los animales (reducción del rendimiento productivo y de la respuesta inmune). Es muy importante calcular el costo-beneficio que implica la utilización de estos productos en la elaboración de alimentos balanceados.

CONCLUSIONES

El adsorbente utilizado a razón de 2 kg/t de alimento para este experimento presentó un efecto protector en los parámetros evaluados.

REFERENCIAS

1. Corrier DE et al. 1987. *Vet. Immunol Immunopathol.* 1987; 14:11-21.
2. Council for Agricultural Science and Technology. 2003. Ames, Iowa, USA. No. 139.
3. Grove JF. 1988. *Natural Products Reports.* 5:187-209.
4. Morehouse LG. 1985. *Mycotoxins of veterinary importance in the United States.* 383-410.

HOW EFFECTIVE ARE CURRENT COCCIDIOSIS CONTROL PROGRAMS?

¿QUÉ TAN EFECTIVOS SON LOS PROGRAMAS ACTUALES PARA EL CONTROL DE LA COCCIDIOSIS?

S. Fitz-Coy

Merck Animal Health
Salisbury, MD 21801

RESUMEN

Después de 60 años o más, la industria de la avicultura sigue batallando contra la coccidiosis. La ubicuidad de estos parásitos se debe a su fecundidad y a la pared de los oocistos. De igual manera, el confinamiento, la reutilización de la cama, las densidades y los programas profilácticos ayudan a su ubicuidad. Antes del uso de las sulfas en la década de los 40s, los avicultores utilizaban remedios caseros para disminuir la severidad de la coccidiosis. Después de las sulfas, los anticoccídicos químicos fueron la opción. Eran menos costosos y tenían menos efectos colaterales; sin embargo, la resistencia se convirtió en una norma. Para la década de los 70s, se descubrieron los ionóforos, los cuales permitieron a la industria desarrollar programas profilácticos efectivos. Durante los 60s y los 70s, la eficacia entre dos clases de anticoccídicos era similar (aproximadamente del 80%). De los 90s al 2000s ocurrió una disminución más marcada en la eficacia de los ionóforos en comparación con los anticoccídicos químicos. Para el 2006, la eficacia de los anticoccídicos parecía haberse estabilizado.; sin embargo, los ionóforos siguieron teniendo una eficacia menor que los anticoccídicos químicos.

SUMMARY

After 60 or more years the poultry industry is still battling coccidiosis. The ubiquity of these parasites is due to fecundity and oocysts wall. Also, confined brooding, re-used litter, densities and prophylactic programs aid in the ubiquity. Prior to the use of sulfas in the 1940s, poultry keepers used home remedies to alleviate coccidiosis severity. Following the sulfas, chemical anticoccidials became the choice. They were less costly with fewer side effects; however, resistance became the norm. By the 1970s, ionophores were discovered; these enabled the industry to develop effective prophylactic programs. During the 1960-70s the efficacy between the two classes of anticoccidials were similar (approximately 80%). From 1990s to 2000, there was a more noticeable decline in the efficacy of ionophores, compared to the chemical anticoccidials. By 2006, the efficacy of the anticoccidials appeared to have stabilized; however, ionophores remained at a lower efficacy than chemical anticoccidials.

ABSTRACT

Many improvements have occurred in the commercial poultry industry; re-using litter for several flocks of chickens, managing feed intake, light intensity and duration during each grow-out. Some other changes are bird genetics, age at which the birds are marketed and densities at which the birds are grown. Also better environmental conditions inside the houses due to evaporative cooling and air quality are other major improvements in the commercial industry. Other changes are the removal of roxarsone (3-Nitro[®]) from commercial poultry diets, extended uses of the anticoccidials, long withdrawal periods and short lay-out periods between flocks.

For more than 50 years, the control of coccidiosis has mainly been with the use of in-feed anticoccidials and with some use of live coccidia vaccines. Shuttle programs and product rotation are quite common and considered good management practices. But over use of an anticoccidial drug in the presence of a moderate coccidia challenge may lead to the development of drug tolerant or even drug resistant strains of coccidia.

Vaccinating chickens with drug sensitive strains of coccidia has shown great promise; this practice enables the addition of drug sensitive strains of coccidia to the population within the house environ; Mathis et al and Peek and Landman, demonstrated that there are benefits for using Coccivac-B[®] or Paracox[®] in a rotational program with anticoccidials (2,3). The data showed sensitivity was restored to Clinacox[™] (diclazuril) or diclazuril and monensin. Recently, some commercial poultry companies have used an anticoccidial (ionophore or chemical) following the

administration of a live coccidia vaccine but the drug was not fed until 13 – 21 d or 24 – 28 d of age. The verdict on this practice is not yet out.

The review of data from 1960s to 2013 has indicated we might not have been good stewards of managing and maintaining the efficacy of available anticoccidials. For example, the three most commonly used anticoccidials (nicarbazin, salinomycin and monensin) the drug efficacy at launch was 85-90%. But after many years of use, the average efficacy against field isolates for monensin and salinomycin is approximately 44% and nicarbazin is 74%. The degradation in efficacy for the two ionophores and nicarbazin is approximately 51% and 18%, respectively. Data from anticoccidial sensitivity tests (AST) for 11 field isolates of *E. maxima* from several broiler production areas in the US to salinomycin shown considerable variability in susceptibility; 45% of the isolates resistant, 36% partial resistant and 19% demonstrated some susceptibility. With no knowledge of new approvals for anticoccidials, preserving efficacy of the current drugs should be paramount.

Birds immunized with a live coccidia vaccine and grown in commercial houses on re-used litter were challenged at 30 d of age with an isolate compiled from 12 company contract farms. Results showed variability in the levels of immunity to cecal and intestinal species 5% and 38%, respectively.

To maintain the efficacy of the anticoccidial drugs, a more judicious use of these products is required. This should include using vaccines and anticoccidials and regular monitoring with ASTs and or necropsy sessions.

REFERENCES

1. Personal data.
2. Mathis G. and C. Broussard, 2003 XIII Congress of the World Veterinary Poultry Assn.
3. Peek, H. W and W. J. Landman, 2006. Avian Dis. 434-439. Higher incidence of *Eimeria* spp. field isolates sensitive for diclazuril and monensin associated with the use of live coccidiosis vaccination with Paracox-5[®] in broiler farms.

DIATOMS AS A NOVEL ADJUVANT FOR VACCINES APPLIED VIA THE *IN OVO* ROUTE IN POULTRY

LAS DIATOMEAS COMO UN ADYUVANTE NOVEDOSO PARA VACUNAS APLICADAS A TRAVÉS DE LA RUTA *IN OVO* EN AVES

R.A. Gallardo^A, L. Corbeil^A, M. Hildebrand^B, and M. Pitesky^C

^ADepartment of Population Health and Reproduction, School of Veterinary Medicine, University of California, 1089 Veterinary Medicine Dr. VM3B, Davis CA, 95616

^BMarine Biology Research Division, Scripps Institution of Oceanography, University of California, San Diego, 9500 Gilman Dr., La Jolla, CA, 92093

^CUniversity of California Cooperative Extension, 1089 Veterinary Medicine Dr. VM3B, Davis, CA, 95616

RESUMEN

La inmunización *in ovo* de pollos es una de las tecnologías más revolucionarias y que ahorran más trabajo en la industria avícola moderna. Poco se sabe acerca de los sitios de entrada de antígenos en el embrión después de la inyección in- ovo. Sin embargo, la importancia del uso de adyuvantes está bien establecida específicamente para las vacunas inactivadas y recombinantes. Los adyuvantes se han utilizado en la vacunación para mejorar la inmunogenicidad de la vacuna. Una alternativa innovadora puede ser el uso de las diatomeas, que son microalgas de una sola célula eucariota omnipresente en los hábitats acuáticos. Se espera que Frustule, la pared celular de sílice de las diatomeas, proporcione capacidades adyuvantes. La característica más interesante es que las diatomeas pueden proporcionar una plataforma para la expresión de proteínas inmunogénicas y de ese modo actuar como un vector de expresión que proporciona un enfoque de una vacuna novedosa. La diatomea *Thalassiosira pseudonana* se pondrá a prueba para la toxicidad en los huevos y también como un nuevo adyuvante para un antígeno viral común en las aves. Los resultados serán discutidos.

SUMMARY

The *in ovo* immunization of chickens is one of the most revolutionary and labor saving technologies in modern poultry production. The importance of using adjuvants is well established specifically for killed and recombinant vaccines. Adjuvants have been used in vaccination to improve the vaccine immunogenicity. An innovative alternative may be the use of diatoms, which are single cell eukaryotic microalgae which are ubiquitous in aquatic habitats. Frustule, the silica cell wall of the diatoms, is expected to provide adjuvant capabilities. The most fascinating characteristic is that diatoms may provide an expression platform for immunogenic proteins and in that way act as an expression vector providing a novel vaccine approach. The diatom *Thalassiosira pseudonana* was tested for toxicity in embryonated eggs. In a first experiment, five groups of chickens were created. Three groups received 20, 100, or 500ug of diatoms respectively. One group received Freund's incomplete adjuvant and the last group PBS. Results showed that hatchability, mortality, chick quality, average weights, and uniformities were not affected in the diatom-inoculated groups, strongly suggesting that diatoms do not induce any detrimental or toxic effects. In a second experiment humoral immune responses against inactivated Newcastle disease virus (NDV) will be measured in presence or absence of common adjuvants (mineral oil or aluminum hydroxide) and diatoms.

INTRODUCTION

In ovo immunization is one of the most revolutionary technologies performed during the chick's embryonic stage. The procedure consists of the injection of the appropriate vaccine through the eggshell at 18 d of embryonation during the egg transfer to the hatching trays. Almost 200 million eggs are vaccinated using the *in ovo* route in the U.S. annually. Some *in ovo* machines inoculate up to 30,000 eggs per hour and also perform the egg transfer, eliminating the need of post hatch vaccination (3,4). Immune responses can be induced in embryos starting at 12 to 14 d of incubation; soon after the emergence of T and B cell progenitors (2,5,9). Widely known is the ability of the *in ovo* technique to induce immune responses in embryos inoculated at 18 d of age. Adjuvants have been used

in vaccination to improve the immunogenicity of vaccines especially in killed products. Many of the recombinant protein based vaccines face the problem of being poorly immunogenic creating the need of using adjuvants to boost immune responses (6). So far tested adjuvants include oil in water emulsions, aluminum hydroxide gel, or aluminum phosphate, lipid formulations, and cytokine based adjuvants like type one interferon with aluminum being the most widely used (7).

Diatoms are single cell eukaryotic microalgae present nearly in all water habitats (1). They are very attractive as vaccine candidates because they replicate in natural or artificial seawater at generally ambient temperature with sunlight and minimal nutrients, making inexpensive production feasible. They can also be lyophilized for long-term storage and can be sonicated to produce fine particles and nanoparticles. Frustules, the silica cell wall of the diatoms, have been used for several applications in nanotechnology including drug delivery systems (10). The diatom silica has been proposed as a substitute for drug delivery vehicles, due to their structural, mechanical, chemical, and optical features (10). These silica shells have a large surface area, nanoscale porosity, and they show biodegradable capabilities. Diatoms could provide an expression platform and because their cell walls are made of nanostructured silica, they can also act as an adjuvant (8) New adjuvants are needed in a food animal production in part because of the shift to less immunogenic recombinant vaccines as opposed to live attenuated vaccines with greater immunogenic potential. Based on the previously presented information, we tested the diatom *Thalassiosira pseudonana* for toxicity in 18 d embryonated eggs at different concentrations when inoculated via the *in ovo* route mimicking commercial procedures.

MATERIALS AND METHODS

Five groups of 30 eggs were inoculated with different experimental solutions. Group 1, 2, and 3 were inoculated with 500, 100, and 20ug of diatoms in a 200uL inoculum respectively. Group 4 was inoculated with 200uL of incomplete Freund's adjuvant and Group 5 was inoculated with 200uL of PBS. Egg weight was measured and averaged in each group. Mortality after inoculation was also recorded. Hatchability and quality of the chickens was recorded. The quality assessment was developed based on the umbilical cord evaluation. Any crust residue encountered in the umbilical scar was counted and the percentage of chickens with crusty umbilicus was scored. Chicken weight and uniformity was calculated at 1, 3, 5, 7, 11, and 14 d of age.

RESULTS AND DISCUSSION

Egg weight before inoculation demonstrated similarity in their values. Specifically averages ranged from 57.7grs in Group 3 to 58.6grs in Group 1. No embryo mortality was noticed after the *in ovo* inoculation at 18 d of embryonation, confirming that the procedure was adequately performed. No major differences in hatchability were detected in the different chicken groups (Table 1), even though the hatching on Group 4 was late compared with the other experimental groups. The lowest hatchability was detected in Group 2 (100ug of diatoms) and the highest in Group 5 (PBS inoculated). One chick died in Group 4 four d post hatch.

Chick quality was measured as explained above. Highest levels of umbilical scars were detected in Groups 1, 3, and 4 with 34,4%. Group 2 showed the lowest level with 17,9% (Table 1). Lower body weights can be seen in Group 4 during the first 11 days of age, being statistically significant until d five (Table 2). This demonstrates a detrimental effect of the oil Freund's adjuvant over the chicken's first week of development. This detrimental effect is not seen in any of the groups inoculated with diatoms. Uniformity in the different chicken groups showed statistically lower levels in Group 4 compared with Groups 1, 2, and 5 (Table 2).

CONCLUSION

In conclusion, no toxic or detrimental effects were identified in the group of chickens inoculated at 18 d of embryonation with different concentrations of diatoms.

Considering these results, our next step will be to measure humoral immune responses against inactivated NDV adjuvanted with diatoms and compare them with the effect of common adjuvants such as mineral oil and aluminum hydroxide.

REFERENCES

1. Dolatabadi, J.E.N., and M. de la Guardia. Applications of Diatoms and Silica Nanotechnology in Biosensing, Drug and Gene Delivery, and Formation of Complex Metal Nanostructures. *T. Anal. Chem.* 30:1538-1548. 2011.
2. Dunon, D., J. Salomonsen, K. Skjødt, J. Kaufman, and B. Imhof. Ontogenic Appearance of MHC Class I (BF) Antigens During Chicken Embryogenesis. *Clin. Develop. Immunol.* 1:127-135. 1990.
3. Gildersleeve, R. In ovo Technology Update. *Zootec. Int.* 73-77. 1993.
4. Gildersleeve, R., C. Hoyle, A. Miles, D. Murray, C. Ricks, M. Secrest, C. Williams, and C. Womack. Developmental Performance of an Egg Injection Machine for Administration of Marek's Disease Vaccine. *J. Appl. Poultry Res.* 2:337-346. 1993.
5. Houssaint, E., A. Mansikka, and O. Vainio. Early Separation of B and T Lymphocyte Precursors in Chick Embryo. *J. Exp. Med.* 174:397-406. 1991.
6. Josefsberg, J.O., and B. Buckland. Vaccine Process Technology. *Biotech. Bioeng.* 109:1443-1460. 2012.
7. Li, S., E. Locke, J. Bruder, D. Clarke, D.L. Doolan, M.J. Havenga, A.V. Hill, P. Liljestrom, T.P. Monath, and H.Y. Naim. Viral Vectors for Malaria Vaccine Development. *Vaccine* 25:2567-2574. 2007.
8. Lincopan, N., M.R. Santana, E. Faquim-Mauro, M.H. da Costa, and A.M. Carmona-Ribeiro. Silica-Based Cationic Bilayers as Immunoadjuvants. *BMC Biotech.* 9:5. 2009.
9. Reynaud, C., B. Imhof, V. Anquez, and J. Weill. Emergence of Committed B Lymphoid Progenitors in the Developing Chicken Embryo. *EMBO J.* 11:4349-4358. 1992.
10. Wang, Y., J. Cai, Y. Jiang, X. Jiang, and D. Zhang. Preparation of Biosilica Structures from Frustules of Diatoms and their Applications: Current State and Perspectives. *Appl. Microbiol. Biotech.* 97:453-460. 2013.

(A full version of this article will be published in *Avian Diseases*.)

Table 1. Hatchability and quality in the different experimental chicken groups.

Group	Hatchability (%)	Quality (umbilical scar incidence %)
1 (500ug diatoms)	96.6	34.4
2 (100ug diatoms)	93.3	17.9
3 (20ug diatoms)	96.6	34.4
4 (Freund's incomplete)	96.6	34.4
5 (PBS)	100	20

Table 2. Average body weights (gr)/uniformity (%) in the different experimental chicken groups at different times.

	Day 1	Day 3	Day 5	Day 7	Day 9	Day 11	Day 14
Group 1	43.5/100	46.8/96.6	58.9/89.7	75.2/89.7	90.4/75.9	109.9/75.9	135.8/65.5
Group 2	43.7/100	47.3/96	59.9/85.7	74.5/82.1	88.7/75	107.7/75	130.2/67.9
Group 3	42.9/100	47.3/93.1	59.3/79.3	73.2/82.8	88.1/65.6	105/65.5	130.5/62.1
Group 4	41.9/88.9	46.7/75	56.6/64.3	71.6/60.7	87.1/67.9	104/64.3	131.2/64.3
Group 5	43.4/100	47.3/96.7	59.5/90	74.8/86.7	87.8/83.3	111.1/83.3	139.8/80

CHANGES IN MANAGEMENT PRACTICES RELEVANT TO *SALMONELLA* ENTERITIDIS ON U.S. TABLE EGG LAYER FARMS

L. Garber

USDA Animal and Plant Health Inspection Service, Veterinary Services, Centers for Epidemiology and Animal Health, 2150 Centre Ave, Bldg. B, Fort Collins CO 80526

INTRODUCTION

Salmonella Enteritidis (SE) is a food-borne pathogen frequently attributed to consumption of improperly prepared and/or undercooked eggs. In 2010, the Food and Drug Administration (FDA) implemented an egg rule to control SE on farms producing eggs for the table egg market (1). The FDA food safety requirements became effective on July 9, 2010, through a rule for egg producers having 50,000 or more laying hens. The rule also required egg producers with fewer than 50,000 but at least 3,000 laying hens to comply with the regulation by July 9, 2012. Producers are required to have a SE prevention plan that addresses SE-monitored pullets, biosecurity, rodent/pest control, poultry house cleaning and disinfection, and egg refrigeration. Eggs must be held and transported at or below 45°F beginning 36 h after time of lay. Testing requirements include testing of the pullet environment for SE when pullets are 14 to 16 wk of age. If this environmental test is negative, no additional testing of the environment is required until 40 to 45 wk of age. Testing of the layer house environment is required at 40 to 45 wk of age and four to six wk after each molt. If a positive environmental test occurs, producers must either divert eggs for breaking (or other treatment that achieves at least a 5-log destruction of SE) for the life of the flock or begin egg testing; four consecutive negative tests (consisting of 1000 eggs each) at two wk intervals are required to continue producing eggs for the table egg market. Producers who only produce eggs for breaking need only comply with the refrigeration requirements. Producers who sell all their eggs directly to consumers or have less than 3,000 hens are not covered by the rule.

The FDA used information from a 1999 National Animal Health Monitoring System (NAHMS) Layer study in their assessment of the need for and economic impact of the egg rule. As practices have changed substantially since 1999, it was determined that updated information on practices would be useful to both the industry and government agencies. Therefore, NAHMS conducted a study in summer 2013 to estimate the prevalence and evaluate risk factors for SE on commercial layer farms, as well as to assess changes in management practices since 1999 relevant to SE control and prevention.

MATERIALS AND METHODS

1999 study. The study design for the NAHMS Layers '99 study has been described previously (2). Briefly, the National Agricultural Statistics Service (NASS) maintained a list of operations with 30,000 or more laying hens as a basis for estimating monthly egg production. An operation may have had one farm or multiple farms. All operations on the NASS list in 15 states (AL,AR,CA,FL,GA,IN,IA,MN,MO,NE,NC,OH,PA,TX,WA) were eligible to participate in the study. All farms were selected for operations having 10 or fewer farms. If an operation had more than 10 farms, a random sample of farms was selected. A questionnaire was administered that addressed management practices. Severity of rodent problem on each participating farm was assessed by data collector observation. Data were weighted to reflect the population of operations with 30,000 or more laying hens in the 15 states.

Additionally, swabs from manure, egg belts, elevators, and walkways were collected from poultry houses and submitted to the Agricultural Research Services (ARS) laboratory in Athens, GA for culture.

2013 study. A sample of farms having 3,000 or more laying hens was selected from the FDA list of registered premises in 19 states (AL,AR,CA,FL,GA,IL,IN,IA,MI,MN,MO,NE,NC,OH,PA,TX,WA,WI,New England). A questionnaire was administered that addressed management practices relevant to SE, such as biosecurity, rodent control, molting and vaccination. No biologic samples were collected. Producers were asked about testing for SE in the layer house environment between June 1, 2012 and May 31, 2013. Testing may have been by culture, PCR, or other rapid tests. Questions regarding pullet rearing, SE testing and vaccinating were primarily answered by a company representative while questions relating to day-to-day layer management were primarily answered by farm personnel. Data were weighted to reflect the population of farms with 3,000 or more laying hens in the 19 states.

Only farms with 30,000 or more laying hens were included in the analysis for comparison to the 1999 study. Table 1 summarizes the differences in study design for the two studies.

RESULTS

In the 1999 study, 7.1% of layer houses were environmentally positive for SE via culture. In the 2013 study, 1.0% of flocks tested between June 1, 2012 and May 31, 2013 tested positive for SE. No flocks from farms with <30,000 layers tested positive and 1.2% of flocks from larger farms were positive.

Vaccination of pullets against *Salmonella* was rarely performed in 1999 (5.4% of farms) whereas nearly all farms did so in 2013 (98.7%). The most common protocol was to give pullets a series of two live vaccines via spray followed by a bacterin injection, although many other protocols were used. For approximately half of the farms, the first vaccine was administered in the hatchery. In 2013, an increased percentage of farms monitored SE in pullets, routinely tested for SE in the layer house, and participated in a SE QA program compared to 1999.

A higher percentage of farms fed pullets pre/probiotics in 2013 compared to 1999, while a lower percentage of farms gathered eggs by hand or molted their flocks. For farms that did molt in 2013, the most common procedure was to feed an alternative diet rather than to restrict or withhold feed. There was a significant increase in cage-free housing; 18.7% of farms had at least one cage-free house in 2013 (11.8% of houses) compared to 0.8% of farms (0.6% of houses) in 1999.

More farms processed eggs on farm in 2013 compared to 1999, and nearly all stored eggs at <50° F. Egg racks were more commonly cleaned and/or disinfected before reusing in 2013 compared to 1999. Producers reported less severe problems with rodents in 2013 compared to 1999; traps and sticky tape were a more common rodent control method and cats were less common. A higher percentage of producers required employees to use footbaths and required visitors to park in a restricted area away from the poultry houses in 2013. Cleaning and disinfecting procedures for feeders, hoppers, water tanks, and houses were similar in both years. Although we attempted to keep differences in study design between the 2 studies to a minimum, there were some differences which may have had an effect on the estimates.

REFERENCES

1. Code of Federal Regulations, Title 21, Volume 2, Part 118 Production, storage, and transportation of shell eggs.
2. Garber, L., M. Smeltzer, P. Fedorka-Cray, S. Ladely, and K. Ferris. *Salmonella enterica* Serotype enteritidis in table egg layer house environments and in mice in U.S. layer houses and associated risk factors. *Avian Dis.* 47:134-142. 2003.

Table 1. Comparison of 1999 and 2013 NAHMS layer farm studies.

	1999 study	2013 study
List frame	NASS	FDA
Inference population	Operations with 30,000 or more laying hens in 15 states	Farms with 3,000 or more laying hens in 19 states (subset of farms with 30,000 or more laying hens for comparison to 1999 study)
Testing	Swabs of layer house environment collected one time by data collector for culture	Producer reported test results for a 1 year period. Tests included culture, PCR, and other rapid tests
Rodent assessment	One time data collector observation	Producer reported typical level of problem for a 1 year period

SEROVAR B - AVIBACTERIUM PARAGALLINARUM, THE TRUE PATHOGEN

SEROVAR B – AVIBACTERIUM PARAGALLINARUM, EL VERDADERO PATÓGENO

A. García and D. Fuentes

Laboratorios Avilab. Porcicultores 80 Tepatitlán Jal. Mex. C.P.47693
puma_doc@hotmail.com

RESUMEN

Coriza infecciosa es enfermedad contagiosa que afecta principalmente el aparato respiratorio. El mayor impacto se presenta en parvadas multiedades. La repercusión económica en las parvadas, tiende a ser debido al incremento en deshechos y a la reducción de la producción de huevo (10% - 40%).

Aves de postura comercial de diferentes edades, que habían recibido dos inmunizaciones a coriza infecciosa, fueron afectadas al mismo tiempo con *Avibacterium paragallinarum* serogrupos B y C de Page. La producción de huevo disminuyó en un 20% y la mortalidad se elevó al doble.

Aves inmunizadas en laboratorio con diferentes productores de bacterina de coriza, y desafiadas con serogrupo B, fueron afectadas en diferentes grados de lesión, demostrando no protección, así como no reactividad cruzada entre miembros del mismo serogrupo y que este es más patógeno que los otros serogrupos.

SUMMARY

Infectious coryza is an upper respiratory tract disease in chickens that can appear in all ages with the major impact occurring in multiage flocks. The economic loss is due to the increase in culling and a drop in egg production from 75% to 15.7%.

Layer birds of different ages, which have received two doses of coryza bacterin, were affected at the same time with Page's serovars B and C of *Avibacterium paragallinarum*. The egg production dropped 20% and the mortality increased two fold.

An experimental vaccine was produced with the autogenous serovar B. Birds with this vaccine were protected after challenge; the birds with the commercial bacterin (it has two different strain of serovar B), showed the typical signs of coryza. It shows that among the members of this serovar there is no cross reactivity and this serovar is more aggressive than Page's other serovars.

One of the best ways to control coryza is through the use of autogenous vaccine.

(Manuscript will be submitted to *Avian Pathology*.)

GENOMA COMPLETO DE LA CEPA CHIMALHUACAN DEL VIRUS DE LA ENFERMEDAD DE NEWCASTLE

COMPLETE GENOME OF THE CHIMALHUACAN STRAIN OF THE NEWCASTLE DISEASE VIRUS

L. García-Barrera^A, D. Cortés-Espinosa^A, A. Toscano^B, E. Lucio-Decanini^B y A. Absalón^A

^AInstituto Politécnico Nacional. CIBA Tlaxcala. Carr. Est. Santa Ines-Tecuecomac Km 1.5, Tepetitla, Tlaxcala, México. Tel. +52 (55) 5729 6000 Ext. 87813. aabsalon@ipn.mx

^BInvestigación Aplicada S.A. de C.V. México

SUMMARY

Newcastle disease virus continues to be one of the greatest economic losses for Mexican poultry. Last century in the early 1970s, an outbreak of this highly virulent virus hit the U.S. and Mexico and other Latin American countries. In one of these outbreaks, a Newcastle disease virus with clearly velogenic pathogenic characteristics was isolated. One of these clones that remained frozen since 1992 was completely sequenced and its genetic characteristics are presented in this paper. The virus belongs to genotype V that is prevalent in Mexico, which is very similar to the strain Largo/71 isolated in the USA also in the early 1970s. Phylogenetic analysis suggests that the viruses currently circulating are descended from the Chimalhuacan strain.

RESUMEN

El virus de la enfermedad de Newcastle continúa siendo uno de que mayores pérdidas económicas representan para la avicultura Mexica. A principio de la década de los 1970s del siglo pasado, se presentó un brote de este virus de alta virulencia que afectó a México y USA, además de otros países de Latinoamérica. De uno de estos brotes se aisló un virus de la enfermedad de Newcastle con características claramente velogénicas de patogenicidad. Uno de estos clones mantenidos en congelación desde 1992 fue secuenciado completamente y sus características genéticas se presentan en este trabajo. El virus pertenece al genotipo V que es el predominante en México, con mucha semejanza a la cepa Largo/71 aislada en USA también a inicios de la década de los 1970s. El análisis filogenético sugiere que los virus que circulan actualmente descienden de la cepa Chimalhuacan.

INTRODUCCIÓN

La enfermedad de Newcastle es una de las causas más importantes de pérdidas económicas en la industria avícola. La enfermedad es causada por un Paramyxovirus aviar tipo 1 (APMV-1) perteneciente al género *Avulavirus* también llamado virus de la enfermedad de Newcastle (NDV).

En México el primer brote de alta patogenicidad del NDV en aves domésticas se presentó en la década de los 1950s, a inicios de la industrialización de la avicultura en América. Este primer brote de alta patogenicidad fue reportado como cepa Querétaro/50, que de acuerdo a las recientes clasificaciones pertenecía al genotipo II. Fue en esa época se inició con la vacunación para la prevención de la enfermedad utilizando la cepa Lasota. El segundo brote de alta virulencia fue a inicios de la década de los 1970s cuando se presentaron brotes que afectaron a México y a USA.

Esta cepa fue caracterizada por su índice patogenicidad Intracraneal (ICIP) de 1.9. En el 1980 el gobierno mexicano a través de la Secretaria de Agricultura (SAGARPA; www.sagarpa.gob.mx) la estableció como cepa de desafío referencia. Desde entonces, esta cepa ha sido utilizada para la evaluación de la efectividad de las vacunas que se comercializan actualmente en México. De igual forma, todas las vacunas importadas contra el NDV de acuerdo a las leyes mexicanas, deben ser evaluadas para protección contra un desafío de esta cepa.

La cepa “Chimalhuacan/73” desde entonces ha sido transferida a varios laboratorios aunque desafortunadamente no se envió a una colección apropiadamente. Una alícuota de la cepa fue transferida a Investigación Aplicada en 1992, en donde fue replicada y mantenida en nitrógeno líquido desde entonces. Al primer pase de esta alícuota se le denominó “Semilla maestra” y a partir de esta se ha generado “Semilla de trabajo”.

En este reporte, nosotros presentamos la secuencia del genoma completo de la cepa “Chimalhuacan” obtenida a partir de la amplificación de la “Semilla maestra”. Adicionalmente, se analizan sus principales características genéticas y se compara con el genoma de otras cepas velogénicas aisladas en Norte América.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

El ensamble de las secuencias revela que el genoma de la cepa “Chimalhuacan” tiene un tamaño de 15,192 nt. De igual forma que otros virus de la enfermedad de Newcastle contiene 6 genes que codifican a 6 proteínas: Nucleoproteína (NP), Fosfoproteína (P), Proteína de Matriz (M), Proteína de Fusión (F) Hemaglutinina-Neuraminidasa (HN), and RNA polimerasa dependiente de RNA (L) en sentido 3'-NP-P-M-F-HN-L-5'.

La secuencia del extremo 3' NCR tiene un tamaño de 112 nt; mientras que la región 5' NCR tiene un tamaño de 199 nt. La región de inicio de la transcripción genética Gene start (GS) del gen NP es AATCTAAAA, P, M, F, HN y L. Por su parte la región de final de transcripción o gene end (GE) tiene secuencias: NP-TTGATGTTTTT; P, M, F, HN y L.

Las regiones intergénicas comprendidas entre la secuencia GE y GS tiene: 2 nt entre NP/P ;1 nt entre P/M; 1 nt entre M/F; 31 nt entre F/HN; y 47 nt entre HN/L.

El porcentaje de G+C del genoma viral es del 46.3% y se observa un decremento del gen NP a L.

Filogenéticamente, la cepa Chimalhuacan está muy relacionada a la cepa Largo/71 aislada en el estado de Florida. Pertenece al genotipo V, característico de las cepas aisladas en los últimos 40 años de brotes ocurridos en granjas avícolas.

CONCLUSIONES

El virus de la enfermedad de Newcastle, cepa Chimalhuacan tiene un genoma de 15,192 nt. La cepa pertenece al genotipo V, y tiene un perfil de aminoácidos en el sitio de la proteína de Fusión característico de los virus velogénicos. En cuanto a su uso como cepa de desafío en pruebas de constatación de vacunas para el control del NDV en México, esta cepa es ideal debido a su perfil de alta virulencia y a que pertenece al mismo genotipo de las cepas de campo que han circulado en México durante los últimos 40 años.

EVALUACIÓN DE LA INFECTIVIDAD DE METAPNEUMOVIRUS AVIAR EN DIFERENTES CULTIVOS CELULARES

EVALUATION OF THE PERMISSIVENESS OF DIFFERENT CELL CULTURES TO THE AVIAN METAPNEUMOVIRUS

K. Gaviña^{ABD}, L. Padilla-Noriega^{AB}, H. Ramírez-Mendoza^C y J.F. Rivera-Benítez^C

^AInstituto de Investigaciones Biomédicas, Universidad Nacional Autónoma de México

^BDepartamento de Microbiología y Parasitología, Facultad de Medicina, Universidad Nacional Autónoma de México

^CDepartamento de Microbiología e Inmunología, Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia, Universidad Nacional Autónoma de México

^DAutor corresponsal. Dirección de correo: Departamento de Microbiología y Parasitología, Facultad de Medicina, Universidad Nacional Autónoma de México, Ciudad Universitaria 3000, Delegación Coyoacán, CP 04510, Distrito Federal, México. Correo electrónico: karagavina@gmail.com.

SUMMARY

Avian metapneumovirus (aMPV) is a paramyxovirus affecting mainly the respiratory tract of birds. *In vitro* replication is commonly done in the Vero line, however, in this study the permissiveness of ten mammal continuous lines and of a primary culture of chicken fibroblasts to a Mexican isolate of aMPV was determined infecting each culture and establishing the viral yield per Colony Forming Units (CFU). Three highly permissive lines were identified to aMPV: A-72, PK-15 and BGM (~106 CFU/mL), two moderately permissive: RK-13 and MARC-145 (103-104 CFU/mL) and the lines LLC-MK2, MDBK, MDCK, Hep-2 and the main culture of fibroblasts were not permissive. The findings in this study are useful to expand the repertoire of cell lines useful for aMPV isolation, which in turn will allow us to implement diagnosis techniques.

RESUMEN

Metapneumovirus aviar (MPVa) es un patógeno que afecta principalmente el tracto respiratorio de las aves. Este virus se aísla comúnmente realizando múltiples pases en cultivos homólogos, para posteriormente adaptarlo a la línea celular Vero, por lo que, en este estudio se determinó la infectividad de un aislado mexicano de MPVa en otras 8 líneas continuas de mamífero y en un cultivo primario de fibroblastos de pollo. Esto se llevó a cabo infectando cada cultivo para obtener el título mediante dosis infectantes en cultivo celular al 50% (DICC₅₀). De esta manera, se identificaron 3 líneas celulares con títulos altos (A-72, BGM y PK-15), mientras que las líneas RK-13 y MARC-145 presentaron títulos moderados. Los hallazgos de este estudio permitieron explorar nuevas líneas celulares para optimizar el aislamiento de MPVa, lo que a su vez permitirá implementar técnicas de diagnóstico.

INTRODUCCIÓN

MPVa es un patógeno que ocasiona rinotraqueítis en pollos y pavos (2), sin embargo, la infección puede diseminarse al aparato reproductivo ocasionando una caída en la producción de huevo, así como disminución de la fertilidad en gallos. (7,10) Además, en presencia de agentes complicantes como *Escherichia coli* se puede producir el síndrome de cabeza hinchada. (7) MPVa es un miembro de la familia Paramixoviridae, subfamilia Pneumovirinae y se clasifica de acuerdo a sus características genéticas y antigénicas en cuatro subtipos denominados A, B, C y D. (6,9) La replicación de este virus *in vitro* se lleva a cabo en dos pasos, primero se propaga en cultivos primarios homólogos, cultivos de órganos traqueales o en embrión de pollo, y posteriormente, se adapta a la línea continua Vero. (3) Por lo tanto, en este estudio se cuantificó la infectividad de MPVa en diferentes cultivos celulares, para identificar a las líneas útiles para el diagnóstico de este virus.

MATERIALES Y MÉTODOS

Células. Las células empleadas fueron Vero (riñón de mono verde), LLC-MK₂ (riñón de mono Rhesus), MDBK (riñón de bovino), MDCK (riñón de perro), A-72 (carcinoma de perro), MARC-145 (riñón de feto de mono Rhesus), Hep-2 (carcinoma de laringe de humano), BGM (riñón de mono verde), RK-13 (riñón de conejo), PK-15 (riñón de cerdo), así como fibroblastos de embriones de pollo libres de patógenos específicos de 9 días. Los cultivos celulares se mantuvieron en Medio Esencial Modificado por Dulbecco (D-MEM) suplementado con 7% de suero fetal bovino (SFB) a 37° C hasta su uso.

Virus. El virus que se empleó en este estudio se obtuvo a partir de un aislamiento de campo de MPVa subtipo A, el cual fue sometido previamente a seis pases en cultivo primario de tráquea y a seis pases en células Vero (aMPV/A/chicken/Mx/Jal/2008).

Infectividad de MPVa en diferentes cultivos celulares. En este ensayo se llevó a cabo la titulación de la infectividad de MPVa, evaluando la capacidad del virus para producir efecto citopático (ECP) en cada uno de los cultivos celulares empleados, mediante dosis infectantes en cultivo celular al 50% (DICC₅₀), para este fin, cada uno de los cultivos se sembraron en placas de 96 pozos (1 x 10⁵ células/mL), se dejaron crecer durante 24 horas y posteriormente se infectaron con diluciones decuples seriadas de MPVa, el periodo de adsorción fue de dos horas, después el inóculo se reemplazó por MEM suplementado con 1% de SFB y la placa se mantuvo en incubación a 37°C durante tres días, después de este periodo las células se lavaron con PBS tres veces y fueron teñidas depositando en cada pozo 150µL de cristal violeta, una vez transcurridos 15 minutos, se realizaron otros tres lavados con agua destilada y las placas se dejaron secar a temperatura ambiente, por último, se observó al microscopio la formación de ECP y se obtuvo el título mediante el método Reed y Muench. (8)

RESULTADOS

Evaluación del ECP en diferentes cultivos celulares infectados con MPVa. El ECP más evidente se presentó en las células Vero y consistió en la formación de sincicios pequeños observables a partir de 18 horas post-infección, los cuales se volvieron gigantes (de más de 60 núcleos contados al microscopio) después de 72 horas post-infección, después de este periodo, las células comenzaron a lisarse. Por su parte, las células BGM junto con las células A-72 mostraron un ECP considerable que consistió en sincicios moderados (de 15 a 50 núcleos). En cambio, las células PK-15, MARC-145 y RK-13 mostraron redondeamiento, desprendimiento y aparente muerte celular. Por último, hubo cultivos en donde no se observó ningún ECP, en particular en las células LLC-MK₂, MDBK, MDCK, Hep-2 y en los fibroblastos de embrión de pollo.

Titulación de MPVa mediante DICC₅₀. En este ensayo los títulos más altos se obtuvieron en las células Vero, A-72, BGM y PK-15 (de 2.5 x 10⁶ a 6.3 x 10⁴ DICC₅₀/ml) y en las células MARC-145 y RK-13 títulos entre 3.6 x 10⁴ y 3.1 x 10³ DICC₅₀/ml, mientras que el resto de los cultivos resultaron negativos, cómo puede observarse en el Cuadro 1.

DISCUSIÓN

Para realizar este estudio se utilizaron a las células Vero como la línea de referencia, pues es en ellas en donde se alcanza el título más alto, esto puede ser debido a que éstas células presentan dos deficiencias en la respuesta de interferón (IFN), ya que por un lado tienen un daño genético en el locus de IFN β (5) y por otro lado, se ha demostrado que las células Vero también fallan en inducir un estado antiviral debido a una expresión muy baja del factor regulador de IFN 3 (IRF3). (1)

Además del empleo de las células Vero en el diagnóstico, a nivel experimental se han estado buscando nuevas alternativas para lograr la replicación eficiente de MPVa con títulos altos utilizando nuevas líneas continuas (4), y en este estudio se identificó un alto título de replicación en las líneas continuas A-72, PK-15 y BGM, además de un ECP notable que consistió en la formación de sincicios, aunque de un tamaño moderado observables a partir de las 48 horas, sin embargo, cabe mencionar que el virus stock empleado tenía seis pases previos en las células Vero y sólo uno en el resto de las células, así que el título probablemente se incrementaría con pases subsecuentes, por lo se pueden considerar a estas líneas como excelentes candidatas para la obtención de máximos títulos virales. Se identificó también un título moderado en las líneas MARC-145 y RK-13. Aunque estas líneas celulares no son buenas candidatas para el aislamiento de MPVa, podrían ser interesantes para el estudio de restricción de hospedero a este virus. En estas líneas se observó en cambio redondeamiento y muerte celular. La aparente muerte celular podría estar relacionada con la inducción de apoptosis, que a su vez es un factor capaz de restringir la replicación viral. Por lo tanto, este estudio contribuye a optimizar el aislamiento de MPVa en líneas celulares donde se obtienen

títulos altos de antígeno de referencia con un evidente ECP e inclusive algunas de ellas son más fáciles de mantener *in vitro* que las células Vero.

REFERENCIAS

1. Chew, T., R. Noyce, S.E. Collins, M.H. Hancock, L. Mossman. Characterization of the interferon regulatory factor 3-mediated antiviral response in a cell line deficient for IFN production. *Mol. Immunol.* 46: 393–399. 2009.
2. Cook, J. A. K. Avian pneumovirus infections in turkeys and chickens. *Review. Vet. J.* 160:118–125. 2000.
3. Cook, J.K.A., D. Cavanagh. Review: Detection and differentiation of avian pneumoviruses (metapneumoviruses). *Avian Pathol.* 31: 117-132. 2002.
4. Coswing L.T., M.B. Dos santos, H.M. Hafez, H.L. Ferreira, C.W. Arns. Propagation of avian metapneumovirus subtypes A y B using chicken embryo related and other cell systems. *J. Virol. Methods.* 167: 1-4. 2010.
5. Emeny, J.M., M.J. Morgan. Regulation of interferon system evidence that Vero cells have a genetic defect in interferon production. *J. Gen. Virol.* 43: 247-252. 1979.
6. Juhasz, K., A. J. Easton. Extensive sequence variation in the attachment (G) proteína gene of avian pneumovirus: evidence for two distinct subgroups. *J. Gen. Virol.* 75: 2873-2880. 1994.
7. Gough, R. E. Avian pneumoviruses. In: *Diseases of poultry*, 11th ed. Y. M. Saif, H. J. Barnes, J. R. Glisson, A. M. Fadly, L. R. McDougald, and D. E. Swayne, eds. Iowa State University Press, Ames, IA. pp. 308–317. 2003.
8. Reed, L.J., H. Muench. A simple method of estimating fifty percent endpoints. *The American Journal of Hygiene.* 27 (3): 493-497. 1938.
9. Velayudhan, BT., B. McComb, R.S. Bennet, V.C. Lopes, D. Shaw, D.A. Halvorson, K.V. Nagaraja. Emergence of a virulent type C avian Metapneumovirus in turkeys in Minnesota. *Avian Dis.* 49: 520-526. 2005
10. Villareal, L.Y.B., P.E. Brandao, J.L. Chacón, M.S. Assayag, P.C. Maiorka, P. Raffi, B.S. Saidenberg, R.C. Jones, A.J.P. Ferreira. Orchitis in Roosters with Reduced Fertility Associated with Avian Metapneumovirus Infections. *Avian Dis.* 51: 9000-9004. 2007.

Cuadro 1. Títulos obtenidos después de infectar cada cultivo celular con MPVa.

Cultivo celular	DICC₅₀/mL
Vero	2.51 x 10 ⁶
A-72	1.99 x 10 ⁶
BGM	1 x 10 ⁵
PK-15	6.3 x 10 ⁴
MARC-145	3.6 x 10 ⁴
RK-13	3.16 x 10 ³
LLC-MK₂	Negativo
MDBK	Negativo
MDCK	Negativo
HEP-2	Negativo
Fibroblastos	Negativo

NATIONAL ANTIMICROBIAL RESISTANCE MONITORING SYSTEM (NARMS) ON THE FARM FOR POULTRY-PILOT STUDY RESULTS

SISTEMA NACIONAL DE VIGILANCIA DE RESISTENCIA A LOS ANTIBIÓTICOS (NARMS) EN LA GRANJA PARA RESULTADOS DE ESTUDIOS PILOTO EN AVES

T. Gaydos^A, C. Hofacre^A, R. Singer^B, R. Berghaus^A, V. Baxter^A, and P. McDermott^C

^AThe University of Georgia- Department of Population Health. Athens, GA, USA

^BUniversity of Minnesota- Department of Population Health. St. Paul, MN, USA

^CUnited States Food and Drug Administration- Center for Veterinary Medicine. Laurel, MD, USA

RESUMEN

Los genes de resistencia a los antibióticos han estado circulando en las bacterias por más de 30,000 años. Los profesionales médicos han combatido la resistencia a los antibióticos desde que se aisló el primer antibiótico y se produjo en masa. En 1996 se inició NARMS para monitorear la susceptibilidad a los antibióticos en los seres humanos, los mercados al por menor, y los animales productores de alimentos. Desde 1996 hasta el 2011 NARMS ha recolectado más de 107,000 muestras clínicas de los seres humanos, los animales productores de alimentos y los mercados de carne al por menor. Estas muestras proporcionaron información valiosa acerca de los patrones de resistencia a los antibióticos. En 2011, la FDA y el USDA reconocieron que los aislamientos de *Salmonella* a partir de muestras de plantas de procesamiento no fueron suficientes para un sistema nacional de monitoreo. Un estudio piloto recogió 400 muestras de arrastre en botas dentro de las casetas de pollos de engorda y 100 muestras en casetas de pavos para aislar *Salmonella* y *Campylobacter* y controlar la resistencia a los antibióticos. De las muestras recogidas, 5 % de *Salmonella* y 50% de *Campylobacter* fueron susceptibles a los antibióticos y 26% de *Salmonella* y 8% de *Campylobacter* fueron resistentes a más de tres antibióticos.

SUMMARY

The genes for antibiotic resistance have been circulating in bacteria for more than 30,000 years. Medical professionals have combated antibiotic resistance since the first antibiotic was isolated and mass-produced. In 1996 NARMS was started to monitor antibiotic susceptibility in humans, retail markets, and food-producing animals. From 1996-2011 NARMS collected more than 107,000 clinical samples from humans, food producing animals, and retail meat markets. These samples provided valuable information about antibiotic resistance patterns.

In 2011 the FDA and USDA recognized that *Salmonella* isolates from processing plant samples were not sufficient for a national monitoring system. A pilot study collected 400 boot sock samples from broiler houses and 100 samples from turkey houses to isolate *Salmonella* and *Campylobacter* and monitor antibiotic resistance. Of the samples collected, 53% of *Salmonella* and 50% of *Campylobacter* were pansusceptible to antibiotics and 26% of *Salmonella* and 8% of *Campylobacter* were resistant to more than three antibiotics.

ABSTRACT

The National Antimicrobial Resistance Monitoring System is an interagency program that tracks antimicrobial resistance in foodborne bacteria from food animals, retail meats, and human clinical cases. To evaluate the logistics and potential value of a pre-harvest component for poultry monitoring, we conducted a pilot study collecting samples from poultry houses. During the course of the pilot study 400 boot sock samples were collected from 100 broiler houses and 100 samples from 25 turkey houses. Standard microbiological procedures were used to isolate *Salmonella* and *Campylobacter* and test them for susceptibility to a panel of antimicrobials. Of the samples collected on poultry farms, *Salmonella* was isolated from 206 (41%) boot socks and *Campylobacter* from 391 (78%) boot socks. Of the isolates obtained, 58.3% of *Salmonella* and 47.6% of *Campylobacter* were pansusceptible to antimicrobials and 16.0% of *Salmonella* and 11.3% of *Campylobacter* were resistant to three or more antimicrobials.

INTRODUCTION

While the most urgent problems of antimicrobial resistance are associated with hospital pathogens (1) a comprehensive strategy to address resistance is incomplete without examining the potential roles of agricultural antibiotic use. In 1996 NARMS was started to monitor antimicrobial susceptibility in humans, retail markets, and food-producing animals. From 1996-2011 NARMS collected more than 206,000 clinical samples from human cases, processing plant samples, food producing animals, and retail meat markets (2). These samples provided valuable information about antimicrobial resistance patterns and trends over time.

For animal monitoring, NARMS has historically relied on HACCP samples collected by FSIS. Most of these samples consist of product specimens collected at the end of processing, and therefore, are not true animal samples. In addition, data shows that the microbial status of animals changes upon transport such that testing at slaughter may not be a good indicator of on-farm status (3). To examine the potential value of a pre-harvest component to NARMS, a pilot study was proposed to determine the prevalence of antimicrobial resistant *Salmonella* and *Campylobacter* on the farm in commercial poultry.

MATERIALS AND METHODS

NARMS isolate collection. In this study 100 broiler houses and 25 turkey houses were used. The farms were sampled over six months. On each visit, samples were collected using four boot socks per house: two boot socks, one on each foot, were used for each half of the house. The samples were taken from the area between the feeder and drinker lines. After sampling, the boot socks were placed into a Whirlpak® (Nasco) bag with 100mL of buffered peptone water (BPW) and the air removed from the bag. The samples were transported on ice to the diagnostic lab for isolation.

Samples were processed for isolation and identification using standard microbiological techniques (4,5). The *Campylobacter* enrichment broth was Bolton's broth and the selective agar was Campy-Cefex (Remel). The *Salmonella* enrichment was tetrathionate-brilliant green broth and iodine. This was added to the BPW and the selective agar was XLT4 agar (Remel). Isolates were sent to the FDA Center for Veterinary Medicine for serotyping and susceptibility testing (6).

Antimicrobial minimal inhibitory concentrations (MICs) were determined by broth microdilution according to the Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI) standards (7,8,9) using a 96-well microtiter plate (Sensititre, Trek Diagnostic Systems, Thermo Fisher Scientific Inc., Cleveland, OH). *Salmonella* isolates were tested using a custom plate developed for Gram-negative bacteria (catalog # CMV2AGNF) and *Campylobacter* isolates were tested using a custom plate developed for *Campylobacter* testing (catalog # CAMPY). CLSI approved interpretive criteria were used when available; otherwise provisional NARMS breakpoints were used (6). The antimicrobial agents tested with *Salmonella* were: Amikacin (AMI), Ampicillin (AMP), Amoxicillin/Clavulanic Acid (AUG), Ceftriaxone (AXO), Chloramphenicol (CHL), Ciprofloxacin (CIP), Trimethoprim/sulfamethoxazole (SXT), Cefoxitin (FOX), Gentamicin (GEN), Kanamycin (KAN), Nalidixic Acid (NAL), Sulfisoxazole (FIS), Streptomycin (STR), Tetracycline (TET), Ceftiofur (TIO). The antimicrobial agents tested with *Campylobacter* were: ciprofloxacin (CIP), doxycycline (DOX), erythromycin (ERY), gentamicin (GEN), and meropenem (MER), tetracycline (TET), azithromycin (AZI), clindamycin (CLI), florfenicol (FFN), nalidixic acid (NAL), and telithromycin (TEL). CLSI interpretive criteria, based on epidemiological cutoff values, are available for: CIP (≥ 4 $\mu\text{g/ml}$), TET (≥ 16 $\mu\text{g/ml}$), ERY (≥ 32 $\mu\text{g/ml}$), and DOX (≥ 8 $\mu\text{g/ml}$). NARMS resistance breakpoints used for other agents were: >8 $\mu\text{g/mL}$ for GEN, >16 $\mu\text{g/mL}$ for MER, >8 $\mu\text{g/mL}$ for AZI, >8 $\mu\text{g/mL}$ for CLI, >64 $\mu\text{g/mL}$ for NAL, and >16 $\mu\text{g/mL}$ for TEL [10].

RESULTS AND DISCUSSION

Of the samples collected on poultry farms, *Salmonella* was isolated from 206 (41%) boot socks and *Campylobacter* from 391 (78%) boot socks. Of the *Salmonella* isolates 51 (24.8%) Kentucky, 26 (12.6%) Infantis, 23 (11.2%) Mbandaka, 16 (8.7%) Cubana, 15 (7.3%) Typhimurium, 9 (4.4%) Enteritidis, 9 (4.4%) Alachua, 6 (2.9%) Newport, 10 (4.9%) other serotypes. Of the *Salmonella* isolated, 120 (58.3%) were susceptible to all antimicrobials tested. Of the antimicrobial resistant isolates, 6 (2.9%) were resistant to one antimicrobial, 47 (22.8%) were resistant to two antimicrobials, 7 (3.4%) were resistant to three antimicrobials, 10 (4.9%) were resistant to four antimicrobials, 16 (7.8%) were resistant to five or more antimicrobials. The individual antimicrobial susceptibilities are shown in Figure 1.

Of the *Campylobacter* isolated the species were as follows: 240 (61%) jejuni, 151 (39%) coli. Of the *Campylobacter* isolates 186 (47.6%) were susceptible to all tested antimicrobials, 114 (29.2%) were resistant to one antimicrobial, 47 (12.0%) were resistant to two antimicrobials and 44 (11.3%) were resistant to three antimicrobials. Resistance to tetracycline was detected in 155 (39.6%) isolates, ciprofloxacin in 92 (23.5%) isolates, nalidixic acid in 91 (23.3%) isolates, and azithromycin in 1 (0.3%) isolate (Figure 2).

REFERENCES

1. Prevention, C.f.D.C.a., *Antibiotic Resistance Threats in the United States, 2013*, 2013.
2. Services, D.o.H.a.H., *The National Antimicrobial Monitoring System- Strategic Plan 2012-2016*.
3. Wesley, I.V., Harbaugh, E., Trampel, D. W., Rivera, F., Rostagno, M. H., & Hurd, H. S., *Effect of preslaughter events on the prevalence of Salmonella in market-weight turkeys*. Journal of Food Protection, 2006. **69**(8): p. 1785-1793.
4. W.D. Waltman, R.K.G., *Salmonellosis*, in *A Laboratory Manual for the Isolation, Identification, and Characterization of Avian Pathogens*, L. Dufour-Zavala, Editor. 2008, American Association of Avian Pathologists. p. 3-9.
5. J.A. Wagenaar, W.F.J.-R., *Campylobacter Infections in Poultry*, in *A Laboratory Manual for the Isolation, Identification, and Characterization of Avian Pathogens*, L. Dufour-Zavala, Editor. 2008, American Association of Avian Pathologists. p. 27-30.
6. Administration, U.S.F.a.D., *NARMS 2011 Retail Meat Annual Report 2012*: <http://www.fda.gov/downloads/AnimalVeterinary/SafetyHealth/AntimicrobialResistance/NationalAntimicrobialResistanceMonitoringSystem/UCM334834.pdf>.
7. Institute, C.a.L.S., *Performance Standards for Antimicrobial Disk and Dilution Susceptibility Tests for Bacteria Isolated from Animals*, in *Approved Standard-Second Edition*2002, CLSI: Wayne, PA.
8. Institute, C.a.L.S., *Performance Standards for Antimicrobial Disk and Dilution Susceptibility Tests for Bacteria Isolated from Animals*, in *Informational Supplement (M31-S1)*2004, CLSI: Wayne, PA.
9. Institute, C.a.L.S., *Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing*, in *Twenty-Second Informational Supplement (M100-S22)*2012. CLSI: Wayne, PA.
10. Paul S. Mead, L.S., Vance Dietz, Linda F. McCaig, Joseph S. Bresee, Craig Shapiro, and R.V.T. Patricia M. Griffin, *Food-Related Illness and Death in the United States*. Emerging Infectious Diseases, 1999. **5**(5): p. 607-625.

Figure 1. The antimicrobials tested with the *Salmonella* isolates at the left; the number of isolates resistance on the right. Lighter gray bars represent antimicrobial resistant isolate percentages.

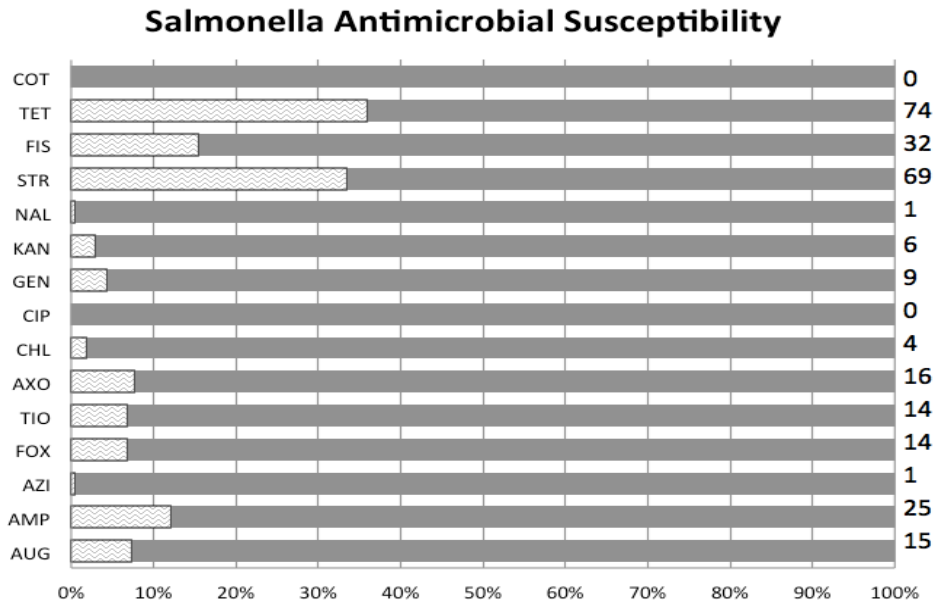
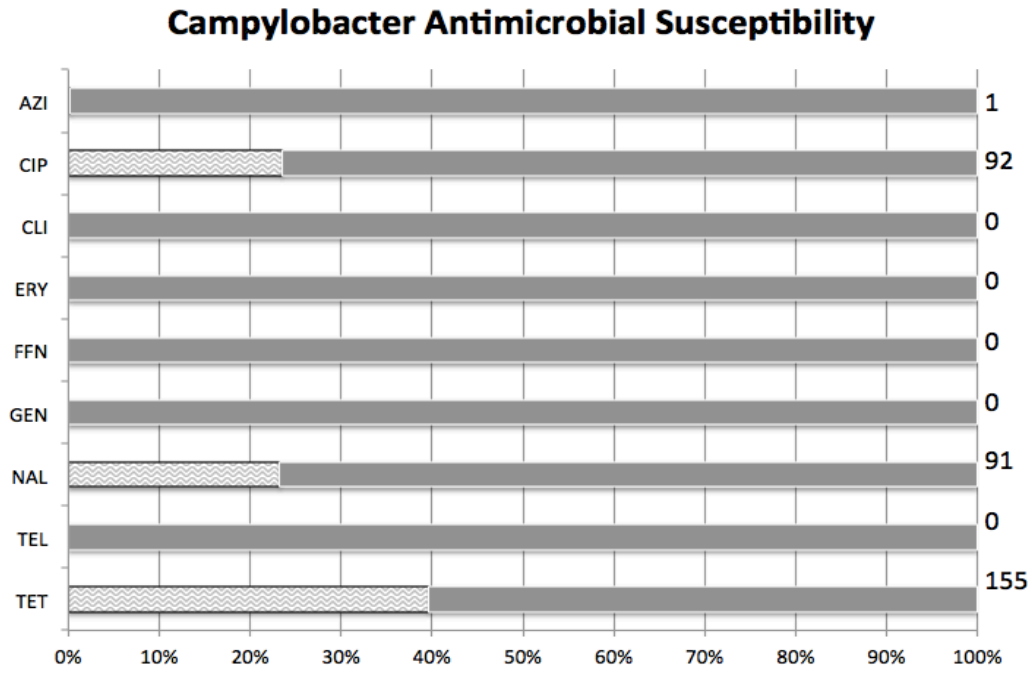


Figure 2. The antimicrobials tested with the *Campylobacter* isolates at the left; the number of isolates resistance on the right. Lighter gray bars represent antimicrobial resistant isolate percentages



MULTILOCUS SEQUENCE TYPING (MLST) OF CAMPYLOBACTERS TO IDENTIFY POTENTIAL SOURCES AND VEHICLES OF COLONIZATION IN TURKEY FARMS

TIPIFICACIÓN SECUENCIAL MULTILOCAL (TSM) DE CAMPILOBACTERIAS PARA IDENTIFICAR FUENTES Y VEHÍCULOS POTENCIALES DE COLONIZACIÓN EN GRANJAS DE PAVOS

M. Giacomelli and A. Piccirillo

Department of Comparative Biomedicine and Food Science, University of Padua
Viale dell'Università, 16 - 35020 Legnaro (PD), Italy

RESUMEN

Se realizó una investigación molecular en fuentes y vehículos potenciales de infección con *Campylobacter* en granjas comerciales de pavos. Se aislaron cepas de *C. jejuni* y *C. coli* de reproductoras y su progenie criadas en dos diferentes granjas por tres ciclos de producción consecutivos y fueron analizadas por medio de la tipificación secuencial multilocal (TSM). Las cepas aisladas de fuentes medioambientales (P.E. Agua de beber, antecámara y pisos interiores, ratones e insectos), se colectaron durante los mismos ciclos de producción y también fueron analizadas. La TSM de los *C. jejuni* y *C. coli* aislados se realizó de acuerdo con los siete esquemas locales empleando los juegos primarios y las condiciones experimentales sugeridas por la base de dato de PubTSM de *Campylobacter*. Se detectaron similitudes genéticas entre los aislamientos de las reproductoras y su progenie, así como entre las aves y algunas de las fuentes mediambientales, principalmente en el agua de beber. La genotipificación es una herramienta poderosa, para entender las dinámicas epidemiológicas del *Campylobacter* en granjas de pavos.

SUMMARY

A molecular investigation on potential sources and vehicles of *Campylobacter* infection in commercial turkey farms was carried out. *C. jejuni* and *C. coli* strains isolated from breeders, their progeny and the growing flocks reared in two different farms for three sequential production cycles were analysed by multilocus sequence typing (MLST). Strains isolated from environmental sources (drinking water, anteroom and in-house floor, flies, *Alphitobius diaperinus*), collected during the same production cycles, were also analysed. MLST was performed according to the seven-loci schemes employing the primer sets and the experimental conditions suggested by the *Campylobacter* PubMLST database. Genetic similarity was detected between isolates from breeders and their progeny, as well as between birds and environmental sources, such as flies, *Alphitobius diaperinus* and drinking water. Results of the present study suggest that these environmental sources may be involved in *Campylobacter* colonization of meat turkeys.

INTRODUCTION

Thermophilic campylobacters are among the leading bacterial pathogens involved in human gastroenteritis worldwide (8). In the European Union, campylobacteriosis has been the most commonly reported zoonotic disease in humans since 2005 (6). Members of the *Campylobacter* genus naturally colonize a wide range of domestic and wild animals (8). Poultry are recognized as the main reservoir of the microorganism and rarely show clinical signs of disease. Particularly, chickens and turkeys carry *Campylobacter* at high concentration in their intestinal tract, determining a high risk of carcass contamination during the slaughtering process. The target for the control of *Campylobacter* in poultry should be the farm; therefore it is crucial to identify the most important sources for flock colonization in order to develop intervention strategies (2). Although some studies on the epidemiology of *Campylobacter* in poultry production have been carried out, sources and vehicles of flock colonization are still poorly understood. In addition, despite the recognized importance of turkeys in the transmission of *Campylobacter* and the increased turkey meat production in the last decade, very few studies on the epidemiology of this microorganism have been conducted in this poultry species.

In the present study, we used the MLST method to investigate on the relationships between campylobacters colonizing animals and other sources in the turkey farm environment in order to better understand which one of them can act as source or vehicle of infection for reared animals.

MATERIALS AND METHODS

Strain collection. *C. jejuni* (n = 57) and *C. coli* strains (n = 78) from different sources were examined in the present study. Strains were isolated between April 2012 and June 2013 during a longitudinal sampling carried out for three sequential production cycles in two meat turkey farms (farm A and farm B) located in Veneto Region, Northern Italy. During the first production cycle two flocks per farm were examined, one composed by progeny of *Campylobacter*-positive breeders, whereas the second, reared within a different house, was composed by progeny of breeders of unknown *Campylobacter* status. Samples from the farm environment were also collected. In each farm a target turkey house was selected, where the monitoring continued for the two following production cycles. *Campylobacter* spp. isolation was performed as previously described (7). Water samples were filtered through 0.2 µm membrane filters (Sartorius, Goettingen, Germany) using a vacuum pump before processing.

*Campylobacter*s genotyped in the present study included strains from breeders (n = 19) and from growing turkeys (n = 39), as well as strains isolated from drinking water (water line, n = 2; drinkers, n = 24), the anteroom (n = 2) and in-house floor (n = 22), flies (n = 13) and *Alphitobius diaperinus* (n = 12). They were selected in order to represent each source of isolation and sampling in both farms.

Genotyping. Strains were genotyped by multilocus sequence typing (MLST) according to the seven loci scheme for *C. jejuni* and *C. coli* developed by Dingle *et al.* (3,4). DNA was extracted from overnight cultures by thermal lysis of the bacterial cells and internal fragments of the target genes were amplified by PCR and then sequenced using primers and reaction conditions suggested by the *Campylobacter* MLST database (<http://pubmlst.org/campylobacter/>). Allele number identification and sequence type (ST) and clonal complex (CC) assignment for each isolate, were obtained by interrogation of the *Campylobacter* MLST database.

RESULTS AND DISCUSSION

Twenty-two different STs, 10 in *C. jejuni* (STs 51, 104, 257, 2116, 2274, 2863, 3102, 2850, 2863 and 6941) and 12 in *C. coli* (STs 825, 829, 832, 1170, 1586, 1628, 1764, 2912, 5150, 5401, 6689 and 6940) were detected among the 134 strains examined. Five STs (829, 832, 2116, 2274 and 2863) were common to different sources. Out of four STs detected among breeders strains, two (STs 829 and 2863) were detected also in isolates from their progeny and in environmental samples. The occurrence of same STs among breeders and their progeny may suggest the vertical transmission of *Campylobacter* spp. However, it should be noticed that these STs were detected not only in the progeny flocks, but also in turkeys of different origin, as well as in environmental samples, suggesting a different origin of these genotypes, rather than their vertical transmission.

Overlapping of STs was observed also between flocks of different origin reared in the same farms, suggesting the occurrence of cross-contamination between flocks. The finding of STs matching between isolates from flies captured in one flock and from animals reared in the other flock suggests flies as responsible for cross-contamination between flocks, as previously demonstrated experimentally (10). Also, STs of strains from *Alphitobius diaperinus* matched those of isolates from growing turkeys in several instances. Unlike flies, these insects are less likely to be vectors of cross-contamination between flocks reared in the same farm or source of entry of *Campylobacter* spp. in the farm, since they live within the poultry house, hiding and persisting over time in cracks and joints of the floor and walls (9). They may rather serve as ongoing reservoirs of contamination within a poultry flock and could be involved in carry-over between subsequent flocks (1). However, the latter hypothesis was not supported by our study, since no strains were isolated from any source during downtime.

Regarding water, the STs of the isolates recovered from the drinkers matched those of the turkey isolates on seven of the eight testing occasions. It is likely that water contamination followed flock infection, since previous studies showed the rapid contamination of water in drinkers in *Campylobacter*-positive flocks due to faecal excretion (5). Our findings, *i.e.* the widespread occurrence of turkey-colonizing *Campylobacter*s in water of drinkers, suggest that genotypes colonizing turkeys are able to survive in water. Therefore, contaminated drinking water may act as an effective vector in spreading these microorganisms among birds. However, the role of water as source of infection cannot be excluded since in the first production cycle of farm B, *Campylobacter*s belonging to the same ST (829) were concurrently isolated from the water line of one poultry house and the turkey flock receiving that drinking water.

In the present study, several strain isolated from the environment were genotypically identical to isolates recovered from growing turkey flocks. Although it was not possible to define the most likely source of flock colonization since strains from environmental sources were isolated concurrently with birds, this study provides further insight into the possible transmission routes and the epidemiology of *C. jejuni* and *C. coli* in commercial turkey farms.

REFERENCES

1. Bates, C., Hiatt, K.L., and N.J. Stern. Relationship of *Campylobacter* isolated from poultry and from darkling beetles in New Zealand. *Avian Dis.* 48:138-147. 2004.
2. Bull, S.A., Allen, V.M., Domingue, G., Jørgensen, F., Frost, J.A., Ure, R., Whyte, R., Tinker, D., Corry, J.E., Gillard-King, J., and T.J. Humphrey. Sources of *Campylobacter* spp. colonizing housed broiler flocks during rearing. *Appl. Environ. Microbiol.* 72:645-652. 2006.
3. Dingle, K.E., Colles, F.M., Wareing, D.R., Ure, R., Fox, A.J., Bolton, F.E., Bootsma, H.J., Willems, R.J., Urwin, R., and M.C. Maiden. Multilocus sequence typing system for *Campylobacter jejuni*. *J. Clin. Microbiol.* 39:14-23. 2001.
4. Dingle, K.E., Colles, F.M., Falush, D., and M.C. Maiden. Sequence typing and comparison of population biology of *Campylobacter coli* and *Campylobacter jejuni*. *J. Clin. Microbiol.* 43:340-347. 2005.
5. European Food Safety Authority. Scientific Opinion on *Campylobacter* in broiler meat production: control options and performance objectives and/or targets at different stages of the food chain. *EFSA Journal* 9:2105. 2011.
6. European Food Safety Authority and European Centre for Disease Prevention and Control. The European Union Summary Report on Trends and Sources of Zoonoses, Zoonotic Agents and Food-borne Outbreaks in 2011. *EFSA Journal* 11:3129. 2013.
7. Giacomelli, M., Andrighetto, C., Lombardi, A., Martini, M., and A. Piccirillo. A longitudinal study on thermophilic *Campylobacter* spp. in commercial turkey flocks in Northern Italy: occurrence and genetic diversity. *Avian Dis.* 56:693-700. 2012.
8. Humphrey, T., O'Brien, S., and M. Madsen. *Campylobacter*s as zoonotic pathogens: a food production perspective. *Int. J. Food. Microbiol.* 117:237-257. 2007.
9. Kaufman, P.E., Burgess, M., Rutz, D.A., and C. Glenister. Population dynamics of manure inhabiting arthropods under an integrated pest management (IPM) program in New York poultry facilities-3 case studies. *J. Appl. Poult. Res.* 11:90-103. 2002.
10. Shane, S.M., Montrose, M.S., and K.S. Harrington. Transmission of *Campylobacter jejuni* by the housefly (*Musca domestica*). *Avian Dis.* 29:384-391. 1985.

FIRST COMPARISON OF *CAMPYLOBACTER JEJUNI* AND *CAMPYLOBACTER COLI* ISOLATED FROM HUMANS AND POULTRY IN ITALY: PRELIMINARY RESULTS

PRIMERA COMPARACIÓN ENTRE *CAMPYLOBACTER JEJUNI* Y *CAMPYLOBACTER COLI* AISLADOS DE HUMANOS Y AVES EN ITALIA: RESULTADOS PRELIMINARES

M. Giacomelli^A, A. Piccirillo^A, C. Salata^{BC}, S. Bettanello^B, E. De Canale^{E^B}, and G. Palù^{G^{BC}}

^ADepartment of Comparative Biomedicine and Food Science, University of Padua, Viale dell'Università, 16 - 35020 Legnaro (PD), Italy

^BRegional Reference Centre for Gastroenteric Diseases, Microbiology and Virology Unit, Azienda Ospedaliera di Padova, Via Giustiniani, 2 - 35128 Padua, Italy

^CDepartment of Molecular Medicine, University of Padua, Via Gabelli, 63 - 35121 Padua, Italy

RESUMEN

El presente estudio fue realizado para evaluar la relación genética entre cepas de *Campylobacter jejuni* y *C. coli* aisladas de humanos y pollo de engorda, en el norte de Italia. Los aislamientos de humanos fueron colectados de casos clínicos de gastroenteritis aguda, mientras que las de los pollos fueron aisladas de pollos de engorda en granjas comerciales. La tipificación molecular fue llevada a cabo por medio de tipificación secuencial multilocal (TSM) de acuerdo con siete esquemas locales empleando los juegos primarios y las condiciones experimentales sugeridas por la base de datos del PubTSM de *Campylobacter*. Una amplia diversidad genética fue detectada entre las campilobacterias aisladas tanto de humanos y pollos, con una variedad mayor en las aisladas en humanos en comparación con las de los pollos. Un número mayor de nuevos alelos y TSs fueron hallados en ambas cepas tanto de humanos como en pollos, mientras que se halló un número menor de relaciones genéticas entre las campilobacterias de humanos y pollos. A pesar de lo que es comúnmente reportado, de acuerdo a nuestros descubrimientos los pollos no parecen ser una fuente predominante de la campilobacteriosis humana.

SUMMARY

The present study was undertaken to evaluate the genetic relationship between *Campylobacter jejuni* and *C. coli* strains isolated from humans and broilers in Northern Italy. Human isolates were recovered from clinical cases of acute gastroenteritis, whereas chicken strains were isolated from broilers in commercial farms. Molecular typing was carried out by multilocus sequence typing (MLST) according to the seven-loci schemes employing the primer sets and the experimental conditions suggested by the *Campylobacter* PubMLST database. A wide genetic diversity among campylobacters isolated from both humans and chickens was detected, with a higher diversity in human isolates compared to chickens. A high number of new sequence types were found in both human and chicken strains, whereas a low level of genetic relatedness was noticed between human and chicken campylobacters. Despite what is commonly reported, according to our findings chickens seem not to be the predominant source of human campylobacteriosis.

INTRODUCTION

Molecular typing has been used in source attribution studies to estimate the importance of different *Campylobacter* reservoirs and to analyse transmission routes for human campylobacteriosis (7). Currently MLST represents the method of choice for genotyping of *Campylobacter* spp. and it is extensively used for source attribution of human cases, as it allows assessing geographical, temporal and host species-related variation in type (1,4).

To our knowledge, genotyping by MLST sequencing has not previously been published from Italian *Campylobacter* isolates neither in humans nor in chickens, their main reservoir. With the aim to fulfil this lack of information, in the present paper we report the first results regarding *C. jejuni* and *C. coli* genotypes implicated in human gastroenteritis cases in Italy and their genetic relatedness with chicken isolates.

MATERIALS AND METHODS

Strains. Eighteen human *Campylobacter* strains (11 *C. jejuni* and 7 *C. coli*) and 39 chicken strains (23 *C. jejuni* and 16 *C. coli*) were included in the study. Human strains were isolated from clinical cases of acute gastroenteritis during the routine activity of the Regional Reference Centre for Infectious Diseases in Veneto region (North-Eastern Italy). Chicken isolates derived from a survey carried out in commercial farms located in North-Eastern Italy (5). Both human and chicken isolates were collected during 2009.

MLST. Genotyping was performed according to the seven-loci schemes for *C. jejuni* and *C. coli* developed by Dingle *et al.* (3,4), employing the primer sets and the experimental conditions suggested by the *Campylobacter* MLST database (<http://pubmlst.org/campylobacter/>). Genomic DNA was extracted from overnight cultures grown on tryptic soy agar (OXOID, Basingstoke, UK) supplemented with 5% horse blood (OXOID) by simple lysis of the bacterial cells. Sequences were aligned to the alleles in the *C. jejuni* and *C. coli* PubMLST database to determine the allele numbers. The sequence type (ST) and the clonal complex (CC) of each allelic profile were designated by interrogation of the database. New allele sequences and STs were submitted to the curator of the *Campylobacter* PubMLST database for number designation.

RESULTS AND DISCUSSION

Out of 57 *Campylobacter* strains, 35 different STs were identified (Table 1). Among human strains 16 different STs were observed, whereas 19 different STs were detected among chicken strains. Overall, 17 STs, including 6 human and 11 chicken isolates were not previously described. Thirty-nine isolates grouped into eight CCs, while the remaining 19 isolates had STs that could not be assigned to any CC. In detail, 14 STs of human isolates were grouped into six known CCs, while two STs did not belong to any CC. Among chicken isolates, 13 STs belonged to 5 known CCs, while six STs did not belong to any CC. Two CCs, ST-828 CC and ST-21 CC, predominated and accounted for 22.8% (n = 13) and 21% (n = 12) of all the isolates, respectively. ST-21 CC, ST-443 CC and ST-828 CC were shared between human and chicken campylobacters, whereas no overlapping STs were found.

A high genetic diversity was detected among human and chicken *C. jejuni* and *C. coli* population examined herein, as widely documented all over the world (2,6,8,9). By comparing human and chicken *Campylobacter* isolates, we also noticed that a higher diversity in CCs was present among human *C. jejuni* compared to chicken isolates, which is consistent with previously published data (2). On the other hand, a larger number of novel STs unassigned to a defined CC among chicken *C. coli* compared to human isolates was identified, in accordance with that reported by other studies (6,9). In the present study, no human STs were the same as those found in chickens, whereas three CCs were found overlapping between human and chicken isolates. A more evident overlap between human and chicken *C. jejuni* genotypes has been reported by other authors (2,7,8).

Molecular typing has previously been used to infer the source and the route of transmission of campylobacteriosis in humans and an overlapping of genotypes in *Campylobacter* species infecting humans and chickens suggested this food-producing animal as the main source of human infection (7,8). In our study, *Campylobacter* genotypes implicated in human gastroenteritis cases did not show a substantial matching with isolates originating from chickens. These preliminary data, therefore, would suggest a weak association between human and chicken *Campylobacter* isolates circulating in Italy. However, more data are needed to further clarify genotype distribution and population structure of thermophilic *Campylobacter* spp. and to identify potential sources of human campylobacteriosis in Italy.

REFERENCES

1. Ahmed, M.U., Dunn, L., and E.P. Ivanova. Evaluation of current molecular approaches for genotyping of *Campylobacter jejuni* strains. *Foodborne Pathog. Dis.* 9:375-385. 2012.
2. de Haan, C.P., Kivisto, R., Hakkinen, M., Rautelin, H., and M.L. Hanninen. Decreasing trend of overlapping multilocus sequence types between human and chicken *Campylobacter jejuni* isolates over a decade in Finland. *Appl. Environ. Microbiol.* 76:5228-5236. 2010.
3. Dingle, K.E., Colles, F.M., Wareing, D.R., Ure, R., Fox, A.J., Bolton, F.E., Bootsma, H.J., Willems, R.J., Urwin, R., and M.C. Maiden. Multilocus sequence typing system for *Campylobacter jejuni*. *J. Clin. Microbiol.* 39:14-23. 2001.
4. Dingle, K.E., Colles, F.M., Falush, D., and M.C. Maiden. Sequence typing and comparison of population biology of *Campylobacter coli* and *Campylobacter jejuni*. *J. Clin. Microbiol.* 43:340-347. 2005.

5. Giacomelli, M., Andrighetto, C., Rossi, F., Lombardi, A., Rizzotti, L., Martini M., and A. Piccirillo. Molecular characterization and genotypic antimicrobial resistance analysis of *Campylobacter jejuni* and *Campylobacter coli* isolated from broiler flocks in Northern Italy. *Avian Pathol.* 41:579-88. 2012.

6. Griekspoor, P., Engvall, E.O., Olsen, B., and J. Waldenstrom. Multilocus sequence typing of *Campylobacter jejuni* from broilers. *Vet. Microbiol.* 140:180-185. 2010.

7. Kittl, S., Heckel, G., Korczak, B.M., and P. Kuhnert. Source attribution of human *Campylobacter* isolates by MLST and *fla*-typing and association of genotypes with quinolone resistance. *PLoS One* 8:e81796. 2013.

8. Sheppard, S.K., Dallas, J.F., Strachan, N.J., MacRae, M., McCarthy, N.D., Wilson, D.J., Gormley, F.J., Falush, D., Ogden, I.D., Maiden, M.C., and K.J. Forbes. *Campylobacter* genotyping to determine the source of human infection. *Clin. Infect. Dis.* 48:1072-1078. 2009.

9. Wirz, S.E., Overesch, G., Kuhnert, P., and B.M. Korczak. Genotype and antibiotic resistance analyses of *Campylobacter* isolates from ceca and carcasses of slaughtered broiler flocks. *Appl. Environ. Microbiol.* 76:6377-6386. 2010.

Table 1. *C. jejuni* and *C. coli* MLST genotypes among human and chicken isolates. New sequence types are shown in bold face.

Source	<i>Campylobacter</i> species	CC	ST	N°	
Human	<i>C. jejuni</i>	ST-257	257	2	
			6852	1	
		ST-206	572	2	
		ST-443	443	1	
			2361	1	
		ST-21	6851	1	
		ST-353	3327	1	
		NA	6850	1	
		NA	6856	1	
		<i>C. coli</i>	ST-828	827	1
				829	1
				854	1
				1556	1
				2317	1
	6853		1		
	6854		1		
Chicken	<i>C. jejuni</i>	ST-21	50	6	
			5553	1	
			6862	1	
			6863	1	
			6864	1	
			6865	1	
		ST-446	2850	4	
		ST-443	6867	1	
		NA	3029	7	
		<i>C. coli</i>	ST-828	2642	2
				6866	2
				3026	1
				6868	1
			ST-1150	6877	1
NA	3031		3		
NA	5401		3		
NA	6859		1		
NA	6860	1			
	NA	6861	1		

NA = not assigned

USO DE UN ESTABILIZADOR PARA CONTRARRESTAR EFECTOS ADVERSOS DE COMPONENTES DEL AGUA DURANTE LA MEDICACIÓN EN EL AGUA DE BEBIDA

USE OF A STABILIZER TO COUNTERATTACK THE ADVERSE EFFECT FROM WATER COMPONENTS DURING MEDICATION IN DRINKING WATER

G. Gómez^A, J. Sánchez^B, N. Christy^B y J. Coss^C

^AAlcer Alimentos S.A. de C.V.

^BBoehringer Ingelheim Vetmedica S.A. de C.V.

^CBoehringer Ingelheim Vetmedica S.A. de C.V.

drgabrielalcer@prodigy.net.mx

CP.44940

SUMMARY

Several factors can affect the results expected after application of a vaccine and/or medication as product quality, strength, storage, and application method of the products according to the manufacturer's recommendations. In the case of vaccination and/or medication into the drinking water, which is a commonly used practice in the poultry industry, there is a factor of vital importance to the quality of water. In the case of water supply through underground shaft, the problem is that water usually contains large amounts of dissolved mineral salts that give hardness and altering the taste, the absorption and bioavailability of antimicrobials. To ensure proper operation of either a vaccine or an antimicrobial, the quality of water must comply with a pH around 7, hardness less than 300 ppm and be free of chlorine and iodine.

In a farm with 250,000 birds applied a water stabilizer, which yielded the appropriate pH, less than 300 ppm hardness and elimination of chlorine and iodine. The control group was previously medicated without applying water stabilizer. Since water was obtained under optimum conditions the medication was applied with antibiotics. We measured minimum inhibitory concentrations (MIC) of each group for *E. coli*, *Salmonella* Enteritidis, *Staphylococcus aureus*, and *Streptococcus uberis* after 10 min, one h and two h after the medication. The results showed that by stabilizing the water, CIM is smaller and more uniform for the group when it stabilized the water, showing a statistically significant difference and saving money on medication.

RESUMEN

Existen varios factores que pueden afectar los resultados esperados tras la aplicación de una vacuna y/o medicamento como: la calidad de los productos, la dosificación, el almacenamiento y la aplicación de los productos de acuerdo a las recomendaciones del fabricante. En el caso de la vacunación y/o medicación en el agua de bebida, la cual, es una práctica comúnmente utilizada en la avicultura, existe un factor de vital importancia que es la calidad del agua.

En el caso del abastecimiento a través de pozos subterráneos, el problema es que generalmente contienen grandes cantidades de sales minerales disueltas que le confieren dureza y que alteran el sabor, modifican la absorción y la biodisponibilidad de los antimicrobianos.

Para garantizar un adecuado funcionamiento, ya sea de una vacuna o de algún medicamento, la calidad de agua debe cumplir con un pH alrededor de 7, una dureza menor a 300 ppm y estar libre de cloro y yodo.

En una granja de 250,000 aves se aplicó un estabilizador de agua, donde se obtuvo, el pH adecuado, dureza menor a 300 ppm y la eliminación de cloro y yodo. Las cassetas que fueron el grupo control fueron medicadas sin aplicar previamente el estabilizador de agua. Ya que se obtuvo un agua en condiciones óptimas se realizó la medicación con los antibióticos aplicados normalmente en la granja, se midieron concentraciones mínimas inhibitorias (CMI) de cada grupo para *E. coli*, *Salmonella* Enteritidis, *Staphylococcus aureus*, y *Streptococcus uberis* a los 10 minutos, a la hora y a las dos horas posteriores a la medicación. Los resultados muestran que al estabilizar el

agua, la CIM es menor y más uniforme para el grupo donde se estabilizó el agua, mostrando una diferencia estadística significativa y un ahorro económico en la medicación.

INTRODUCCIÓN

Actualmente la producción avícola requiere de técnicas de medicación y vacunación masiva que permitan al productor inmunizar una gran cantidad de aves en un corto periodo de tiempo.

Los procesos de vacunación y medicación en el agua de bebida son frecuentemente utilizados hasta el momento. Dado el tiempo y las operaciones necesarias para llevar a cabo este método, la calidad del agua es el factor más importante a considerar ya que la vacuna o el medicamento estarán en contacto con ésta por un largo periodo de tiempo. Si el agua no cumple con las mínimas características fisicoquímicas requeridas para llevar a cabo la operación, no se tendrá el efecto esperado y las pérdidas económicas serán altas.

El problema de varias granjas avícolas es que los pozos subterráneos con los que cuentan como fuente de abastecimiento generalmente contienen grandes cantidades de sales minerales disueltas que le confieren la característica de la dureza. La cual no solo altera el sabor del agua, si no también modifica la absorción y biodisponibilidad de antimicrobianos como tetraciclinas las cuales se quelan en presencia de iones Ca^{2+} y se inactivan; las sulfonamidas que al interactuar con aguas duras se precipitan en las tuberías; los β -lactámicos se degradan al contacto con aguas duras inactivándolos por completo, etc...

La calidad mínima requerida para asegurar la máxima eficiencia de los procesos de vacunación y medicación están relacionados con los tres parámetros más importantes: pH, dureza del agua y la presencia de cloro y/o yodo.

Un factor determinante en la eficiencia de los procesos de vacunación y medicación es el pH. Como todo sistema vivo, los virus y las bacterias son sensibles a la desnaturalización o desactivación al encontrarse en un pH fuera del rango biológico. De esta manera, el pH ideal para la vacunación o medicación es alrededor de 7.0.

La dureza del agua es la presencia de calcio y magnesio, originada por depósitos minerales en el subsuelo. Estos iones tienen una acción quelante en el virus, bacterias e ingredientes activos que son usados en la vacunación y medicación. La condición ideal es cuando la dureza del agua es <100 ppm sin problemas para la salud del ave pero pueden ser aceptados como niveles máximos hasta 180ppm. Así como la ausencia de cloro y yodo.

Un estabilizador de agua es un producto formulado para resolver los retos más difíciles en los procedimientos de vacunación y/o medicación masiva, incluso bajo las peores condiciones fisicoquímicas del agua, que pueden dañar la eficiencia de la vacuna o un medicamento.

El estabilizador actúa sobre la dureza presente en el agua eliminándola permanentemente, estabiliza el pH de la solución hasta lograr la neutralidad, elimina los iones de cloro y yodo permanentemente de la solución. El presente trabajo se utilizó la prueba de T de Student's como análisis estadístico para encontrar diferencias estadísticas significativas entre los grupos (1,2,3).

MATERIALES Y MÉTODOS

La evaluación se llevó a cabo en una granja de 250,000 aves (pollo de engorda), localizada en el valle de México. Las aves fueron divididas en dos grupos:

- Grupo con estabilizador (A)
- Grupo control sin estabilizador (B)

A partir de una muestra de agua proveniente del pozo subterráneo se realizaron las siguientes mediciones:

- Examen cualitativo del agua (5).
- Examen cuantitativo del agua (6,7,8,9).
- Medición de pH.
- Medición de dureza.

A partir de órganos se realizó.

- Análisis bacteriológico.

Con una muestra de Colistina, Fosfomicina y Tilvalocina se realizaron los Conteos Mínimos Inhibitorios (CIM):

- CIM para *E. coli*.
- CIM para *Salmonella* Enteritidis.
- CIM para *Staphylococcus aureus*.
- CIM para *Streptococcus uberis*.

Después de haber suspendido el suministro de agua subiendo las líneas entre 1 – 2 h, a Las aves del grupo A se les administró un estabilizador de agua a una relación de 0.5 gramos por litro de agua preparando una solución madre y posteriormente vaciándola en el tinaco.

Después de diez min se realizó la medicación de los antibióticos para ambos grupos.

De cada grupo se tomaron 3 muestras de 15 mL cada una en tubos cónicos estériles, por línea del agua de bebida a los 10 min, a la hora y a las dos horas. Las muestras las muestras fueron conservadas en refrigeración hasta que llegaron al laboratorio para su análisis.

RESULTADOS

Examen cualitativo del agua: muestra la presencia de bacterias productoras de gas y mal olor, contaminación por bacterias entéricas en el agua de pozo. A la recepción de las aves de uno d, se aisló *E. coli* de todos los órganos analizados.

Resultados pH. Agua de pozo: 8.2, agua de pozo más estabilizador de agua (6,4).

Resultados de dureza. Agua de pozo: 425 ppm, agua de pozo más estabilizador de agua: <100 ppm.

Tabla1 muestra los parámetros productivos a la séptima semana de edad.

DISCUSIÓN

El grupo con estabilizador de agua (A), tuvo mejores resultados en cuanto a uniformidad y concentraciones mínimas inhibitorias observándose diferencias estadísticas significativas al análisis estadístico Student's t- Test. El estabilizador de agua demostró su capacidad para mejorar la calidad de la misma. Al cierre de parámetros productivos a la séptima semana podemos concluir que las casetas control tuvieron un total de 5.85% de mortalidad, mientras que las casetas con el estabilizador de agua obtuvieron un 4.15% de mortalidad, existe un 1.7% de mortalidad a favor del grupo donde se usó el estabilizador de agua.

En cuanto a peso el grupo control obtuvo 2,357 kg a comparación del grupo con estabilizador de agua el cual obtuvo 2,551Kg, dando una diferencia de 194 gramos a favor del grupo con estabilizador de agua. El costo de medicación del grupo control fue de \$.46 y del grupo con el estabilizador de agua fue de \$.19, siendo este grupo \$27 centavos por ave más barato que el control.

REFERENCIAS

1. Sumano H.L.; Gutiérrez L.O. Farmacología Clínica en aves. Consideraciones sobre el agua desde la perspectiva de la industria avícola. Capítulo VII, Departamento de fisiología y farmacología. Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia. Ed. 3ra. P.p. 317-338. 2008.
2. Ryan KJ; Ray CG. Sherris Medical Microbiology (4th ed. edition). McGraw Hill, 2004.
3. Actualidades en Vacunología Aviar. México D.F. Junio 27, 2008.
4. Swayne, D., Glisson, J., Jackwood, M, Pearson, J. and Reed, W. A Laboratory Manual for the Isolation and Identification of Avian Pathogens. American Association of Avian Pathologist, Inc. Fourth Edition. Kennett Square, Pennsylvania, 1998.
5. Norma oficial mexicana nom-127-ssa1-1994, "salud ambiental, agua para uso y consumo humano-límites permisibles de calidad y tratamientos a que debe someterse el agua para su potabilización" modificada en el 2001.
6. Norma oficial mexicana nom-092-ssa1-1994, bienes y servicios. método para la cuenta de bacterias aerobias en placa.
7. Norma oficial mexicana nom-113-ssa1-1994, bienes y servicios. método para la cuenta de microorganismos coliformes totales en placa.
8. Norma oficial mexicana nom-115-ssa1-1994, bienes y servicios. método para la determinación de *Staphylococcus aureus* en alimentos.
9. Norma oficial mexicana nom-111-ssa1-1994, bienes y servicios. método para la cuenta de mohos y levaduras en alimentos.

PROTECTION OF NEONATAL BROILER CHICKENS FOLLOWING *IN OVO* INJECTION OF OLIGODEOXYNUCLEOTIDES CONTAINING CPG MOTIFS (CPG-ODN) FORMULATED WITH CARBON NANOTUBES OR LIPOSOMES

PROTECCIÓN DE POLLOS DE ENGORDA DESPUÉS DE LA APLICACIÓN *IN OVO* DE OLIGODEOXINUCLEÓTIDOS (ODN) QUE CONTIENEN MOTIVOS CPG (CPG-ODN) FORMULADOS CON NANOTUBOS O LIPOSOMAS

T. Gunawardana^A, M. Foldvari^B, T. Zachar^A, S. Popowich^A, B. Chow-Lockerbie^A, M. Vaneva Ivanova^B, S. Tikoo^{CD},
S. Kurukulasuriya^A, P. Willson^C, and S. Gomis^A

^ADepartment of Veterinary Pathology, Western College of Veterinary Medicine, University of Saskatchewan,
Saskatoon, SK, S7N 5B4, Canada

^BSchool of Pharmacy, University of Waterloo, 200 University Avenue West, Waterloo, ON, N2L 3G1, Canada.

^CVaccine and Infectious Disease Organization, 120 Veterinary Road, University of Saskatchewan,
Saskatoon, SK, S7N 5E3, Canada

^DVaccinology and Immunotherapy, School of Public Health, University of Saskatchewan,
Saskatoon, SK, 7N 5E3, Canada

RESUMEN

Previamente hemos demostrado que la administración *in ovo* de oligodeoxinucleótidos (ODN) que contienen motivos CpG (CpG-ODN) pudo proteger de manera significativa a pollos de engorda recién nacidos contra infecciones por *Escherichia coli* o *Salmonella* Typhimurim. Los objetivos del presente estudio fueron examinar la seguridad y los efectos protectores del CpG-ODN formulado con 2 tipos de nanotubos de carbono (CNTs) o dos sistemas de suministro de lípidos surfactantes (LSC) en pollos de engorda recién nacidos contra septicemia por *E. coli*. La tasa de supervivencia de los pollos en los grupos que recibieron solución salina después de la infección por *E. coli* fue del 20 al 30%. En contraste, los pollos que recibieron las formulaciones de CpG-ODN tuvieron una tasa de supervivencia del 60 al 80%, lo cual fue significativamente más alto. La carga bacteriana y el puntaje clínico fueron bajos en los grupos tratados con CNT o LSC-CpG-ODN en comparación con los grupos que recibieron CpG-ODN o solución salina. Esta es la primera vez que se demuestra que los CpG-ODN formulados con CNT y LSC tienen un efecto inmunoprotector contra infecciones por *E. coli* en pollos de engorda recién nacidos después de su administración *in ovo*.

SUMMARY

We have previously shown that *in ovo* delivery of unformulated oligodeoxynucleotides (ODN) containing CpG motifs (CpG-ODN) was able to significantly protect neonatal broiler chickens against *Escherichia coli* or *Salmonella* Typhimurium infections. The objectives of this study were to examine the safety and immunoprotective effects of CpG-ODN formulated with two types of carbon nanotubes (CNTs) or two types of lipid-surfactant (LSC) delivery systems in neonatal broilers against *E. coli* septicemia. The survival rate of birds in groups receiving saline following *E. coli* infection was 20% to 30%. In contrast, birds receiving CpG-ODN formulations had a significantly higher survival rate of 60% to 80%. Bacterial loads and clinical scores were low in groups treated with CNT- or LSC-CpG-ODN compared to the groups receiving CpG-ODN or saline. This is the first time that CpG-ODN formulated with CNT and LSC have been demonstrated to have an immunoprotective effect against an *E. coli* infection in neonatal broiler chickens following *in ovo* delivery.

INTRODUCTION

Neonatal chickens are highly susceptible to diseases since many pathogens enter through mucosal surfaces, and the mucosal immune system is not fully mature until several wk post hatch (13). *Escherichia coli* causes a variety of disease syndromes in poultry including yolk-sac infection, omphalitis, respiratory tract infection, septicemia, and cellulitis (19). Vaccines are a well-known method to stimulate the immune system for improved disease protection, but they are not available for all disease agents and are not effective when an immediate protective effect is required. Hence, these trends point to a need for development of alternative strategies for infectious disease control (2).

The vertebral innate immune system identifies pathogen-associated molecular patterns (PAMPs) by pattern recognition receptors (PRRs), inducing immune responses which prevent infections (25). Non-vertebral DNA which contains comparatively higher amounts of unmethylated cytosine-phosphodiester-guanine (CpG) dinucleotides than vertebral DNA acts as a PAMP. These unmethylated CpG dinucleotides (CpG motifs), are recognized as the molecular pattern that contributes to the immunostimulatory activity of non-vertebral DNA (1). Toll-like receptor 9 (TLR 9) in mammals, which is a PRR, recognize these unmethylated CpG motifs and initiates immunostimulatory pathways (1). The context of the unmethylated CpG dinucleotides including specific flanking sequences are responsible for the extent of immune stimulation (23). Synthetic preparations of oligodeoxynucleotides containing CpG-ODNs simulating non-vertebral DNA, have shown similar immunostimulatory activity (33). This discovery has shown an important preventive immunotherapeutic treatment option which stimulates the host's immune system. Studies have revealed the immunostimulatory action of CpG-ODNs in many vertebral species including mice (9), fish (20), cattle and sheep (26), and chickens (18, 29). Other than the immunostimulatory action, CpG-ODNs are being used as vaccine adjuvants due to the ability to activate antigen presenting cells and B cells (22). CpG-ODNs are also used for cancer therapy due to natural killer cell and cytotoxic T cell activation (22). Furthermore, CpG-ODNs are being used for anti-allergic treatments due to the ability to promote Th1-type immune response and thus suppress Th2-type allergic responses (22). The immunoprotective effect of CpG-ODN against several crucial diseases such as *E. coli* (16-18) and *Salmonella* Typhimurium (29) bacterial infections, protozoan diseases caused by *Eimeria* (10) and viral diseases such as infectious bursal disease (31) and infectious bronchitis (11) have been demonstrated in chickens.

Extending the bioavailability and duration of action of CpG-ODN may increase the therapeutic value. Unfortunately, CpG-ODN used *in vivo* is rapidly eliminated from the circulation due to adsorption onto serum proteins and degradation by serum nucleases (24). A possible technique for protecting CpG-ODNs from degradation while increasing uptake by cells of the immune system, involves liposome encapsulation (32) or fusion with biphasic lipid vesicles (3). Formulating CpG-ODN with polyphosphazene polymers showed an enhanced protection of chickens from *E. coli* infection (30).

Nanotechnology can be described as the technology involved in the manufacture, control, manipulation, and study of structures or devices whose size is of the nanometer scale. Carbon nanotubes (CNTs) exist in two types, single-wall (SWNT) and multi-wall (MWNT). CNTs have been extensively investigated as multipurpose carriers for drug delivery and diagnostic applications. The organic functionalization of CNTs can significantly improve their solubility and biocompatibility profile; as a result, their manipulation and integration into biological systems has become possible. Functionalised CNTs currently hold strong promise as novel systems for the delivery of drugs, antigens and genes (8). Use of CNTs to enhance uptake of CpG-ODN and increase antiglioma immunity in mice have been reported (6). To our knowledge, CNTs have not been used for formulation of CpG-ODN and delivery in chicken embryos. The objectives of this study were to determine the safety and immunoprotective effects of two types of CNTs and two types of LSCs in delivery systems formulated with CpG-ODN as immunostimulants in neonatal broiler chickens.

MATERIALS AND METHODS

Delivery of CpG ODN formulations by the *in ovo* route. The objective of this experiment was to enhance the immunoprotective effects of CpG-ODN by formulating with single wall carbon nanotubes (SWNTs) or lipid surfactant composites (LSC) in neonatal birds. Eighteen day old embryonated eggs were injected with 50 µg of CpG-ODN formulated with SWNT (SWNT - CpG-ODN), LSC-CpG-ODN, unformulated CpG-ODN or saline. Each of four groups of embryonating eggs received either 100 µL of formulation or saline by the *in ovo* route in the amniotic cavity through the air cell using 22 gauge needles with one inch length. Forty embryonating eggs were randomly allocated into each of the four groups. After hatching, the groups of birds were inoculated on d one of age (which was approximately 24 h following hatch) with 1×10^3 or 1×10^4 cfu of stationary phase *E. coli* by the subcutaneous

route in the neck. Half of each group (n=20) were inoculated with 1×10^5 cfu of *E. coli* and the remaining birds (n=20) were inoculated with 1×10^4 cfu of *E. coli*.

Safety of CpG-ODN formulated with CNT or LSC. The objective of this project was to study the safety and toxicity of these CpG-ODN formulations in neonatal broiler chickens until 42 d post-hatch while being conducted in two separate experiments. In the first experiment, four groups of birds (n=18 for each group) were injected with SWNT-CpG-ODN, LSC-CpG-ODN, CpG-ODN or saline by the *in ovo*. Birds were examined daily for any clinical signs and mortality. Tissue sections were collected from the gastrointestinal tract (crop, esophagus, proventriculus, gizzard, duodenum, jejunum, ileum, and ceca), kidneys, lungs, liver, muscle, trachea and lymphoid organs (spleen, bursa, and thymus) at 19, 20 and 21 d of incubation and at three, six, and nine d post-hatch for histopathology.

RESULTS AND DISCUSSION

Birds in the first trial that received either CpG-ODN formulated with SWNT or LSC (> 75% survival) experienced one-third (0.32; $p < 0.001$) the relative risk of mortality following a lethal dose of *E. coli* compared to CpG-ODN alone and saline control groups (30% survival). The cumulative clinical score was significantly lower in birds that received CpG-ODN formulated with SWNT or LSC compared to birds that received either CpG-ODN alone or saline ($p < 0.05$). Moreover, birds that received CpG-ODN formulated with either SWNT or LSC had a significantly greater proportion of lower bacterial loads compared to birds that received CpG-ODN alone or saline ($p < 0.005$).

No mortality or clinical signs were detected in any of the embryos or birds following administration of CpG-ODN formulations throughout d 42 post-hatch in the first safety experiment. No histopathological lesions were diagnosed in any of the organs at any of the time points of embryos or birds throughout d 42 post-hatch in groups that received any CpG-ODN formulation, CpG-ODN or saline.

CpG-ODN formulated with CNT or lipid surfactant vesicles was observed to synergistically enhance the immunoprotective efficiency against *E. coli* infections in neonatal broiler chickens. It is very encouraging to note that CpG-ODN formulations with CNT did not cause adverse reactions in chicken embryos or neonatal broiler chickens.

REFERENCES

1. Ahmad-Nejad, P., H. Hacker, M. Rutz, S. Bauer, R.M. Vabulas, and H. Wagner. Bacterial CpG-DNA and lipopolysaccharides activate Toll-like receptors at distinct cellular compartments. *European journal of immunology* 32:1958-1968. 2002.
2. Al-Ghamdi, M.S., F. El-Morsy, Z.H. Al-Mustafa, M. Al-Ramadhan, and M. Hanif. Antibiotic resistance of *Escherichia coli* isolated from poultry workers, patients and chicken in the eastern province of Saudi Arabia. *Tropical medicine & international health : TM & IH* 4:278-283. 1999.
3. Alcon, V., M. Baca-Estrada, M. Vega-Lopez, P. Willson, L. Babiuk, P. Kumar, R. Hecker, and M. Foldvari. Mucosal delivery of bacterial antigens and CpG oligonucleotides formulated in biphasic lipid vesicles in pigs. *The AAPS Journal* 7:E566-E571. 2005.
4. Alcon, V.L., M. Baca-Estrada, M.A. Vega-Lopez, P. Willson, L.A. Babiuk, P. Kumar, and M. Foldvari. Intranasal immunization using biphasic lipid vesicles as delivery systems for OmIA bacterial protein antigen and CpG oligonucleotides adjuvant in a mouse model. *Journal of Pharmacy and Pharmacology* 57:955-961. 2005.
5. Azhar, S., S. Akhtar, and M. Munir. Post-Vaccinal Observation of Lymphoid Organs in Broiler Chicks Inoculated with Hot and Mild Vaccinal Strains of Infectious Bursal Disease Virus. *J. Vet. Anim. Sci* 2:72-78. 2012.
6. Badie, B., D.C. Zhao, D. Alizadeh, L.Y. Zhang, W. Liu, O. Farrukh, E. Manuel, and D.J. Diamond. Carbon Nanotubes Enhance CpG Uptake and Potentiate Antiglioma Immunity. *Clin Cancer Res* 17:771-782. 2011.
7. Barry, A. Clinical specimens for microbiologic examination. *Infectious disease: a guide to the understanding and management of Infectious Processes*. PD Haeprich, ed. Harper and Row, New York:103-107. 1972.
8. Bianco, A., K. Kostarelos, and M. Prato. Applications of carbon nanotubes in drug delivery. *Current opinion in chemical biology* 9:674-679. 2005.
9. Cho, H.C., B.H. Kim, K. Kim, J.Y. Park, J.H. Chang, and S.K. Kim. Cancer immunotherapeutic effects of novel CpG ODN in murine tumor model. *International immunopharmacology* 8:1401-1407. 2008.
10. Dalloul, R.A., H.S. Lillehoj, M. Okamura, H. Xie, W. Min, X. Ding, and R.A. Heckert. In vivo effects of CpG oligodeoxynucleotide on *Eimeria* infection in chickens. *Avian Dis* 48:783-790. 2004.

11. Dar, A., A. Potter, S. Tikoo, V. Gerdts, K. Lai, L.A. Babiuk, and G. Mutwiri. CpG Oligodeoxynucleotides Activate Innate Immune Response that Suppresses Infectious Bronchitis Virus Replication in Chicken Embryos. *Avian Diseases* 53:261-267. 2009.
12. de Jong, S., G. Chikh, L. Sekirov, S. Raney, S. Semple, S. Klimuk, N. Yuan, M. Hope, P. Cullis, and Y. Tam. Encapsulation in liposomal nanoparticles enhances the immunostimulatory, adjuvant and anti-tumor activity of subcutaneously administered CpG ODN. *Cancer immunology, immunotherapy : CII* 56:1251-1264. 2007.
13. Dibner, J.J., C.D. Knight, M.L. Kitchell, C.A. Atwell, A.C. Downs, and F.J. Ivey. Early feeding and development of the immune system in neonatal poultry. *J Appl Poultry Res* 7:425-436. 1998.
14. Foldvari, M., and M. Bagonluri. Carbon nanotubes as functional excipients for nanomedicines: I. pharmaceutical properties. *Nanomed-Nanotechnol* 4:173-182. 2008.
15. Foldvari, M., and M. Bagonluri. Carbon nanotubes as functional excipients for nanomedicines: II. Drug delivery and biocompatibility issues. *Nanomed-Nanotechnol* 4:183-200. 2008.
16. Gomis, S., L. Babiuk, B. Allan, P. Willson, E. Waters, R. Hecker, and A. Potter. Protection of chickens against a lethal challenge of *Escherichia coli* by a vaccine containing CpG oligodeoxynucleotides as an adjuvant. *Avian Diseases* 51:78-83. 2007.
17. Gomis, S., L. Babiuk, B. Allan, P. Willson, E. Waters, N. Ambrose, R. Hecker, and A. Potter. Protection of neonatal chicks against a lethal challenge of *Escherichia coli* using DNA containing cytosine-phosphodiester-guanine motifs. *Avian Diseases* 48:813-822. 2004.
18. Gomis, S., L. Babiuk, D.L. Godson, B. Allan, T. Thrush, H. Townsend, P. Willson, E. Waters, R. Hecker, and A. Potter. Protection of chickens against *Escherichia coli* infections by DNA containing CpG motifs. *Infection and Immunity* 71:857-863. 2003.
19. Goren, E. Observations on experimental infection of chicks with *Escherichia coli*. *Avian pathology : journal of the W.V.P.A* 7:213-224. 1978.
20. Jørgensen, J.B., L.-H. Johansen, K. Steiro, and A. Johansen. CpG DNA Induces Protective Antiviral Immune Responses in Atlantic Salmon (*Salmo salar* L.). *Journal of virology* 77:11471-11479. 2003.
21. Klasing, K.C. Nutritional modulation of resistance to infectious diseases. *Poultry science* 77:1119-1125. 1998.
22. Klinman, D.M. Immunotherapeutic uses of CpG oligodeoxynucleotides. *Nat Rev Immunol* 4:249-258. 2004.
23. Krieg, A.M. CPG MOTIFS IN BACTERIAL DNA AND THEIR IMMUNE EFFECTS*. Annual review of immunology 20:709-760. 2002.
24. Litzinger, D.C., J.M. Brown, I. Wala, S.A. Kaufman, G.Y. Han, C.L. Farrell, and D. Collins. Fate of cationic liposomes and their complex with oligonucleotide in vivo. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes* 1281:139-149. 1996.
25. Medzhitov, R., and C.A. Janeway, Jr. Decoding the patterns of self and nonself by the innate immune system. *Science* 296:298-300. 2002.
26. Nichani, A.K., A. Mena, Y. Popowych, D. Dent, H.G.G. Townsend, G.K. Mutwiri, R. Hecker, L.A. Babiuk, and P.J. Griebel. In vivo immunostimulatory effects of CpG oligodeoxynucleotide in cattle and sheep. *Veterinary immunology and immunopathology* 98:17-29. 2004.
27. Rampling, A., R. Upton, L. Ward, J. Anderson, E. Peters, and B. Rowe. SALMONELLA ENTERITIDIS PHAGE TYPE 4 INFECTION OF BROILER CHICKENS: A HAZARD TO PUBLIC HEALTH. *The Lancet* 334:436-438. 1989.
28. Saavedra, R., R. Leyva, E.P. Tenorio, M.L. Haces, M. Rodriguez-Sosa, L.I. Terrazas, and P. Herion. CpG-containing ODN has a limited role in the protection against *Toxoplasma gondii*. *Parasite immunology* 26:67-73. 2004.
29. Taghavi, A., B. Allan, G. Mutwiri, A. Van Kessel, P. Willson, L. Babiuk, A. Potter, and S. Gomis. Protection of Neonatal Broiler Chicks Against *Salmonella Typhimurium* Septicemia by DNA Containing CpG Motifs. *Avian Diseases* 52:398-406. 2008.
30. Taghavi, A., B. Allan, G. Mutwiri, M. Foldvari, A. Van Kessel, P. Willson, L. Babiuk, A. Potter, and S. Gomis. Enhancement of immunoprotective effect of CpG-ODN by formulation with polyphosphazenes against *E. coli* septicemia in neonatal chickens. *Current drug delivery* 6:76-82. 2009.
31. Wang, X., P. Jiang, S. Deen, J. Wu, X. Liu, and J. Xu. Efficacy of DNA vaccines against infectious bursal disease virus in chickens enhanced by coadministration with CpG oligodeoxynucleotide. *Avian Dis* 47:1305-1312. 2003.
32. Wilson, K.D., S.D. de Jong, and Y.K. Tam. Lipid-based delivery of CpG oligonucleotides enhances immunotherapeutic efficacy. *Advanced Drug Delivery Reviews* 61:233-242. 2009.

33. Yamamoto, S., T. Yamamoto, S. Shimada, E. Kuramoto, O. Yano, T. Kataoka, and T. Tokunaga. DNA from bacteria, but not from vertebrates, induces interferons, activates natural killer cells and inhibits tumor growth. *Microbiology and immunology* 36:983-997. 1992.

ESTUDIO COMPARATIVO DE RESULTADOS SEROLÓGICOS DE CUATRO LABORATORIOS NACIONALES DE LA PRUEBA DE HI PARA LA ENFERMEDAD DE NEWCASTLE E INFLUENZA AVIAR A PARTIR DE SUEROS DE POLLO DE ENGORDA

COMPARATIVE STUDY OF SEROLOGICAL RESULTS OF THE HI TEST FOR NEWCASTLE DISEASE AND AVIAN INFLUENZA FROM BROILER SERA FROM FOUR NATIONAL LABORATORIES

A. Guadarrama^A, D. Marrufo^A y E. Lucio^A

^A Investigación Aplicada S.A. de C.V., 7 Norte 416. Col. Centro. C.P. 75700, Tehuacán, Puebla. México

Tel. (238) 380 3805

Cel. 238 388 22 05

Fax 380 3806

E-mail: aguadarrama@grupoidisa.com

SUMMARY

Broilers of the Ross lineage, which were kept in isolation units were used. At three wk of age an emulsified vaccine was applied subcutaneously for the prevention of avian influenza and Newcastle disease at a dose of 0.5 mL per bird. All birds were serologically monitored at three, six, and seven wk of age and sera were sent to four national diagnostic laboratories where the HI test was performed for avian influenza and Newcastle disease, differing up to six logarithms for avian influenza at six and seven wk. Data were analyzed using a factorial treatment design of four by three; with statistically significant differences between laboratories and monitoring.

RESUMEN

Se utilizaron pollos de engorda de la estirpe Ross, los cuales se mantuvieron en unidades de aislamiento. A las tres semanas de edad se les aplicó una vacuna emulsionada para la prevención de influenza aviar y enfermedad de Newcastle vía subcutánea, a una dosis de 0.5 mL por ave. Todas las aves se monitorearon serológicamente a las tres, seis y siete semanas de edad y los sueros se enviaron a cuatro laboratorios de diagnóstico nacionales en donde se realizó la prueba de HI para influenza aviar y enfermedad de Newcastle, encontrándose diferencias de hasta seis logaritmos para el caso de influenza aviar a las seis y siete semanas. Los datos se analizaron por medio de un diseño de tratamientos factorial de cuatro por tres; encontrándose diferencias estadísticamente significativas entre laboratorios y entre monitoreo.

INTRODUCCIÓN

La enfermedad de Newcastle es una de las más importantes infecciones de las aves. Esta se encuentra distribuida alrededor del mundo y ha sido la causa de grandes pérdidas económicas en la industria avícola (1). Su agente causal es el virus de la enfermedad de Newcastle, un virus que es capaz de infectar alrededor de 240 especies de aves y se disemina por medio del contacto directo entre aves enfermas y aves saludables (2).

El virus de la enfermedad de Newcastle (NDV) puede emplearse como un antígeno en una variedad amplia de pruebas serológicas, lo que permite que se utilicen las técnicas de neutralización o de enzoinmunoensayo (ELISA) Y HI para valorar el nivel de anticuerpos en las aves. En la actualidad, la prueba de HI es la más ampliamente utilizada para la detección de anticuerpos contra NDV en las aves (OIE, 2008).

La influenza aviar representa una de las enfermedades infecciosas de mayor importancia no sólo en la industria avícola comercial sino también en otras especies aviares, mamíferos y humanos (3). Los constantes brotes detectados alrededor del mundo en aves comerciales son de gran importancia a nivel económico, en aves silvestres representa un grave problema por la conservación de las especies. La susceptibilidad al virus de influenza aviar es variable entre aves comerciales y aves silvestres. Las *Gallineceas* se consideran altamente susceptibles (4), mientras que, las aves silvestres son reconocidas como reservorios naturales de la enfermedad con variable morbilidad

dependiendo de la virulencia de la cepa involucrada (5). Dependiendo de la especie, la edad y el tipo de ave, los rasgos característicos de la cepa vírica implicada y los factores ambientales, la enfermedad virulenta que afecta a las aves totalmente susceptibles puede variar desde una muerte súbita con pocos signos clínicos o sin signos aparentes, hasta una enfermedad más característica con signos clínicos variados, que incluye síntomas respiratorios, secreciones oculares y nasales, tos, disnea, hinchazón de los senos nasales o la cabeza, cianosis de la piel no cubierta de plumas, barbillas y cresta, signos de descoordinación, nerviosismo y diarrea (OIE, 2008).

Como todos los virus de influenza tipo A poseen antígenos de la nucleocapside y de la matriz similar, para detectar anticuerpos frente a estos antígenos se emplean pruebas de inmunodifusión en gel de agar. En estas pruebas se utilizan preparaciones de virus concentradas que contengan uno o ambos tipos de antígeno. No todas las especies de aves desarrollan anticuerpos precipitantes demostrables. Los ensayos de inhibición de la hemoaglutinación también se han empleado en la serología diagnóstica de ruina, aunque es posible que esta técnica no detecte algunas infecciones concretas debido a que la hemoaglutinina es específica del subtipo vírico (OIE, 2008).

OBJETIVO

Comparación de los resultados serológicos obtenidos por medio de la prueba de HI para enfermedad de Newcastle e influenza aviar reportados por 4 laboratorios nacionales.

MATERIAL Y MÉTODO

Aves. Se utilizaron 13 pollos de engorda de la estirpe Ross de un día de edad provenientes de una empresa de Córdoba, Veracruz.

Unidades de aislamiento. Los 13 pollos se ingresaron al día de edad a una unidad de aislamiento con aire filtrado a presión negativa tipo Horsfall-Bauer, donde se les dio agua y alimento a libre acceso.

Vacuna. Se utilizó la vacuna emulsionada que contenía los antígenos de influenza aviar y enfermedad de Newcastle a una dosis de 0.5 mL, aplicada vía subcutánea.

Diseño experimental.

Actividad	Edad de las aves
Recepción de aves	Un día de edad
Primer muestreo serológico Vacunación con AI+ND	3 semanas
Segundo muestreo serológico	6 semanas
Tercer muestreo serológico	7 semanas

Laboratorios. Las muestras obtenidas se colocaron en diferentes viales, se identificaron y se enviaron a cuatro laboratorios nacionales (IA, AV, UN y BI)

Pruebas. A las muestras de sueros obtenidas por monitoreo se les realizaron las pruebas de HI para enfermedad de Newcastle e Influenza Aviar.

Análisis estadístico. Se utilizó un diseño completamente al azar y un diseño de tratamiento factorial de 4X3 (4 laboratorios evaluados en 3 monitoreos con 13 repeticiones).

RESULTADOS

(Refiérase a los gráficos al fin del manuscrito.)

DISCUSIÓN

La OIE menciona que la prueba de HI para enfermedad de Newcastle como para influenza aviar es ampliamente utilizada para determinar los títulos de anticuerpos para estas enfermedades. Por ello, y debido a la importancia de esta prueba, se realizó el trabajo comparativo donde se encontró que si hubo diferencia de los resultados emitidos por los diferentes laboratorios para influenza aviar en el segundo y tercer muestreo serológico.

Valladares menciona que la prueba de HI ha sido ampliamente utilizada para el subtipo H5 del virus de influenza aviar. Debido a que las propiedades antigénicas de la hemoaglutinina pueden modificarse debido a mutaciones de punto, la homología entre el antígeno de la prueba y los virus de campo es muy importante para lograr un nivel adecuado de detección de anticuerpos. En este estudio, se encontró que hubo una seroconversión

tanto para la enfermedad de Newcastle como para influenza aviar en aves vacunadas con estos antígenos y detectadas por los cuatro laboratorios nacionales. Sin embargo, si se encontró una diferencia en los resultados de Influenza Aviar probablemente asociado a la homología entre los antígenos de las pruebas.

CONCLUSIONES

Los diferentes laboratorios reportaron resultados muy similares por suero durante el primer monitoreo tanto en la prueba de HI para enfermedad de Newcastle como para influenza aviar.

Durante el segundo y tercero muestreo, los diferentes laboratorios reportaron resultados muy similares en el HI de enfermedad de Newcastle.

El resultado de HI para influenza aviar en el segundo monitoreo fue muy similar en todos los laboratorios, excepto en el grupo identificado como IA A donde los títulos fueron superiores en el 92.3% de los sueros.

Al aplicar un factorial de 4X3 con un 95% de confianza se determinó que estadísticamente si hubo un efecto de laboratorio y de tiempo sobre los resultados evaluados.

REFERENCIAS

1. Lancaster J.E. A history of Newcastle disease with comments on its economic effects. *World Poultry Sci J*; 1976, 32:167-175.
2. Kaleta E. F., Baldauf C. Newcastle disease in free-living and pet birds. In: Newcastle disease Edited by: Alexander DJ. Boston: Kluwer Academic Publishers; 1998,197-246.
3. Capua I, Alexander D. J. The challenge of avian influenza to the veterinary community. *Avian Pathol*; 2006, 35:189-205.
4. Perkins L.E.L., Swayne D.E. Pathobiology of A/Chicken/Hong Kong/220/97(H5N1) avian influenza virus in seven gallineous species. *Vet Pathol*; 2001, 38:149-154.
5. Alexander D.J. A review of avian influenza in different bird species. *Vet Microbiol*; 2000, 74:3-13.

Gráfico 1. Resultados del primer muestreo serológico. HI de enfermedad de Newcastle. Datos expresados en Log_2 .

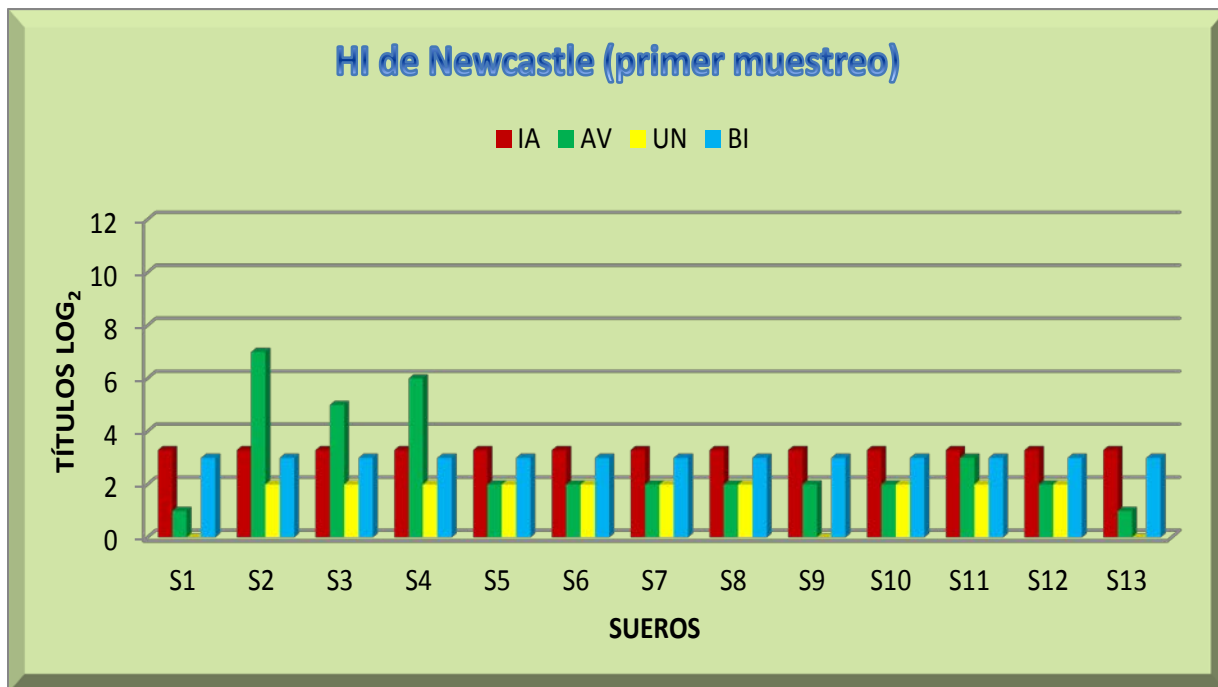


Gráfico 2. Resultados del segundo muestreo serológico. HI de enfermedad de Newcastle. Datos expresados en Log_2 .

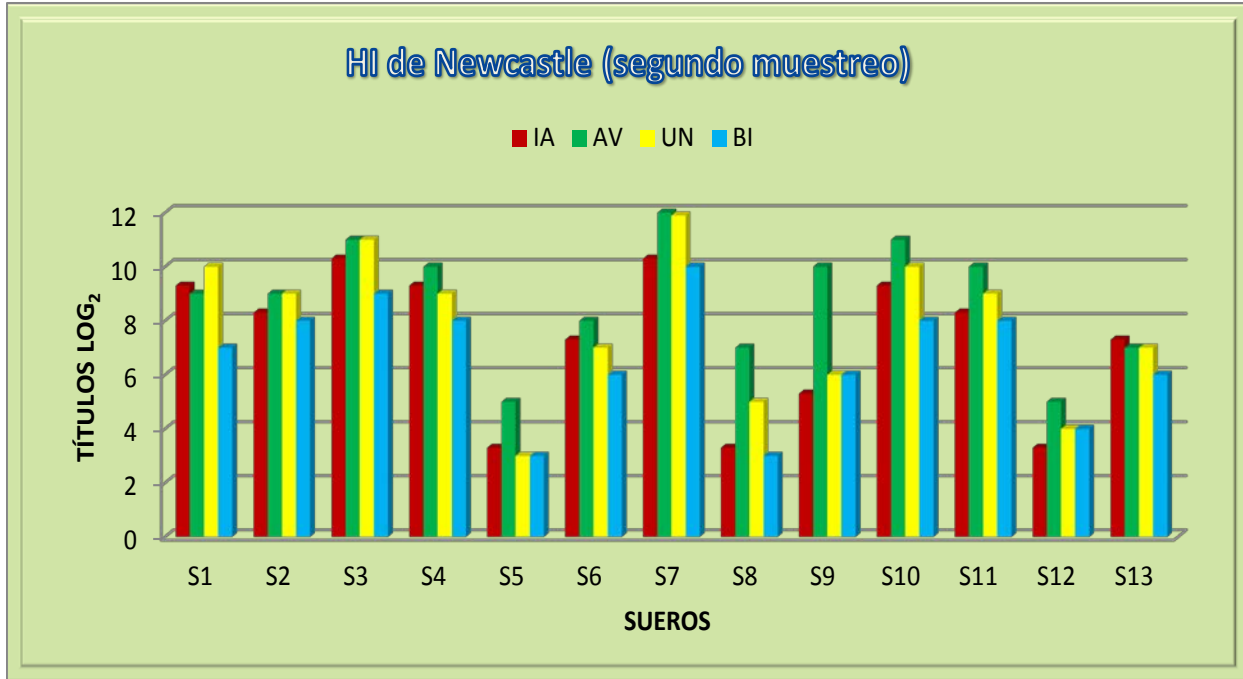


Gráfico 3. Resultados del tercer muestreo serológico. HI de enfermedad de Newcastle. Datos expresados en Log_2 .

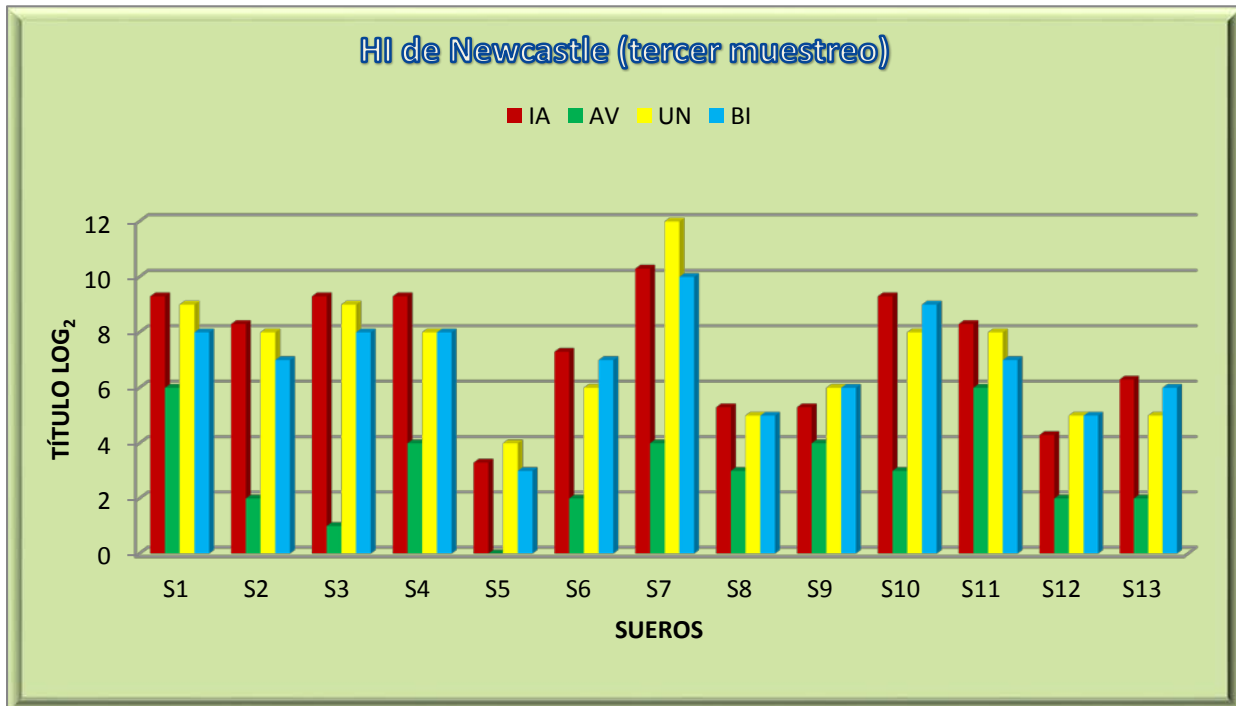


Gráfico 4. Resultados del primer muestreo serológico. HI de influenza aviar. Datos expresados en Log₂.

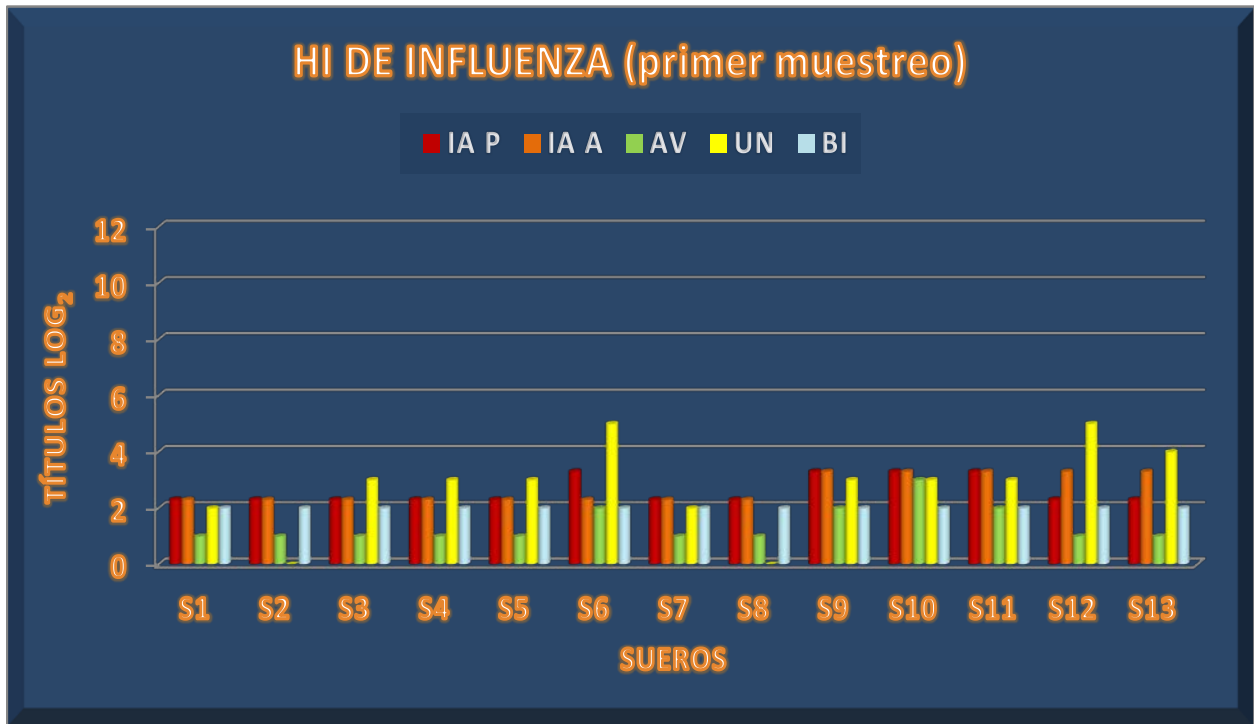


Gráfico 5. Resultados del segundo muestreo serológico. HI de influenza aviar. Datos expresados en Log₂.

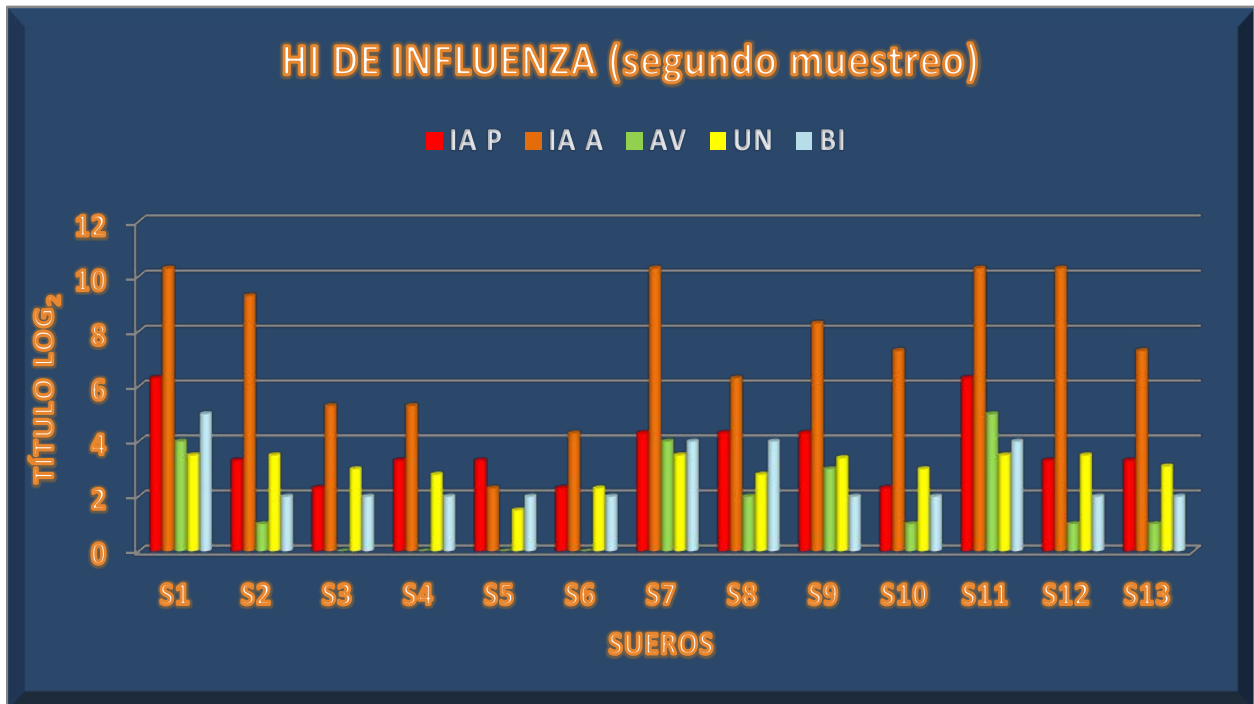
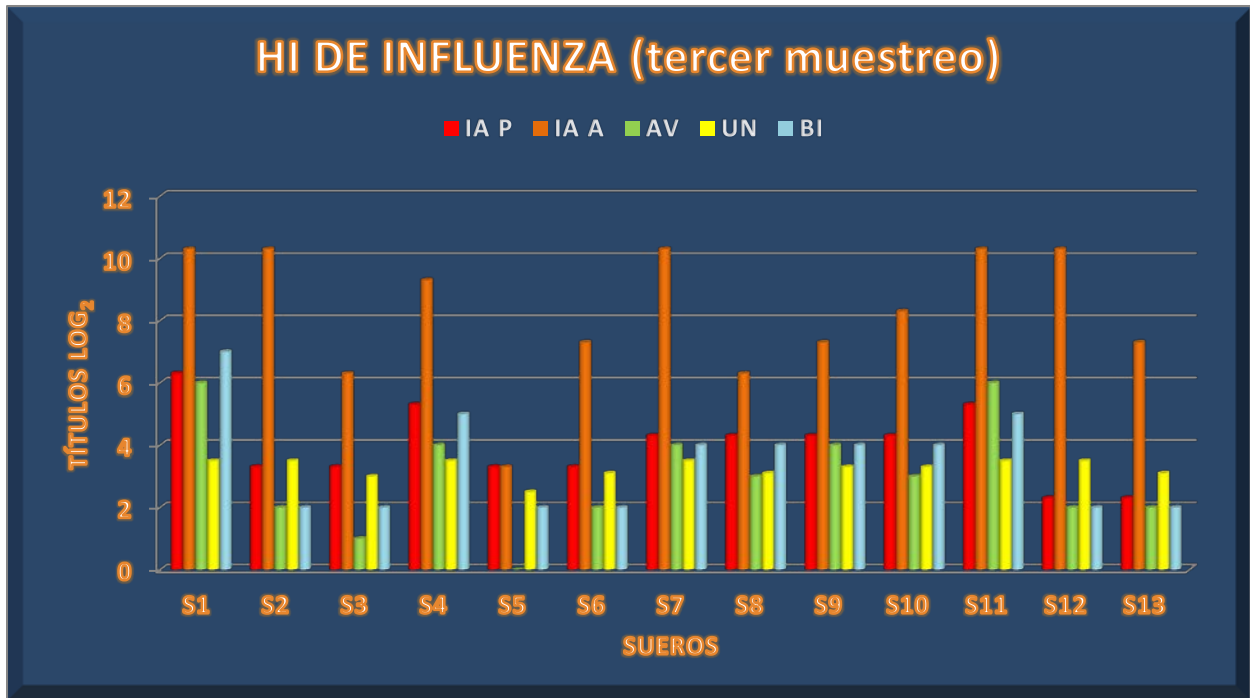


Gráfico 6. Resultados del tercer muestreo serológico. HI de influenza aviar. Datos expresados en Log₂.



ESTIMACIÓN DE LA FRECUENCIA DE *MYCOPLASMA GALLISEPTICUM* EN AVES DE TRASPATIO DEL MUNICIPIO DE AGUASCALIENTES DIAGNOSTICADO MEDIANTE PCR

ESTIMATION OF *MYCOPLASMA GALLISEPTICUM* FREQUENCY IN BACKYARD POULTRY IN AGUASCALIENTES DIAGNOSED BY PCR

J.J. Hernández-Rangel, L. Medina-Esparza^A, T. Queza y C. Cruz-Vázquez

^AInstituto Tecnológico el Llano Carretera Aguascalientes-San Luis Potosí, Km. 18 El Llano, C.P. 20330, Aguascalientes, México lmedinaesparza@yahoo.com.mx.

SUMMARY

Mycoplasma gallisepticum infection affects laying hens by decreasing laying rate, and increasing embryo mortality and FCR. The way of transmission of this infection makes its control and treatment difficult. The objective of the present work was to estimate the frequency of *Mycoplasma gallisepticum* using PCR in backyard hens. Twelve communities of the state of Aguascalientes were monitored during 12 m. Four hundred eighty trachea swab samples were obtained. The samples underwent DNA extraction and PCR in final point tests. Tested sequences were Mg13R and Mg14F; they were run in 2% agarose gel, and observed in a photodocumentator with 185 pb stripes. 61.2% of the samples (294/480) were positive to *Mycoplasma gallisepticum* in 83% of the communities. It is concluded that *Mycoplasma gallisepticum* infection in backyard hens is high, which indicates a high dissemination of *Mycoplasma gallisepticum* in the study area.

RESUMEN

La infección por *Mycoplasma gallisepticum*, afecta principalmente disminuyendo la postura, aumenta la muerte embrionaria y conversión alimenticia; la formas de transmisión de esta infección dificulta su tratamiento y control. El objetivo fue estimar la frecuencia de micoplasmosis mediante la técnica de PCR en gallinas de traspatio. Se monitoreo durante seis meses, 12 comunidades del estado de Aguascalientes. Se obtuvieron 480 muestras de hisopados traqueales. A las muestras se les hizo extracción del ADN y posteriormente las pruebas de PCR en punto final. Las secuencias probadas fueron la Mg13R y Mg14F, se corrieron en gel agarosa al 2%, posteriormente se observaron en un fotodocumentador con bandas de 185 pb. El 61.2% (294/480) de las muestras fueron positivas a micoplasmosis, en el 83% de las comunidades. Se concluye que la infección por micoplasmosis en gallinas de traspatio es alta, lo que indica una amplia difusión del Mg en la zona de estudio.

INTRODUCCIÓN

El sector avícola mexicano juega un papel muy importante económicamente hablando gracias a que participa con el 63.4% dentro de la producción pecuaria nacional, el estado de Aguascalientes es importante en la producción avícola, ya que, ocupa el cuarto lugar a nivel nacional en cuanto a la producción de carne de pollo con el 9% de la producción total (8).

Actualmente, se establece como una problemática sanitaria la presencia de *Mycoplasma gallisepticum* (Mg) y *Mycoplasma synoviae* (Ms), debido a que puede adquirirse la enfermedad mediante transmisión vertical y horizontal, por lo que, es un problema difícil de monitorear, debido a la permanencia y cronicidad de este tipo de microorganismo dentro de las parvadas, por lo que se dificulta su prevención y detección rápida (2). La pérdida económica, causada por el bajo índice de conversión alimenticia, se observa con la baja en la postura de reproductoras, ponedoras y la muerte embrionaria en huevos infectados (5,6).

A pesar de las medidas de bioseguridad que ha adoptado la industria avícola, la micoplasmosis aviar, se encuentra presente en las granjas avícolas, de esto surge la necesidad de realizar un estudio inicial, principalmente en aves de traspatio, sobre la enfermedad, así como, estandarizar una técnica alternativa de diagnóstico altamente sensible y específica, como la reacción en cadena de la polimerasa (PCR), y con ello realizar monitoreos periódicos y frecuentes, para disminuir el tiempo de diagnóstico e identificación del Mg.

El objetivo del presente trabajo fue estimar la frecuencia de *Mycoplasma gallisepticum* mediante la técnica de PCR en gallinas de traspatio en el estado de Aguascalientes.

MATERIALES Y MÉTODOS

El estudio se realizó en unidades avícolas de traspatio ubicadas en el estado de Aguascalientes, México. El presente es un estudio epidemiológico de tipo descriptivo, donde la selección de las unidades de producción fue mediante el método no probabilístico de conveniencia (7).

El trabajo se dividió en dos fases, primero una fase de campo, la cual se llevó a cabo en el periodo de marzo a agosto de 2012, se realizó el muestreo traqueal en gallinas mayores a un año de edad, en cada una de las unidades de traspatio participantes, los muestreos se llevaron a cabo de manera semanal en 45 aves, para tener un gran total de 480 aves muestreadas durante este periodo. Todos los hisopados traqueales obtenidos, fueron colocados en un tubo de ensayo, previamente identificados con fecha, unidad y número de muestra, en un medio a base de triptosa fosfato (DIFCO, BD 260300), se colocaron en hieleras a una temperatura de 4°C y debidamente aislados con material térmico, posteriormente fueron transportados al laboratorio del Instituto Tecnológico el Llano Aguascalientes, donde se procesaron de manera inmediata a su llegada.

Posteriormente se llevó a cabo la fase de laboratorio, donde se realizó la extracción de ADN, con el protocolo para la extracción de ADN de células en cultivo o tejidos conservados en medio de transporte.

La PCR punto final, se realizó en base al protocolo propuesto por la Organización Internacional de Epizootias (4), con secuencias o primers específicos para Mg: MG14F: 5'-GAG-CTA-ATC-TGT-AAA-GTT-GGT-C-3' y MG13R: 5'- GCT-TCC-TTG-CGG-TTA-GCA-AC-3', mismos cebadores utilizados por Jarquin y col. (3), con el protocolo de reacción modificada de OIE, 2008. La amplificación se llevó a cabo en un termociclador Techne (Cambridge) Limited 1995. Los productos obtenidos de ésta, se corrieron en un gel de agarosa al 2% (Agüero y col. 2004), el cual se visualizó en un trasiluminador de luz ultravioleta, para observar una banda cuyo peso molecular fue de 185 pb que identifica la presencia de ADN de Mg.

Para el análisis estadístico de los presentes datos se empleó la fórmula descrita por Thrusfield (7) para determinar la frecuencia (F), que se describe como el número de instancias, enfermos o atributos relacionados, en una población conocida a un tiempo determinado, sin distinción entre viejos y nuevos casos. Es decir describe el número de animales enfermos en relación con la población en riesgo de desarrollar la enfermedad:

$$F = \frac{\text{Número de individuos enfermos en un punto en particular en el tiempo}}{\text{Número de individuos en la población de riesgo en un punto en particular del tiempo}}$$

RESULTADOS

Al realizar las primeras pruebas de PCR, los amplicones se corrieron en un gel de agarosa al 2%, por un tiempo promedio de dos horas, agregando un marcador de peso molecular, observándose las bandas a una altura de 185 pb, con lo cual se confirma la presencia de ADN de Mg, como se puede apreciar en la Figura 1.

Una vez realizadas las pruebas se encontró que del total de muestras procesadas (480) 294 fueron positivas a Mg mediante la técnica de PCR, con lo cual se estableció una frecuencia general de 61.25% (294/480). Callison (6), encuentran una frecuencia de 52.8% (228/442), esto al desarrollar y validar una PCR tiempo real con sondas TaqMan.

CONCLUSIÓN

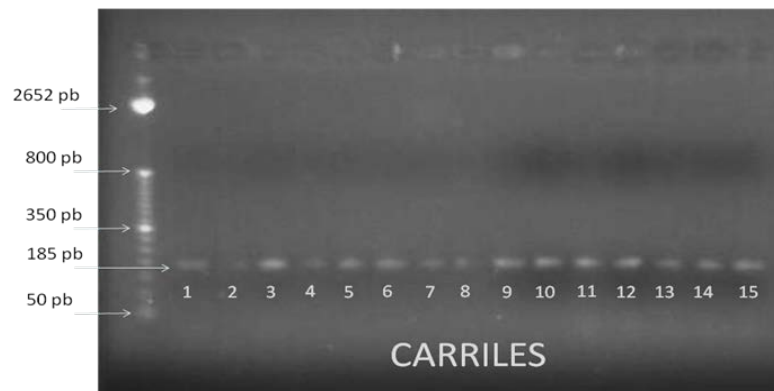
La frecuencia obtenida en el presente estudio fue de 61.25% (294/480), la cual será un punto de referencia al ser este el primer estudio en su tipo para la región donde se llevo a cabo, aportando datos interesantes para la industria avícola de Aguascalientes.

REFERENCIAS

1. Callison S. A., S. M. Riblet, S. H. Kleven, S. Sun, D. L. Suarez, N. Ikuta, D. Hilt, And M. García, Development and Validation of a Real-Time TaqMan Polymerase Chain Reaction Assay for the Detection of *Mycoplasma gallisepticum* in Naturally Infected Birds. AVIAN DIS, 50: 537-544. 2006.

2. Hess M., C. Neubauer, Y. R. Hackl. Interlaboratory comparison of ability to detect nucleic acid of *Mycoplasma gallisepticum* and *Mycoplasma synoviae* by polymerase chain reaction. *AVIAN PATHOLOGY* 36 (2): 127-133. 2007.
3. Jarquin, R., J. Schultz, I. Hanning, And S. Ricke. Development of a Real-Time Polymerase Chain Reaction Assay for The Simultaneous Detection of *Mycoplasma Gallisepticum* and *Mycoplasma Synoviae* Under Industry Conditions. *AVIAN DIS*, 53(1): 73-77. 2009.
4. OIE. Manual of Diagnostic Tests and Vaccines for Terrestrial Animals 2008. Chapter 2.3.5. Avian Mycoplasmosis (*Mycoplasma gallisepticum*, *M. synoviae*). 2008 De http://www.oie.int/eng/normes/mmanual/2008/pdf/2.03.05_%20AVIAN_MYCO.pdf. 10 feb. 2011.
5. Papazisi, L., T. S. Gorton, G. Kutish, P. F. Markham, G. F. Browning, D. K. Nguyen, S. Swartzell, A. Madan, G. Mahairas Y S. J. Geary. The complete genome sequence of the avian pathogen *Mycoplasma gallisepticum* strain Rlow. *MICROBIOLOGY*. 149: 2307–2316. 2003.
6. Sprygin A. V., D. B. Andreychuk, A. N. Kolotilov, M. S. Volkov, I. A. Runina, N. S. Mudrak, A. V. Borisov, V. N. Irza, V. V. Drygin And N. A. Perevozchikova. Development of a duplex real-time TaqMan PCR assay with an internal control for the detection of *Mycoplasma gallisepticum* and *Mycoplasma synoviae* in clinical samples from commercial and backyard poultry. *AVIAN PATHOLOGY* 39(2): 99-109. 2010.
7. Thrusfield, M. *Veterinary Epidemiology*. 3th edition. London, UKD: Blackwell Science. 2007
8. UNA. Union Nacional de Avicultores. 2011. De <http://www.una.org.mx/index>. 17 mar. 2011.

Figura 1. Pesaje de muestras positivas a Mg, observándose con un peso molecular de 185 pb.



EVALUACIÓN DE UNA MEZCLA DE MINERALES TRAZA ORGÁNICOS, ÁCIDOS ORGÁNICOS CON Y SIN LA ADICIÓN DE ENZIMAS EXÓGENAS EN DIETAS SORGO-SOYA PARA GALLINAS ISA BROWN

EVALUATION OF A MIXTURE OF ORGANIC TRACE MINERALS, ORGANIC ACIDS AND ENZYMES IN SORGHUM- SOYBEAN DIETS FOR ISA BROWN HENS

V. Herrera^A, C. Cortes^A, R. Sánchez^B y G. Ávila^A

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

^BSecretaría Administrativa – FMVZ-UNAM
mvzlazaro46@gmail.com

SUMMARY

This study evaluated the addition of two organic trace mineral premixtures, organic acids and the presence or absence of carbohydrase enzymes in diets for layers. 360 Isa Brown hens 72 wk old were used, fed with sorghum-soybean based diets; treatments were: Treatment 1-Sorghum + soybean basal diet; Treatment 2-As 1 + premix 1; Treatment 3-As 1 + Premix 2; Treatment 4-As 1 reformulated + premix 1 (Premix 1 with enzymes and Premix 2 without enzymes). Results from 10 wk of experimentation indicated differences ($p < 0.05$) for: laying percentage (77.5c , 81.9a , and 78.9 bc and 80.7ab) egg weight (63.9 b , 64.6a , 63.7by 63.9b g), feed intake (109.3b , 113ab , 110.5b and 118a g) and feed conversion (2.20b, 2.23b, 2.20b, and 2.32a). It can be concluded that the addition of trace minerals or inorganic minerals, organic acids and growth promoters in sorghum – soy diets for hens did not affect growth performance , but the inclusion of carbohydrases improved yield .

RESUMEN

El presente estudio, se llevó a cabo con la finalidad de estudiar la adición de una premezcla de minerales traza orgánica, ácidos orgánicos y la presencia o ausencia de enzimas carbohidrasas en la dieta de gallinas postura (premezcla 1 y 2). Se utilizaron 360 gallinas de la línea Isa Brown, de 72 semanas de edad y de 55 semanas en producción, alimentadas con dietas a de base sorgo- pasta de soya, los tratamientos fueron: Tratamiento 1- Dieta testigo sorgo + pasta de soya con minerales traza inorgánicos y promotor de crecimiento; Tratamiento 2- Como T1 + 4kg/ton premezcla 1; Tratamiento 3- Como T1 + 4kg/ton premezcla 2; Tratamiento 4- reformulado con premezcla 1 4kg/ton. Los resultados obtenidos en 10 semanas de experimentación indicaron diferencias entre tratamientos ($p < 0.05$) para; porcentaje de postura, peso del huevo g consumo de alimento ave/día/g y conversión alimenticia; con respecto huevo sucio, huevo fárfara, huevo roto, unidades Haugh, color de la yema del huevo y resistencia del cascarón no hubo diferencia ($P < 0.05$) entre los tratamientos. Con los resultados obtenidos en el presente estudio, se puede concluir que la adición de minerales traza orgánicos y ácidos orgánicos en una dieta sorgo-soya con minerales traza inorgánicos y promotor de crecimiento para gallinas no mejora los parámetros productivos; sin embargo la inclusión de enzimas carbohidrasas en esta premezcla incrementa el comportamiento.

INTRODUCCIÓN

La industria avícola está continuamente en busca de aditivos para mejorar la eficiencia alimentaria; entre estos compuestos, los ácidos orgánicos son alternativas prometedoras. Los ácidos orgánicos suelen inhibir el crecimiento de los microorganismos en las raciones y en consecuencia, preservar el equilibrio microbiano en el tracto gastrointestinal (TGI) de las aves.

Para contrarrestar los efectos negativos de los PNA contenidos en las paredes celulares de los granos y semillas oleaginosas, se utilizan enzimas exógenas, como xilanasas y β -glucanasas, las cuales influyen también en la salud intestinal.

MATERIAL Y MÉTODOS

Se utilizaron 360 gallinas, de la línea Isa Brown de 72 semanas de edad y de 55 semanas en producción, las cuales se alojaron en corrales, con piso de cemento y cama de paja de trigo en una caseta de ambiente natural. Las aves se distribuyeron al azar en ocho grupos de 45 aves cada uno. A las aves se les proporcionó un fotoperiodo de 16 hrs luz x día. Además el alimento y el agua se ofrecieron a libre acceso durante todo el experimento. Se empleó un diseño completamente al azar, de cuatro tratamientos con dos repeticiones de 45 gallinas cada una. Los tratamientos fueron como se señala a continuación:

- Tratamiento 1 Dieta basal sorgo + soya
- Tratamiento 2 Como 1 + premezcla 1, 4kg/ton (ON TOP)
- Tratamiento 3 Como 1 + premezcla 2, 4kg/ton. (ON TOP)
- Tratamiento 4 Dieta sorgo + soya con menor cantidad de Energía Metabolizable (3%), Proteína (2%) y aminoácidos esenciales (2%) 1, 4kg/ton.

Durante las 10 semanas de experimentación, se llevaron registro semanales de porcentaje de postura, peso promedio del huevo, masa de huevo por ave por día, consumo de alimento, conversión alimenticia, porcentaje de huevos con cáscara rota y cáscara en fáfara y porcentaje de mortalidad. Se realizaron cuatro mediciones de la calidad interna de huevo (a las 2, 5, 7 y 10 semanas), coloración de la yema del huevo, Unidades Haugh y la resistencia a la rotura del cascarón en fuerza (kg).

RESULTADOS

Los resultados obtenidos en 10 semanas de experimentación indicaron diferencias entre tratamientos ($p < 0.05$) para; porcentaje de postura, peso del huevo g, consumo de alimento ave/día/g y conversión alimenticia como lo muestra el cuadro 1; en el cuadro 2 con respecto huevo sucio, huevo fáfara, huevo roto, unidades Haugh, color de la yema del huevo y resistencia del cascarón no hubo diferencia ($P < 0.05$) entre los tratamientos. i

REFERENCIA

1. López C.C., Arce M.J., Ávila G.E. Mitos y Realidades del Sistema Digestivo y sus Implicaciones sobre la Productividad. Asociación Española de Ciencias Avícolas. Julio de 2006.
2. Piquer FJ. Bases de la utilización de complejos enzimáticos en nutrición animal: estudio comparativo entre especies. XII Curso de especialización FEDNA; 1996 noviembre 7-8; Madrid España: Fundación Española para el Desarrollo de la Nutrición Animal.; 1-7 1996.
3. Quiroz M.A., Dibner J.J., Knight C.D. y González-Esquerro R. Uso de ácidos orgánicos como alternativa para el control de la enteritis necrótica. Seminario Internacional Novus – Nra, Santiago de Querétaro, México, Abril 8, 2005.
4. Romero VFJ. Utilización de enzima xilanasa y β -glucanasas en dietas (sorgo+soya+alfalfa) para gallinas en postura. (Tesis de licenciatura) Distrito Federal, México. Universidad Nacional Autónoma de México; 2003.

Cuadro 1. Parámetros productivos en 10 semanas de producción en gallinas Isa Brown.

Tratamiento	% Postura	Peso de Huevo (g)	Masa de Huevo (g)	Consumo de alimento (g)	Conversión alimenticia (kg:kg)
Dieta testigo	77.5 c	63.9 b	49.5 a	109.3 b	2.20 b
On Top Premezcla 1	81.9 a	64.6 a	51 a	113.8 ab	2.23 b
On Top premezcla 2	78.9 bc	63.7 b	50.0 a	110.5 b	2.20 b
Premezcla 1 reformulado	80.7 ab	63.9 b	51.2 a	118.0 a	2.32 a

Valores con diferente literal en la columna son distintos ($P < 0.05$)

Cuadro 2. Resultados de Unidades Haugh, color de yema y resistencia del cascarón.

Tratamiento	UH	Color	Fuerza(kg)
Dieta testigo	75.2	8.0	1.12
On Top Premezcla 1	82.0	7.7	1.19
On Top Premezcla 2	74.6	8.1	1.16
Premezcla 1 reformulado	75.0	8.3	1.25

Valores con diferente literal en la columna son distintos (P<0.05)

EFFECT OF COCCIDIA VACCINE ON *SALMONELLA* HEIDELBERG COLONIZATION IN BROILER CHICKENS

EFFECTO DE LA VACUNA CONTRA COCCIDIA SOBRE LA COLONIZACIÓN DE *SALMONELLA* HEIDELBERG EN POLLOS DE ENGORDA

C. Hofacre^A, L. Newman^B, C. Broussard^B, G. Mathis^C, and R. Berghaus^A

^AThe University of Georgia, Athens, Georgia

^BMerck Animal Health, Summit, New Jersey

^CSouthern Poultry Research, Athens, Georgia

RESUMEN

Existe una mayor demanda por parte del consumidor de pollo producido sin antibióticos, lo cual se traduce en un aumento en el uso de la vacuna contra coccidia en pollos de engorda. Dado que tanto *Salmonella* como la cepa de la vacuna de *Eimeria tenella* habitan en el ciego no se ha estudiado si esto tiene un efecto sobre alguno de los organismos. Pollitos de engorda de un día de edad recibieron una vacuna contra coccidia (Coccivac B[®]) o salinomicina (60g/ton) en el alimento y luego la mitad de los pollitos fueron alimentados por sonda con *S. Heidelberg*.

La prevalencia de *S. Heidelberg* en las aves vacunadas con Coccivac -B fue 17 % menor que en las aves control (control 68.8 % vs 51.3 % Coccivac -B) y un 16% menor que los pollos de engorda tratados con salinomicina (67,5%). Además de la prevalencia numéricamente más baja de *S. Heidelberg*, los pollos de engorda vacunados con Coccivac -B que habían sido colonizados con *Salmonella*, tuvieron una media geométrica de MPN de *S. Heidelberg* inferior en su ceca (3.3 ufc / gramo) vs los tratados con salinomicina (5.5 ufc / gramo) y los controles (4.3 ufc / gramo).

SUMMARY

In recent years there has been an increase in the use of coccidia vaccine in broilers. *Eimeria tenella* and *E. necatrix* have been shown to increase the shedding of *Salmonella*. Since both *Salmonella* and the vaccine strain of *Eimeria tenella* inhabit the ceca it has not been studied whether this vaccine use has an effect on the shedding of *Salmonella*. Day old male broiler chicks were given a coccidia vaccine (Coccivac B[®]) or salinomycin (60g/ton) in the feed and then ½ of the chicks in each pen were gavaged with *S. Heidelberg*.

The *S. Heidelberg* prevalence in the Coccivac-B vaccinated birds was 17% lower than the control birds (68.8% control vs. 51.3% Coccivac-B) and 16% lower than the salinomycin treated broilers (67.5%). In addition to numerically lower *S. Heidelberg* prevalence the Coccivac-B vaccinated broilers that had colonized with *Salmonella* had a lower geometric mean most probable number (MPN) of *S. Heidelberg* in their ceca (3.3 cfu/gram) vs. the salinomycin treated (5.5 cfu/gram) and the control (4.3 cfu/gram).

INTRODUCTION

The intestine of a chicken is a complex organ that is a balance of bacteria, viruses, and protozoa. When a condition occurs to alter this delicate balance, such as coccidiosis, then especially the bacteria component of the flora is affected (3). *Salmonella*, although a small part, is a part of the normal bacteria flora of a healthy chicken's intestines. However, in a human intestine it can result in disease that we call foodborne illness.

The management of all three parts of this flora is critical to prevent any *Salmonella* spp. that may be present from becoming an even larger part of the normal flora in the ceca. The two species of coccidia that reproduce either part or all of their lifecycle in the ceca are *Eimeria tenella* and *E. necatrix* (4). It has also been well documented that disease caused by *E. tenella* and *E. necatrix*, commonly referred to as coccidiosis, can also result in increased *Salmonella* colonization and shedding (1,5).

The control of *Eimeria* spp. from causing clinical disease can be by in-feed medication, vaccination or a combination of both (2). There has been a significant increase in the number of broilers that have been given coccidia vaccines in recent years. The reasons vary from coccidia resistance to the in-feed coccidiostats, to

attempting to re-establish susceptible (vaccine) strains of *Eimeria* in broiler houses, to meeting consumer preferences for broilers grown “free of drugs”. It is also known that the timing of the coccidia cycle and thus the damage to the intestinal epithelium can be very different between the ionophore anticoccidial drugs and for birds given a coccidia vaccine at 1 day of age

As previously stated, the disease coccidiosis caused by *E. tenella* and *E. necatrix* can result in increased *Salmonella* colonization (1,5). However, what has not been demonstrated in a controlled study is whether subclinical coccidia infection from a low dose coccidiostat in the feed or a coccidia vaccine will have a similar effect on *Salmonella* colonization of broiler ceca.

MATERIALS AND METHODS

One thousand and two hundred male broiler chickens, Cobb x Cobb were randomly divided into three treatments; 50 chicks per pen with eight pen-level replicates/treatment. The control broilers received no coccidia prevention, the coccidia vaccinated broilers received a full dose of Coccivac-B by coarse spray and the salinomycin treated broilers were fed 60 g/ton of salinomycin from day of age to 35 d. Half of the broiler chicks upon placement were orally gavaged with 3.4×10^5 colony forming units (CFU) of a nalidixic acid resistant *S. Heidelberg*. These seeders were also tagged. The remaining birds in each pen served as contact control or horizontal exposure. All had bedding of soft wood shavings that had been used one time before for a broiler grow out. This provided a natural/more typical coccidia challenge.

At 42 d of age 10 broilers from each pen (5 direct and 5 contact) were humanely euthanized, ceca removed aseptically and placed into sterile whirl pack bags onto ice for transport. *Salmonella* culture was performed for prevalence of *Salmonella* using tetrathionate enrichment and XLT-4 agar. Also, the *Salmonella* in the ceca were enumerated by the most probably number method (MPN) using tetrathionate and XLT-4.

STATISTICAL ANALYSIS

Descriptive statistics for continuous variables were reported using the mean and standard deviation. Because the variances within treatment groups were not homogeneous with respect to pen-level fecal oocyst counts, separate nonparametric Kruskal-Wallis tests were used to compare groups at each time point. Pairwise multiple comparisons were performed using a nonparametric Bonferroni procedure to limit the type I error rate to 5% over all comparisons. Cecal *Salmonella* MPNs and prevalences were compared between treatment groups and challenge status categories using generalized estimating equations linear and logistic models, respectively, to account for the correlation between responses of birds from the same pens. Generalized estimating equations models were performed using robust standard errors and an exchangeable working correlation structure. All statistical testing assumed a two-sided alternative hypothesis, and $P < 0.05$ was considered significant. Analyses were performed using commercially available statistical software (Stata version 12.1, StataCorp LP, College Station, TX).

RESULTS AND DISCUSSION

The *Salmonella* challenge was successful as evidenced by 100% of the pens having drag swabs positive for *S. Heidelberg* 14 d post challenge. However, by d 42 only 75% of the coccidia vaccinated pens were *Salmonella* positive vs. 100% positive salinomycin treated pens and 88% of the control pens were *Salmonella* positive. Even though these differences were not statistically significant it was consistent with less *Salmonella* shedding by the coccidia vaccinated broilers.

The *Salmonella Heidelberg* prevalence in the Coccivac-B vaccinated birds were 17% lower than the control birds (68.8% positive control vs. 51.3% positive Coccivac-B) and 16% lower than the salinomycin treated broilers (67.5%). Again, these differences were not statistically significant but follow the same pattern as the *Salmonella* environmental positive.

Salmonella log₁₀ MPNs for culture-positive samples are summarized by treatment group and bird challenge status (dosed or not dosed) in Table 1. In the univariate analysis there was no significant difference between the mean *Salmonella log₁₀* MPNs of the treatment groups ($P = 0.774$) but the mean \log_{10} MPN of birds that had been individually dosed was significantly higher than the mean \log_{10} MPN of birds that had not been individually dosed ($P = 0.002$). In a multivariable model that contained both treatment and dosing status there was a significant interaction between treatment and challenge status ($P = 0.048$), so treatments were compared separately by challenge status. There was not a significant difference between treatments in either birds that were individually dosed ($P = 0.737$) or in birds that were not individually dosed ($P = 0.349$). When comparing birds that were

individually dosed to those that were not individually dosed, the birds that were individually dosed had a significantly higher mean \log_{10} MPN than birds that were not individually dosed in the control group ($P = 0.004$), but not in the Coccivac-B ($P = 0.080$) or salinomycin ($P = 0.565$) groups.

CONCLUSION

In summary, the Coccivac-B vaccinated and *Salmonella* challenged broilers had numerically lower *Salmonella* in their environment, lower *Salmonella* prevalence in their ceca and had a lower geometric mean *Salmonella* MPN in their ceca (3.3 cfu/g) vs. the salinomycin treated (5.5 cfu/g) and the control (4.3 cfu/g). The results of this study confirm the field study findings of Volkova, et al. (7). In their study of sampling 66 commercial broilers flocks in the S. Eastern U.S., they found that administration of live *Eimeria* oocyst vaccine to day old broilers was associated with a reduced probability of detecting *Salmonella* in the flock. The reason the coccidia vaccine resulted in lower *Salmonella* colonization may be due to the timing of the *Eimeria* lifecycle as it produces ceca epithelial cell damage. As seen in Figure 1, the oocyst counts in the litter from the Coccivac-B pens were high by d 13 but dropped rapidly by d 19 where the salinomycin treated pens had lower levels of *Eimeria* oocysts on d 13 and then had peak counts on d 22 with continued higher oocyst numbers out to even d 40.

A second reason for the coccidia vaccinated broilers having lower *Salmonella* colonization could also be due to a combination of the age of the broilers when exposed to coccidia and also the amount of intestinal damage. Tellez, et al. found increased resistance to *S. Enteritidis* organ invasion following subclinical coccidial infections (6). It could be theorized that the early coccidia exposure with the Coccivac-B in this study resulted in a rapid host inflammatory response in the intestine during the same time period that the *Salmonella* Heidelberg was colonizing, thus preventing the *Salmonella* from colonizing internal organs and/or eliminating the *Salmonella* before it could colonize.

Regardless of the mechanism it can be concluded from this study that the use of a coccidial vaccine may allow the broiler chicken to be less susceptible to *Salmonella* Heidelberg colonization.

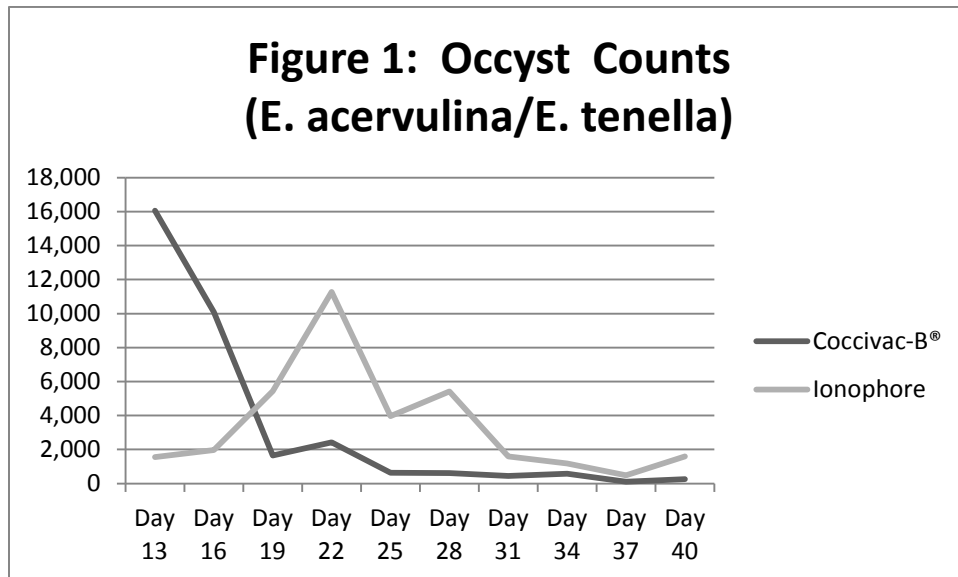
REFERENCES

1. Arakawa A, Baba E, Fukata T. *Eimeria tenella* infection enhances *Salmonella typhimurium* infection in chickens. Poultry science. 1981;60(10):2203-9. Epub 1981/10/01.
2. Chapman HD, Cherry TE, Danforth HD, Richards G, Shirley MW, Williams RB. Sustainable coccidiosis control in poultry production: the role of live vaccines. International journal for parasitology. 2002;32(5):617-29. Epub 2002/04/12.
3. Collier CT, Hofacre CL, Payne AM, Anderson DB, Kaiser P, Mackie RI, et al. Coccidia-induced mucogenesis promotes the onset of necrotic enteritis by supporting *Clostridium perfringens* growth. Veterinary immunology and immunopathology. 2008;122(1-2):104-15. Epub 2007/12/11.
4. Reid M. A diagnostic chart for mine species of fowl coccidia. University of Georgia College of Ag Exper Station Bulletin. 1973(Research Report #163).
5. Stephens JF, D. B. Barnett, and D. F. Holtman. Concurrent *Salmonella typhimurium* and *Eimeria necatrix* infections in chicks. Poultry science. 1964(43):352-6.
6. Tellez GI, M. H. Kogut, and B. M. Hargis. *Eimeria tenella* or *Eimeria adenoides* induction of morphological changes and increased resistance to *Salmonella enteritidis* infection in leghorn chickens. Poultry science. 1994;73(396-401).
7. Volkova VV, Wills RW, Hubbard SA, Magee D, Byrd JA, Bailey RH. Associations between vaccinations against protozoal and viral infections and *Salmonella* in broiler flocks. Epidemiol Infect. 2011;139(2):206-15.

Table 1. Mean (standard deviation) *Salmonella* log₁₀ MPN in 150 culture-positive ceca samples by treatment group and challenge status (dosed or not dosed).

Dosed	Control	Coccivac-B®	Salinomycin	Total
No	0.44 ^a (0.81)	0.36 ^a (0.40)	0.74 ^a (0.95)	0.53 (0.80)
Yes	0.79 ^b (0.74)	0.63 ^a (0.79)	0.74 ^a (1.02)	0.72 (0.85)
Total	0.63 (0.79)	0.52 (0.66)	0.74 (0.98)	0.64 (0.83)

Within columns, means with a superscript in common do not differ with a level of significance of 5% over all comparisons. There were no significant differences between treatment groups for either the birds that were individually dosed or for those that were not individually dosed. Sample sizes: control not dosed, n = 25; control dosed, n = 30; Coccivac-B® not dosed, n = 17; Coccivac-B® dosed, n = 24; salinomycin not dosed, n = 25; salinomycin dosed, n = 29



EFEECTO DE LA ADICIÓN DE GLUTAMINA + ÁCIDO GLUTÁMICO EN DIETAS DE POLLO DE ENGORDA SOBRE LA INTEGRIDAD INTESTINAL Y EL COMPORTAMIENTO PRODUCTIVO

EFFECT OF THE ADDITION OF GLUTAMIN + GLUTAMIC ACID ON BROILER CHICKENS DIETS ON INTESTINE INTEGRITY AND PRODUCTIVE PERFORMANCE

Miguel IJ^{A*}, Vázquez DAS^A, Gomez VG^B Hernández EJ^C y Ávila GE^A

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

^BDepartamento de Medicina y Zootecnia de Aves-FMVZ-UNAM

^CDepartamento de Morfología-FMVZ-UNAM

mvz.jorge.miguel@gmail.com

SUMMARY

The objective of the present study was to evaluate five levels of glutamine + glutamic acid (0, 700, 1400, 2100 and 2800 ppm/ton) in diets for broiler chickens and observe its effects on the intestine integrity and productive performance at 49 d of age. Eight hundred Ross chickens distributed in five treatments were used. Results for carcass weight and FCR indicated a significant ($P<0.05$) difference. Treatment 2 had a heavier weight compared to Treatments 1 and 5, but similar to Treatments 3 and 4. For FCR, data indicated a better FCR for Treatments 2 and 5 compared to Treatments 1, 3 and 4. For villus height, data showed difference ($P<0.05$) between treatments, with a highest height for treatment 2 compared to the rest of the treatments.

RESUMEN

El objetivo del estudio fue evaluar cinco niveles de glutamina + ácido glutámico (0,700, 1400,2100 y 2800 ppm/Ton) en dietas para pollo de engorda y observar el efecto sobre la integridad intestinal y el comportamiento productivo a los 49 d de edad. Se utilizaron 800 pollos Ross 308 distribuidos en cinco tratamientos. Los resultados obtenidos para peso de la canal y conversión alimenticia, indicaron que existió diferencia ($P<0.05$). Con un mayor peso de la canal en el tratamiento 2, respecto a los tratamientos 1 y 5, pero similar a los tratamientos 3 y 4. En conversión alimenticia los datos obtenidos muestran que se obtuvo una mejor conversión alimenticia en los tratamientos 2 y 5 en comparación a los tratamientos 1, 3 y 4. Para altura de las vellosidades intestinales, los datos indicaron diferencia ($P<0.05$) entre tratamientos, con una mayor altura en el tratamiento 2 respecto a los demás tratamientos.

INTRODUCCIÓN

La glutamina es un aminoácido que se le considera como condicionalmente esencial, debido a que el organismo si lo sintetiza pero bajo determinadas situaciones de estrés, la cantidad sintetizada es insuficiente para cubrir con las necesidades del organismo (1). Investigaciones en cerdos demuestran que la glutamina mejora la altura de las vellosidades intestinales, teniendo así mayor superficie de digestión y absorción de nutrientes, mejorando la ganancia de peso y conversión alimenticia (3). Con base en estos antecedentes, se realizó el presente estudio con el objeto de evaluar el efecto de adicionar un producto a base de glutamina + ácido glutámico en los primeros 21 días de vida en dietas sorgo + pasta de soja para pollos de engorda y su impacto en los parámetros productivos y la longitud de las vellosidades intestinales.

MATERIAL Y MÉTODOS

Se utilizaron 800 pollos de engorda de un día de edad, de la estirpe Ross 308 obtenidos de una incubadora comercial. Las aves fueron distribuidas en 25 lotes de 32 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 cinco tratamientos, cada uno con cinco repeticiones de 32 aves cada una, durante la etapa de iniciación de 0-14 días y la de crecimiento de 15 a 21 días de edad recibieron un producto comercial a base de glutamina y ácido glutámico como se describe a continuación:

T1= Dieta sorgo + pasta de soya

T2= T1 + 700 ppm de la mezcla de glutamina y ácido glutámico/ ton

T3= T1 + 1400 ppm de la mezcla de glutamina y ácido glutámico/ ton

T4= T1 + 2100 ppm de la mezcla de glutamina y ácido glutámico/ ton

T5= T1 + 2800 ppm de la mezcla de glutamina y ácido glutámico/ 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 rendimiento de la canal. Para la medición de la longitud de las vellosidades se tomaron muestras de asa duodenal al día 35 de edad, los fragmentos de intestino fueron procesados mediante la técnica de inclusión en parafina y teñidos con la técnica de hematoxilina y eosina. Los datos de las variables en estudio, se sometieron a un análisis de varianza conforme un diseño completamente al azar.

RESULTADOS

Los resultados de 1-49 días de experimentación para peso vivo, peso de la canal y conversión alimenticia se encuentran en el Cuadro 1. Los datos obtenidos para peso de la canal y conversión alimenticia, indicaron que existió diferencia ($P<0.05$). Con un mayor peso de la canal el tratamiento 2 con respecto del tratamiento 1 y 5, y similar el tratamiento 2 al 3 y 4. Para conversión alimenticia los datos obtenidos muestran que se obtuvo una menor conversión alimenticia en los tratamientos 2 y 5 con respecto de los tratamientos 1, 3 y 4. Para peso vivo, los datos no indicaron diferencia ($P<0.05$) entre tratamientos.

REFERENCIAS

1. Bartell, S.M. and A.B. BatalThe 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. Nebraska Swine Rep. Univ. Nebraska, Lincoln. Pages 29–32, 2002
3. Peter J. Reeds, Douglas G. Burrin, Barbara Stoll and Farook Jahoor. Glutamate and Glutamine in Metabolism. J. Nutr. 130: 978S–982S, 2000.

Cuadro 1. Datos obtenidos en pollos alimentados con diferentes niveles de un producto a base de glutamina y ácido glutámico.

Tratamiento	Peso Vivo (g)	Peso de la Canal (g)	Conversión Alimenticia (Kg:Kg)
Testigo	2928 a	2008 b	1.97 ab
700 ppm	3125 a	2375 a	1.93 c
1400 ppm	2966 a	2254 ab	1.98 ab
2100 ppm	3000 a	2250 ab	1.99 a
2800 ppm	2999 a	2159 b	1.93 c

Valores con distintas literales son diferentes ($P<0.05$)

Cuadro 2. Altura de las vellosidades intestinales (duodeno) en pollos a los 35 días de edad.

Tratamiento	Altura de las vellosidades (μm)
Testigo	751 b
700 ppm	905 a
1400 ppm	739 b
2100 ppm	785 b
2800 ppm	800 b

Valores con distintas literales son diferentes ($P < 0.05$)

FITO-ANTIMICROBIANOS EN LA DESINFECCIÓN DEL HUEVO DE GALLINA

PHITO-ANTIMICROBIALS IN EGG DISINFECTION

M. Itza Ortiz^{A*}, N. Núñez López^B, R. Rivas Caceres^A, J. López Esparza^C, P. Enrique Lara y Lara^D, E. Pérez Eguía^A, J. María Carrera Chavez^A y C. Rodríguez Alarcón^A

^ADepto. Ciencias Veterinarias- Universidad Autónoma de Ciudad Juárez. Av. Benjamín Franklin No. 4651 Circuito Pronaf, CP. 32315, Cd. Juárez, Chihuahua (México). Tel: 52 (656) 688-1825

^BTesista. Estudiante del Programa de Química. Universidad Autónoma de Ciudad Juárez. naielly@live.com

^CDepto. Química - Universidad Autónoma de Ciudad Juárez. rivas@uacj.mx; juan.esparza@uacj.mx

^DInstituto Tecnológico de Conkal. Km. 16.3 Carretera Mérida-Motul Conkal, CP. 97345, Yucatán, México. Tel: 52 (999) 912-4133 / Fax: 52 (999) 912-4135 pedro.lara@itconkal.edu.mx

*Autor de correspondencia mateo.itza@uacj.mx

SUMMARY

Ovotransferrin present in the albumin is considered a defense mechanism against bacterial contamination of the egg. Some bacteria have evasion mechanisms that can contaminate the egg. The objective of this study is to evaluate the phito-antimicrobial activity of organic extracts of greasewood (*Larrea tridentata*), fresh thyme or Mexican mint (*Plectranthus amboinicus*), and common oregano (*Origanum vulgare*) on Gram positive and negative bacteria of economical impact in the contamination of hen's eggs. The organic extracts were prepared at levels of 30%, 35% and 40% in an ethyl alcohol solution. A total of eight bacteria were studied and were divided in two groups. Data were analyzed using SAS. Differences ($P<0.05$) were found for extract type, concentration level and kind of bacteria. Besides, interaction of extract and level ($P<0.04$), extract, level and bacteria ($P<0.002$) were found. It is concluded that *L. tridentata* had the highest phito-antimicrobial activity.

RESUMEN

La ovotransferrina presente en la albúmina es considerada un mecanismo de defensa contra la contaminación bacteriana del huevo. Algunas bacterias poseen mecanismos de evasión que pueden contaminarlo. El objetivo del presente estudio fue evaluar la actividad fito-antimicrobiana de extractos orgánicos de La Gobernadora (*Larrea tridentata*), Orégano orejón (*Plectranthus amboinicus*) y Orégano común (*Origanum vulgare*), sobre bacterias Gram positivas y negativas de impacto económico en la contaminación del huevo de gallina. Los extractos orgánicos fueron preparados en niveles de 30, 35 y 40% en una solución de alcohol etílico. Un total de ocho bacterias estuvieron bajo estudio y fueron divididas en dos grupos. Los datos se analizaron usando SAS. Se encontraron diferencias ($P<0.05$) sobre el tipo de extracto, nivel de concentración y el tipo de bacteria. Además de interacción del extracto y nivel ($P<0.04$), extracto, nivel y bacteria ($P<0.002$). Se concluye que la *L. tridentata* tuvo una mayor actividad fito-antimicrobiana.

INTRODUCCIÓN

El huevo de gallina es un alimento de origen animal, de consumo básico en la alimentación humana por su composición nutricional, de manera más específica por su alto valor proteico (5). El huevo posee mecanismos para evitar la contaminación bacteriana como la cutícula, cascarón, membranas del huevo, así como la ovotransferrina presente en la albúmina; considerada el principal mecanismo de defensa contra el crecimiento bacteriano, ya que captura el hierro y evita que las bacterias lo utilicen (17).

Se sabe que el cascarón de huevo esta normalmente cubierto por agentes microbiológicos patógenos (bacterias) que sin un proceso de desinfección pueden enfermar al ser humano; tales como *Salmonella* Enteritidis y *Salmonella* Typhimurium (3). *Salmonella* Enteritidis por ser parte de la biota normal del huevo se puede encontrar tanto en la parte interna como en la externa (4). *Enterococcus faecalis* a pesar de ser un microorganismo que aparentemente se encontraba bajo control ha mostrado en los últimos años una resistencia y planea colocarse entre los principales agentes etiológicos de bacteremias, infecciones urinarias y otros diversos padecimientos intrahospitalarios (8).

En la actualidad se conoce la resistencia de bacterias a antimicrobianos o extractos químicos antibacteriales debido al uso descontrolado que el ser humano ha tenido. Existen diversas líneas de investigación que están tratando de contrarrestar mediante medios menos agresivos todo este efecto tan dañino (16).

Los extractos orgánicos son mezclas complejas de metabolitos secundarios de fácil obtención, puesto que no llevan un proceso tan complejo y contaminante en comparación a los extractos químicos antibacteriales que son de uso común. Así mismo, dichos metabolitos aparte de ser menos agresivos a la naturaleza en comparación con los productos químicos antibacteriales que se usan en la actualidad, son de fácil obtención y pueden ser aislados por diversos métodos como la destilación por arrastre de vapor, por expresión de los frutos o por medio de Soxhlet que representan un costo menor, puesto que no necesitan reactivos costosos ni un equipo tan sofisticado (9).

Los aceites esenciales de los extractos vegetales cubren un amplio espectro de efectos farmacológicos mostrando diversas propiedades como antiinflamatorios, antioxidantes, y anticancerígenos. Otras actividades biológicas se reportan como biocidas en contra de una amplia gama de microorganismos (10).

El Orégano común (*Origanum vulgare*) tiene en los aceites esenciales sus componentes principales, los cuales son: timol, carvacrol, pineno, cymol, alfa thuyona, selineno, dipenteno, alfa terpineno; ácidos polifenólicos: ácido rosmarínico, cafeico, ursólico, clorogénico; flavonoides: apigenol, luteolol, kaempferol, diosmetol y taninos, principios amargos (11), los fenoles como el timol y el carvacrol poseen actividad antimicrobiana debido a su naturaleza ácida del grupo hidroxilo, que forma un puente de hidrogeno con un centro enzimático activo (7) y presenta actividad antimicrobiana probada en cepas de bacterias Gram-negativas como son: *Escherichia coli*, *Pseudomona aeruginosa*, *Salmonella Typhimurium*, *Salmonella cholerae suis* y *Vibrio cholerae*, las bacterias Gram-positivas: *Staphylococcus aureus* y *Bacillus cereus* presentando diferentes grados de sensibilidad ante esta especie de Orégano por el método semicuantitativo de incorporación y de disco difusión en agar una vez separado en Cromatógrafo de gases (1,6).

Los extractos alcohólicos (etanol y metanol al 70%) al 6% con polvo vegetal seco (tallos y hojas) de Gobernadora (*Larrea tridentata*), presenta una actividad antifúngica contra *Aspergillus flavus*, *Aspergillus niger*, *Penicillium chrysogenum*, *Penicillium expansum*, *Fusarium poae* y *Fusarium moniliforme* (13,19).

La presente investigación espera que mediante el uso de extractos orgánicos como agentes antibacteriales contribuya a las investigaciones y conclusiones en usos alternativos a los antimicrobianos que desde hace tiempo se han empleado. De aquí que el objetivo del presente trabajo fue evaluar la actividad fito antimicrobiana de los extractos sobre diferentes bacterias Gram positivas y Gram negativas de impacto económico en la contaminación del huevo de gallina.

METODOLOGÍA

Toma de muestra. La Gobernadora (*Larrea tridentata*) fue tomada de un arbusto que se encuentra en el jardín del Instituto de Ciencias Biomédicas de la Universidad Autónoma de Ciudad Juárez; el Orégano orejón (*Plectranthus amboincus*) se tomó del invernadero del mismo Instituto y el Orégano común (*Origanum vulgare*) se compró en un supermercado local, por consiguiente no fue sometido al proceso de secado (Lachica *et al.*, 1973).

Preparación de los extractos. *Larrea tridentata* y *Plectranthus amboincus* son deshojados manualmente en laboratorio de Microbiología del mismo Instituto. Las hojas fueron secadas en una incubadora a 45°C durante 48 horas (11). La preparación de los extractos fue al 30, 35 y 40%. Usando una balanza analítica y añadiendo con ayuda de una pipeta alcohol etílico al 75% a cada recipiente, para dar un total de nueve tratamientos (tres de *Larrea tridentata*, tres de *Plectranthus amboincus* y tres de *Origanum vulgare*).

Fase *in vitro*. Una vez obtenidos los extractos, se procederá a preparar caldos nutritivos en cajas Petri para cultivar las ocho cepas bacterianas que serán usadas para medir la concentración mínima inhibitoria (CMI) con respecto al halo de inhibición del crecimiento de acuerdo a la técnica de Bauer *et al.* (1966).

Cepas. Fueron divididas en dos grupos Gram (+) y Gram (-). Las cepas Gram (+) son: *Streptococcus pyogenes*, *Staphylococcus aureus*, *Enterococcus faecalis*, *Salmonella Gallinarum* y *Bacillus subtilis*. Las cepas Gram (-) son: *Klebsiella oxytoca*, *Salmonella p-Typhimurium* y *Escherichia coli* las cuales fueron incubadas en el cuarto de estufa de cultivo bacteriano a una temperatura de 37 a 38°C por 24 h. Se estandarizo las concentraciones bacterianas a 50 unidades Klett usando un aparato llamado Klettómetro. Las cajas de Petri con Muller Hinton se llevaron a medio estéril para inocular las tres repeticiones de cada bacteria por especie, esto es, se inocularon las 216 cajas de Petri para colocar inmediatamente los sensidiscos previamente introducidos en los extractos (7 días antes) usando unas pinzas esterilizadas con alcohol etílico grado absoluto por flameado.

Análisis cromatográfico de gases. Con los extractos alcohólicos de *Larrea Tridentata* y *Plectranthus amboincus* se realizó el análisis para observar el perfil químico (2,11), mientras que para el *Origanum* el Carvacrol y Timol tienen un efecto sinérgico que le da la acción antibacterial (14).

Análisis estadístico. La variable de respuesta fue la concentración mínima inhibitoria (CMI), halo de inhibición del crecimiento bacteriano, fue analizada mediante la prueba no paramétrica de Kruskal-Wallis (15) usando SAS (18) y la comparación de medias usando el método de Tukey tomándose como mínima significativa un alfa de 0.05%.

RESULTADOS Y DISCUSION

Los resultados encontrados se presentan en el Cuadro 1. Se puede observar diferencias ($P < 0.05$) sobre el tipo de extracto, nivel de concentración del extracto en la solución alcohólica, el tipo de bacteria y la interacción del extracto y nivel ($P < 0.04$), extracto, nivel y bacteria ($P < 0.002$). En los tres niveles de extracción del extracto se observaron diferencias siendo la mayor cuando la concentración estuvo al 35%. La *Salmonella p_Typhimurium* resultó con un mayor CMI; sin embargo aunque en menor grado también fueron inhibidas *S. Gallinarum* y *E. coli*, dos bacterias importantes causantes de enteritis, la primera en aves y la segunda afectando incluso al ser humano.

CONCLUSIONES

Se concluye que la Gobernadora (*L. tridentata*) posee una mayor actividad fito antimicrobiana que el Orégano orejón (*Plectranthus amboincus*) y Orégano común (*Origanum vulgare*) y puede ser usada en concentraciones del 35% para limpiar el huevo de gallina.

REFERENCIAS

1. Albado Plaus, E., Sáez Flores, G., Grabiél Ataucusi, S. Composición química y actividad antibacteriana del aceite esencial del *Oreganum vulgare* (orégano). *Revista Medica Herediana* (12):16-19. 2001. En revisión en línea. Accesado el 3 de febrero del 2011.
2. Allen, S. *Chemical Analysis of Ecological Materials*. Blackwell Scientific Publications. London. 1989.
3. Arnedo, A., Bellido, J.B., Pac, M.R., Criado, J., Usera, M.A., Mesanza, I., González, F., Pérez, R., Cortés, J.M. Brotes epidémicos de salmonelosis por consumo de huevos. 1998. En revisión en línea. Accesado el 4 de abril del 2011. Obtenido de http://www.doyma.es/revistas/ctl_servlet?_f=7012&articuloid=6347.
4. CDC (Centros para el control y la prevención de enfermedades). Consejos para reducir el riesgo de adquirir *Salmonella* por el consumo de huevos. Atlanta, GA. 2010. Accesado el 25 de noviembre de 2010. Obtenido de <http://www.cdc.gov/spanish/especialesCDC/SalmonellaHuevos/>.
5. Closa, S., Marchesich, C., Cabrera, M., Morales JC. Composición de huevos de gallina y codorniz. 1999. En revisión en línea. Accesado el 5 de abril del 2011. Obtenido de http://www.nutricionemexico.org.mx/alan/1999_2_14.pdf.
6. García Luján, C. Actividad antibacteriana de extractos vegetales en cepas hospitalarias de *Staphylococcus aureus* con resistencia múltiple. Universidad Autónoma Agraria Antonio Narro. Torreón, México. 2006.
7. García, L. Componentes químicos y su relación con las actividades biológicas de algunos extractos vegetales. *Revista Química Viva*. Durango, México. 2010.
8. Garza-Velasco, R., Hernández-Acosta, K., Mejía-Chávez, A. Los factores de virulencia y la actual importancia clínica de *Enterococcus faecalis*. 2004. En revisión en línea. Accesado el 31 de marzo del 2011. Obtenido de <http://depa.pquim.unam.mx/bacteriologia/pdfs/ART%20CDC-Enterococcus.pdf>.
9. Iáñez, E. Agentes Químicos. Tomado del Sitio web para la consulta de Microbiología general de la Licenciatura en Biología de la Universidad de Granada. 2005. Accesado el 21 de diciembre del 2010. Obtenido de <http://www.ugr.es/~eianez/Microbiologia/14agquimicos.htm>.
10. Kalembe, D. and A. Kunicka. Antibacterial and antifungal properties of essential oils. *Curr Med Chem* 10(10):813-29. 2003.
11. Kalra, Y.P. *Handbook of reference methods for plant analysis*. Soil and Plant Analysis Council, Inc. CRC Press, USA: 300 p. 1998.
12. Lachica, M., Aguilar, A., y Yáñez, J. Análisis foliar. Métodos utilizados en la Estación Experimental Zaidín. *Anales de Edafología y Agrobiología* 32:1033-1047. 1973.
13. Lira Saldivar, R. H. Estado actual del conocimiento sobre las propiedades biocidas de la Gobernadora (*Larrea tridentata*). Tomado de la *Revista Mexicana de Fitopatología*. Tomo 21(002):214-222. 2003. Accesado el 3 de febrero del 2011. Obtenido de <http://redalyc.uaemex.mx/pdf/612/61221217.pdf>.

14. Lossa, R. Una composición que contiene carvacrol y timol para uso como bactericida. Tomada de la Oficina Española de patentes y marcas. España. 2004. Accesado el 15 de Marzo de 2011. Obtenido de http://www.espatentes.com/pdf/2215652_t3.pdf.
15. Mendenhall, W., and R. J. Beaver. Introduction to linear model and the design and analysis of experiments. In introduction to probability and statistics. W. Mendenhall, ed. Belmont, Duxbury. pp 244-251. 1994.
16. Ojeda, A. El rompimiento de la humanidad con la naturaleza. Un abordaje desde la dialéctica crítica. Tomado de la Revista TECSISTECATL: Economía y Sociedad de México. Volumen 1:4. 2008.
17. Rosario, C. Escherichia coli: Generalidades. Departamento de Producción Animal: Aves, FMVZ, UNAM. 2006. Accesado el 03 de Enero de 2011.
18. SAS User's Guide. Version 9.1 ed. SAS Inst. Inc., Cary, NC. 2004.
19. Tequida-Meneses, M., Cortez-Rocha, M., Rosas-Burgos, E. C., López-Sandoval, S., Corrales-Maldonado, C. Efecto de extractos alcohólicos de plantas silvestres sobre la inhibición de crecimiento de *Aspergillus flavus*, *Aspergillus niger*, *Penicillium chrysogenum*, *Penicillium expansum*, *Fusarium moniliforme* y *Fusarium poae*. 2002. En revisión en línea. Accesado el 3 de febrero del 2011. Obtenido de <http://www.reviveroammicol.com/2002-19/084088.pdf>.

Cuadro 1. Concentración mínima inhibitoria (mm) de diferentes extractos orgánicos y nivel de concentración (%) con actividad antimicrobiana sobre bacterias Gram (+) y Gram (-) de impacto económico en la contaminación del huevo de gallina.

<i>Larrea tridentata</i>	1.126 ^a ±0.713
<i>Origanum vulgare</i>	0.901 ^b ±0.622
<i>Plectranthus amboincus</i>	0.436 ^c ±0.528
nivel 30%	0.763 ^b ±0.681
nivel 35%	1.008 ^a ±0.745
nivel 40%	0.691 ^b ±0.592
<i>Salmonella p_typhimurium</i> (-)	1.348 ^a ±0.458
<i>Staphylococcus aureus</i> (+)	1.193 ^{ab} ±0.803
<i>Enterococcus faecalis</i> (+)	0.877 ^{bc} ±0.772
<i>Bacillus subtilis</i> (+)	0.803 ^{bc} ±0.528
<i>Streptococcus pyogenes</i> (+)	0.696 ^c ±0.698
<i>Salmonella gallinarum</i> (+)	0.592 ^c ±0.621
<i>Escherichia coli</i> (-)	0.555 ^c ±0.644
<i>Klebsiella oxytoca</i> (-)	0.500 ^c ±0.429

Literales diferentes entre renglones son significativas (P<0.05)

(+) Gram positiva; (-) Gram negativa

Media ±D.E

CARENCIA DE FÓSFORO EN UNA DIETA INICIADOR PARA POLLITA DE REEMPLAZO A CERO SEMANAS DE EDAD

LACK OF PHOSPHORUS IN A PULLET STARTER DIET AT ZERO WEEKS OF AGE

M. Itza Ortiz^{A*}, M. Ríos Ovando^A, E. Pérez Eguía^A, J. María Carrera Chavez^A, E. Jaramillo López y A. Quezada Casasola^A

^ADepto. Ciencias Veterinarias- Universidad Autónoma de Ciudad Juárez. Av. Benjamín Franklin No. 4651 Circuito Pronaf, CP. 32315, Cd. Juárez, Chihuahua (México). Tel: 52 (656) 688-1825

*Autor de correspondencia mateo.itza@uacj.mx; mirna.rios@uacj.mx; eperez@uacj.mx; jose.carrera@uacj.mx; ejaramil@uacj.mx; aquezada@uacj.mx

SUMMARY

Phosphorus is very important for growth of pullets, essentially on metabolism, development and maintenance of bone structure; it is involved in energy and enzymatic reactions, and constitutes the cell wall. This clinical case occurred in a pullet commercial farm of the Bovans White lineage. 13,000 day-old pullets were received from the hatchery; the day before the starter feed was deposited in the corresponding silo. Pullets showed the following symptoms at the sixth d of age: ruffled feathers, emaciation, prostration and high mortality. A necropsy showed normal organs and fragility was observed in the bones of the ribs, keel and shanks. Mortality peaked at 69.36 %. The analysis of the feed showed total lack of phosphorus that was confirmed at the food plant. The surviving pullets had growth below the sexual maturity standard.

RESUMEN

El fósforo tiene gran importancia durante el crecimiento de las pollitas, esencialmente sobre el metabolismo, desarrollo y mantenimiento de su estructura ósea, participa en reacciones energéticas y enzimáticas, y como constituyente de la pared celular. El presente caso clínico se registró en una granja comercial de pollitas de reemplazo de la estirpe Bovans White. Se recibieron 13,000 pollitas de un día de edad de la incubadora, el día anterior el alimento iniciador se depositó en el silo correspondiente. Las pollitas presentaron al sexto día de edad los siguientes síntomas: pluma erizada, emaciación, postración y alta mortalidad. A la necropsia se observó órganos normales y fragilidad en los huesos de las costillas, quilla y tarsos. La mortalidad alcanzo el 69.36%. El análisis del alimento arrojó carencia total de fósforo que fue corroborado en la planta de alimento. Las pollitas sobrevivientes tuvieron un crecimiento inferior al estándar a la madurez sexual.

INTRODUCCIÓN

Las funciones del calcio y fósforo son requeridos para las funciones base minerales del tejido óseo, actividades en los tejidos blandos y equilibrio homeostático en el cuerpo (6). El fósforo participa en reacciones metabólicas relacionadas con la transferencia de energía y enzimática, como constituyente de la pared celular, está estrechamente relacionado y regulado en parte por la vitamina D (2). El fósforo es necesario para depositar durante el día el calcio en los huesos que es retirado durante la noche en numerosos procesos metabólicos como equilibrio ácido-base, la capacidad tampón y en procesos de intercambio de energía (4). Las necesidades de fósforo depende de la etapa de crecimiento y la finalidad del mineral es reconstruir el esqueleto y cuando existe una carencia en etapa de crecimiento se manifiesta en un aumento de la fragilidad ósea, y en consecuencia, en un aumento de la mortalidad (3). Sus fuentes son diversas y se clasifican en orgánicas (vegetales o animal) e inorgánicas (mineral).

METODOLOGÍA

Un total de 13,000 pollitas de la estirpe Bovans White de tres lotes diferentes fueron recibidas de un día de edad de la incubadora y fueron alojadas en casetas de piso de cemento, de acuerdo al manual de la Bovans White (2012). La recepción fue de acuerdo a los lineamientos operativos de la empresa que establecen tener un día antes

almacenado el alimento tipo iniciador, 15 toneladas, en los silos correspondientes de la caseta y tres h antes a la recepción programada, 8:00 am, encendidas las criadoras para atemperar la caseta a unos 32°C, un total de 12 criadoras por caseta. El alimento y agua se ofreció a libre acceso.

RESULTADOS Y DISCUSION

Los tres primero días post recepción la mortalidad estuvo considerada dentro del estándar con una mortalidad de n= 5 a n= 10 en la caseta, sin embargo a partir del cuarto día post recepción la mortalidad se disparó a 39, con incrementos mayores llegado a la máxima mortalidad a la semana 2-4 con n= 1,700 (Figura 1).

El saco vitelino se absorbe las primeras 72 horas y tiene la finalidad de alimentar al pollito durante este tiempo (5). La mortalidad incremento a n= 75 al quinto día y paso a más de n= 100 al sexto. El incremento en la mortalidad llevó a realizar una revisión de la caseta que consistió en un check list de la limpieza y desinfección y recepción del lote para encontrar alguna causa que estuviera relacionada con el incrementado la mortalidad. Fueron enviadas muestras de pollitas al laboratorio para descartar presencia de alguna bacteria como *E. coli*, debido que se observó un cuadro de colibacilosis (Figura 2) al octavo día. Los resultados de laboratorio aislaron *E. coli*, sin embargo se consideró que la presencia de la bacteria fue oportunista en este caso y no la causa primaria de la elevada mortalidad. También se enviaron muestras de alimento de los silos de la caseta afectada al laboratorio nutrición de la misma empresa.

Otros signos observados fueron pollitas que al doblarle el tarso tuvieron una resistencia muy baja, es importante mencionar que los tarso no se rompieron solamente se doblaban como cartón. Las pollitas a los 14 días presentaron una postración similar a un problema de Marek (Figura 3); sin embargo una característica particular fue que caminaban sobre los tarsos antes de quedar completamente postradas, este signo puede asociarse a Perosis (7) debido a que se observó una inflamación de las articulaciones tarsianas. Sin embargo, dicha inflamación no fue perosis, fue originada por el arrastre de la pollita por no poder soportar su propio peso, y como consecuencia de la postración al no alcanzar el bebedero y comedero el incremento en la mortalidad.

Se observó también pollitas muy pequeñas (raquitismos) en relación de sus contemporáneas alojadas en la caseta siguiente (Figura 4) cuando tenían casi las tres semanas de edad. A la necropsia se pudo confirmar la baja resistencia de todos los huesos de la pollita incluyendo las costillas (7), característica primaria de un problema de raquitismo asociado a una deficiencia de fosfato cálcico y vitamina D3.

Como consecuencia del seguimiento al problema la planta de alimento reportó a los 18 días, post inicio del problema, que el bache que fue balanceado y llevado a la granja y colocado en la caseta con el problema no contenía fosfato de calcio. Un total de 9,018 pollitas (69.36%) con las características mencionadas anteriormente murieron como consecuencia de la ausencia de fósforo en la dieta iniciador.

Todo el alimento sin fosfato de calcio fue retirado y distribuido en la granja de gallinas de postura comercial próximas a su salida o término de su primer ciclo de postura. A la caseta en crecimiento que reportó el problema fue llevado alimento “nuevo” y las pollitas que sobrevivieron se recuperaron.

CONCLUSIONES

La mortalidad por ausencia de fosfato de calcio en la dieta iniciador de la pollita de reemplazo incrementa la mortalidad y está puede ser tan elevada como el tiempo en que el avicultor detecta el problema. Tomar y enviar muestras de las aves afectadas y del alimento al laboratorio, además de la necropsia en campo es crucial para un buen diagnóstico en granja.

REFERENCIAS

1. Bovans white management guide. Centurion Poultry, Inc. 2012.
2. De Blas, C. y Mateos, G. Nutrición y Alimentación de Gallinas Ponedoras. Madrid, España. Ed AEDOS. 567 pag. 1991.
3. FEDNA, Funación Española para el Desarrollo de la Nutrición Animal. Programas de alimentación en avicultura: ponedoras comerciales. Sn. Madrid, España. 423 pag. 1994.
4. Keshavarz, K. and Nakajima, S. Evaluación de calcio y fosforo requerida para la óptima formación del huevo. Poultry Science 1998; 79:144-153.
5. Noy, Y, Sklan D. Posthatch development in poultry. J Appl Poult Res 1997; 6:344-354.
6. Underwood, E. The mineral nutrition of livestock. 3a ed. Wallingford, Oxon. Commonwealth Agricultural Bureaux International. Germany, 76 pag. 1999.

7. Woernle. H. Enfermedades de las aves. Acribia, ed. Zaragoza, España. 150 pag. 1996.

Figura 1. Número de bajas en pollitas de reemplazo de la estirpe Bovans White de acuerdo a su edad en semanas asociadas a ausencia de fósforo en la dieta iniciador.

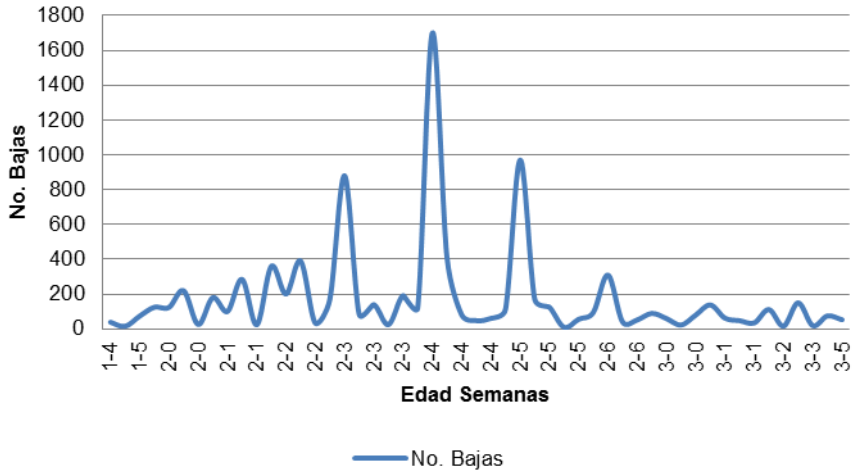


Figura 2. Pollitas de reemplazo de la estirpe Bovans White de 1-4 semanas de edad con signos clínicos asociados a una enteritis causada por *E. coli* (colibacilosis).



Figura 3. Pollitas de reemplazo de la estirpe Bovans White de 2-0 semanas de edad con signos clínicos de postración total asociados a ausencia de fósforo en la dieta iniciador.



Figura 4. Pollitas de reemplazo de la estirpe Bovans White de 3-0 semanas de edad con signos clínicos asociados a raquitismos por ausencia de fosfato de calcio en la dieta iniciador.



USO DE ANTIMICROBIANOS EN LA RECEPCIÓN DE LA POLLITA DE REEMPLAZO

ANTIMICROBIAL USE DURING PULLET RECEIVING

M. Itza Ortiz^A, C. Hernández^B, Y. Castillo Castillo^C, M. Rios Ovando^D, J. Ortiz Ortiz^A, E. Pérez Eguía^A, J. María Carrera Chavez^A y D. Marcela Beristain Ruiz^A

^ADepto. Ciencias Veterinarias- Universidad Autónoma de Ciudad Juárez. Av. Benjamín Franklin No. 4651 Circuito Pronaf, CP. 32315, Cd. Juárez, Chihuahua (México). Tel: 52 (656) 688-1825

^BTesista. Estudiante del Programa de Medicina Veterinaria y Zootecnia. Universidad Autónoma de Ciudad Juárez

^CDepto. Ciencias Veterinaria – Campus Nuevo Casas Grandes, Universidad Autónoma de Ciudad Juárez
yamicela.castillo@uacj.mx

^DInstituto Tecnológico de Conkal. Km. 16.3 Carretera Mérida-Motul Conkal, CP. 97345, Yucatán, México. Tel: 52 (999) 912-4133 / Fax: 52 (999) 912-4135 jortort@yahoo.com.mx

SUMMARY

Antimicrobial use in pullets is frequent as prophylaxis due to the stress these suffer during transport to the farm that can cause opportunistic bacteria to increase mortality. The aim of this study was to determine the effectiveness of three antimicrobial on mortality during the first three wk of age of pullets: ceftiofur hydrochloride (T1) equivalent to 50 mg ceftiofur, enrofloxacin 10% (T2), a combination of the above (T3) and a negative control (T0). Two hundred pullets were used for each of the four groups. SAS PROC MIXED analyzed the data. Differences ($P < 0.05$) in mortality were found by use of antimicrobial, T1 was 5.50 % (N = 11), while for T2 were of 3.03 % (N = 6), T3 5.50% (N = 11) and T0 4.0% (N = 8). We conclude that with adequate disinfection the use of antimicrobials may be unnecessary.

RESUMEN

El uso de antimicrobianos en las pollitas de remplazo es frecuente como profilaxis debido al estrés que sufren estas durante el transporte a la granja puede originar que bacterias oportunistas incrementen la mortalidad. El objetivo del presente estudio fue determinar la efectividad de tres antimicrobianos, clorhidrato de ceftiofur (T1) equivalente a 50 mg de ceftiofur, enrofloxacin al 10% (T2), una combinación de las anteriores (T3) y un testigo negativo (T0) sobre la mortalidad durante las primeras tres semanas de edad de la pollita de reemplazo. Se usaron 200 pollitas por cada uno de los cuatro grupos. Los datos fueron analizados por PROC MIXED del SAS. Se encontraron diferencias ($P < 0.05$) en la mortalidad por uso de antimicrobiano, T1 fue del 5.50% (N=11), mientras que para T2 del 3.00% (N=6), T3 del 5.50% (N=11) y para T0 del 4.0% (N=8). Se concluye que realizando una desinfección adecuada el uso de antimicrobianos puede no ser necesario.

INTRODUCCIÓN

Los agentes antimicrobianos actúan mediante diferentes mecanismos de acción. Las diversas regiones de ataque antibacteriano en general son consideradas en la pared bacteriana, membrana bacteriana, interfiriendo con la síntesis de proteínas o ácidos nucleicos en diversos niveles del organoide encargado de su elaboración. En el ribosoma, actúa un cúmulo de agentes, a saber: Aminoglucósidos y aminociclitolos, tetraciclinas, cloranfenicol y sucedáneos, lincosamidas y macrólidos. Dada la complejidad de este proceso, hay diversos blancos que son impactados por los diferentes agentes antimicrobianos.

El efecto de promotor del crecimiento de los antimicrobianos fueron descubiertos en 1940 cuando se observó que los animales alimentados con micelos secos de *Streptomyces aureofaciens* que contienen residuos de chlortetraciclina mejoraron el crecimiento de los animales. Los mecanismos de acción de estos promotores del crecimiento están relacionados con la interacción de la microbiota intestinal.

El uso de antimicrobianos durante la recepción es un manejo usado por los avicultores para minimizar la mortalidad por bacterias oportunistas que pudieran afectar a las pollitas recién llegadas a granja debido a desinfecciones deficientes o mal manejo en la limpieza y desinfección del equipo de recepción donde la mayor mortalidad se encuentra entre la primero y segunda semana de vida de la pollita. El objetivo del presente estudio fue

determinar la efectividad de tres antimicrobianos que comúnmente son empleado en la industria avícola en la recepción de la pollita de reemplazo.

METODOLOGÍA

Los datos fueron obtenidos en una granja comercial de pollitas de reemplazo de la línea genética Bovans White, alojadas en piso. La granja se encuentra ubicada en el estado de Yucatán, México, 20°57' 6.82" N y 89° 56' 30.69" O a una altura de 5 m. El clima es del tipo Aw₀, el más seco de los climas cálidos, sub-húmedos de acuerdo a la clasificación de Köppen modificada por García (3), con una temperatura anual entre 21.0 y 33.8° C (4).

Se utilizaron 800 pollitas del mismo lote de incubadora que fueron alojadas en casetas de piso de cemento a un día de edad hasta la sexta semana de edad. Todas pollitas fueron recibidas con la vacuna de Marek en incubadora y en granja se aplicó la vacuna NOBILIS® CLONE 30+Ma5 al décimo segundo día vía oral en el agua de bebida. El manejo y alimentación se realizó de acuerdo a lo recomendado por la línea Bovans White (1).

Las pollitas fueron distribuidas en cuatro tratamientos con 200 pollitas cada uno, donde cada pollita representó una unidad experimental. Se utilizaron tres antimicrobianos de amplio espectro clorhidrato de ceftiofur (T1) equivalente a 50 mg de ceftiofur, enrofloxacin a 10% (T2), una combinación de las anteriores (T3) y un testigo negativo (T0). Los antimicrobianos fueron usados de acuerdo a las recomendaciones del fabricante en el agua de bebida por cinco días consecutivos desde el primer día de recepción. La mortalidad (n) fue registrada a diario mientras que el peso corporal (g) se obtuvo por aves hasta el final de experimento.

Los datos fueron analizados usando la prueba de χ^2 para mortalidad mientras que el peso corporal (g) por el PROC GLM del SAS (8). Las diferencias entre medias fueron determinadas por la prueba de SNK (4).

RESULTADOS Y DISCUSION

Se encontraron diferencias ($P \leq 0.05$) entre tratamientos en el peso corporal (g) de las pollitas; sin embargo no se encontraron diferencias ($P \geq 0.05$) en la mortalidad en T1 fue del 5.50% (N=11), T2 del 3.03% (N=6), T3 del 5.50% (N=11) y T0 del 4.0% (N=8). Se observó que la infección del saco vitelino es la principal causa (55.91%) de mortalidad seguida por aspergilosis (38.74%). Las menos frecuentes fueron las ahogadas (0.22%) en el bebedero de la caseta y por corte de pico (0.43%), actividad relacionada al manejo de la cría de la pollita de reemplazo.

La falta de una adecuada desinfección, buen manejo de huevo fértil o un rol de productos en incubadora o granja pueden llegar a propiciar la presencia de *E. coli* principal bacteria asociada a infección del saco vitelino (7).

CONCLUSIONES

Se concluye que realizando una desinfección adecuada el uso de antimicrobianos en la recepción de la pollita de reemplazo puede no ser necesario.

REFERENCIAS

1. Bovans white management guide. 2012. Centurion Poultry, Inc.
2. Dibner JJ, Richards JD. Antibiotic growth promoters in agriculture: History and mode of action. Poult. Sci. 2005; 84:634–643.
3. García E. Modificación al sistema de clasificación climática de Köppen. UNAM. México. DF. 1973; 214 pag.
4. Itzá MF, García L, Castro F. Consumo de alimento, causa y porcentaje de mortalidad en granjas de postura comercial bajo condiciones climáticas de Yucatán, México. Veterinaria México. 2006; 37(3):379-390.
5. Mendenhall W. Introduction to probability and statistics; *In*: Introduction to Linear Model and the Design and Analysis of Experiments, Mendenhall, W., R. J. Beaver, (eds.), Belmont(California):Duxbury. 1994; pp: 244-251.
6. Niewold TA. The nonantibiotic anti-inflammatory effect of antimicrobial growth promoters, the real mode of action? A hypothesis. Poult. Sci. 2007; 86:605–609.
7. Rosario CC, López CC, Téllez IG, Navarro OA, Anderson RC, Eslava CC. Serotyping and virulence genes detection in *Escherichia coli* isolated from fertile and infertile eggs, dead-in-shell embryos and chicken with yolk sac infection. Avian Dis 2004; 48:791-802.
8. SAS User's Guide. 2004. Version 9.1 ed. SAS Inst. Inc., Cary, NC.

Cuadro 1. Peso corporal (g) y mortalidad (n) en la pollita de reemplazo a la sexta semana de edad que fueron recepcionadas con antimicrobianos en el agua de bebida los primeros cinco días de edad.

	Testigo (T0)	Enrofloxacina 10% (T2)	Clorhidrato de Cefitiofur* (T1)	Combinación T1 y T2
Peso corporal (g)	460.0 ^a ±47.57	410.0 ^b ±12.92	407.0 ^b ±6.32	402.0 ^b ±24.45
Mortalidad (n)	1.14 ^a ±1.21 (8/200)	0.85 ^a ±1.07 (6/198)	1.57 ^a ±1.81 (11/200)	1.57 ^a ±2.44 (11/200)

*equivalente a 50 mg de cefitiofur

Las literales diferentes entre columnas son significativas ($P \leq 0.05$)

Media ±D.E

PROTEÍNA MATRIZ DE NEWCASTLE COMO PLATAFORMA PARA LA OBTENCIÓN DE PARTÍCULAS PSEUDOVIRICAS (VLPs) DE *FOWL ADENOVIRUS* SEROTIPO 4 (FADV-4) GENERADAS A PARTIR DE LA FIBRA-2

MATRIX PROTEIN OF NEWCASTLE AS A PLATFORM TO OBTAIN PSEUDOVIRIC PARTICLES (VLPs) OF FOWL ADENOVIRUS SEROTYPE 4 (FADV-4) GENERATED FROM FIBER 2

R. Izquierdo-Lara^{A*}, A. Chumbe^A, A. Figueroa^B, L. Saravia^A y M. Fernandez^{AB}

^ALaboratorio de Biotecnología Molecular y Genómica, FARVET SAC., Chincha Alta, Ica, 11141, Perú

^BLaboratorio de Cultivos Celulares y Virología, FARVET SAC, Chincha Alta, Ica, 11141, Perú

*Corresponding author: Ray Izquierdo-Lara

Email: ray.izquierdo@farvet.com

SUMMARY

FADV-4 causes hepatitis to inclusion bodies (HCI) and occasionally hydropericardium syndrome (SHP). Currently, vaccines are not totally effective and can revert. VLPs are good candidates to vaccines. However, FADV is a virus that has no viral envelope and has a very complex structure, so that VLPs generation is technically difficult. The objective of the present work was to obtain VLPs in which surface the Fiber-2 protein of the FADV-4 is exposed.

In order to do that, the Matrix and the Fiber-2 were expressed simultaneously in DF-1 cells. The Fiber-2 was merged in its N-terminal side to the cytoplasmic and trans membrane domain of the Newcastle's NH protein. Purified VLPs were evaluated using western blot, which resulted in stripes positive to anti-NDV serum, ~40kDa corresponding to the Matrix and the anti Fiber-2 serum, obtaining a stripe of ~55 kDa.

VLPs are excellent immunogens, and this is why they can be evaluated as vaccines to control HCI and SHP outbreaks.

RESUMEN

Fowl adenovirus serotipo 4 (FADV-4) causa hepatitis a cuerpos de inclusión (HCI) y síndrome de hidropericardio (SHP), generando pérdidas en la industria avícola. Actualmente, las vacunas contra FADV no son totalmente efectivas y en ocasiones pueden revertir, por lo que es necesario desarrollar nuevas vacunas para controlar esta enfermedad. Por otro lado, los han mostrado ser excelentes inmunógenos. Sin embargo, FADV es un virus sin envoltura, estructuralmente complejo, por lo que generar partículas pseudoviricas (VLPs) de este virus es un desafío técnicamente muy difícil de realizar. Para superar este inconveniente, hemos aprovechado la cualidad de la proteína Matriz (M) del virus de la enfermedad de Newcastle (NDV), de tomar parte de la membrana del hospedero y formar viriones, para generar VLPs con envoltura cuya superficie contiene a la proteína Fibra-2 de FADV-4. Para ello, se expresó simultáneamente en células DF-1 la Matriz y la Fibra-2. Esta última fusionada en el extremo N-terminal a los dominios citoplasmático y transmembrana de la proteína HN de Newcastle. Los VLPs purificados fueron evaluados por western blot, obteniéndose bandas positivas a suero anti-NDV de ~40 kDa correspondiente a la Matriz, y a suero anti-Fibra2 obteniendo una banda de ~60 kDa.

Este es el primer reporte de la obtención de VLPs para un adenovirus, dando un paso importante en el desarrollo de la siguiente generación de vacunas contra FADV. Sin embargo, estos VLPs necesitan ser probados para determinar su eficiencia como vacuna contra FADV-4.

INTRODUCCIÓN

Fowl adenovirus serotipo 4 (FADV-4) produce hepatitis a cuerpos de inclusión (HCI) y síndrome de hidropericardio (SHP) (1); condiciones que han sido reportadas en muchos países del mundo, especialmente en Asia, centro y Suramérica (2), causando pérdidas en la industria avícola. Varias formulaciones de vacunas han sido usadas en campo, especialmente las producidas de hígados afectados, pero ninguna de ellas cumple el criterio de inducir

una respuesta inmune pronta y duradera contra brotes naturales de la enfermedad (3).

FAdV-4 pertenece a la familia *Adenoviridae*, que se caracterizan por ser virus icosaédricos, sin envoltura y con un genoma de DNA de doble cadena (4). En general, la cápside de FAdV contiene 4 proteínas estructurales principales: el Hexón, el Pentón, la Fibra-1 y la Fibra-2. De estas proteínas, la proteína Fibra-2 juega un rol principal en la entrada del virus a la célula huésped (5). Además, se ha demostrado que la Fibra-2 es capaz de generar una eficiente protección cuando se usa como proteína recombinante (6).

Las partículas pseudovíricas VLPs consisten en una o más proteínas estructurales, sembrando al virión sin incluir el genoma del virus, así, generando potenciales vacunas más seguras sin la necesidad de usar adyuvantes (7). La proteína M de virus de la enfermedad de Newcastle (NDV) tiene la capacidad de tomar parte de la membrana celular y ensamblar con alta eficiencia viriones vacíos cuando es expresada en células aviares (8). Esta característica ha permitido el desarrollo VLPs que usan como plataforma la proteína M y los dominios citoplasmático (DC) y dominio transmembrana (DT) de las proteínas F y HN de NDV (9).

En este trabajo, hemos desarrollado un VLP para FAdV-4, utilizando como la proteína M y los DC y DT de la HN de NDV para incorporar la proteína fibra-2 al virión.

METODOLOGÍA

Construcción de Plásmidos que codifican los VLPs. Se realizó un reacción en cadena de la polimerasa con transcriptasa inversa (RT-PCR) para amplificar el ORF completo de la proteína M a partir de RNA extraído de NDV, utilizando los primers: 5'-caatGCTAGCACCATGGACTCATCTAGGACAATTGGGC -3' y 5'-gaGCGGCCGCTTATTTCTTAAAAGGATTGTATTTGG-3' (las bases subrayadas corresponden a los sitios NheI y NotI, respectivamente). El ORF de la proteína M fue insertado en el plásmido pcDNA3.1 (Invitrogen®) entre los sitios NheI y NotI, generando el plásmido pcDNA3.1/M.

El plásmido pcDNA3.1 contiene los promotores CMV y SV40, donde el primero se usa para expresar el gen de interés, mientras que el segundo expresa el gen de resistencia a la neomicina. Para usar el promotor SV40 para expresar un segundo gen de interés, se amplificó a pcDNA3.1/M con los primers

5'-TTGCGTACGCCTGCAGGGCGGGACTCTGGGGTTTCGAAATG-3' y

5'- AATGGCTAAGCGATCGCCCGGGAGCTTTTTGCAAAAGC-3'

eliminando el gen de resistencia a la neomicina y colocando los sitios SbfI y AsiSI (bases subrayadas) a los extremos. Luego se insertó la Proteína Verde Fluorescente Potenciada (EGFP), sintetizada por GeneScript (Piscataway, NJ), obteniéndose el plásmido pcDNA dual/M-EGFP.

La fibra-2 de FAdV-4 fue fusionada en su extremo N-terminal a los DC y DT de la HN de NDV, generando la proteína hnF2. El gen que codifica esta proteína, fue sintetizado por GeneScript (Piscataway, NJ). El gen hnF2 fue insertado entre AsiSI y SbfI en el pcDNA dual/M-EGFP, generando el plásmido pcDNA dual/M-hnF2. Un esquema de todos los plásmidos se muestra en la Figura 1.

Transfección de células DF-1. Para encontrar la proporción óptima de polietilimina de 25kDa (PEI25) (Sigma-Aldrich) y DNA que debe ser usada para la transfección de células DF-1, 1 y 2 µg del plásmido pcDNA dual/M-EGFP fue transfectado con diferentes cantidades de PEI25 en una placa de 12 pocillos. La solución de trabajo del PEI25 fue una dilución de 1:1000 (w/v) en agua ultrapura.

La obtención de VLPs se realizó transfectando células DF-1 con el plásmido pcDNA dual/M-hnF2 con la proporción óptima de PEI25/DNA, escalada en base al área para flask T-225. Luego de 4h de incubación las células fueron lavadas con D-PBS y se les colocó medio DMEM al 5% de suero fetal bovino.

Purificación de VLPs. Se modificó el protocolo de McGinnes et al (10). Brevemente, el sobrenadante fue colectado a las 72 y 96 h post-transfección y el debris fue removido por centrifugación a 2000 xg por 10 min. Los VLPs fueron ultracentrifugados en el rotor type 19 (Beckman) a 18000rpm por 12h. El pellet fue resuspendido en Buffer TNE, cargado sobre una gradiente discontinua de sucrosa (65%-20%) y centrifugado en el rotor SW28 (Beckman) a 24000 rpm por 6h. La capa "esponjosa" situada en la interface entre 20% y 65% de sucrosa, fue colectada, mezclada con 2 volúmenes de 80% de sucrosa y colocada sobre 1ml de sucrosa al 80%, luego se colocó en la parte superior 3.5ml de sucrosa al 50% y 2 ml de sucrosa al 10%. La gradiente fue centrifugada a 38000rpm por 18h en el rotor SW41 (Beckman). Los VLPs en la interface de 50% y 10% de sucrosa fueron colectados y concentrados en una columna amicon de 100kDa. Todas las centrifugaciones fueron hechas a 4°C.

Análisis de proteínas de los VLPs purificados. La evaluación de las proteínas presentes en los VLPs purificados fue evaluada por Western Blot (WB). Para ello se realizó un *electroforesis en gel de poliacrilamida con dodecilsulfato sódico* (SDS-PAGE) de gradiente discontinua (5% y 10%). Luego las proteínas se transfirieron a una membrana de nitrocelulosa. Se realizaron 2 WB: el primero para la detección de la proteína M de NDV y el segundo para la detección de la proteína hnF2. Para la detección de la proteína M se usó antisuero de pollo contra NDV

(Charles Rivers) y para la detección de hnF2 se utilizó antisuero de pollo contra la proteína fibra-2 de FAdV-4. Para ambos WB, el anticuerpo secundario fue un anticuerpo de ratón contra IgY de pollo conjugado con HRP (Promega).

RESULTADOS

Optimización de la transfección. La cantidad óptima de DNA/PEI25 para cada pocillo de una placa de 12 pocillos fue de 1 µg de DNA por 2 µL de PEI. Esta proporción fue extrapolada para los flask T225 en base al área (~60 veces el área de un pocillo de una placa de 12 pocillos). Finalmente cada flask T225 fue transfectado con 60 µg del plásmido pcDNA dual/M-hnF2 y 120 µL de PEI.

Obtención de VLPs. Los VLPs recuperados en el sobrenadante de las células transfectadas fueron purificados por varios pasos de ultracentrifugación. Luego las proteínas fueron detectadas por WB. La proteína M dio una banda de ~40kDa positiva a suero anti NDV, coincidiendo con el tamaño antes reportado (11). Por otro lado, la proteína hnF2 resultó positiva al suero anti Fibra-2, generando una banda de más de 60kDa. La figura 2 muestra el WB realizado a los VLPs, tanto con suero anti NDV, como con suero anti Fibra-2.

DISCUSIÓN

Las proteínas M y hnF2 fueron encontradas juntas en los VLPs purificados, indicando que la incorporación de la proteína hnF2 en los viriones fue exitosa. El extremo N-terminal de la proteína hnF2, compuesto de los DC y DT de la proteína HN, tiene la capacidad de interactuar con la proteína M (8), lo que explica la incorporación eficiente la proteína hnF2 al virión.

El VLP generado tiene un alto potencial inmunogénico y si bien, la única proteína de FAdV-4 incorporada en el VLP es la Fibra-2, se espera que la protección generada contra el virus sea mayor que la protección obtenida por la proteína sola. Esto debido principalmente a dos razones: la primera es que los VLPs exhiben una gran repetición del antígeno en su superficie, lo que puede inducir una fuerte respuesta inmune de células B (12); la segunda razón se debe a que los VLPs presentan un tamaño similar al de un patógeno, lo que les permite ser captados por las células presentadoras de antígeno (en especial células dendríticas) y su subsecuente procesamiento y presentación vía MHC-I y MHC-II (12).

En resumen, el presente trabajo es el primero en reportar la obtención de VLPs para un adenovirus, dando un paso importante en el desarrollo de la siguiente generación de vacunas contra FAdV. Sin embargo, el potencial inmunológico de estos VLPs necesita ser probado in vivo, para determinar su eficiencia como vacuna contra FAdV-4.

REFERENCIAS

1. H. Grgić, Z. Poljak, S. Sharif and E. Nagy. Pathogenicity and Cytokine Gene Expression Pattern of a Serotype 4 Fowl Adenovirus Isolate. *PLoS One*. 8(10): e77601. 2013.
2. Hafez HM. Avian adenoviruses infections with special attention to inclusion body hepatitis/hydropericardium syndrome and egg drop syndrome. *Pak Vet J*, 31(2): 85-92. 2011.
3. Khan, A.A., Sabri, A.N., Mansoor, M.K. and Hussain, I. Hydropericardium syndrome in Pakistan: a review. *World's Poult. Sci. J.*, 8: 647-654. 2005.
4. San Martín C. Latest Insights on Adenovirus Structure and Assembly. *Viruses*, 4, 847-877; doi:10.3390/v4050847. 2012.
5. Tan P, Michou AI, Bergelson J & Cotten M. Defining CAR as a cellular receptor for the avian adenovirus CELO using a genetic analysis of the two viral Fibre proteins. *Journal of General Virology*, 82, 1465-1472. 2001.
6. Schachner, A., Marek, A., Jaskulska, B., Bilic, I., Hess, M. Recombinant FAdV-4 fiber-2 protein protects chickens against hepatitis-hydropericardium syndrome(HHS). *Vaccine*, <http://dx.doi.org/10.1016/j.vaccine.2013.12.056>. 2014.
7. Liu F, Ge S, Li L, Wu X, Liu Z & Wang Z. Virus-like particles: potential veterinary vaccine immunogens. *Res. Vet. Sci.*, doi:10.1016/j.rvsc.2011.10.018. 2011.
8. Pantua H, McGinnes L, Peebles M & Morrison T. Requirements for the Assembly and Release of Newcastle Disease Virus-Like Particles. *Journal of Virology*. DOI: 10.1128/JVI.00726-06. 2006.
9. Morrison T. Newcastle disease virus-like particles as a platform for the development of vaccines for human and agricultural pathogens. *Future Virol*. September 1; 5(5): 545-554. 2010.
10. McGinnes L, Pantua H, Laliberte J, Gravel K, Jain S, Morrison T. Assembly and Biological and Immunological Properties of Newcastle Disease Virus-Like Particles. *Journal of Virology*. p. 4513-4523. 2010.

11. Battisti, A. J., Meng, G., Winkler, D.C., McGinnes, L.W., Plevka, P., Steven, A.C., Morrison T.G., Rossmanna M.G. Structure and assembly of a paramyxovirus matrix protein. *Proc Natl Acad Sci US A.* 109(35): 13996-14000. 2012.

12. E. Crisci, J. Bárcena, M. Montoya. Virus-like particles: The new frontier of vaccines for animal viral infections. *Vet. Immunol. Immunopathol.* <http://dx.doi.org/10.1016/j.vetimm.2012.04.026>. 2012.

Figura 1. Esquema de clonamiento del plásmido que codifica el VLP. El ORF completo de la proteína M fue amplificado a partir de RNA extraído de NDV e insertado en el plásmido pcDNA3.1 entre NheI y NotI, generando el plásmido pcDNA3.1/M. Para usar el promotor SV40 para expresar un segundo gen de interés, se amplificó a pcDNA3.1/M eliminando el gen de resistencia a la neomicina y colocando los sitios SbfI y AsiSI a los extremos. Luego se insertó la EGFP, obteniéndose el plásmido pcDNA dual/M-EGFP. La Fibra-2 de FAdV-4 fue fusionada en su extremo N-terminal a los DC y DT de la HN de NDV, generando la proteína hnF2. El gen hnF2 fue insertado entre AsiSI y SbfI en el pcDNA dual/M-EGFP, generando finalmente el plásmido pcDNA dual/M-hnF2.

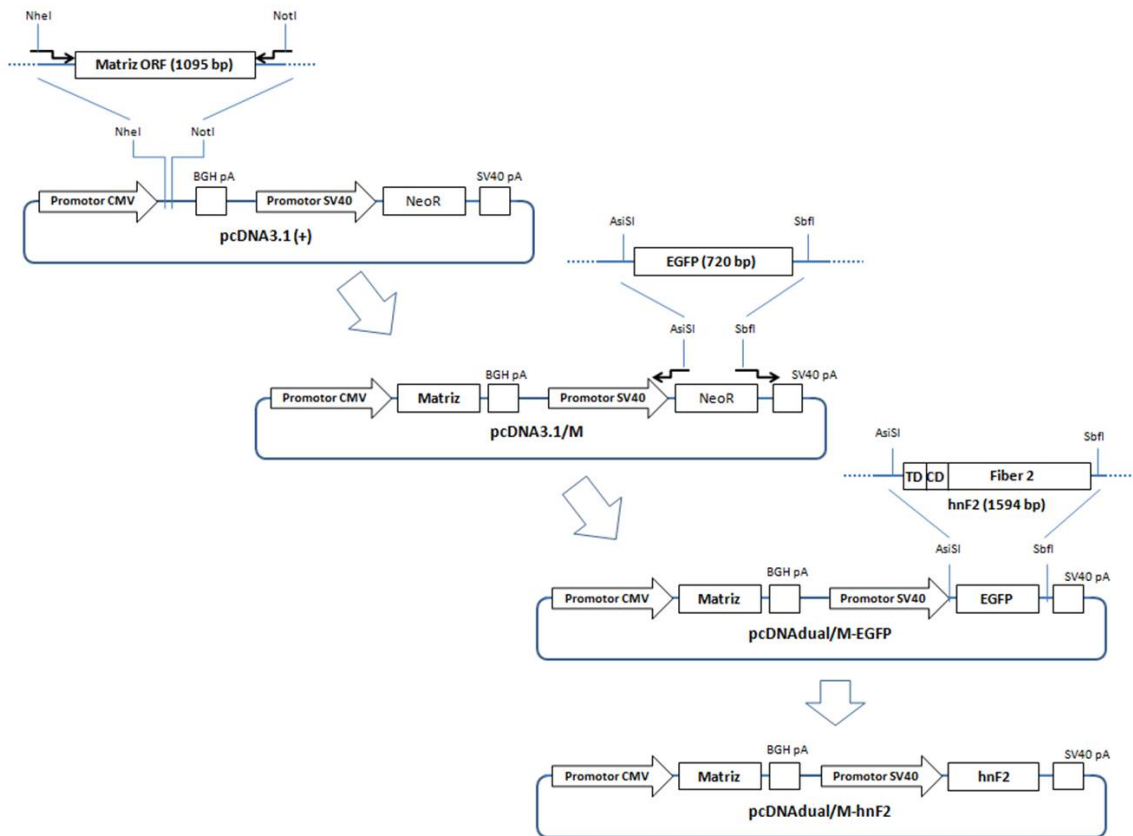


Figura 2. Western Blot de los VLP purificados. Los VLPs purificados del sobrenadante de células transfectadas fueron corridos por SDS-PAGE y luego transferidos a una membrana de nitrocelulosa. Luego las proteínas fueron detectadas por WB. (A) La proteína M, en el carril 1, dio una banda de ~40kDa positiva a suero anti NDV. En el carril 2 se corrió NDV completo como control positivo. (B) La proteína hnF2, carril 1, resultó positiva al suero anti Fibrin-2, generando una banda de más de 60kDa. El carril 2 contiene proteína Fibrin-2 purificada de *E.coli* como control positivo.



INFECTIOUS BURSAL DISEASE (GUMBORO) IS STILL CAUSING POULTRY PRODUCTION PROBLEMS

D. Jackwood

Food Animal Health Research Program
The Ohio State University
Ohio Agricultural Research and Development Center
Wooster, Ohio, USA

ABSTRACT

Evolutionary forces at work for over half a century have selected for phenotypic changes among infectious bursal disease virus (IBDV) strains. Point mutations and homologous recombination in genome segment A have had a profound effect on the antigenicity and pathogenicity of IBDV. The reassorting of IBDV genome segments has contributed to changes in pathogenicity among the viruses particularly the very virulent (vv)IBDV. As a result, the viruses we are trying to control today are much different than the viruses that were infecting chicken flocks 50, 25 or even five years ago. Gumboro disease continues to be a problem because vaccines have not kept pace with the antigenic changes occurring in these viruses. We now know that even minor amino acid changes can have profound effects on the antigenicity and pathogenicity of IBDV. Clinical Gumboro caused by the vvIBDV continues to cause losses for poultry producers. Subclinical IBDV infections and the immune suppression that accompanies them can reduce feed efficiency, cause slower growth rates and lead to secondary infections. The inactivated vaccines used to produce maternal immunity and the live-attenuated and recombinant HVT-IBD vaccines used to produce active immunity in chicks all seem to provide better protection when their antigenic structure matches that of the field viruses.

INTRODUCTION

Gumboro disease is caused by IBDV. This virus is a member of the family *Birnaviridae*, genus *Avibirnavirus*. They have a bi-segmented double-stranded RNA genome. This is important because mutations in RNA viruses occur more frequently than in DNA viruses. As a result, the antigenic and pathogenic types of IBDV have evolved considerably since it was first identified approximately 50 years ago (5). These viruses no longer fit into the two antigenic classes (classic and variant) identified in the 1980s. Numerous antigenic strains of the serotype 1 viruses have been identified. In addition, a wide range of pathogenicity exists from naturally attenuated to the very virulent (vvIBDV) strains (30).

ANTIGENICITY

Two serotypes of IBDV have been identified. The serotype 1 viruses typically infect chickens and cause immune suppression in that species (5). Serotype 2 viruses infect numerous avian species including turkeys but thus far no disease has been attributed to the viruses belonging to this serotype (4,23,24).

Approximately 30 years ago, the serotype 1 viruses were characterized into two antigenic groups known as classic and variant. Today this is an oversimplification of the antigenic variability we have observed among these viruses. Several antigenic subtypes have been described within the classic virus group; for example the Winterfield and Lukert strains (22,32) and antigenic drift is largely responsible for the continued emergence of new antigenic variant viruses (14).

The antigenic phenotype of IBDV is determined by the hypervariable sequence region of VP2 (hvVP2) (1,3,9,10). The crystal structure of VP2 identified four loop structures in the hypervariable sequence region that were designated P_{BC}, P_{DE}, P_{FG}, and P_{HI} (7). The antigenic characteristics of IBDV are controlled by specific amino acids at the apex of these loops (6,20).

Studies have shown that several evolutionary mechanisms are used by IBDV to change the amino acids on these loop structures. Amino acid substitution mutations in the P_{BC} and P_{DE} domains have contributed to antigenic drift among IBDV strains (14). We examined amino acids 222 and 254 on the variant Del-E strain of IBDV and found that single amino acid mutations at both sites profoundly affect antigenicity (14).

In addition to antigenic drift, the loop structures on VP2 have mutated through homologous recombination. This is an event that occurs when different strains of IBDV infect the same host cell. The co-infection provides an opportunity for their genome segments to break and recombine. When this happens within the hvVP2 region, the antigenic structure of the virus can be affected.

Using phylogenetic analysis, two studies on IBDV genome segment A found incongruent phylogenetic trees indicating strong evidence for recombination between vvIBDV and vaccine strains of the virus (11,12). We identified IBDV that had recombination events in their genomes during a molecular epidemiologic study from 2001 to 2011 in commercial chickens from Mexico, Colombia and Venezuela (13). Most of the IBDV identified had the typical variant or classic amino acid sequences across the hvVP2 region. However, fifteen viruses identified in Mexico, six viruses from Venezuela, and one from Colombia had hvVP2 amino acid combinations characteristic of both classic and variant IBDV strains. The VP2 amino acid sequences in the P_{BC} and P_{HI} loop structures of the Venezuela and Colombia viruses were similar to most Winterfield classic viruses while their P_{DE} and P_{FG} loop sequences were typical of the Delaware variant strain. The Mexico viruses had P_{BC} loop sequences that were typical of variant IBDV strains but their P_{DE} and P_{FG} loop structures contained amino acids that were similar to Winterfield classic strains.

PATHOGENICITY

A wide range of IBDV serotype 1 pathotypes exist in nature. They have been generally classified into sub-clinical (scIBDV), classic virulent (cvIBDV) and very virulent (vvIBDV) groups (30). Although there are some countries that do not have vvIBDV, phylogenetic studies indicate these highly pathogenic viruses have spread to nearly all poultry producing countries in the world including the United States (8,27,29). Phylogenetic studies also indicate that all known vvIBDV are closely related (28) however there appears to be some mutations that are creating vvIBDV with unique nucleotide sequences. These viruses are usually found within a defined geographic region.

Studies have shown that amino acids 253 and 284 in VP2 are involved in virulence of IBDV (2,21,25,31). It was also shown that genome segment B which encodes the viral RNA-directed RNA polymerase was important for efficient viral replication and virulence *in vivo* (21). The discovery of a natural reassortant of IBDV also demonstrated that genome segment B is important for the pathogenicity of vvIBDV strains (19). It appears that more than one molecular determinant contributes to the virulence of IBDV.

CONTROL OF GUMBORO

Current vaccination and control strategies used by the poultry industry rely heavily on maternal immunity being passed to progeny chicks. Inactivated commercial vaccines prepared from antiquated strains of IBDV are available for the production of maternal immunity in breeder flocks but they usually do not fully protect progeny chicks against vvIBDV (16). Furthermore, these vaccines are also ineffective against newly emerging viruses that have undergone antigenic drift (14).

Live-attenuated commercial vaccines have been used in young chicks in an attempt to improve protection but they are only marginally effective against the new antigenic types of IBDV and most are not effective against the highly pathogenic vvIBDV (18,26). The recombinant HVT-IBD vaccines have improved protection to some IBDV strains but they too are based on a single antigenic type of virus and may not fully protect against evolving IBDV strains. The increased use and success of autogenous vaccines and recent publications on the molecular basis for antigenic drift (14) indicate commercial IBD vaccines are not keeping up with the evolution of IBDV. The spread of vvIBDV and genome reassorted vvIBDV throughout the world including the USA, suggests the vaccines used for this acute strain of the virus could perform better (15,16). A vaccine specifically designed to control vvIBDV is needed.

Multivalent vaccines for IBDV exist and they do a good job protecting against some strains of the virus. Using one multivalent vaccine product to protect against all possible strains of IBDV however may not be practical because antigenic change will continue as immunologic selection pressures drive the evolution of these viruses (18). The use of molecular tools to diagnose the IBDV strains breaking through vaccine immunity and then genetically engineering a vaccine to that specific antigenic type of IBDV is possible (17). It is likely these designer vaccines will be able to keep up with IBDV evolution and effectively control Gumboro disease long into the future.

REFERENCES

1. Bayliss, C. D., U. Spies, K. Shaw, R. W. Peters, A. Papageorgiou, H. Muller, and M. E. G. Bournnell. A comparison of the sequences of segment A of four infectious bursal disease virus strains and identification of a variable region in VP2. *J. Gen. Virol.* 71:1303-1312. 1990.
2. Boot, H. J., A. H. ter Huurne, A. A. Hoekman, B. Peeters, and A. Gielkens. Rescue of Very Virulent and Mosaic Infectious Bursal Disease Virus from Cloned cDNA: VP2 is not the Sole Determinant of the Very Virulent Type. *J. Virol.* 74(15):6701-6711. 2000.
3. Brandt, M., K. Yao, M. Liu, R. A. Heckert, and V. N. Vakharia. Molecular determinants of virulence, cell tropism, and pathogenic phenotype of infectious bursal disease virus. *J. Virol.* 75:11974-11982. 2001.
4. Chettle, N., R. K. Eddy, and P. J. Wyeth. The isolation of infectious bursal disease virus from turkeys in England. *British Vet. Journal.* 141:141-145. 1985.
5. Cosgrove, A. S. An apparently new disease of chickens-Avian Nephrosis. *Avian Dis.* 6:385-389. 1962.
6. Coulibaly, F., C. Chevalier, B. Delmas, and F. A. Rey. Crystal structure of an aquabirnavirus particle: Insights into antigenic diversity and virulence determinism. *J. Virol.* 84:1792-1799. 2010.
7. Coulibaly, F., C. Chevalier, I. Gutsche, J. Pous, J. Navaza, S. Bressanelli, B. Delmas, and F. A. Rey. The Birnavirus crystal structure reveals structural relationships among icosahedral viruses. *Cell.* 120:761-772. 2005.
8. Eterradossi, N., C. Arnauld, F. Tekai, D. Toquin, H. Le Coq, G. Rivallan, M. Guittet, J. Domenech, T. P. van den Berg, and M. A. Skinner. Antigenic and genetic relationships between European very virulent infectious bursal disease viruses and an early West Africa isolate. *Avian Pathol.* 28:36-46. 1999.
9. Eterradossi, N., C. Arnauld, D. Toquin, and G. Rivallan. Critical amino acid changes in VP2 variable domain are associated with typical and atypical antigenicity in very virulent infectious bursal disease viruses. *Arch. Virol.* 143:1627-1636. 1998.
10. Eterradossi, N., D. Toquin, G. Rivallan, and M. Guittet. Modified activity of a VP2-located neutralizing epitope on various vaccine, pathogenic and hypervirulent strains of infectious bursal disease virus. *Arch. Virol.* 142:255-270. 1997.
11. He, C-Q., L-Y. Ma, D. Wang, G-R. Li, and N-Z. Ding. Homologous recombination is apparent in infectious bursal disease virus. *Virology.* 384:51-58. 2009.
12. Hon, C-C, T-Y Lam, C-W Yip, R. Wong, M. Shi, J. Jiang, F. Zeng, and F. C. Leung. Phylogenetic evidence for homologous recombination within the family Birnaviridae. *J. Gen. Virol.* 89:3156-3164. 2008.
13. Jackwood, D. J. Molecular epidemiologic evidence of homologous recombination in infectious bursal disease viruses. *Avian Dis.* 56:574-577. 2012.
14. Jackwood, D. J. and S. E. Sommer-Wagner. Amino acids contributing to antigenic drift in the infectious bursal disease Birnavirus (IBDV). *Virology.* 409:33-37. 2011.
15. Jackwood, D. J., S. E. Sommer-Wagner, B. M. Crossley, S. T. Stoute, P. R. Woolcock, and B. R. Charlton. Identification and pathogenicity of a natural reassortant between a very virulent serotype 1 infectious bursal disease virus (IBDV) and a serotype 2 IBDV. *Virology.* 2011.
16. Jackwood, D. J., S. E. Sommer-Wagner, S. T. Stoute, P. R. Woolcock, B. M. Crossley, S. K. Hietala, and B. R. Charlton. Characteristics of a very virulent infectious bursal disease virus from California. *Avian Dis.* 53:592-600. 2009.
17. Jackwood, D. J. and S. T. Stoute. Multivalent virus-like-particle vaccine protects against classic and variant infectious bursal disease viruses. *Avian Dis.* 57:41-50. 2013.
18. Jackwood, D. J. and S. T. Stoute. Molecular evidence for a geographically restricted population of infectious bursal disease viruses. *Avian Diseases.* 57:57-64. 2013.
19. Le Nouen, C, G. Rivallan, D. Toquin, P. Darlu, Y. Morin, V. Beven, C. de Boisseson, C. Cazaban, S. Comte, Y. Gardin, and N. Eterradossi. Very virulent infectious bursal disease virus: reduced pathogenicity in a rare natural segment-B-reassorted isolate. *J. Gen. Virol.* 87:209-216. 2006.
20. Letzel, T., F. Coulibaly, F. A. Rey, B. Delmas, E. Jagt, A. 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.
21. Liu, M. and V. N. Vakharia. VP1 protein of infectious bursal disease virus modulates the virulence in vivo. *Virology.* 330:62-73. 2004.
22. Lukert, P. D., J. Leonard, and R. B. Davis. Infectious bursal disease virus: antigen production and immunity. *Am. J. Vet. Res.* 36:539-540. 1975.
23. McFerran, J. B., M. S. McNulty, E. R. McKillop, T. J. Connor, R. M. McCracken, D. S. Collins, and G. M. Allan. Isolation and serological studies with infectious bursal disease viruses from fowl, turkeys, and ducks: demonstration of a second serotype. *Avian Pathol.* 9:395-403. 1980.

24. McNulty, M. S., G. M. Allan, and J. B. McFerran. Isolation of infectious bursal disease virus from turkeys. *Avian Pathol.* 8:205-212. 1979.
25. Mundt, E. Tissue culture infectivity of different strains of infectious bursal disease virus is determined by distinct amino acids in VP2. *J. Gen. Virol.* 80:2067-2076. 1999.
26. Sreedevi, B., L. J. LeFever, S. E. Sommer-Wagner, and D. J. Jackwood. Characterization of Infectious Bursal Disease Viruses from Four Layer Flocks in the United States. *Avian Dis.* 51:845-850. 2007.
27. Stoute, S. T., D. J. Jackwood, S. E. Sommer-Wagner, G. L. Cooper, M. L. Anderson, P. R. Woolcock, A. A. Bickford, C. G. Senties-Cue, and B. R. Charlton. The Diagnosis of very virulent infectious bursal disease in California Pullets. *Avian Dis.* 53:321-326. 2009.
28. van den Berg, T. P. Acute infectious bursal disease in poultry: a review. *Avian Pathol.* 29:175-194. 2000.
29. van den Berg, T. P., N. Etteradossi, D. Toquin, and G. Meulemans. Infectious bursal disease (Gumboro Disease). *World Trade and Public Health Implications, OIE Scientific and Technical Rev.* 19:509-543. 2000.
30. van den Berg, T. P., D. Morales, N. Etteradossi, G. Rivallan, D. Toquin, R. Raue, K. Zierenberg, M. F. Zhang, Y. P. Zhu, C. Q. Wang, H. J. Zheng, X. Wang, G. C. Chen, B. L. Lim, and H. Muller. Assessment of genetic, antigenic and pathotypic criteria for the characterization of IBDV strains. *Avian Pathol.* 33:470-476. 2004.
31. van Loon, A., N de Haas, I. Zeyda, and E. Mundt. Alteration of amino acids in VP2 of very virulent infectious bursal disease virus results in tissue culture adaptation and attenuation in chickens. *J Gen Virol.* 83 (1):121-129. 2002.
32. Winterfield, R. W., A. S. Dhillon, H. L Thacker, and L. J. Alby. Immune responses of white leghorn chicks from vaccination with different strains of infectious bursal disease virus and in the presence of maternal antibodies. *Avian Dis.* 24:179-188. 1979.

COMPOSTAJE EN SECO DE LA MORTALIDAD DE LA GRANJA DE AVES DE LA FACULTAD DE MEDICINA VETERINARIA Y ZOOTECNIA DE LA UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

DRY COMPOSTING MADE OUT OF MORTALITY FROM THE POULTRY FARM OF FMVZ, UNAM

T. Jínez Méndez, Á. González Ernesto y K. Valle Valenzuela

Centro de Enseñanza Investigación y Extensión en Producción Avícola, Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia, UNAM. Salvador Díaz Mirón s/n. Avenida Tláhuac, Km 21.5, Colonia Zapotitlán, Delegación Tláhuac, México D.F. Teléfono: 5845-0029 y 5845-1530 fax E-mail: tomas_jinez@hotmail.com

SUMMARY

In order to impact the environment the least possible (air and water), dry composting of mortality from CEIEPAv, FMVZ, UNAM was carried out. To do the composting, the center has eight boxes to make compost. The process lasted 30 d, in which the temperature was monitored daily during the first wk; from the second wk on, temperature was monitored every three d. The maximum temperature registered was 148°F on d three, 134°F on d 14, 94°F, on d 23, and 82°F on d 24. To prepare the compost, a product based on bacteria and enzymes (COMPOST-AID) was used. The product dosage is 2 g/kg of mortality, it is mixed with water and sprayed on the mortality and left for 30 d so that enzymes and bacteria can transform the solid residues, and at the end of the process we have quality compost.

RESUMEN

Con la finalidad de tratar de impactar lo menos posible al ambiente (aire y agua), se realizó el compostaje en seco de la mortalidad del CEIEPAv de la FMVZ de la UNAM. Para la realización del compostaje el centro cuenta con un área de 8 cajones para la elaboración de compostas, las cuales están construidas con piso de cemento y una canaletta para recolectar los posibles lixiviados producidos durante el proceso de compostaje, los muros son de tabique y están aplanados con cemento, el techo es de lámina galvanizada y se cuenta con una fuente de agua. El proceso de compostaje duró 30 días durante los cuales se registró la temperatura diariamente durante la semana 1 y a partir de la semana 2 se tomó cada tres días. La temperatura máxima registrada fue de 148 °F al día 3, de ahí se inicia un descenso de la temperatura al d 14 es de 134°F y al día 18 es de 126°F al día 23 ya es más baja de 94°F y al día 24 ya es de 82°F para la realización de la composta se utilizó un producto a base de bacterias y enzimas (COMPOST-AID®) la dosis del producto es de 2 gramos por kg de mortalidad, este es mezclado con agua y se asperja sobre la mortalidad, se cubre con gallinaza y con material vegetal seco y se deja por 30 días para que las enzimas y bacterias transformen los desechos.

INTRODUCCIÓN

Los residuos sólidos comprenden todos los desechos que provienen de actividades animales y humanas, que normalmente son sólidos y que son desechados como inútiles y superfluos. Los seres humanos y los animales han utilizado los recursos de la tierra para la supervivencia y la evacuación de residuos. En tiempos remotos, la evacuación de desperdicios humanos y animales no planteaba un problema ya que la población era pequeña y la tierra era abundante sin embargo a medida que fue creciendo la población hubo la necesidad de producir más alimento para más población y con ello se han generado más residuos. Algunos países sobre todo los desarrollados ya tiene tiempo que están legislando acerca de estos residuos sin embargo en los países como México y otros parecidos a él se inicia una legislación muy tibia ya que se ha permitido algunas minas a cielo abierto además de concentraciones excesivas de animales ya sea ganado de leche de carne, cerdos y aves con la consecuente generación de desechos. El termino residuo sólido es muy extenso pero en este caso en particular hablamos de la gallinaza y de una alternativas que se puede hacer para tratar de impactar lo menos al ambiente y poder darle un uso

sustentable, la elaboración de composta en seco de la gallinaza y la mortalidad es una buena alternativa de manejar la mortalidad de una granja sin afectar la salud de las aves sanas y obteniendo además un producto con valor agregado.

MATERIAL Y MÉTODOS

La investigación se llevó a cabo en el Centro de Enseñanza Investigación y Extensión en Producción Avícola de la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia de la Universidad Nacional Autónoma de México, el cual cuenta con la siguiente infraestructura.

Área de compostas. El CEIEPAv cuenta con ocho Cajones para la elaboración de composta contruidos con tabique y aplanados con cemento, con las siguientes dimensiones, 6.5 m de largo, 1.3 m. de ancho y 1.2 m. de alto, techo de lámina galvanizada, piso de cemento con un declive del 3%, toma de agua, báscula analítica con divisiones de 0.1g, termómetro Taylor con una graduación que va de -40 a 160°F aspersores manuales, azadones, palas, carretilla, cubetas y COMPOST-AID.

Para la elaboración de la composta se usó el producto a razón de 2g de COMPOST-AID por kg de mortalidad diluido en agua de la red pública, la composta se inicia colocando una capa de material vegetal seco de 15 cm de alto, se coloca una capa de gallinaza de 10 cm de alto y en seguida se coloca la mortalidad eviscerada, y se asperja a la mortalidad con el producto, se coloca otra capa de gallinaza y finalmente se cubre con una capa de 15 cm de alto de material vegetal seco y se dejo por 30 días al término del cual se observo el resultado.

El registro de las temperaturas fue el siguiente: día 1- 125°F, día 2-140°F, día 3-146°F, día 4-142°F, día 7-135°F, día 8-132°F, día 14-132°F, día 18-126°F, día 21-114°F, día 23-94°F, día 24 ya estaba a temperatura ambiente

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Las temperaturas por encima de los 60°C y el tiempo que duran estas temperaturas eliminan cualquier agente patógeno que este tanto en las heces como en los cadáveres, el proceso no requiere de control de humedad ni de ventilación, únicamente se forman las capas de heces, mortalidad y sustrato y se deja que actúen las bacterias y enzimas del producto, en este caso la granja cuenta con la infraestructura necesaria para la elaboración de compostas, pero en caso de no contar con ella se pueden elaborar trincheras o hileras y cubrirlas con plástico en caso de que no se cuente con cobertizo, El proceso de compostaje en seco es una buena alternativa para manejar la gallinaza y la mortalidad dentro de las granjas avícolas, además de obtener un producto con valor agregado y algo quizá lo más importante es que se impacte lo menos posible al ambiente ya que aunque legalmente no estamos obligados a hacerlo éticamente sí.

Fotografía 1. Restos de la composta.



EXPERIENCES WITH COCCIDIOSIS VACCINE USE IN LAYERS IN THE UNITED STATES

EXPERIENCIAS CON LA UTILIZACIÓN DE LA VACUNA CONTRA LA COCCIDIOSIS EN GALLINAS DE POSTURA COMERCIALES EN LOS ESTADOS UNIDOS

K. Jones

Technical Services Veterinarian, CEVA Animal Health
kelli.jones@ceva.com

RESUMEN

La coccidiosis existe en la industria de las gallinas de postura a pesar de las prácticas comunes en donde se utilizan productos anticoccidianos y vacunas para combatirla. Este estudio fue de interés en 2013 cuando la producción de una vacuna contra la coccidiosis comúnmente utilizada se vio comprometida, haciendo que el producto escaseara en la industria avícola de los Estados Unidos. Como una alternativa, otra vacuna entró al mercado durante ese tiempo. Este hecho, permitió que se hicieran comparaciones de campo entre los dos productos por medio del seguimiento de diversos parámetros, los cuales incluyen el conteo de ooquistes de pollitos criados en suelo y en jaulas. Estos datos serán presentados y demostrarán que a pesar de que ambas vacunas indujeron inmunidad después de 21 días de la vacunación, existieron diferencias definitivas entre las dos vacunas a lo largo del estudio. Esto junto con otras observaciones, indica que una exposición inicial a una dosis más baja de ooquistes puede ser mejor que una dosis inicial alta que posteriormente requiera tratamiento químico. Se presentarán resultados de este estudio.

SUMMARY

Coccidiosis exists in the layer industry despite common practices utilizing anticoccidials and vaccines to combat it. This study became of interest in 2013 when production of a commonly utilized coccidiosis vaccine was compromised, thus making the product scarce in the industry. As an alternative, another vaccine entered the U.S. market during this time. This opportunity allowed for field comparisons to be made between the two products by way of monitoring various parameters including oocyst counts from both floor reared and cage reared pullets. This data will be presented and will show that despite the fact that both vaccines induced immunity after 21 d post vaccination, there were definite differences observed along the way between the two vaccines. These, along with other observations indicate that a lower initial dose of oocysts may be better than a higher one that subsequently requires treatment.

INTRODUCTION

Coccidiosis exists in the layer industry despite common practices utilizing anticoccidials and vaccines to combat it. Anticoccidials are commonly utilized in the industry because they have advantages that include increased growth rates and a lack of post vaccinal reactions. Chemicals attempt to provide a complete kill and shutdown of the coccidia life cycle, whereas ionophores are designed to allow for leakage with subsequent immunity to occur. Potential disadvantages to these anticoccidials include the development of chemical resistance (1,5) which can lead to severe coccidiosis breaks, sensitivity to ionophore toxicity and delayed cycling when birds are older.

Live non-attenuated vaccines are administered via a liquid or gel spray application on the first day of life in the hatchery or on the farm. Their mode of action is to initiate immunity by providing the first low level dose of oocysts in a uniform, controlled manner. There are many advantages to coccidiosis vaccination. For example, vaccine oocysts remain sensitive to chemicals and can eventually replace more resistant field oocysts. They can also be used in organic and antibiotic free programs. They have also shown to be cost competitive to chemicals/ionophores. A program comparison provided by a major layer producer showed that their amprolium prevention program costs them \$0.03/bird. To vaccinate they spend \$0.035-\$0.04/bird. Their amprolium treatment program, however, commonly costs \$0.09/bird + cost of lost birds/eggs. Disadvantages to coccidiosis vaccination include the fact that

uniform application uptake is critical, spray application can wet and chill chicks, live virulent strains can cause post vaccinal “stress”, and cycling is heavily dependent on management.

CASE REPORT

During 2013, the leading coccidiosis vaccine supplier for the layer industry had production issues thus making the product extremely scarce in the industry. As a result, another coccidiosis vaccine entered the United States market. During this same time, a large commercial layer company found themselves vaccinating half of their pullet placements with traditional coccidiosis vaccine and the remaining half with the new product. Because of this, there was opportunity to compare both vaccines side by side.

MATERIALS AND METHODS

Company flocks included both cage and floor reared commercial layer pullets of the same breed. Half of the flocks received one commercial vaccine and the remaining half received the other vaccine. The traditional product was applied via 21mL of course water spray at one d of age in the hatchery, whereas the new vaccine was administered via 25mL gel droplet application. Initial uptake of vaccine was assessed by the presence or absence of vaccine dye on the tongue after application. Field observations were recorded.

In addition, to monitor the efficacy of the vaccine application and the successful recycling on the farm, regular oocyst counts on fresh fecal samples were done. Oocysts in freshly sampled feces reflect the current intensity of the coccidial infection present (3). Fecal sample periods post coccidiosis vaccination included: 7 d, 14 d, 21d, and 28 d. Representative samples (60-100g) of *fresh* droppings were collected in a Ziploc[®] bag using plastic spoons. Droppings were to represent a random sampling throughout the house, collected on the routine walk-through. Sample bags were labeled with: farm name/flock number/site/house number/sex/age at collection/date of collection. Samples were refrigerated until they were sent via express/overnight delivery on ice to the laboratory for processing.

Fecal/cecal samples were all processed in the laboratory and oocyst counts were performed per gram of feces using a modification of a McMaster counting chamber technique described by Long and Rowell (4). Briefly, using applicator sticks, one gram of thoroughly mixed fecal sample was obtained. Sample was then placed in a 15ml conical disposable centrifuge tube. Fecasol[®] solution (15mL) was then added, the tube was capped and the sample was mixed well using a vortex. Cheese cloth was then placed in a strainer over a beaker and the mixed sample was poured in the strainer. The cheese cloth was squeezed to get most of the solution out. The solution was then poured from the beaker back into the conical tube and capped. It was again mixed using a vortex and was loaded into a McMaster slide using a pipette. The slide was allowed to settle for five minutes prior to performing the counts. Both sample processing and oocyst counts were all performed blindly by the same technician for consistency.

RESULTS

Hatchery observations. Liquid spray application required with the traditional product had a tendency to wet and chill the chicks by around 5°F compared to the gel droplet application which only decreased temperature by 0.8°F. In addition, liquid application of the traditional product required agitation, as oocysts had a tendency to settle. In comparison, the gel droplet application of the new vaccine did not appear to wet chicks, and oocysts remained suspended in the gel without agitation. Also, uptake of the new gel droplet product (based on dyed tongues) was 99-100%.

Floor reared pullets. Both products achieved a vaccine "take" indicated by positive oocyst counts at 7 d post vaccination. In addition, recycling of oocysts occurred with both products demonstrated by a significant increase from 7 – 14 d post vaccination and again from 14-21 d post vaccination. Oocysts per gram (OPG) of feces peaked at 21 d post vaccination, as expected, for both products. Immunity developed during this time and infection cleared as seen by a decrease in oocyst per gram of feces between 21-28 d post vaccination. Both vaccines appeared to yield the same final result, however, the path which both products took to achieve this immunity varied tremendously. For example, the traditional vaccine had much higher 7 d average counts (36,000-60,000 OPG) compared to the new vaccine average (2,000 OPG). This could have been attributed to a much higher initial dose and a very fresh product serial following the earlier shortage of vaccine supply. In addition to the high counts at 7d, there were also reports and confirmed observations of bloody droppings with accompanying spikes in mortality in flocks that received the traditional vaccine. The individual farm counts were also interesting, as the new product had much more consistent cycling curves compared with the traditional product, in that there was a nice steady increase followed by a steady decrease in oocysts per gram (OPG) of feces.

Cage reared pullets. Again, it appeared that both products achieved the final goal of developing immunity to coccidiosis, but similar to results from the floor reared pullets, the two curves presented very differently along the way. Like in floor reared birds, 7 d counts of birds vaccinated with the traditional vaccine were extremely high (30,000-90,000 OPG) compared to the new product (1,000-2,000 OPG). Some 14 d counts of birds vaccinated with the traditional product were also extremely high (> 250,000 OPG) compared to the new product (26,000 OPG). These traditionally vaccinated high OPG flocks all had to be treated with amprolium prior to 21 d of age due to bloody droppings, high morbidity and mortality from 7-18 d. Additionally, like with the floor reared pullets, individual farm results were more consistent for the new vaccine flocks vs. the traditional vaccine flocks.

DISCUSSION

Both vaccines appeared to successfully lead to the development of immunity by 21 d for both cage and floor reared layers. This was supported by the decline in oocysts per gram of feces from 21-28 d. There were, however, distinct differences in cycling curves of the two products. There were much higher 7-14 d counts accompanied by bloody droppings and mortality with the traditional vaccine compared to the new product. There were also high peaks and even clinical coccidiosis breaks on some farms vaccinated with the traditional product. Treatment with amprolium was necessary in some cases. It is important to keep in mind that anytime there is a clinical break in a flock, there are added costs of medication, pullet mortality, performance loss and cost of potential eggs lost. Because of clinical disease plus the added costs for flocks receiving traditional vaccine, the new vaccine product was the best value for coccidiosis control.

For floor reared birds, re-cycling of oocysts is promoted by proper management of litter moisture. This is achieved by adjusting the bird density during brood. It is suggested to start birds off at a maximum of 0.5 ft²/chick for the first 7d, a maximum of 0.75 ft²/chick from 7-12 d and a maximum of 1 ft²/chick from 12-14 d. Keeping birds at these parameters will help to ensure that there is enough oocyst exposure to provide adequate cycling. Moisture is needed for sporulation. Ideal litter moisture is around 25-35%. Excessive moisture will yield too many oocysts, whereas too little moisture in the barn will yield too few oocysts.

For cage reared birds, it is critical to manage fecal/oocyst availability. For example, folks have had success by leaving cage paper down through 22 d to get past the peak cycling period. 40% cage floor coverage for 5w was highly effective in a recent study (6). Thick dissolvable paper or paper plates have also proven effective in our studies. In addition, any processing of chicks should revolve around oocyst cycling to avoid cycle interruption. For instance, beak trim and move birds around 9-10 d of age rather than at 6-7 d of age. This practice does two important things. First, it avoids interrupting the cycle at 7 d. Second, beaks are not sensitive when needed most for fecal uptake. Another practice that influenced oocyst re-cycling was moving birds. Best OPG counts were observed when birds were moved from upper to lower cages. Initial chick placement in upper cages is beneficial because this allows for feces to fall to lower cages and inoculate them for when chicks are later moved down.

REFERENCES

1. Chapman, H.D., Biochemical, genetic and applied aspects of drug resistance in *Eimeria* parasites of the fowl. Avian Pathol., 26 (1997), pp. 221-244.
2. Gordon, H.M., Whitlock, H.V., 1939. A new technique for counting nematode eggs in sheep faeces. J. Coun. Sci. Ind. Res. Aust. 12, 50-52.
3. Hodgson, J.N., 1970. Coccidiosis: oocyst counting technique for coccidiostat evaluation. Exp. Parasitol. 28, 99-102.
4. Long, P.L., Rowell, J.G.. Counting oocysts of chicken coccidia. Lab. Pract., 7 (1958), pp. 515-518 534
5. Peek, H.W., Landman, W.J.M.. Resistance to anticoccidial drugs of Dutch avian *Eimeria* spp. field isolates originating from 1996, 1999 and 2001. Avian Pathol., 32 (4) (2003), pp. 391-401.
6. Price K. R., Guerin, M.T., Newman, L., Hargis, B.M. and J.R. Barta. Examination of a Novel Practical Poultry Management Method to Enhance the Effect of Live *Eimeria* Vaccination for Conventionally
7. Housed Replacement Layer Pullets. International Journal of Poultry Science 12 (3): 175-184, 2013.

ACKNOWLEDGMENTS

This work was sponsored by CEVA Animal Health and could not have been possible without the efforts of the CEVA layer sales and product support team. In addition, huge appreciation goes out to Ms. Nora Johnson, certified medical technologist, for performing all of the oocyst counts for this study.

VACCINE PROTECTION OF CHICKENS AGAINST THE 2012 MEXICAN H7N3 HIGHLY PATHOGENIC AVIAN INFLUENZA VIRUS

PROTECCIÓN DE LA VACUNA PARA POLLOS CONTRA EL VIRUS MEXICANO DE LA INFLUENZA AVIAR ALTAMENTE PATOGENICA H7N3 DEL 2012

D. Kapczynski^A, M. Pantin-Jackwood^A, S. Guzman^B, Y. Ricardez^B, E. Spackman^A, K. Bertran^A, D. Suarez^A,
and D. Swayne^A

^AExotic and Emerging Avian Disease Research Unit, Southeast Poultry Research Laboratory, Agricultural Research Service, USDA, 934 College Station Road, Athens, GA 30605

^BBiosafety Laboratory Level 3, The Mexico - United States Commission for the Prevention of Foot and Mouth Disease and Other Exotic Animal Diseases (CPA), 2SENASICA-SAGARPA, Palo Alto, Mexico, 05110

RESUMEN

En junio de 2012, se reportó un brote de influenza aviar altamente patogénica (IAAP) H7N3 en aves domésticas en Jalisco, México. Desde entonces el virus se ha extendido a muchos estados de los alrededores y se siguen reportando nuevos brotes. Se realizaron pruebas de vacunas para determinar la eficacia protectora de una vacuna H7 inactivada. En la primera serie de experimentos, un linaje mexicano de AI de baja patogenicidad (IABP) H7N3 aislado de un pato, con un 98% de similitud de secuencia con el virus de la IAAP, se aplicó a dos pollos de una semana de edad. Las aves vacunadas mostraron una protección del 100 % cuando se desafiaron. En un segundo experimento, se vacunaron gallinas de postura de 26 semanas de edad, una o dos veces, y se desafiaron con el virus de la influenza aviar altamente patógeno.

La eliminación del virus se redujo en todas las aves vacunadas, en comparación con las aves control. Se discutirá el impacto del desafío IAAP en la producción de huevos y la transmisibilidad. Estos resultados demuestran que el aislamiento de la vacuna IABP puede proporcionar protección contra el virus de la influenza aviar H7N3.

SUMMARY

In June of 2012, an outbreak of highly pathogenic avian influenza (HPAI) H7N3 was reported poultry in Jalisco, Mexico. Since that time the virus has spread into many surrounding States and new outbreaks continue to be reported. The purpose of this study was to characterize the Mexican 2012 H7N3 HPAI virus (A/chicken/Jalisco/CPA1/2012) and determine protection conferred against the virus by different H7 low pathogenic (LP) inactivated vaccines in chickens. Both adult and young chickens intranasally inoculated with the virus became infected and died between two and four d post inoculation (pi). High virus titers and viral replication in many tissues was demonstrated at two d pi in infected birds. The Jalisco virus had high sequence similarity of greater than 97% to wild bird viruses from North America in all eight gene segments. The hemagglutinin gene of the virus contained a 24 nucleotide insert at the hemagglutinin cleavage site which had a 100% sequence identity to chicken 28S ribosomal RNA, suggesting the insert was non-homologous recombination with the host genome. For vaccine protection studies, both U.S. H7 LPAI viruses and a 2006 Mexican H7 LPAI virus were tested as antigen in experimental oil emulsion vaccines and injected into chickens three weeks prior to challenge. All H7 vaccines tested provided >90 % protection against clinical disease after challenge and decreased the number of birds shedding and the titers of viral shedding. In a second experiment, 26 wk old egg laying hens were vaccinated either singly or doubly and challenged against the HPAI virus. All vaccinated birds survived challenge and reduced shedding of virus compared to sham vaccinated birds. These results demonstrate the LPAI vaccine isolate can provide protection against the HPAI H7N3 virus.

(Manuscript to be published in *Avian Diseases*.)

EVALUATION OF FOUR DIFFERENT VACCINATION PROGRAMS AGAINST HPAI H5N1 2011 EGYPTIAN VIRUS IN COMMERCIAL BROILER CHICKENS REARED UNDER LABORATORY CONDITIONS

ESTUDIO A PRUEBA PARA EVALUAR CUATRO DIFERENTES PROGRAMAS DE VACUNACIÓN CONTRA EL VIRUS EGIPCIO HPAI H5N1 2011 EN POLLO DE ENGORDA COMERCIAL CRIADOS EN CONDICIONES DE LABORATORIO

W. Kilany^A, A. El-H. A. Hanafei^B, A. Fatouh^C, A. Selim^A; A. A. Erfan^A; M. Safwat^A; A. Shawake^A, Soad Abd El-Aziz^A, V. Palya^D, B. Le Tallec^E, P. Cruz^E, Y. Gardin^E, M. Paniago^E, and F. Lozano^E

^ACentral Laboratory for Veterinary Quality Control, Egypt

^BAl- Watania Poultry Company, Egypt

Ceva Animal Health ^CEgypt, ^DHungary and ^EFrance

RESUMEN

Un total de 300 de pollos de engorda comercial de un día de edad con niveles de anticuerpos maternos (AM) contra la influenza aviar sub-tipo H5, fueron distribuidos en 6 grupos de tratamiento de 50 aves cada uno y vacunados como sigue: Grupo 1 vacunados en la incubadora con la vacuna Vector rHVT_AI por vía subcutánea. Grupo 2 con una vacuna re-asociada muerta re-H5N1 de origen egipcio. Grupo 3 una vacuna inactivada H5N2 de cepa Potsdam. Grupo 4 una vacuna re-asociado inactivada re-H5N3 de cepa de origen Vietnamita. Grupo 5 no vacunado y expuesto ; y Grupo 6 vacunado y no expuesto. Todas las vacunas inactivadas fueron administradas parenteralmente a los siete d de edad. Todos los pollos de engorda comercial fueron expuestos al día 29 de edad con una variante clade 2.2.1.1 de HPAIV H5N1 (A/Chicken/Egypt/1164D/2011). Se hicieron observaciones a los 14 días después de la exposición, incluyendo signos clínicos, mortalidad, detección de virus, baja del virus y serología. Los resultados serán presentados.

SUMMARY

A total of 150 one d old commercial broiler chicks carrying maternally derived antibody (MDA) against sub-type H5 of avian influenza and reared in a BSL3 facility were distributed into 6 treatment groups of 25 birds each, as follows: Group 1 (G1): Vector rHVT-AI vaccine given by sub-cutaneous route at day-old at the hatchery (0.2 mL). Group 2 (G2): A re-assortant inactivated vaccine re'H5N1 of Egyptian origin strain (0.5 mL). Group 3 (G3): An inactivated vaccine H5N2 Potsdam strain (0.5 mL). Group 4 (G4): A re-assortant inactivated vaccine re'H5N3 Vietnamese origin strain (0.5 mL). Group 5 (G5): Non-vaccinated and challenged positive control and Group 6 (G6): Non-vaccinated and non-challenged negative control. All inactivated vaccines in Groups 2, 3 and 4 were administered via sub-cutaneous route at seven d of age. All commercial broiler chickens were challenged at 29 d of age with a HPAIV H5N1 variant clade 2.2.1.1 (A/Chicken/Egypt/116AD/2011). An observation period of 14 d post challenge (dpc) was conducted and the parameters measured were: clinical signs, mortality, virus shedding and serology. The percentages of protection rate against mortality were: G1: 80%; G2: 66%; G3: 60%; G4: 40%; G5: 0%; G6: 100%. The percentage of virus shedders by group at three and six dpc were respectively: G1: 26% and 13%; G2: 73% and 42%; G3: 80% and 42%; G4: 60% and 66%; G5: 100% and 100%. The vector rHVT-AI vaccine provided the highest protection against the HPAIV H5N1 2011 variant virus challenge strain when compared with the reassortant and inactivated vaccines evaluated.

MATERIALS AND METHODS

Location. BSL3 facilities at the National Laboratory for Veterinary Quality Control on Poultry Production (NLQP), Cairo, Egypt.

Birds. A total of 150 commercial broilers from an AI-H5 hyper-immunized broiler breeder parent flock were used for this study.

Treatment groups. Birds were distributed into six groups as described in Table 1.

Challenge virus. A/Chicken/Egypt/116A/2011 HPAI H5N1 administered at a dose of 10^6 EID₅₀/bird in 100 uL/bird given via intra-nasal route. A minimum of 80% mortality at five d post-challenge in the positive control group was considered for the validity of the challenge.

Birds challenged. At 29 d of age, 15 broilers with the highest HI titers to a homologous HA antigen from each group were selected for the challenge study. Only 10 birds were used for the two control groups 5 and 6.

Parameters measured. Clinical signs (dyspnea, ruffled feathers, depression); Mortality and lesions post-mortem; Virus excretion by real time RT-PCR from oro-pharyngeal swabs taken at 3, 6, 10 and 14 dpc; and Serology (HI test). A 14 d observation period was conducted after the challenge administration at 29 d of age.

Serology. Homologous and heterologous HA antigens from different H5N1 (2006; 2010; 2011 and 2012) and H5N2 strains were used for the evaluation of the serological response in each vaccinated group.

Results. Cumulative mortality results by treatment group at the end of the challenge observation period are presented in Figure 2. Specific mortality to AI was confirmed by real time RT-PCR in samples of internal organs. Virulent challenge was validated in Group 5 with 100% mortality by d six. Birds in Group 1 had the lowest mortality (3/15) and mortality in Groups 2, 3 and 4 were 5/15, 6/15 and 9/15 respectively. No birds were infected with AIV in the negative controls.

Detection of AIV shedding post-challenge. The amount of virus detected in the oro-pharyngeal swabs taken at 3, 6, 10 and 14 dpc using a real time RT-PCR showed similar virus levels at three and six dpc, however the percentage of shedder birds at these dpc was lower in the broilers of Group 1. No virus shedding was detected by RT-PCR in any of the groups at 10 and 14 dpc.

CONCLUSION

The highest protection against mortality (80%) and shedding was observed in the vaccinated group with the vector rHVT-AI H5 vaccine. Birds in Groups 2 and 3 vaccinated with inactivated vaccines RG H5N1 and H5N2 had a protection against mortality of 66% and 60% respectively. The Group 4 vaccinated with the inactivated vaccine RG H5N3 had 40% protection. Measurement of virus shedding by real time RT-PCR in the oropharyngeal swabs taken at 3, 6, 10 and 14 d of age showed detectable shedding at three and six dpc only in all vaccinated groups, being the birds in Group 1 showing the lowest virus excretion rate.

Table 1. Vaccine group distribution and challenge age.

Group	Birds	Vaccines	Age	Dose / bird	Challenge HPAIV H5N1 10 ⁶ EID ₅₀ /Bird
1	25	rHVT-AI H5	1 day	0.2 ml	29 days
2	25	Inactivated vaccine - IV H5N1 RG	7 days	0.5 ml	29 days
3	25	Inactivated vaccine - IV H5N2	7 days	0.5 ml	29 days
4	25	Inactivated vaccine – IV H5N3 RG	7 days	0.5 ml	29 days
5	25	Non-vaccinated-Challenged	-----	-----	29 days
6	25	Non-vaccinated-Non-challenged	-----	-----	-----

Figure 1. Cumulative mortality dpc by treatment group.

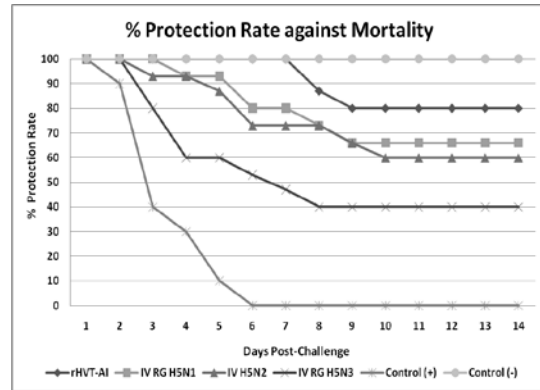
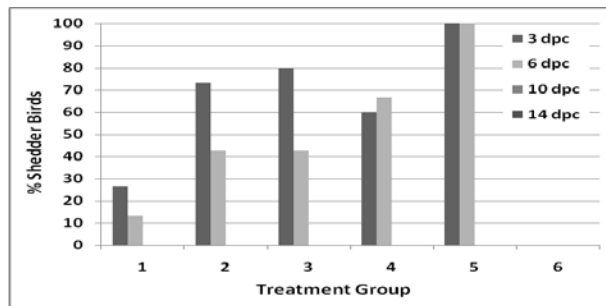


Figure 2. Percentage of shedder birds by treatment group at different dpc.



MOLECULAR IDENTIFICATION OF SELECT *SALMONELLA* SEROTYPES OUT OF MIXED CULTURES FROM MODIFIED SEMISOLID RAPPAPORT-VASSILIADIS MEDIUM

IDENTIFICACIÓN MOLECULAR DE SEROTIPOS SELECCIONADOS DE *SALMONELLA* ENTERICA DE CULTIVOS MIXTOS A PARTIR DE UN MEDIO RAPPAPORT- VASSILIADIS SEMISÓLIDO MODIFICADO

U. Klaube

Cobb-Vantress, Inc., Siloam Springs, AR 72761

undine.klaube@cobb-vantress.com

RESUMEN

La serotificación clásica de *Salmonella* como herramienta epidemiológica requiere cultivos puros de aislamientos y una biblioteca de antisueros específicos para antígenos O-y H-. Para determinar el serotipo completo, se tiene que hacer un gran esfuerzo en la inducción de fases alternas de antígeno -H. Hemos desarrollado un protocolo cuantitativo de la reacción en cadena de polimerasa (qPCR), que permite la identificación de los serotipos seleccionados de *Salmonella* a partir de muestras ambientales de aves, enriquecidas en el medio Rappaport-Vassiliadis semisólido modificado (MSRV, por sus siglas en inglés). Esta prueba basada en SYBR puede identificar las secuencias genéticas únicas de seis grupos comunes O- (B, C1, C2, D, E, y G), así como seis complejos de antígeno flagelar (i, r, Z10, G, M, 2 / 5/6/7, y e, n, x / e, n, Z15) de un cultivo crudo de matriz mixto. La presencia potencial de aislamientos críticos tales como Enteritidis, Typhimurium, Infantis, Heidelberg y Hadar, en una muestra puede entonces confirmarse o descartarse antes de que un cultivo puro esté disponible, lo que permite una aplicación mucho más rápida de las medidas de seguimiento que el enfoque tradicional de serotificación.

SUMMARY

Classical serotyping of *Salmonella* as an epidemiological tool requires pure isolate cultures and a library of O- and H-antigen specific antisera. To determine the full serotype, significant effort has to be expended on inducing alternate H-antigen phases. We have developed a quantitative polymerase chain reaction (qPCR) protocol that allows the identification of select *Salmonella* serotypes from environmental poultry samples enriched in modified semisolid Rappaport-Vassiliadis medium (MSRV). This SYBR-based assay can identify the unique genetic sequences of six common O-groups (B, C1, C2, D, E, and G) as well as six flagellar antigen complexes (i, r, Z₁₀, g,m, 2/5/6/7, and e,n,x/e,n,Z₁₅) from a crude matrix mixed culture. The potential presence of critical isolates such as Enteritidis, Typhimurium, Infantis, Heidelberg, and Hadar in a sample can thus be confirmed or ruled out before a pure culture is available, allowing for a much swifter implementation of follow-up measures than the traditional serotyping approach.

INTRODUCTION

Epidemiologists have long relied on serotyping of *Salmonella* to distinguish strains and track outbreaks of this important food-borne pathogen. Participation in the National Poultry Improvement Plan (NPIP) and export regulations also mandate that certain *Salmonella* serotypes be identified in the poultry farm environment when present (6).

The White-Kauffmann-Le Minor scheme organizes the currently known 2,579 *Salmonella* serovars into distinct groups based on somatic O-antigens and flagellar H-antigens (3). Determining the complete serotype of a *Salmonella* isolate requires an extensive library of all possible O- and H-antigen specific antisera as well as a sufficient amount of a pure culture. Maintaining the antisera library is expensive, and other challenges such as problems with antisera production and isolates exhibiting abnormal morphology have given rise to the increasing popularity of molecular serotyping approaches (4, 5).

We have developed a protocol that uses published primer sequences of six common O-groups (B, C1, C2, D,

E, and G) as well as six flagellar antigen complexes (i, r, z₁₀, g, m, 2/5/6/7, and e, n, x/e, n, z₁₅) in a SYBR Green based quantitative PCR (qPCR) application to allow for identification of select *Salmonella* serotypes without having a pure culture (1, 2). We report here that a crude DNA extraction from a mixed modified semisolid Rappaport-Vassiliadis (MSRV) culture is sufficient to determine whether certain *Salmonella* serotypes such as Enteritidis, Typhimurium, Heidelberg, Infantis, and Hadar are present in a sample. This enables the user to implement interventions at least one day earlier than conventional serotyping procedures. The approach also works from a pure culture that is not typable due to atypical somatic antigen structure (“rough” *Salmonella*), problematic phase inversion, or limitations of an antisera library.

MATERIALS AND METHODS

Field samples. Field samples were collected using foot swabs moistened with 2X skim milk and subsequently processed in tetrathionate broth and MSR/V before streaking on selective agars upon a positive PCR signal. Field isolates were sent to the National Veterinary Services Laboratory to confirm presumptive serotypes.

qPCR. Quantitative PCR was performed using a SYBR Green based reaction mix. Template DNA was prepared as a crude boil from MSR/V in molecular grade water. Samples were run on a 35 cycle three-step PCR program with evaluation of fluorescence intensity after every amplification cycle. Following the program, a melt curve analysis was performed.

Data analysis. Samples were evaluated for a combination of expected cycle threshold (C_t) and melt peak (T_m) accuracy to make positive or negative calls. A *Salmonella* genus specific primer set was used to establish a C_t baseline for each sample. Purified DNA preparations of known isolates were used as positive controls.

RESULTS

Field samples showed characteristic melt peaks corresponding to the relevant positive control(s). Some unspecific amplification did occur; it was however easily distinguishable from true positives due to lack of expected melt peaks and high cycle thresholds. Running a reference well per sample targeting the *Salmonella* genus helped to establish a range that the molecular serotyping targets would amplify within should the sample be positive.

For efficiency reasons, we also tested amplification specificity of combinations of primer sets in the same well. The H-antigens could not be combined due to excessive unspecific amplification. However, we were able to combine the six O-group primer sets into three reactions: Grp. B and D, Grp. C1 and C2, and Grp. E and G. The melt temperatures within those combined reactions were significantly different enough that they could be used to determine the identity of an isolate while decreasing the number of reaction wells necessary to complete the panel.

After determining the serotype of field samples molecularly out of MSR/V wherever possible, we compared these results to classical serotyping completed from a pure colony. All isolates tested molecularly were reliably shown to contain the same antigens both by our laboratory and the National Veterinary Services Laboratory when using the serological approach. For example, samples that typed as Grp. B, H:r, and H:2/5/6/7 molecularly were subsequently identified as *Salmonella* Heidelberg serologically. Samples that were negative on all nine primer sets of the panel were later determined to be isolates such as *Salmonella* Cerro (6,14,18:z₄,z₂₃:[1,5]:z₄₅,z₈₂).

DISCUSSION

In this work we have shown that it is possible to determine the presence or absence of certain critical *Salmonella* serotypes without having to wait for a pure culture. Instead, we were able to make this determination using merely a crude boil DNA extract from MSR/V that also contains significant background flora found in the poultry environment. Furthermore, the nine primer sets used allow for the identification of at least a partial serotype of a majority of the commonly isolated *Salmonella* serovars.

While this approach is not intended to replace cultural isolation and purification of a suspected *Salmonella*, it can serve as an early warning system should important isolates such as *Salmonella* Enteritidis, Typhimurium, Heidelberg, Infantis, or Hadar be present in a sample. The sooner a product can be flagged as potentially affected, the earlier intervention decisions can be made to minimize negative impact. This is true for international export decisions as well as determining whether to depopulate a local flock.

The molecular approach described above reveals itself to be superior when dealing with multiple *Salmonella* serotypes present in the same sample. NPIP regulations dictate the screening of three to five colonies per sample (6). We have handled several cases where molecular panel results showed the presence of at least two distinct types of *Salmonella* in MSR/V, but serological serotyping of five colonies revealed only one serovar present on the selective

agar. Re-culturing from MSRV would eventually produce the second serovar, but only because we knew to search for it.

Lastly, this qPCR method is also helpful when conventional serotyping is inconclusive or incomplete due to library limitations and abnormal isolate morphology. In fact, using our protocol with a pure colony as template rather than a mixed culture MSRV sample reduces background amplification and shows even more clearly that targeting DNA is often quicker, easier, and possibly even cheaper than using the classical serological method.

REFERENCES

1. Essam Soliman, S., C. Kilpatrick, S. Mohamed Ahmed, M. Eman Abouelhassan, R. Nimmanapelli, and P. G. Reddy. Allelotyping PCR for detection and screening of *Salmonella enterica* serovar Enteritidis and Typhimurium. *Int. J. Poultry Sci.* 8:156-160. 2009.
2. Fitzgerald, C., M. Collins, S. van Duyn, M. Mikoleit, T. Brown, and P. Fields. Multiplex, bead-based suspension array for molecular determination of common *Salmonella* serogroups. *J. Clin. Microbiol.* 45:3323-3334. 2007.
3. Grimont, P. A. D., and F.-X. Weill. Antigenic formulae of the *Salmonella* serovars. 9th ed. WHO Collaborating Centre for Reference and Research on *Salmonella*, Paris, France. 2007.
4. McQuiston, J. R., R. Parrenas, M. Ortiz-Rivera, L. Gheesling, F. Brenner, and P. I. Fields. Sequencing and comparative analysis of flagellin genes *fliC*, *fljB*, and *flpA* from *Salmonella*. *J. Clin. Microbiol.* 42:1923-1932. 2004.
5. McQuiston, J. R., R. J. Waters, B. A. Dinsmore, M. L. Mikoleit, and P. I. Fields. Molecular determination of H antigens of *Salmonella* by use of a microsphere-based liquid array. *J. Clin. Microbiol.* 49:565-573. 2011.
6. USDA APHIS. National Poultry Improvement Plan and Auxiliary Provisions. 9 CFR 145, 146, and 147. 2014.

THE IMPACT OF SODIUM AND CHLORIDE LEVELS AND RATIOS ON THE PERFORMANCE OF BROILERS FED DIETS CONTAINING LASALOCID

EL IMPACTO DE LOS NIVELES Y PROPORCIONES DE SODIO Y CLORURO EN EL RENDIMIENTO DE LOS POLLOS DE ENGORDA ALIMENTADOS CON DIETAS QUE CONTIENEN LASALOCID

M. LaVorgna, T. Barbosa, and J. Dickson

Zoetis Global Poultry, Durham, NC, USA. 27703

RESUMEN

Los ionóforos son moléculas solubles en lípidos que transportan iones a través de la membrana de la célula, conduciendo a la interrupción de gradientes de concentración de iones transmembranales de microorganismos. Los ionóforos se han utilizado en gran medida en la avicultura para controlar la coccidiosis. Se ha especulado que los diferentes niveles de electrolitos pueden afectar el rendimiento de los pollos de engorda alimentados con ionóforos. Se sabe que los niveles de sodio y cloro varían en gran medida entre las dietas de pollos de engorda comerciales, dando gran variabilidad a los niveles de electrolitos en las dietas de pollos de engorda, lo que podría exacerbar estos efectos. El presente estudio tiene como objetivo evaluar los parámetros de rendimiento de los pollos de engorda alimentados con dos niveles diferentes de un ionóforo divalente (lasalocid) en combinación con 12 proporciones diferentes de sodio: cloro. El diseño del estudio consistió en ocho bloques de veinticuatro corrales cada uno. Un total de 4,224 machos Cobb 500 se dividieron en 192 corrales. Los resultados se presentarán, incluyendo el aumento de peso promedio, la tasa de conversión de alimento, consumo de agua, la mortalidad, la calificación de lesiones plantares y las puntuaciones de la marcha.

ABSTRACT

The study was designed to evaluate the impact of sodium and chloride levels and relative ratios on the performance of broilers fed diets containing the divalent ionophore lasalocid. A total of 4224 Cobb 500 male broilers were divided among 192 pens across 24 treatments. Data collected included average body weight gain, feed conversion ratio, water consumption and mortality. Weight gain and feed conversion results indicated interactions between sodium and chloride for a number of treatments.

INTRODUCTION

Ionophores are lipid-soluble molecules that transport ions across the cell membrane, leading to disruption of transmembrane ion concentration gradients of microorganism. Ionophores have been largely used in poultry to control coccidiosis. It has been speculated that different levels of electrolytes may affect performance of broilers fed with ionophores. It is known that levels of sodium (Na) and chloride (Cl) vary among commercial broiler diets, giving great variability to dietary electrolyte balance (DEB) levels. The study design evaluated the performance parameters of broilers fed with two different levels of a divalent ionophore (lasalocid) in combination with 12 different sodium:chloride (Na:Cl) ratios.

MATERIAL AND METHODS

Animals. 4224 Cobb 500 males were divided into 192 pens at one d of age. Birds were housed in an environmentally controlled building in 3'x 5' concrete floor pens at the stocking density of 0.75 sq ft/bird. Birds were vaccinated for Marek's disease *in ovo* and for Newcastle and infectious bronchitis by spray application at day of hatch.

Experimental design. Table 1 describes the group distribution for the study. The study has 24 different groups divided into two different levels of a divalent ionophore (lasalocid) in combination with 12 different Na:Cl ratios.

For each Na level, there were three relative percentage levels of Cl (80%, 100% and 120%). Each treatment has eight replicates distributed in a randomized complete block design, with the pen as the experimental unit. Birds were kept for 42 d with feed *ad libitum*. Feed schedule consisted of 3 different diets: Starter (0-18 d), Grower (19-28 d) and Finisher (29-42 d).

Data collection. At the beginning of each feed phase (d 0, 18, and 28), water consumption was measured for a period of four d. Feed consumption and body weight gain was measured at 18, 28, 35 and 42 d. Mortality was observed twice a day and all mortality was necropsied and weighted for feed conversion adjustment.

Statistical analysis. The model for this study was a randomized complete block with pen as the experimental unit and repeated measures. All hypothesis tests were conducted at the 0.05 level of significance using two-sided tests. Primary variables were weight gain per bird, calculated by dividing pen weight by the number of animals and subtracting D0 pen weight divided by the number of animals at D0, and adjusted feed conversion, calculated on study d 18, 28, 35 and 42 using the total feed consumption for the pen divided by the total weight of surviving birds with D0 weight subtracted.

RESULTS

Performance data for birds receiving 90 ppm of Lasalocid (T1-T12) are shown of Figure 1. Remaining significant ($p \leq 0.05$) results are described below. Cumulative body weight gains for birds receiving 90 ppm of Lasalocid (T1-T12) were superior to those receiving 125 ppm (T13-T24) at d 28, 35, and 42. Also, birds receiving diets with 90 ppm of Lasalocid (T1-T12) exhibited significantly lower feed conversions than did those receiving 125 ppm (T13-T24) at d 35 and 42.

A number of interactions were identified as related to sodium and chloride levels. Evaluation of the effect of chloride at the different levels of sodium found that at 18 d of age, for birds receiving high levels of dietary sodium (0.22%), the high chloride (0.26%) treatments produced significantly lower feed conversions than did the medium chloride levels. Also, at d 28, 35, and 42, for those birds receiving high dietary sodium levels (0.22%), the high chloride (0.26%) treatments produced feed conversions that were lower than either the medium (0.22%) or low (0.18%) chloride levels. Moreover, for birds receiving low dietary levels of sodium (0.16%), those treatments that received low chloride (0.12%) levels produced feed conversion ratios at d 28, 35, and 42 that were lower than those receiving high (0.20%) chloride levels. Evaluation of the effect of sodium at different levels of chloride found that for birds receiving high levels of dietary chloride (T3/15, T6/18, T9/21 and T12/24), those receiving high (0.22%), medium (0.19%), or progressive (0.18 to 0.22%) sodium levels produced significantly lower feed conversions at 28, 35, and 42 d than birds receiving low (0.16%) levels of dietary sodium. Additionally, for birds receiving medium levels (100%) of dietary chloride, those that received medium sodium levels (0.19%) exhibited lower feed conversions at 28, 35, and 42 d than did those birds receiving high sodium levels (0.22%).

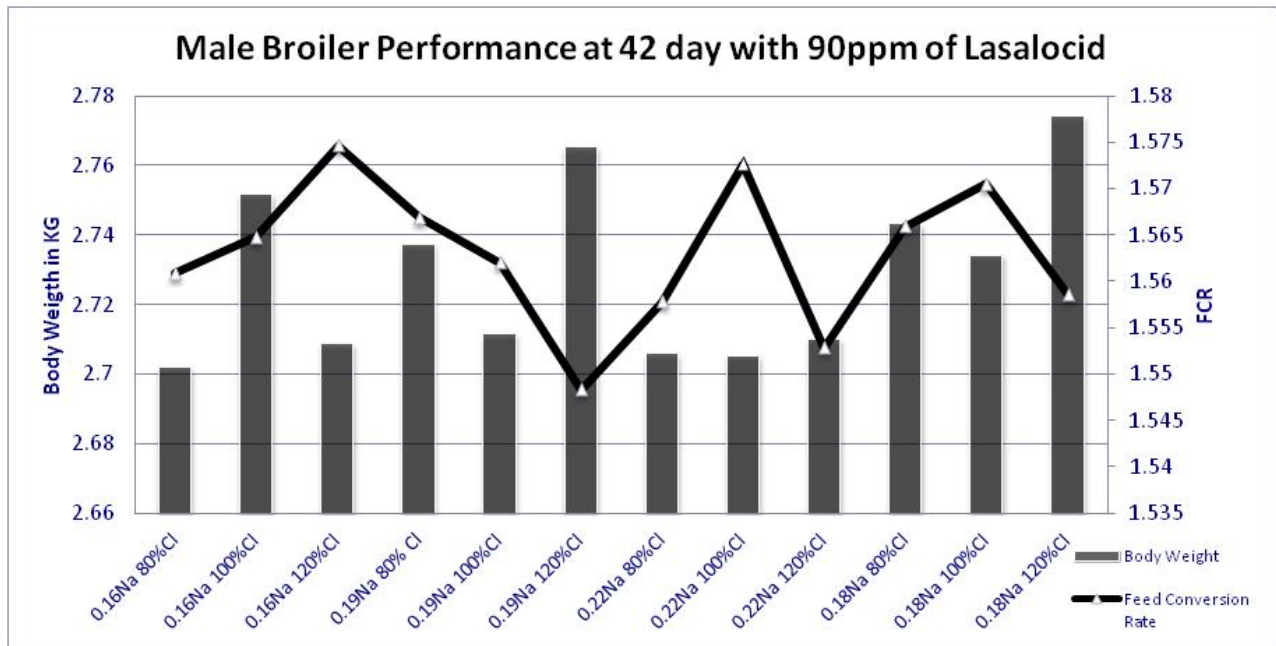
CONCLUSIONS

The trial data indicated that there was interaction between electrolytes (Na & Cl), thus the ratios of these key nutrients can be as important as the actual levels. Body weight gain and feed consumption may be affected by different levels of ionophores inclusion in the diets. The conditions present in this study, where coccidial challenge was not taken into consideration suggested that broilers receiving a high (125 ppm) level of Lasalocid during the latter stages of the growing cycle had lighter body weights and higher feed conversions than those receiving a moderate (90 ppm) level. This appears to be due, at least in part, to a reduction in feed intake. We also found that, for broilers receiving medium (0.19%) or progressive (0.18% / 0.20% / 0.22%) dietary sodium levels, there was a trend for increased weight gains and reduced feed conversions when dietary chloride levels were 120% of respective sodium levels. Finally, in that ionophores at higher doses tend to restrict feed intake especially in the latter phases of the growth cycle, it is advisable to base the dose level on coccidial challenge; utilizing lower levels in the finisher phase when prudent.

Table1. Study design and group distribution.

Treatment	Lasalocid (ppm)	Starter (0-18 days)		Grower (19-28 days)		Finisher (29-42 days)		Number of replicates
		% Na	% Cl	% Na	% Cl	% Na	% Cl	
1 / 13	90/125	0.16	0.12	0.16	0.12	0.16	0.12	8
2 / 14			0.16		0.16		0.16	
3 / 15			0.20		0.20		0.20	
4 / 16		0.19	0.15	0.19	0.15	0.19	0.15	8
5 / 17			0.19		0.19		0.19	
6 / 18			0.23		0.23		0.23	
7 / 19		0.22	0.18	0.22	0.18	0.22	0.18	8
8 / 20			0.22		0.22		0.22	
9 / 21			0.26		0.26		0.26	
10 / 22		0.18	0.14	0.20	0.16	0.22	0.18	8
11 / 23			0.18		0.20		0.22	
12 / 24			0.22		0.24		0.26	

Figure 1. Male broiler performance at 42 d feed with 90ppm of Lasalocid at different levels of Na and Cl. Na levels represent percentage (%) levels in the total diet. Cl levels represent the respective percentage (%) of Cl in relation to Na levels.



ANÁLISIS RETROSPECTIVO DE CASOS DE ENFERMEDAD DE MAREK EN AVES DE COMBATE REMITIDOS AL DEPARTAMENTO DE MEDICINA Y ZOOTECNIA DE AVES DE 2000 A 2013

RETROSPECTIVE ANALYSIS OF MAREK'S DISEASE CASES IN FIGHTING COCKS SUBMITTED TO THE POULTRY MEDICINE AND POULTRY SCIENCE DEPARTMENT (DMZA) FROM 2000 TO 2013

N. Ledesma, A. Luisa García, F. Sánchez Godoy y M. Teresa Casaubon H.

Departamento de Medicina y Zootecnia de Aves, FMVZ- UNAM, Distrito Federal, México

SUMMARY

Marek's disease is one of the main immunosuppressive diseases of domestic poultry produced by a herpesvirus. Although there are vaccines that are used successfully in poultry production, in fighting cocks the vaccination is limited to vaccines with serotype 3. The goal of the present work is to analyze the information of Marek's disease cases submitted to the DMZA of the FMVZ- UNAM from 2000 to 2013. There were submitted 226 cases of fighting cocks from 16 states of Mexico in which 56 (23.89%) had Marek's disease (MD) alone or in association with other pathogens. Visceral development was encountered in 50% of the cases; nervous development in 34.6%; and a combination of the two in 25.4%. Twenty-six percent had reported vaccination. The findings and possible causes are under discussion.

RESUMEN

La enfermedad de Marek es una de las principales enfermedades inmunodepresoras de las aves domésticas producida por un herpesvirus. Aunque existen vacunas que se han aplicado con éxito en aves de producción, en aves de combate la vacunación se ve limitada a vacunas liofilizadas con serotipo 3. El objetivo del presente trabajo es analizar la información de casos de enfermedad de Marek remitidos al DMZA de la FMVZ UNAM en el período comprendido de 2000 a 2013. Se presentaron 226 casos de aves de combate de 16 estados de la república mexicana en los cuales 56 (23.89%) tuvieron como diagnóstico EM sola o en asociación con otras patologías. En el 50 % de los casos se encontró la presentación visceral seguido de la presentación nerviosa con 34.6% y la combinación de dos o más presentaciones con 25.4%. En 26% se tienen reportada vacunación. Se discuten los hallazgos y posibles causas.

Las aves de combate son de gran importancia en México debido al impacto económico (generación de empleos), social y sanitario sin embargo; es una población poco estudiada. En la República Mexicana existen 2,430 municipios sin contar el Distrito Federal con un promedio de 10 días de feria por municipio. Por lo que hay 24,300 días de fiesta en el país cuyo evento más tradicional suele ser la pelea de gallos; en México se realizan 14,000,000 de casteos anualmente de aves de combate, y se requieren más de 28,000,000 de gallos de los cuales más del 90% son criados en México. Esto representa la incubación natural o artificial de alrededor de 133,000,000 huevos, eclosionando aproximadamente el 60%, es decir 80,000,000 pollos de los cuales se estima que el 50% son machos y el 50% son hembras, de los 40,000,000 de machos, hay una mortalidad de aproximadamente el 30% por lo que solo llegan a la edad adulta 28,000,000 de aves (1).

La mayoría de los criadores (aproximadamente el 60%) no llevan un control sanitario adecuado debido a que no están informados sobre medidas de bioseguridad, medicina preventiva, requisitos zoonosanitarios para la movilización de sus aves, y desconocen el riesgo potencial que conlleva transmitir y difundir enfermedades, que comúnmente afectan a las aves comerciales y que son un riesgo para la avicultura nacional (2).

Dentro de las principales enfermedades que afectan a las aves se puede mencionar: Enfermedades virales como la enfermedad de Newcastle (ENC), influenza aviar (IA), enfermedad de Marek (EM), bronquitis infecciosa (BI), laringotraqueitis infecciosa (LTI), infección de la bolsa de Fabricio (IBF). Bacterianas como salmonelosis y micoplasmosis. Parasitarias como la coccidiasis (3).

Se conoce entre los criadores de aves de combate que la EM es común, sin embargo no se conoce la frecuencia de enfermedad ni factores asociados, por lo que el objetivo de este trabajo fue llevar a cabo un análisis retrospectivo de casos de enfermedad de Marek en aves de combate remitidos al Departamento de Medicina y Zootecnia de Aves de 2000 a 2013.

MATERIAL Y MÉTODOS

Se realizó el estudio retrospectivo de los casos de aves de combate del año 2000 al 2013 presentados en el Departamento de Medicina y Zootecnia de Aves de la Universidad Nacional Autónoma de México. Sección del Laboratorio de Diagnóstico e Investigación de las Aves, ubicado en Avenida Universidad 3000 CP. 04510 Delegación Coyoacán. Distrito Federal. De estos fueron seleccionados los casos cuyo diagnóstico integral fue enfermedad de Marek o bien la EM estuvo en asociación con otra enfermedad. Se recabaron los datos de historia clínica incluyendo el tipo de ave, edad, procedencia, signos clínicos, mortalidad, morbilidad y necropsias de campo si las hubo.

RESULTADOS

Se presentaron 226 casos de aves de combate de 16 estados de la república mexicana en los cuales 56 (23.89%) tuvieron como diagnóstico EM sola o en asociación con otras patologías.

El Estado de México y Distrito Federal fueron las entidades con mayor número de casos con 29.6% y 28.3% respectivamente. Así mismo los estados con menor participación fueron Guanajuato y Sinaloa con un caso cada uno que representa el 0.44%.

En todos los años estudiados, las necropsias en pollos (se considera pollo el ave de combate menor de 1 año) fueron las más frecuentes (50.2%) seguido de necropsias en machos (44.8%). y sólo el 5.71% fueron hembras. La EM fue diagnosticada en 54 casos (23.89%); de esta, la presentación visceral se encontró en un 50%; seguida de la presentación nerviosa con un 34.6% el porcentaje restante se debió a más de una presentación en el mismo caso. Se llegó al diagnóstico de la enfermedad en 51 casos por histopatología y en tres de ellos sólo con los hallazgos a la necropsia.

En 14 casos la EM fue el único diagnóstico, sin embargo la asociación de EM con otras patologías fue frecuente encontrándose lo siguiente:

- 19 casos de EM + coccidiosis siendo esta la asociación más frecuente.
- 3 casos de EM + Enfermedad bacteriana
- 2 casos de EM + *Heterakis* spp. + *Ascaridia galli* + *Raillietina* spp. + *Capillaria* spp.
- 5 casos de EM + coccidiosis + *Heterakis* spp. + *Ascaridia galli* + *Raillietina* spp. *Capillaria* spp. + *Choanotaenia infundibulum*.
- 4 casos de EM + coccidiosis + Enfermedad bacteriana.
- 1 caso de EM + coccidiosis + LTI
- 5 casos de coccidiosis + EM + *Heterakis* spp. + *Ascaridia galli*.
- 1 caso de coccidiosis + EM + Leucosis aviar

La presentación visceral fue la más frecuente seguida de la presentación nerviosa, el Cuadro 1 presenta el número de casos y porcentaje de cada presentación.

DISCUSIÓN

En los casos estudiados la EM fue frecuente, esto pudiera deberse a las condiciones de crianza de los pollos; los criadores de aves de combate, en su gran mayoría no vacunan, por desconocimiento, por la disponibilidad de la vacuna ya que la presentación de la vacuna está hecha para 1000 y 2000 dosis que deben ser almacenadas en nitrógeno líquido lo cual no es costeable para el gallero que aproximadamente incuba 500 crías por año. Otro punto importante a resaltar es que de estos 54 casos diagnosticados con EM en 15 de las historias clínicas se comenta que si aplican la vacuna en incubadora por lo que hay que tomar en cuenta todo el proceso desde la preparación hasta la aplicación y que dicho proceso sea llevado de manera adecuada, por otra parte las casas incubadoras que ofrecen el servicio de vacunación contra la EM, utilizan una presentación liofilizada cuyo porcentaje de protección es menor ante cepas muy virulentas de la EM. Está documentado que la vacuna liofilizada únicamente tiene un 60% de protección ante cepas muy virulentas por último algunos criadores son renuentes a vacunar por temor a que los gallos pierdan sus facultades o se reduzca su temperamento.

Los criadores de aves de combate lo traducen en retraso de crecimiento de los pollos; expresando que los pollos se “secan y se embuchan” esto se debe a la inmunodepresión y la parálisis del nervio vago, con ello aumenta la predisposición a enfermedades secundarias bacterianas, coccidiosis, ERCC, parasitosis entre otras.

Los brotes de la enfermedad de Marek en aves comerciales de postura se presentan de la semana 3 a la 9 y al inicio de la postura, esto difiere con las aves de combate de este estudio en donde se registraron 29 casos de Marek en pollos y 20 casos en aves adultas, esto pudiera explicarse debido a una infección temprana, el periodo de incubación y el alto grado de estrés social, ya que a los 6 u 8 meses es cuando se va estableciendo la madurez sexual de los pollos y estos se encierran en jaulas separadas siendo sometidos al estrés por el encierro

De acuerdo a la presentación de la EM la más común fue la visceral (59%), seguida de la presentación nerviosa (35%). Para ello la cepa genética y la cepa viral pueden influir en la ubicación de las lesiones. Los tumores viscerales son en particular frecuentes en las formas agudas de la enfermedad y pueden encontrarse en ausencia de lesiones nerviosas macroscópicas (4).

Las lesiones nerviosas es la más característica desde el punto de vista clínico, pero se observa solo en un 20 a 40 % de las aves enfermas (5) lo cual coincide con los resultados de este estudio.

Siendo EM una enfermedad inmunodepresora se podría inferir que está directamente relacionada con las demás enfermedades presentadas, en especial con la coccidiosis ya que los pollos al ser criados en semilibertad en piso de tierra y sin adición de coccidiostato aumenta la probabilidad de las aves de ingerir una gran cantidad de oosictos capaces de producir una infección.

CONCLUSIÓN

La EM es frecuente en las aves de combate, siendo el principal factor de riesgo las condiciones de crianza con ausencia de vacunación o vacunación deficiente. Existen pocos estudios específicos en aves de combate por lo que la información recabada contribuye al conocimiento de esta especie. Por otra parte es necesario orientar a los criadores de aves de combate en la medicina preventiva y medidas de bioseguridad.

REFERENCIAS

1. Guerrero ZR. Situación económica de las aves de combate en México Memorias del II congreso internacional y III Congreso Nacional de Medicina Veterinaria y Zootecnia en gallos de pelea. Saltillo Coahuila, México 2006; 16-18.
2. Peña RA. Situación epidemiológica en las galleras de México. Memorias del II congreso internacional y III Congreso Nacional de Medicina Veterinaria y Zootecnia en gallos de pelea. Saltillo Coahuila, México 2006; 11-12.
3. Moreno DR. Principales enfermedades en las aves de combate. 1^{ra} ed. México: Quorum ediciones, 2009.
4. Calnek. BW. Enfermedades de las aves Manual Moderno 2^a Edición México D.F. 2000; 297-309.
5. Sistema de Producción Animal I AVES VOLUMEN 2. División Sistema Universidad Abierta y Educación a Distancia 2^a ed. 2005. UNAM FMVZ.

Cuadro 1. Presentaciones de la enfermedad de Marek diagnosticadas en aves de combate remitidas al Departamento de Medicina y Zootecnia de Aves de la FMVZ UNAM del año 2000 al 2011.

Enfermedad de Marek Presentación:	(n=54)	
	casos	(%)
Visceral	27	50
Nerviosa	18	34.6
Nerviosa y Visceral	3	5.77
Ocular y Visceral	2	3.85
Nerviosa, Muscular y Visceral	2	3.85
Cutánea y Visceral	1	1.92
Visceral y Muscular	1	1.92

LACTOBACILLUS CASEI* CONSUMPTION PREVENTS ENTEROCOLITIS INDUCED BY *SALMONELLA ENTERICA

EL CONSUMO DE *LACTOBACILLUS CASEI* PREVIENE LA ENTEROCOLITIS CAUSADA POR *SALMONELLA ENTÉRICA*

M. Noto Llana, S. Hernán Sarnacki, M. del Rosario Aya Castañeda, G. Garavello, M. Nancy Giacomodonato,
and M. Cristina Cerquetti

Instituto de Microbiología y Parasitología Médica (IMPam-CONICET) and Departamento de Microbiología,
Parasitología e Inmunología, Facultad de Medicina, Universidad de Buenos Aires, Buenos Aires, Argentina

Corresponding autor: Dr Mariángeles Noto Llana, mnotollana@yahoo.com

Paraguay 2155 Piso 12, Buenos Aires, Argentina. Zip code 1121

RESUMEN

Salmonella enterica es un patógeno invasivo que causa enterocolitis en el hombre, ganado y en aves de corral. Aquí, utilizamos un modelo murino de salmonellosis para analizar el efecto del consumo *L. casei* en el desarrollo de la infección. Encontramos que el probiótico ingerido una semana previa a la infección reduce significativamente la invasión y persistencia del patógeno a nivel del bazo y de placas de Peyer. *L. casei* previno el aumento de la permeabilidad intestinal y los cambios histológicos que se generan en la enterocolitis. Más aún, la expresión en ciego y ganglio mesentérico de TNF- α , IL-17, IL-23, IL-1 β e IL-6 que genera la infección por *Salmonella* se inhibió drásticamente en los animales que consumieron el probiótico. Estos resultados sugieren que *L. casei* mejoraría la barrera intestinal mediante la modulación de la expresión de citoquinas involucradas en la diferenciación de células inmunes tales como linfocitos Th17 y células $\gamma\delta$.

SUMMARY

Salmonella enterica is an invasive pathogen that causes enterocolitis in humans, cattle, and poultry. Here, we used a murine model of salmonellosis to analyze the effect of *Lactobacillus casei* consumption during the development of infection. We found that the uptake of probiotic for one wk prior to infection significantly reduces invasiveness and persistence of the pathogen in spleen and Peyer's patches. *L. casei* prevented the increase of intestinal permeability and the histological changes that occur during enterocolitis. Moreover, cecum and mesenteric lymph node augmented expression of TNF- α , IL-17, IL-23, IL-1 β and IL-6 that occurs during *Salmonella* infection was drastically inhibited in animals fed with the probiotic. These results suggest that *L. casei* would enhance intestinal barrier health through modulation of cytokine expression involved in immune cell differentiation such as lymphocytes T helpers 17 (Th17) lymphocytes and $\gamma\delta$ cells.

INTRODUCTION

Salmonella enterica elicit an acute inflammatory response in the intestinal mucosa that can be modeled using streptomycin-pretreated mice (1). This inflammatory reaction is initiated by direct contact of *Salmonella* with host cells, such as epithelial cells, macrophages or dendritic cells, followed by an amplification of inflammatory responses in tissue (12). As a result, changes in gene expression are observed in the intestinal mucosa during *Salmonella* infection, including markedly increased mRNA levels of interleukin (IL)-17 and IL-23 genes (5). Probiotics are defined as live microorganisms which when administered in adequate amounts, confer a health benefit to the host (10). Orally administered probiotics exhibit widespread effects on gut homeostasis and immunomodulation of both mucosal and systemic immunity. In the present work, using an animal model of intestinal infection we were able to determine the protective role of *Lactobacillus casei* DN-114 001 fermented milk on the development of *Salmonella* enterocolitis.

MATERIALS AND METHODS

Bacteria. Wild-type strain of *Salmonella enterica* serovar Enteritidis #5694 (*Salmonella*. Enteritidis) was used to infect mice. Bacteria were cultured in trypticase soy broth at 37°C, 200 cycles per minute, then pelleted by centrifugation and suspended to the appropriate density in saline solution. In all cases the number of bacteria was determined by plating appropriate dilutions on trypticase soy agar plates.

***Salmonella* infection and generation of enterocolitis.** Six to eight wk old female BALB/c mice were pretreated with 20 mg of streptomycin (Sigma Aldrich) given intragastrically (6) and 24 h later they received 3-4 x 10³ CFU of *S. Enteritidis* by the same route. For intragastric infection, 0.2 mL of the bacterial suspension was introduced into the stomach with a 21g blunt needle on a 1.0 mL plastic syringe.

Probiotic administration. Commercially-available fermented milk containing *Lactobacillus casei* DN-114001 (Danone S.A.) was used in this study. It was given to mice ad libitum, as described elsewhere (3) during seven consecutive days prior to *S. Enteritidis* infection. Mice ingested an average dose of 1 x 10⁸ CFU of *L. casei* per day.

Experimental groups. 1: enterocolitis (*EC*): received Streptomycin and *Salmonella*; 2: *L. casei* + *EC*: received *Lactobacillus casei*, Streptomycin and *Salmonella*; 3: *Control*: untreated animals; and *L. casei* + *Strep*: mice received the probiotic and Streptomycin only.

Bacterial colonization and persistence. At the indicated times post infection mice were sacrificed and bacterial loads were analyzed. All Peyer's patches located along the large intestine (6 – 8) and one third of the spleen were removed aseptically from each animal and homogenized in sterile saline solution. *Salmonella*-like colonies appearing on SS plates were grown on triple-sugar-iron agar slants and tested for somatic antigen O9.

Histological analysis. Tissue evaluation was performed as previously designed in our laboratory (8).

Quantitative real-time reverse transcriptase-polymerase chain reaction. Total RNA was extracted from tissues using Trizol reagent (Life Technologies, Inc, Carlsbad, CA) at different time points according to the experiment. Total RNA (1 µg per sample) was reverse transcribed according to the manufacturer's protocol. Primer sequences and cycling conditions are described elsewhere (9).

Intestinal permeability *in vivo*. The intestinal permeability was measured by determining the amount of FITC- dextran in blood after it was orally administered as described previously (13).

Statistical analysis. Statistically significant differences between experimental groups were determined by one-way analysis of variance (ANOVA) followed by Tukey test for multiple comparisons. P-values less than 0.05 were considered statistically significant.

RESULTS

We analyzed the effect of *L. casei* consumption on the intestinal inflammatory response to *S. Enteritidis*. Mice treated with streptomycin only (*Strep* group), fed with *L. casei* and streptomycin (*L. casei* + *Strep*) and animals without any treatment (*Control* group) were included as controls. Forty-eight h after infection animals of the *EC* group presented signs of disease including diarrhea, rough hair coat, and lethargy. We found that *S. Enteritidis* induces diffuse enterocolitis, characterized by an epithelium diminished in height, mononuclear infiltration of the mucosa and submucosa, and loss of normal villus architecture. Administration of *L. casei* for one wk prior to infection prevented histological changes (*L. casei* + *EC* group) as well as the clinical symptoms.

The protective effect of *L. casei* observed on intestinal epithelium and clinical features could be related to the significant decrease in the bacterial invasion observed in the *L. casei* + *EC* group. Our results clearly indicate that consumption of *L. casei* drastically diminishes *S. Enteritidis* invasiveness and shortens splenic persistence of the pathogen. Preserved intestinal epithelium and diminished bacterial invasiveness induced by *L. casei* correlated with 100% survival rate of animals from *L. casei* + *EC* group. Approximately 20% of mice with *Salmonella* enterocolitis die by d seven post infection (8); but no deaths occurred among mice fed with *L. casei* prior to infection.

It has been shown that intestinal permeability increases during enterocolitis (7). To investigate the effect of *L. casei* on gut permeability during *Salmonella* enterocolitis, we administered a single dose of FITC-dextran by gavage to the animals at d two post infection and measured the intensity of fluorescence in serum five h later. We found that, the augment in gut permeability to macromolecules induced by *Salmonella* enterocolitis (*EC* group) was decreased by the consumption of *L. casei* to the same extent as found in healthy mice (*L. casei* + *EC*, *L. casei* + *Strep* and *Control* groups).

Soon after intestinal infection *S. enterica* induces a significant increase in the expression of IL-17 and related cytokines such as TNF- α , IL-1 β , IL-6 and IL-23 (5, 8). We were able to determine that animals fed with the probiotic (*L. casei* + *EC*) did not respond to the pathogen burden, since the expression of IL-17 and related

cytokines was similar to that seen in uninfected mice. This anti inflammatory effect of *L. casei* was even more dramatic in mesenteric lymph nodes.

CONCLUSION

Here we demonstrate that consumption of *L. casei* prior to infection abolishes intestinal inflammation triggered by *Salmonella* enterocolitis; survival rate, invasiveness and persistence of *Salmonella* were improved. Also intestinal histological changes and the raise of intestinal permeability were avoided.

In the present work we show that consumption of *L. casei* prevents IL-17 intestinal response to *Salmonella*, among other cytokines. In a previous work (8), we determined that neutralizing systemic IL-17 inhibited generation of enterocolitis. Upon *Salmonella* infection, the IL-23/IL-17 axis is triggered in the intestinal mucosa. Macrophages and dendritic cells infected with *Salmonella* are a potential source of IL-23, a cytokine that helps to amplify the inflammatory response in intestinal tissue. Thus, IL-23 produced by phagocytes stimulates, in turn, T cells to secrete IL-17 (5). Different T cells -like Th17, $\gamma\delta$ and natural killer T cells (NKT)- present in the intestinal mucosa and lamina propria express the receptor for IL-23 and constitute an important source of IL-17 during *Salmonella* infection (5, 11). Th17, $\gamma\delta$ and NKT cells have been also implicated as a source of IL-17 production in different animal models of inflammation (4). On the other hand, differentiation of Th17 and $\gamma\delta$ T cells requires a specific cytokine environment that includes IL-1 β , IL-6 IL-23 and TGF- β (2). Here, we show that the expression of these cytokines are induced during *Salmonella* enterocolitis and are abrogated by consumption of *L. casei*. Our results suggest that *L. casei* consumption alters the intestinal milieu necessary for differentiation of the immune cells.

REFERENCES

1. Barthel M et al. (2003) Pretreatment of mice with streptomycin provides a *Salmonella enterica* serovar Typhimurium colitis model that allows analysis of both pathogen and host. *Infect. Immun.* 71: 2839–2858.
2. Bi Y, Yang R. (2012) Direct and indirect regulatory mechanisms in TH17 cell differentiation and functions. *Scand J Immunol.* 6: 543-52.
3. De Moreno de Leblanc et al. (2010) Importance of IL-10 Modulation by Probiotic Microorganisms in Gastrointestinal Inflammatory Diseases. *International Scholarly Research Network.* doi:10.5402/2011/892971.
4. Díaz-Peña R et al. (2010) Association of the KIR3DS1_013 and KIR3DL1_004 alleles with susceptibility to ankylosing spondylitis. *Arthritis Rheum* 62: 1000–1006.
5. Godínez I et al. (2009) Interleukin-23 Orchestrates Mucosal Responses to *Salmonella enterica* serotype Typhimurium in the Intestine. *Infect. Immun* 1: 387–398.
6. Hapfelmeier S, Hardt W. (2005) A Mouse Model for *S. typhimurium*-Induced Enterocolitis. *Trends Microbiology* 13: 497–503.
7. Kitajima S, Takuma S, Morimoto M. (1999) Changes in colonic mucosal permeability in mouse colitis induced with dextran sulfate sodium. *Exp Anim* 48:137–143.
8. Noto Llana M et al. (2012) *Salmonella enterica* induces joint inflammation and the expression of IL-17 in draining lymph nodes early after the onset of enterocolitis in mice. *Infect Immun* 6:2231.
9. Noto Llana M et al. (2013). Consumption of *Lactobacillus casei* Fermented Milk Prevents *Salmonella* Reactive Arthritis by Modulating IL-23/IL-17 Expression. *PLoS One.* doi: 10.1371/journal.pone.0082588.
10. Sartor RB (2006) Mechanisms of disease: pathogenesis of Crohn's disease and ulcerative colitis. *Nat Clin Pract Gastroenterol Hepatol* 3: 390–407.
11. Schulz SM et al (2008) IL-17A is produced by Th17, $\gamma\delta$ T cells and other CD4- lymphocytes during infection with *Salmonella enterica* serovar Enteritidis and has a mild effect in bacterial clearance. *Int Immunol.* 9: 1129-38.
12. Srikanth CV and Cherayil BJ. (2007) Intestinal innate immunity and the pathogenesis of *Salmonella* enteritis. *Immunol. Res.* 37:61–78.
13. Wang Q, Fang CH, Hasselgren PO (2001) Intestinal permeability is reduced and IL-10 levels are increased in septic IL-6 knockout mice. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 281: R1013–1023.

SUSCEPTIBILIDAD ANTIMICROBIANA Y GENES DE RESISTENCIA EN AISLAMIENTOS DE *AVIBACTERIUM PARAGALLINARUM* DE PERÚ

ANTIMICROBIAL SUSCEPTIBILITY AND RESISTANCE GENES IN ISOLATES OF *AVIBACTERIUM PARAGALLINARUM* IN PERÚ

G. Luna-Galaz^A, F. Falconi-Agapito^B, V. Morales-Erasto^A, L. Saravia^B, Montalvan-Avalos^B, E. Soriano-Vargas^A y M. Fernández-Díaz^B

^ACentro de Investigación y Estudios Avanzados en Salud Animal, Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia, Universidad Autónoma del Estado de México, Toluca, 50200, México

^BFarmacológicos Veterinarios S.A.C., Carretera Panamericana Sur # 766, Km 198.5, Chincha Alta, Chincha, Ica – Perú

SUMMARY

In the present study the antimicrobial susceptibility of 30 isolates of Peru *Avibacterium paragallinarum* was evaluated against 15 different antimicrobials by the disk diffusion test. The isolates were susceptible to >83% versus amoxicillin-clavulanic acid and florfenicol. Greater than 73% resistance to trimethoprim-sulfamethoxazole, streptomycin and oxacillin was observed. One hundred percent of the isolates were resistant to lincomycin. The neo-Kan, SxT, Lcm, Oxa, and Avilo Str genes were identified by the PCR and sequencing test, which confer resistance to neomycin, sulfamethoxazole-trimethoprim, lincomycin, oxacillin, streptomycin and tetracycline, respectively. In conclusion the isolates showed variability in drug susceptibility and resistance genes, therefore suggesting that the resistance is conferred by other mechanisms.

RESUMEN

En el presente estudio se evaluó la susceptibilidad antimicrobiana de 30 aislamientos de *Avibacterium paragallinarum* de Perú. Se incluyeron un total de 15 antimicrobianos en la prueba de difusión en disco. Más del 75% de los aislamientos fueron susceptibles a amoxicilina-ácido clavulánico y florfenicol. Se observó más del 73% de resistencia a sulfamethoxazole-trimethoprim, estreptomycin y oxacilina. El 100% de los aislamientos fueron resistentes a lincomicina. Mediante la prueba de reacción en cadena de la polimerasa y secuenciación, en todos los aislamientos incluidos en el estudio se identificaron los genes *apHA* (confiere resistencia a neomicina) y los genes Tet R (B), Tet B y *AviLOC* (confieren resistencia a tetraciclina). En conclusión, los aislamientos mostraron susceptibilidad antimicrobiana variable y genes de resistencia, lo cual sugiere que la resistencia es mediada por otros mecanismos.

La coriza infecciosa es enfermedad del tracto respiratorio superior de pollos y gallinas, la cual es ocasionada por la bacteria *Avibacterium paragallinarum*. Esta enfermedad se caracteriza por producir descarga nasal y estornudo, inflamación facial y conjuntivitis. El impacto económico de esta enfermedad se debe a que produce baja considerable en producción de huevo (hasta 40%) (4).

Av. paragallinarum se clasifica serologicamente mediante la prueba de inhibición de la hemoaglutinación en tres serogrupos (A, B y C) y nueve serovariedades (A-1, A-2, A-3, A-4, B-1, C-1, C-2, C-3, C-4) (3).

El tratamiento de aves con coriza infecciosa se basa en diversos antimicrobianos (2). Sin embargo, son pocos los reportes que han estudiado la sensibilidad antimicrobiana. El estudio de esta característica fenotípica es de gran valor, ya que de manera indirecta indican el posible uso terapéutico de algunos antimicrobianos en la industria avícola. Además son la base de estudios de eficacia clínica y componentes moleculares que median esta resistencia.

MATERIALES Y MÉTODOS

Bacterias. Se incluyeron 30 aislamientos de Perú. Todos los aislamientos fueron obtenidos de brotes de coriza infecciosa en gallinas de postura.

Medio. Para el crecimiento de las bacterias se utilizó medio brain-heart infusion BHI suplementado con suero de caballo inactivado al 1% (w/v) y nicotinamide adenine dinucleotide reducido (NAD) (7). Se utilizó agar TM/SN suplementado con NAD para la prueba de sensibilidad *in vitro* (1).

Sensibilidad antimicrobiana. Se utilizó la técnica de difusión en disco, de acuerdo a las especificaciones del Clinical Laboratory Standards Institute (CLSI) (6). Se incluyeron 15 antimicrobianos, generalmente utilizados para el control y tratamiento de la coriza infecciosa: sulfametoxazol-trimetoprim, penicilina, doxiciclina, ampicilina, amoxicilina con ácido clavulánico, colistina, estreptomicina, lincomicina, oxacilina, tetraciclina, neomicina, enrofloxacin, fosfomicina, florfenicol y gentamicina. Como control de la técnica se utilizaron cepas de referencia de *E. coli* (ATCC 25922) y *Staphylococcus aureus* (ATCC 25923). Cultivos de 24 h fueron ajustados a una turbidez de 0.5 en la escala McFarland y sembrados en agar TM/ SN. Las placas fueron incubadas a 37°C durante 24 h, en una atmósfera reducida de oxígeno. Los diámetros de inhibición fueron clasificados en sensible, intermedio y resistente. Los criterios de interpretación de cada uno de los antibióticos fueron basados en puntos de corte previamente reportados para este microorganismo (6,7).

Detección de genes de resistencia. El DNA de los 30 aislamientos fue extraído usando el kit DNeasy® Blood and Tissue kit (QIAGEN, Austin, TX, USA). Con base a los perfiles de resistencia detectados en la prueba sensibilidad *in vitro*, se investigó la presencia de genes de resistencia mediante PCR. Se identificaron los genes apHA (confiere resistencia a neomicina) y los genes Tet R (B), Tet B y AviLOC (confieren resistencia a tetraciclina).

RESULTADOS

Los resultados mostraron que >75% de los aislamientos son susceptibles a ampicilina, colistina, amoxicilina+ácido clavulánico y florfenicol; mientras que los antibióticos que mostraron alta prevalencia (>73%) a ser resistentes fueron sulfametoxazol+trimetoprim, estreptomicina, oxacilina y enrofloxacin. El 100 % de los aislamientos mostraron resistencia a lincomicina (Fig.1).

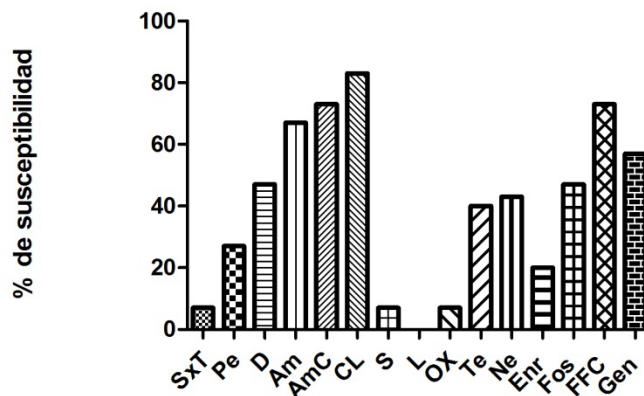
Los genes de resistencia identificados en los 30 aislamientos fueron apHAel cual confiere resistencia a neomicina, Tet R (B) y Tet B, que confieren resistencia a tetraciclina, con un porcentaje de 53 %, 63 % y 70 %, respectivamente.

Las diferencias en susceptibilidad y presencia de genes en los aislamientos incluidos en el estudio, indican que otros mecanismos pueden estar involucrados en la resistencia antimicrobiana de los aislamientos estudiados.

REFERENCIAS

1. Blackall, P. J., and G. G. Reid. Further characterization of *Haemophilus paragallinarum* and *Haemophilus avium*. Vet. Microbiol.7:359–367. 1982.
2. Blackall, P. J. Antimicrobial drug resistance and the occurrence of plasmids in *Haemophilus paragallinarum*. Avian Dis. 32:742-747. 1988.
3. Blackall, P. J., L. E. Eaves, and D. G. Rogers. Proposal of a new serovar and altered nomenclature for *Haemophilus paragallinarum* in the Kume hemagglutinin scheme. J. Clin. Microbiol. 28:1185-1187. 1990.
4. Blackall, P. J., and E. V. Soriano. Infectious coryza and related bacterial infections. In: Diseases of Poultry, 12th ed. Y. M. Saif, A. M. Fadly, J. R. Glisson, L. R. McDougald, L. K. Nolan, and D. E. Swayne, eds. Blackwell Publishing, Ames, IA. pp. 789-803. 2008.
5. Chukiatsiri K, Sasipreeyajan A. J., Blackall, P. J, Yuwatanichsampan S., and Chansiripornchai N. Serovar identification, antimicrobial sensitivity, and virulence of *Avibacterium paragallinarum* isolated from chickens in Thailand. Avian Dis.; 56(2):359-64. 2012.
6. (CLSI) Clinical Laboratory Standards Institute. Performance standards for antimicrobial disk and dilution susceptibility tests for bacteria isolated from animals; approved standard 3rd ed. M31-A3. CLSI, Wayne, PA. 2008.
7. Soriano, V. E., G. Téllez, B. H. Hargis, L. Newberry, C. Salgado-Miranda, and J. C. Vázquez. Typing of *Haemophilus paragallinarum* strains by using enterobacterial repetitive intergenic consensus-based polymerase chain reaction. Avian Dis. 48:890-895. 2004.

Fig. 1. Porcentajes de susceptibilidad de los aislamientos a los antimicrobianos sulfametoxazol-trimetoprim (SxT), penicilina (PE), doxiciclina (D), ampicilina (Am), amoxicilina con ácido clavánico (AmC), colistina (CL), estreptomicina (S), lincomicina (L), oxacilina (OX), tetraciclina (Te), neomicina (Ne), enrofloxacina (Enr), fosfomicina (FOS), florfenicol (FFC), gentamicina (Gen).



EVALUATION OF PULSED-FIELD GEL ELECTROPHORESIS (PFGE) PROFILES ON *SALMONELLA* ISOLATES OF BROILERS AT SLAUGHTER IN ALBERTA CANADA

EVALUACIÓN DE PERFILES DE ELECTROFORESIS DE IMPULSO DE CAMPO EN GEL (PFGE) EN AISLAMIENTOS DE *SALMONELLA* DE POLLOS DE ENGORDA AL SACRIFICIO EN ALBERTA, CANADÁ

C. Mainali and R. King

Animal Health and Assurance Division, Alberta Agriculture and Rural Development
O. S. Longman Building 6909-116 Street
Edmonton, Alberta, Canada T6H 4P2

RESUMEN

El objetivo de este estudio fue evaluar y comparar los perfiles PFGE de aislamientos de *Salmonella* recuperados del buche, el ciego y la piel de pollos de engorda durante el sacrificio. Los buches y los ciegos coincidieron con cada ave pero las pieles se seleccionaron al azar de cada lote. Un total de 704 aislamientos de *Salmonella* de 23 parvadas positivas a *Salmonella* se caracterizaron por PFGE usando el protocolo estándar publicado por el CDC (Atlanta, GA). Se identificaron cincuenta y seis perfiles de campo pulsado diferentes (PP). De los 56 perfiles, 3, 7 y 15 fueron la contabilidad de mayor prevalencia de 40,5 %, 10,0 % y 6,3 % de los aislamientos, respectivamente. Había 26 perfiles únicos que no se compartieron con los aislados de cualquier otra muestra en el estudio. De las 23 parvadas, el 65,2 % tenía al menos un perfil que se encontró en las muestras de buche, ciego y piel, lo que indica que es probable que ocurra contaminación cruzada en la explotación, durante el transporte o en el procesamiento.

SUMMARY

The aim of this study was to evaluate and compare the PFGE profiles of *Salmonella* isolates recovered from crops, ceca and skins of broiler chickens at slaughter. Crops and ceca were matched by bird but the skins were randomly selected from each flock. A total of 704 *Salmonella* isolates from 23 *Salmonella* positive flocks were characterized by PFGE using the standard protocol published by the CDC (Atlanta, GA). Fifty-six different pulsed-field profiles (PP) were identified. Out of the 56 profiles, 3, 7, and 15 were the most prevalent accounting for 40.5%, 10.0%, and 6.3% of the isolates respectively. There were 26 unique profiles that were not shared with isolates from any other samples in the study. Of 23 flocks, 65.2% had at least one profile that was found in the crop, cecal and skin samples indicating that cross contamination is likely to occur on farm, during transport or at processing.

(The full length article will be published in peer reviewed journal.)

THE ROLE OF ACTIVE SURVEILLANCE AND PRE-MOVEMENT BIOSECURITY IN THE MANAGED MOVEMENT OF BROILERS FROM MONITORED FLOCKS DURING A HIGHLY PATHOGENIC AVIAN INFLUENZA OUTBREAK

EL PAPEL DE LA VIGILANCIA ACTIVA Y UN PRE-MOVIMIENTO DE BIOSEGURIDAD EN EL MANEJO DEL MOVIMIENTO DE AVES VIVAS EN UN BROTE DE INFLUENZA AVIAR ALTAMENTE PATOGENICA

S. Malladi^A, J. Todd Weaver^B, M. Buswell^A, J. Slingluff^A, C. Alexander^A, and D. Halvorson^A

^AUniversity of Minnesota, Center for Animal Health and Food Safety, 136 Andrew Boss Laboratory, 1354 Eckles Avenue, St. Paul, MN 55108

^BUSDA Animal and Plant Health Inspection Service, Veterinary Services, Center for Epidemiology and Animal Health, Bldg. B MS-2W4 2150 Centre Avenue, Fort Collins CO 80526

RESUMEN

Las decisiones de manejo de riesgos asociados a los movimientos de aves vivas durante un brote de influenza aviar altamente patogénica son de suprema importancia para la industria de la avicultura con un impacto considerable en el control de brotes y la continuidad del negocio. Un grupo de trabajo en colaboración con participantes de USDA APHIS, la Universidad de Minnesota y los veterinarios de la industria avícola de Estados Unidos se reunió para abordar el manejo del movimiento de aves vivas de instalaciones dentro de una zona de control de la IAAP. Esta iniciativa ha dado lugar al desarrollo de un enfoque para mover aves vivas, con la confianza de que no estén infectadas. El enfoque se basa en tres factores clave para la reducción de riesgos: 1) La vigilancia activa, 2) Un período de aislamiento previo al movimiento con una mejora de la bioseguridad y 3) la incorporación de una distancia de parvadas infectadas conocidas de modo que la propagación de área local sea poco probable. Destacamos la aplicación de este enfoque para la evaluación del riesgo del movimiento de los pollos de engorda al rastro durante un brote de influenza aviar altamente patogénica.

ABSTRACT

Risk management decisions associated with live poultry movement during a highly pathogenic avian influenza (HPAI) outbreak should be carefully considered. Extended movement restrictions can disrupt business continuity. On the other hand, live bird movements may pose a risk for HPAI disease spread. A collaborative workgroup with participants from government, industry and academia was convened to address the managed movement of live poultry from clinically healthy flocks located in a HPAI Control Area. This initiative has led to the development of a risk based approach to move live poultry with a high degree of confidence that they are not infectious. The approach is based on three key risk mitigation measures: 1) active surveillance; 2) a pre-movement isolation period with enhanced biosecurity; and 3) incorporation of a distance from known infected flocks such that infection due to local area spread is unlikely. The application of this risk based approach to the risk assessment of the movement of broilers to slaughter during an HPAI outbreak is highlighted.

Movements of live poultry have been implicated in the spread of avian influenza (AI) in previous outbreaks (3). Therefore, in the event of an outbreak of highly pathogenic avian influenza (HPAI), emergency response measures may involve quarantine and movement control for all live poultry and poultry products from premises located within a Control Area (CA). However, response measures that are aimed at controlling the outbreak may also disrupt continuity of business within the poultry industry with considerable adverse economic consequences (2). Moreover, economic consequences due to disruptions in the logistical supply chain may be greater for larger CAs where a greater number of uninfected premises would come under movement restrictions. The managed movement of live broilers from monitored premises (i.e. flocks that are clinically normal) to slaughter has the potential to reduce the consequences associated with stop movement orders while meeting the primary objective of controlling the outbreak.

To address the managed movement of live poultry from premises within a HPAI CA, a Broiler Sector Working Group (BSWG) was convened as a collaborative initiative with participants from the United States Department of Agriculture, Animal Plant Health Inspection Service, Veterinary Services; the University of Minnesota, Center for Animal Health and Food Safety; and veterinarians from the U.S. broiler industry. BSWG members participate as stakeholders providing input into a scientific risk analysis process to evaluate HPAI control measures. One of the intended outcomes of this initiative is the development of an approach to move broilers to slaughter with increased confidence that infectious broilers are not moved, reducing the risk to human and animal health.

Movement of broilers from known infected premises in an HPAI control area is restricted, as they are usually depopulated on site. Hence, the possibility of movement of infectious broilers to slaughter only arises when HPAI infection in the flock is undetected at the time of movement. The likelihood of detecting an infected flock can be enhanced through pre-movement diagnostic testing and monitoring for clinical signs. The targeted matrix gene real-time reverse transcriptase polymerase chain reaction (rRT-PCR) test is the primary diagnostic test used in conjunction with various sampling protocols. Protocols incorporated into HPAI emergency preparedness plans are based on targeted sampling of daily mortality where the prevalence of HPAI diseased birds would be higher.

The likelihood of HPAI detection increases as the length of time post exposure increases. For example, if a broiler house became exposed a week or more before the scheduled movement day, HPAI is likely detected by movement day and unlikely to pose a movement associated risk. Conversely, exposure closer to the time of movement is relatively less likely to be detected due to the reduced time for HPAI to spread within the flock and disease mortality to occur. One managed movement strategy developed with BSWG input is a pre-movement isolation period (PMIP) to be implemented ahead of the scheduled movement date. In essence, this isolation period requires implementing a higher degree of biosecurity for some days prior to the scheduled movement date. The strategy is beneficial in minimizing the likelihood of the flock becoming exposed to HPAI close to the scheduled movement date.

In this paper, we first evaluate surveillance protocols by estimating the probability of detection under scenarios where the broiler house becomes infected on various days before the time of movement. We then discuss the application of these results in considering various PMIPs with enhanced biosecurity prior to the movement of broilers to slaughter. Finally, we summarize the qualitative assessment of their combined effectiveness.

MATERIALS AND METHODS

Active surveillance protocols. The following active surveillance protocols were considered based on BSWG input. Protocol A: RRT-PCR testing of pooled samples of up to five swabs from the daily mortality collected in the morning on two consecutive days immediately prior to the movement of broilers to slaughter. Protocol B: Similar to protocol A with only change being the testing of pooled samples of up to 11 swabs instead of five swabs. Protocol C: Similar to protocol B, but with the addition of supplementary flock-side Antigen Capture (AC) testing used by industry veterinarians as a screening test close to the time of load-out.

Simulation methods. A stochastic chain binomial disease transmission model was utilized for simulating disease spread and disease mortality on various days post infection of the flock (house)(5). Simulation models of active surveillance were then used to predict disease detection considering factors such as the HPAI transmission model results, normal daily mortality, and sensitivity of the diagnostic tests. In addition to diagnostic testing a daily mortality above 0.3 percent of the house was considered as a trigger for HPAI detection (i.e. unexplained high mortality detected through enhanced passive surveillance).

Development and evaluation of pre-movement isolation measures. A set of enhanced biosecurity measures were developed for implementation during the PMIP based upon input from BSWG workgroup members. Broadly, the measures involved eliminating non-essential visits to the premises and scheduling some of the routine operational visits to occur outside of the PMIP. Enhanced biosecurity measures were included for critical operational contacts such as feed delivery which have to occur during the PMIP. Examples of the feed delivery biosecurity measures that were included for further evaluation in the risk assessment are feed vehicle cleaning and disinfection, restricting the driver from entering the poultry house, and protocols for use and proper removal of personal protective equipment (PPE). Other biosecurity measures related to dead bird disposal, catch crews, and company service personnel were also included. Qualitative assessment approaches using expert opinion, literature review, and past outbreak experiences were used to evaluate the effectiveness of PMIP measures. Options for the duration of the PMIP were evaluated based on the predicted detection probability from quantitative simulation approaches.

RESULTS

Simulation model results indicate that a PMIP of five d or more, in conjunction with the RRT-PCR active surveillance close to the time of movement, increases the probability of HPAI detection (Table 1). Recently introduced HPAI infections reduced the likelihood of HPAI detection for all surveillance protocols, but some of those outbreaks were also detected through Supplementary AC flock side testing.

DISCUSSION

Effectiveness of PMIP. For reducing the overall likelihood of moving infectious broilers, it would be most beneficial to set the duration of the PMIP such that there is a higher likelihood of detecting HPAI by the time of movement. Based on the likelihood of detection presented in Table 1, a consensus was reached in the BSWG that a five d PMIP would be appropriate. However, other durations were also included as options for decision makers to consider during an outbreak.

Managed movement of clinically healthy birds from monitored flocks to slaughter reduces consequences associated with disruption of the logistical supply chain. However, it is important to reduce the likelihood of moving infectious birds, as the unintended consequences of such movement could potentially result in additional HPAI spread. Active surveillance is expected to result in a higher likelihood of detection in cases where disease exposure occurred before implementation of the PMIP. However, the detection likelihood may be reduced for recently introduced infections and targeted biosecurity is critical to prevent HPAI introduction close to the time of movement. Because movement of people and equipment are considered to be the main mechanism of secondary spread, enhanced biosecurity during a few days before movement would be effective in reducing exposure (1).

However, other local spread mechanisms may occur in close proximity to an infected farm (i.e. aerosols, flies, wildlife scavengers) despite implementation of enhanced biosecurity measures (4). Adequate distance from an infected premise could increase confidence that the flock being moved has not been infected through local spread. These risk factors are being further evaluated through risk assessment. Overall, a combination of active surveillance, pre-movement biosecurity, and adequate distance from known infected premises can be considered as a basis for the managed movement of monitored poultry flocks from within a control area with a higher level of confidence that they are not infected.

REFERENCES

1. Alexander, D. J. The Epidemiology and Control of Avian Influenza and Newcastle-Disease. *Journal of Comparative Pathology* 112:105-126. 1995.
2. Bowes, V. A. After the Outbreak: How the British Columbia Commercial Poultry Industry Recovered After H7N3 HPAI. *Avian Diseases* 51:313-316. 2007.
3. Halvorson, D. A. Prevention and management of avian influenza outbreaks: experiences from the United States of America. *Rev Sci Tech* 28:359-369. 2009.
4. Henzler, D. J., D. C. Kradel, S. Davison, A. F. Ziegler, D. Singletary, P. Debok, A. E. Castro, H. Lu, R. Eckroade, D. Swayne, W. Lagoda, B. Schmucker, and A. Nesselrodt. Epidemiology, Production Losses, and Control Measures Associated With an Outbreak of Avian Influenza Subtype H7n2 in Pennsylvania (1996-98). *Avian Diseases* 47:1022-1036. 2003.
5. Weaver, J. T., S. Malladi, T. J. Goldsmith, W. Hueston, M. Hennessey, B. Lee, S. Voss, J. Funk, C. Der, and K. E. Bjork. Impact of Virus Strain Characteristics on Early Detection of Highly Pathogenic Avian Influenza Infection in Commercial Table-Egg Layer Flocks and Implications for Outbreak Control. *Avian diseases* 56:905-912. 2012.

Table 1. Simulation model results from 6000 simulation iterations showing the predicted probability of HPAI detection if the flock (house) became exposed to HPAI virus prior to implementation of PMIP biosecurity measures.

	Predicted detection probability under various PMIPs			
	3 Days	4 Days	5 days	6 days
Protocol A	92.7%	96.4%	98.3%	99.0%
Protocol B	95.8%	98.4%	98.8%	99.5%
Protocol C	98.3%	99.4%	99.6%	99.9%

RETOS Y ESTRATEGIAS PARA EL CONTROL DEL VIRUS DE LA ENFERMEDAD DE NEWCASTLE

CHALLENGES AND STRATEGIES IN THE CONTROL OF NEWCASTLE DISEASE VIRUS

M. Martínez-Núñez^A, F. Vera-Hernández^A, L. García-Barrera^A, D. Cortés-Espinosa^A, A. Toscano^B, E. Lucio-Decanini^B, C. Afonso^C y A. Absalón^A

^AInstituto Politécnico Nacional. CIBA Tlaxcala. Carr. Est. Santa Ines-Tecuexcomac Km 1.5, Tepetitla, Tlaxcala; México. Tel. +52 (55) 5729 6000 Ext. 87813. aabsalon@ipn.mx

^BInvestigación Aplicada S.A. de C.V. México.

^CDepto. de Agricultura de Los Estados Unidos. USA

SUMMARY

Vaccination is the most effective method in the prevention and the most successful in cost – benefit terms, for the control of the Newcastle disease virus. However, due to the fact that some problems related with the disease and the persistence of the virus have not been avoided in the vaccinated poultry population, it has been necessary to generate new strategies to an optimal control of the disease. In this way, producers try to avoid losses due to the poor weight gain, as well as, the low egg production and the poor quality of the eggs in layers. This implicates the antigenic variation and the changes of the NDV in several parts of the world. Obtaining a deep knowledge of the pathogenic mechanisms and immunity before the infection, to stimulate a durable immune response, decrease the secondary reactions and the virus shedding among the birds.

RESUMEN

La vacunación regulada contra el virus de la enfermedad de Newcastle (NDV) ha demostrado ser el método más efectivo de prevención y el más exitoso en términos de costo-beneficio para el control de esta enfermedad. Pese a ello, múltiples reportes señalan severos brotes en unidades intensivas de producción avícola por lo que el NDV sigue representando un riesgo latente para las poblaciones de pollos de engorde y gallinas de postura. Las aves vacunadas poseen títulos de anticuerpos capaces de proveer protección contra mortalidad, sin embargo, la infección y la transmisión del virus puede ocurrir todavía, por lo que es necesario el desarrollo de nuevas estrategias de vacunación. Ello implica tener en cuenta la variación antigénica y los cambios del NDV en varias partes del mundo, así como adquirir un conocimiento profundo de los mecanismos de patogénesis e inmunidad ante la infección, pues es fundamental estimular una respuesta inmune de larga duración que además de disminuir las reacciones secundarias a la vacunación, controle adecuadamente la excreción viral en las aves.

INTRODUCCIÓN

La enfermedad de Newcastle es uno de los procesos patológicos con mayor impacto en la avicultura mundial. Se trata de una enfermedad viral altamente contagiosa causada por un paramixovirus aviar de serotipo 1 (PMVA-1), el cual pertenece al género *Avulavirus* dentro de la familia *Paramyxoviridae* (1,2,3,4). El impacto que el Virus de la Enfermedad de Newcastle (NDV) tiene a nivel global es enorme, pues afecta a más de 250 especies de aves tanto salvajes como domésticas. Por ello, varios países han puesto en marcha campañas de vacunación destinadas a prevenir epizootias. En ellas se emplean vacunas a virus vivo e inactivado (5, 6), las cuales son elaboradas en su mayoría a base de cepas lentogénicas de genotipo II (7,8,9). Es conocido que todos los virus pertenecientes al mismo serotipo inducen niveles óptimos de IgA, IgG, IgM e IgY en el suero de las aves vacunadas por lo que su aplicación ofrece un excelente medio para la reducción del cuadro clínico y prevención de la mortalidad. Sin embargo, pese a los intensos programas de vacunación, la infección y la transmisión del virus sigue ocurriendo durante periodos conocidos como “ventanas de susceptibilidad”. Ello motiva el surgimiento de severos brotes que ocasionan una drástica disminución en la producción, lo cual se ve reflejado en la lentitud en la ganancia de peso, así como la baja de postura y disminución de la calidad del huevo en gallinas ponedoras (10,11,12).

Reducción de la excreción viral. En años recientes se ha demostrado que vacunas desarrolladas en base a NDV's filogenéticamente cercanos al virus endémico de desafío, ofrecen un mayor grado de protección en términos de reducción de excreción viral y propagación del virus. Sin embargo, tanto pollos de engorda como gallinas de postura son rutinariamente vacunados con cepas lentogénicas de genotipo II. (12) Y aun cuando las aves vacunadas están protegidas contra mortalidad, el bajo nivel de seroneutralización generado por las cepas vacunales ocasiona que el virus se continúe excretando en ausencia de signos clínicos, lo que facilita la transmisión horizontal entre aves inmunológicamente susceptibles (5, 13). La limitada neutralización de las partículas virales está determinada por la variación antigénica y la distancia filogenética entre las cepas vacunales y los distintos genotipos, lo cual se refleja en la cantidad de anticuerpos generados por la cepa vacunal y los epítomos reconocidos en el antígeno, así como por la fuerza de unión o avidéz entre antígeno y anticuerpo, la cual depende de la secuencia específica de aminoácidos en las regiones hipervariables de los anticuerpos presentes durante la infección (14). En relación a ello, la estimación de la divergencia genética entre cepas de los distintos genotipos de la clase II demuestra un bajo porcentaje de similitud en la secuencia de nucleótidos y composición de aminoácidos de las dos proteínas más antigénicas del virus: hemaglutinina-neuraminidasa (HN) y proteína de fusión (F). El rango de similitud más bajo se reporta entre el genotipo II y los genotipos V, VI, VII y VIII, reconocidos actualmente como los de más amplia circulación en varias partes del mundo y de los que solo se conocen representantes de alta virulencia (12, 15).

Caracterización de la respuesta inmune y el empleo de adyuvantes moleculares. Dada la evidencia registrada, es un hecho que las diferencias a nivel genético y los continuos cambios fenotípicos y genotípicos que incrementan la virulencia del NDV deben ser tomadas en cuenta en el desarrollo de vacunas para el control de la Enfermedad de Newcastle. De igual manera, y con el fin de desarrollar estrategias novedosas, se ha despertado el interés por comprender los mecanismos de respuesta inmune que se genera ante NDV's de distinto patotipo (4). Por tal razón, la caracterización e identificación de la respuesta transcripcional a inicios de la infección con NDV's de distinta virulencia, ha permitido identificar la participación de una gran variedad de genes implicados en la respuesta antiviral y reacciones proinflamatorias de la respuesta inmune innata. Ello ha evidenciado la importancia de los elementos de respuesta Th1 y Th2, pues se han identificado como los principales mediadores y reguladores durante la infección ya que definen la magnitud y la naturaleza de la respuesta inmune específica. El entendimiento y la caracterización de los mecanismos de la respuesta inmune, ha abierto una amplia gama de posibilidades para modular directa o indirectamente tanto la respuesta inmune innata como la adaptativa. Con ello se busca mantener un control adecuado durante la infección en aves de corral. Debido a ello, el uso de algunas citocinas como agentes terapéuticos o adyuvantes vacunales ha sido explorado intensamente en la última década.

REFERENCIAS

1. Viruses, I.C.o.T.o., F.A. Murphy, and I.U.o.M.S.V. Division Virus taxonomy: classification and nomenclature of viruses : sixth report of the International Committee on Taxonomy of Viruses. Springer-Verlag, 1995.
2. Mayo, M.A. A summary of taxonomic changes recently approved by ICTV. Archives of virology 147:1655-1663. 2002.
3. de Leeuw, O., and B. Peeters Complete nucleotide sequence of Newcastle disease virus: evidence for the existence of a new genus within the subfamily Paramyxovirinae. The Journal of general virology 80 (Pt 1):131-136. 1999.
4. Rauw, F., Y. Gardin, V. Palya, S. van Borm, M. Gonze, S. Lemaire, T. van den Berg, and B. Lambrecht Humoral, cell-mediated and mucosal immunity induced by oculo-nasal vaccination of one-day-old SPF and conventional layer chicks with two different live Newcastle disease vaccines. Vaccine 27:3631-3642. 2009.
5. Kapeczynski, D.R., and D.J. King Protection of chickens against overt clinical disease and determination of viral shedding following vaccination with commercially available Newcastle disease virus vaccines upon challenge with highly virulent virus from the California 2002 exotic Newcastle disease outbreak. Vaccine 23:3424-3433. 2005.
6. van Boven, M., A. Bouma, T.H. Fabri, E. Katsma, L. Hartog, and G. Koch Herd immunity to Newcastle disease virus in poultry by vaccination. Avian pathology : journal of the W.V.P.A 37:1-5. 2008.
7. Alexander, D.J., E.W. Aldous, and C.M. Fuller The long view: a selective review of 40 years of Newcastle disease research. Avian pathology : journal of the W.V.P.A 41:329-335. 2012.
8. Lomniczi, B., E. Wehmann, J. Herczeg, A. Ballagi-Pordany, E.F. Kaleta, O. Werner, G. Meulemans, P.H. Jorgensen, A.P. Mante, A.L. Gielkens, I. Capua, and J. Damoser Newcastle disease outbreaks in recent years in western Europe were caused by an old (VI) and a novel genotype (VII). Archives of virology 143:49-64. 1998.

9. Miller, P.J., E.L. Decanini, and C.L. Afonso Newcastle disease: evolution of genotypes and the related diagnostic challenges. *Infection, genetics and evolution : journal of molecular epidemiology and evolutionary genetics in infectious diseases* 10:26-35. 2010.
10. Miller, P.J., D.J. King, C.L. Afonso, and D.L. Suarez Antigenic differences among Newcastle disease virus strains of different genotypes used in vaccine formulation affect viral shedding after a virulent challenge. *Vaccine* 25:7238-7246. 2007.
11. Rue, C.A., L. Susta, I. Cornax, C.C. Brown, D.R. Kapczynski, D.L. Suarez, D.J. King, P.J. Miller, and C.L. Afonso Virulent Newcastle disease virus elicits a strong innate immune response in chickens. *The Journal of general virology* 92:931-939. 2011.
12. Absalon, A.E., A. Mariano-Matias, A. Vasquez-Marquez, A. Morales-Garzon, D.V. Cortes-Espinosa, R. Ortega-Garcia, and E. Lucio-Decanini Complete genome sequence of a velogenic Newcastle disease virus isolated in Mexico. *Virus genes* 45:304-310. 2012.
13. Miller, P.J., C. Estevez, Q. Yu, D.L. Suarez, and D.J. King Comparison of viral shedding following vaccination with inactivated and live Newcastle disease vaccines formulated with wild-type and recombinant viruses. *Avian diseases* 53:39-49. 2009.
14. Iorio, R.M., and M.A. Bratt Neutralization of Newcastle disease virus by monoclonal antibodies to the hemagglutinin-neuraminidase glycoprotein: requirement for antibodies to four sites for complete neutralization. *Journal of virology* 51:445-451. 1984.
15. Hu, S., H. Ma, Y. Wu, W. Liu, X. Wang, Y. Liu, and X. Liu A vaccine candidate of attenuated genotype VII Newcastle disease virus generated by reverse genetics. *Vaccine* 27:904-910. 2009.

SAFETY OF CHITOSAN ON HATCHING EGGS

LA SEGURIDAD DE UN PRODUCTO NATURAL DE QUITOSANO EN LOS HUEVOS PARA INCUBAR

K. Maschek^{AC}, K. Jones,^A S. Hubbard^A, and E. David Peebles^B

^APoultry Research and Diagnostic Lab, Mississippi State University, 3138 HWY 468 West, Pearl, MS 39288

^BDepartment of Poultry Science, Mississippi State University, 46 Old Bully, Starkville, MS 39762

^CCorresponding author. PO Box 97813 Pearl, MS 39288-7502. E-mail: kmaschek@mvrld.msstate.edu

RESUMEN

El quitosano es un polímero natural que se obtiene industrialmente a partir de la quitina, el componente de principio de los exoesqueletos de los crustáceos e insectos, así como las paredes celulares de algunas bacterias y hongos. El quitosano tiene beneficios potenciales para su uso en incubadoras comerciales y casetas de reproductoras para controlar hongos, bacterias y enfermedades parasitarias. Por estas razones es importante entender el impacto del quitosano en los huevos para incubar.

Este estudio analiza los efectos de un producto de quitosano sobre huevos para incubar de pollos de engorda comerciales. Los huevos se rociaron con concentraciones diluidas en serie de un producto de quitosano y se compararon con el grupo de control.

Los parámetros medidos y comparados en todos los grupos fueron: peso fijo del huevo, peso de huevos embrionados vivos de 11 y 18 días, porcentaje de pérdida de peso de los huevos, la fertilidad, incubabilidad, tasa de nacimiento, la mortalidad de embriones, la calidad de los pollitos y el peso promedio de pollitos nacidos a los 21 días.

SUMMARY

The aim of the study was to determine the safety of a novel chitosan containing product on commercial hatching eggs. Five hundred and forty commercial eggs were sprayed with 5% novel chitosan product at a pH of 5.0. Five hundred and twenty-seven control eggs were sprayed with tap water at pH of 5.0. No statistical difference on total percent hatch was calculated between the control and treatment groups. These results indicate that the safety of this product at 5% solution does not affect hatchability.

INTRODUCTION

Chitosan is bio-polymer made from the de-acetylation of chitin a ubiquitous and naturally occurring material (2,7). It has been shown to have antibacterial and antifungal properties in agriculture and medicine (1,3,4,7,8). Chitosan's ability to be effective depends on numerous characteristics such as concentration in solution, pH, molecular weight and degree of deacetylation (1,6).

Recent trials at Mississippi State University Poultry Research and Diagnostic Lab have investigated the use of a novel chitosan-containing product as an antifungal in empty commercial hatchers against *Aspergillus*. It is important to note that chitosan forms a film on the porous surfaces of egg shells reducing gas and moisture loss from table eggs whereby preserving internal egg quality (2,5). Inhibition of moisture loss and gas exchange may affect the hatch rate of fertilized eggs.

The aim of this study was to determine if applying a novel chitosan product to hatching eggs affected percent hatch.

MATERIALS AND METHODS

Eggs. One thousand and sixty seven commercial hatchery eggs used in this study were donated by a commercial broiler company in Mississippi from 39 wk old hens.

Chitosan source. A 5% solution of a novel chitosan containing product (AVIAN-YS, OII-YS Corp, Carrollton, GA) was mixed with tap-water in a 3 gallon hand pump sprayer. The pH was adjusted to 5.0 using acetic acid as suggested by the manufacturer.

Incubator/sprayer/pH meter. A NatureForm NMC-1080 incubator (NatureForm Hatchery Systems, Jacksonville, FL), an EcoTestr pH2 by Eutech Instruments (Oakton Instruments, Vernon Hills, IL) pH meter and a SOLO 457 3 gallon hand pump sprayer (US9456702, Newport News, VA) were used in this experiment.

Statistical analysis. A chi-square analysis was performed on hatchability data using proc freq (SAS for Windows Version 9.3, SAS Institute, Cary, North Carolina).

Eggs were evenly divided among 36 thirty-egg capacity flats. Two groups of 18 flats were placed separately on tables for spraying with test solution and control solution. A single operator sprayed one group of eggs to completely coat egg shells with a 5% solution of the chitosan product adjusted to pH of 5.0 with acetic acid. This same procedure was repeated for the control group using tap water adjusted to a pH of 5.0 using acetic acid. All eggs were allowed to dry for 24 h in a 65°F holding room. The eggs were then carefully blotted with paper towel to remove any beading moisture from the apex of shells. Egg weights were taken and recorded before set. Eggs were incubated at 99.5°F with 55% humidity for 21 d. At 12 and 19 d of incubation, eggs were weighed, candled and clear eggs removed. Egg weights and counts were repeated after each candling. At 19 d, eggs were moved to hatching baskets and hatch count was conducted every 24 h until d 21. A hatch residue breakout was performed for both groups at 21 d of incubation.

RESULTS

In the control group, five hundred and twenty seven eggs were set and 489 eggs hatched equaling a 92.8% total hatch rate. In the treatment group, 540 were set and 504 hatched equaling a 93.3% total hatch rate. The 0-12 d incubation average weight loss per egg of control and treatment groups was 6.2% and 5.8%, respectively. The 12-19 d incubation average weight loss per egg was 3.9% and 3.8% for control and treatment group, respectively.

The hatch residue breakout had 11 and 10 late hatches, 1 and 0 early dead, 3 and 4 mid dead, 3 and 4 late dead and 3 and 1 pipped chick for control and treatment groups, respectively. No embryo anomalies were seen in the control group. Two chicks had exposed brains and one had an extra pair of legs in the treatment group.

DISCUSSION

The results of this study show that a novel chitosan containing product at 5% solution did not show a detectable difference ($p=0.7266$) in hatchability of eggs. Weight loss per egg during early and late incubation (0-12 d and 12-19 d) showed a slight difference but the significance is unknown at this time.

In future studies, the concentration of chitosan and the possible complications that may result from its film forming properties need to be made clear. Improving this study would involve using higher concentrations of the product and observing for negative changes in embryos and hatching eggs.

Other applications for this natural product in the poultry industry are as an antibiotic. Inclusion into water or feed would be highly valuable and feasible to control enteric bacteria. The addition of chitosan to both hatching and table eggs could help control the spread of *Aspergillus* and *Salmonella*. Future research is needed in order to validate these possible applications.

REFERENCES

1. Benhabiles, M.S., R. Salah, H. Lounici, N. Drouchie, M.F.A. Goosen and N. Mameri. Antibacterial activity of chitin, chitosan and its oligomers prepared from shrimp shell waste. *Food Hydrocolloids*. 29: 48-56. 2012.
2. Bhale, S., H. K. No, W. Prinyawiwatkul, A. J. Farr, K. Nadarajah, and S. P. Meyers. Chitosan coating improves shelf life of eggs. *J. Food Sci.* 68(7): 2378–2383. 2003.
3. Chen, Wenxuan, T. Jin, J. Gurtler, D. Geveke and X. Fan. Inactivation of salmonella on whole cantaloupe by application of an antimicrobial coating containing chitosan and allyl isothiocyanate. *International Journal of Food Microbiology*. 155: 165-170. 2012.
4. Islam, M.D Monarul, S. Md. Masum and K. Rayhan Mahbub. In vitro antibacterial activity of shrimp chitosan against salmonella paratyphi and staphylococcus aureus. *Journal of Bangladesh Chemical Society*. 24(2): 185-190. 2011.
5. Jo, C., D.U. Ahn, K.H. Kim, K.C. Nam and X.D. Liu. Effects of Chitosan Coating and Storage with Dry Ice on the Freshness and Quality of Eggs. *Poultry Science* 90: 467-72. 2011.
6. Kim, S.H., H.K. No, and W. Prinyawiwatkul. Effect of Molecular Weight, Type of Chitosan, and Chitosan solution pH on the shelf-life and quality of coated eggs. *J. Food Sci.* 72:44-48. 2007.

7. Raffat, Dina, K. von Bargen, A. Haas, and H.G. Sahl. Insights into the Mode of Action of Chitosan as an Antibacterial Compound. *Appl. Environ. Microbiol.* 74(12): 3764-3773. 2008.
8. Rodriguez-Nunez, Jesus R., J. Lopez-Cervantes, D. Sanchez-Machado, B. Ramirez-Wong, P. Torres-Chavez and M. O. Cortez-Rocha. Antimicrobial activity of chitosan-based films against *Salmonella typhimurium* and *Staphylococcus aureus*. *Intern. Journ. Food Sci Tech.* 47: 2127-2133. 2012.

ACKNOWLEDGEMENTS

This paper was made possible by the time, energy and inspiration of the authors and staff. Thank you to O2-YS Corporation for their support and vision.

PERFORMANCE OF BROILER CHICKENS USING A COCCIDIAL VACCINE (COCCIVAC-B) OR AN IONOPHORE (SALINOMYCIN)

DESEMPEÑO DE LOS POLLOS DE ENGORDA CON UNA VACUNA CONTRA COCCIDIA (COCCIVAC-B) O UN IONÓFORO (SALINOMICINA)

G. Mathis^A, C. Hofacre^B, C. Broussard^C, and L. Newman^C

^ASouthern Poultry Research, Inc., Athens, GA

^BPoultry Diagnostic and Research Center, Athens, GA

^CMerck Animal Health, DeSoto, KS

RESUMEN

Se realizó un estudio de pollo de engorda criado en piso comparando fármacos anticoccidianos en el alimento con la vacunación con coccidia viva. Fueron ocho réplicas: T1 ninguna vacuna o medicamento, T2 vacuna en aerosol al nacimiento con Coccivac -B, y T3 salinomicina a 60 g / t en el alimento de iniciación y crecimiento solamente. Se colocaron cincuenta pollos de engorda machos de linaje comercial en cada corral. Se registraron los pesos de las aves al d 0, d 21, d 35, y en la finalización (d 43). En la materia fecal se determinaron oocistos por gramo (OPG) para T2 y T3, cada 3 d (D13 - 40). En d 21 las aves vacunadas T2 tuvieron el desempeño más bajo. En d 35 y d 43, tanto T2 como T3 fueron iguales estadísticamente y ambos significativamente mejor que T1. El desempeño estuvo correlacionado con OPGs. Los OPGs de T2S alcanzaron su punto máximo al principio y luego disminuyeron de manera constante. Los OPGs de T3 fueron más variables y empezaron a aumentar en d 40. La conclusión de este estudio fue que el ciclo de la coccidia ocurrió más temprano y con menos variación con la vacunación que con el ionóforo.

SUMMARY

A broiler chicken floor-pen study was conducted comparing an in-feed anticoccidial drug to vaccination with live coccidia. There were eight replications per treatment. The treatments were: T1 no vaccine or drug (NM), T2 spray vaccination at hatch with Coccivac-B (CVB), and T3 the ionophorous antibiotic salinomycin (SAL) fed at 60 g/t in the starter and grower feeds only. Fifty commercial strain male broilers were placed into each pen. Bird weights were recorded at d 0, 21, 35, and termination (d 42). For CVB and SAL, oocysts per gram (OPG) fecal material was determined every 3 d (d 13-40). The CVB vaccinated birds had the poorest performance on d 21. By d 35 and d 42 both CVB and SAL were statistical equal and both significantly better than NM. Performance closely correlated with OPGs. CVB's OPGs peaked early and then steadily lowered. SAL's OPGs were more variable and started to increase on d 40. The conclusion from this study showed coccidia shedding and related cycling occurred earlier and with less variation with Coccivac-B vaccination than with the anticoccidial ionophore salinomycin.

MATERIALS AND METHODS

The trial was conducted at Southern Poultry Research Inc. in a two sided floor pen house. Each pen was approximately 5 x 10 ft in size and all pens had four inches of built up litter with a coating of fresh pine shavings on top. There were ambient humidity and 24 h lighting throughout the trial. Each pen was initially stocked with 50, day of hatch, male Cobb 500 chicks with 0.77 sq. ft/ bird floor space. A total of 1200 chicks were allocated to the three different treatments with eight replicates per treatment (Table 1). Corn-soy based chicken diets were representative of local commercial formulations and calculated analyses met or exceeded National Research Council (1) standards. The rations (crumble/pellet) were fed *ad libitum* from the date of chick arrival until d 42 of the study. Birds were fed starter feed containing the appropriate treatment from days 0 – 21, grower feed from d 21 – 35, and finisher feed from d 35 – 42. All feeds contained no additional antibiotics other than salinomycin in T3 starter and grower feeds. All finisher feeds were non-medicated. Bird weight gain and feed consumption were determined by pen on d 0, 21, 35, and 42.

To determine timing and amounts of oocysts shedding/ cycling fecal samples were collected. For CVB and SAL, from d 13-40, every 3 d fresh fecal samples were collected from each pen. These representative samples were examined to determine the number of oocysts per gram fecal material.

Results were subjected to ANOVA analysis for a completely randomized experimental design using the PROC GLIMMIX procedure of the SAS version 9.2 statistical package (SAS Inst. Inc., Cary, NC). Statistical differences were declared at $P \leq 0.05$.

RESULTS

Broiler live performance weight gain (BWG) (Table 2) and adjusted feed conversion ratios (FCR) (Table 3) were determined for d 21, 35, and 42. Feed conversion ratios were calculated as mortality-adjusted feed conversion ratio calculated as feed weight/ survivor weights + dead bird weights. D21 results showed that the coccidiosis from the CVB birds affected performance with lower BWG and higher FCR compared to NM and SAL. The performance of NM on d 35 and d 42 were significantly poorer than CVB and SAL. Days 35 and 42 performance of CVB was statistically equal to SAL.

OPG are presented in Figure 1. A major OPG peak with the spray-applied CVB was observed approximately 13 d of age. This level was significantly higher than SAL fed birds. The sharp reduction in OPGs for CVB after this major peak indicated that coccidial immunity was developing, reducing the number of parasites reproducing within the bird. By d 25 OPGs were low and at a steady low level throughout the remainder of the study. SAL OPGs were more variable with two distant peaks ~d 19 and 28. The OPG level did decrease after the second peak, however a rise in OPGs was found after the SAL was removed at d 35.

DISCUSSION

The goal of any anticoccidial program is to control severity of coccidiosis and attempt to regulate when the primary damage will occur. Many factors influence oocysts shedding including management, duration of drug program, vaccine condition and application. To sustain good coccidiosis management all programs and influences need to be considered. Poultry anticoccidial programs are either drug or live vaccine. In order to predict coccidiosis control and immunity development, performance and related oocysts litter/fecal numbers are valuable tools. In vaccinated broilers, oocysts shedding started early with a major peak at 2-3 wk. As expected from OPGs, performance was lower for CVB near this OPG peak compared to SAL. An immunity related decline in OPGs occurred with CVB. Thus by d 35 performance both FCR and weight gain were statistically equal between CVB and SAL, with both significantly better than NM. Ionophores mode of action is by partial direct control and regulated immunity development. These traits allow some oocysts to be shed over the course of the grow-out with accompanying immunity development. According to Chapman (2) full immunity to most anticoccidial drugs takes at least 6-7 wk. Thus, after removal of the SAL during the withdrawal period, coccidia oocysts shedding started to increase. In this 42 d study, a loss in performance during the late phase of the grow-out with SAL was not observed. However, it has been documented that even a minor increase in coccidiosis during a late phase of a grow-out can significantly affect performance (3). This study confirmed a strong relationship between performance and OPG. The conclusion from this study was coccidia shedding and related cycling occurred earlier and with less variation with Coccivac-B vaccination than with the anticoccidial ionophore salinomycin.

REFERENCES

1. National Research Council. Nutrient Requirements of Poultry. 9th rev. ed. Natl. Acad. Press. Washington, DC. 1994.
2. Chapman, H. D. (1999). Anticoccidial drugs and their effects upon the development of immunity to *Eimeria* infections in poultry. *Avian Pathol.* 28:521-535.
3. R. G. Teeter, (2008). Calorimetry Applications Quantify the Variable Cost of Subclinical Coccidiosis (“Coccidiasis”) at Various Points in the Broiler Growth Curve WPC Proceeding 2008: 99-101.

Table 1. Treatment groups.

Treatment	Anticoccidial
1. Control (NM)	None
2. Coccidia vaccination (CVB)	Coccivac-B*
3. Ionophorus anticoccidial (SAL)	Salinomycin 60 g/t starter and grower

*Coccivac-B was spray applied at the recommended commercial dose using a SprayCox 2 machine prior to placement. Chicks were allowed to preen for approximately 30 min

Table 2. Broiler weight gain (kg) at d 21, 35, and 42.

Treatment	D21	D35	D42
NM	0.506 a	1.474 b	1.857 b
Coccivac-B	0.457 b	1.522 a	2.005 a
Salinomycin 60g/t	0.512 a	1.531 a	2.038 a

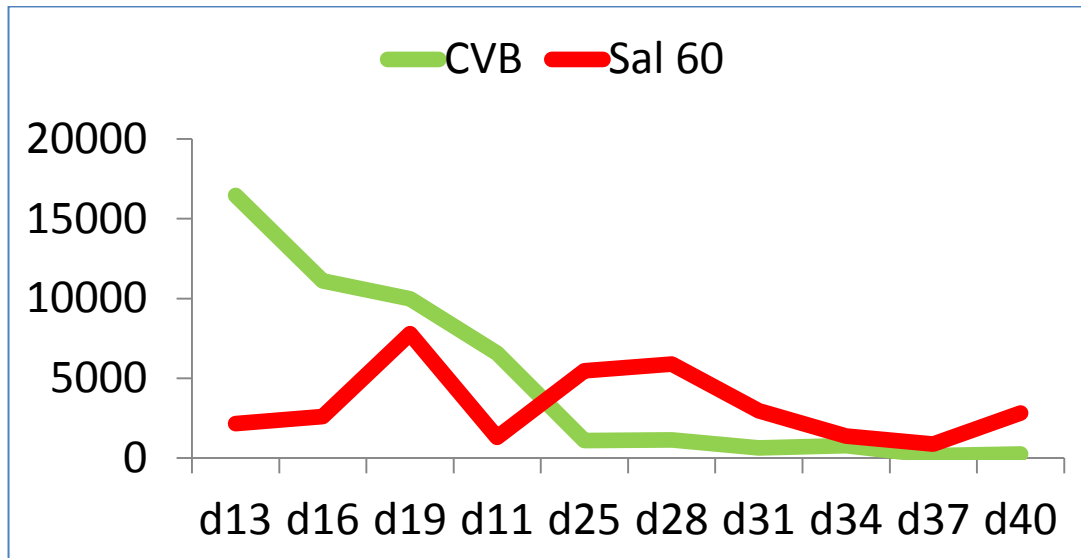
^{A,B} Means within columns with different superscripts are significantly different (p<0.05)

Table 3. Broiler adjusted for mortality feed conversion ratio at d 21, 35, and 42.

Treatment	D21	D35	D42
NM	1.478 a	1.669 a	1.846 a
Coccivac-B	1.485 a	1.590 b	1.705 b
Salinomycin 60g/t	1.452 b	1.577 b	1.717 b

^{A,B} Means within columns with different superscripts are significantly different (p<0.05)

Figure 1. Oocyst shedding patterns for Coccivac B (CVB) vaccination vs salinmoycin 60 g/t (SAL) starter and grower.



USO DE UN ADITIVO ANTI-MICOTOXINAS (A-AM) EN REPRODUCTORAS PESADAS PARA EL CONTROL DE LESIONES ORALES POR MICOTOXINAS DERIVADAS DE HONGOS TIPO *FUSARIUM*

USE OF AN ANTI-MYCOTOXINS ADDITIVE (A-AM) IN HEAVY BREEDERS FOR THE CONTROL OF ORAL LESIONS PRODUCED BY *FUSARIUM* MYCOTOXINS

M. Méndez, E. Camacho, E. Soto, D. Sarfati y B. Lozano

Laboratorio Avimex S.A. de C.V. J.I. Bartolache 1962. Colonia del Valle.
Delegación Benito Juárez. 03100. México, D.F., México

SUMMARY

Damage caused by some dermonecrotic mycotoxins that affect digestive integrity of reproductive birds can alter their performance. The objective of the present work is to present field results of the use of an anti-mycotoxins additive (A-AM) in feed contaminated with fusarium toxins in reproductive birds that have damaged mucosa, and were administered an A-AM during a eight wk period. The regenerative effect on the digestive mucosa integrity (time and degree of the lesion) was evaluated. Results of mycotoxins tests, immediate changes in oral and tongue mucosa regeneration, time of feed intake and improvement in flock performance are presented. It is concluded that the continuous use of the A-AM in reproductive birds will protect their health against the effects of fusarium toxins and in turn their performance.

RESUMEN

Los daños provocados por algunas micotoxinas dermonecroticas que afectan la integridad digestiva de las aves reproductoras pueden alterar su productividad. El objetivo de este trabajo es presentar resultados de campo al uso de un aditivo anti-micotoxinas (A-AM) en alimento contaminado con fusiariotoxinas en aves reproductoras con daño en mucosas a las que se les aplicó por un periodo de ocho semanas un A-AM, y se valoró su efecto regenerativo en la integridad de sus mucosas digestivas (tiempo y grado de lesión). Se presentan los resultados de las pruebas de micotoxinas y la observación de los cambios inmediatos de regeneración en la mucosa oral y lengua, así como el tiempo de consumo de alimento y mejoras en el desempeño productivo de la parvada. Se concluye que el uso continuo de este A-AM en reproductoras protegerá la salud de las aves contra los efectos de fusiariotoxinas y con ello su productividad.

INTRODUCCIÓN

El desarrollo y la salud del tracto gastrointestinal (TGI) es un factor clave en la productividad de las aves domésticas y en específico de las aves reproductoras, donde se ha documentado ampliamente que hongos del tipo *Fusarium* spp. que regularmente contaminan a cultivos de granos y oleaginosas en campo, bajo las condiciones ambientales y micro-ambientales apropiadas de humedad y temperatura, sintetizan, en campo o en almacenamiento, metabolitos secundarios tóxicos para los animales denominados micotoxinas, habiendo caracterizado hasta el momento, por su relevancia desde el punto de vista pecuario, entre otras, a las siguientes: zearalenona (ZEA), vomitoxina o deoxinivalenol (DON), fumonisina B1 (FB1), toxina T-2 (T T-2), diacetoxiscirpenol (DAS), monoacetoxiscirpenol (MAS), triacetoxiscirpenol (TAS) y scirpentriol (STO).

La contaminación de los alimentos balanceados de las aves reproductoras en cualquier fase de su vida productiva, especialmente por micotoxinas del tipo tricotecenos que inducen dermonecrosis, en pico, cavidad oral y mucosas digestivas, tiene el potencial de alterar la salud y productividad de las parvadas afectadas, de ahí la relevancia de implantar programas de prevención.

OBJETIVO

Presentar resultados de campo en el uso de un aditivo anti-micotoxinas purificado (A-AM) en alimento de reproductoras pesadas en fase de producción, sospechoso clínicamente de contaminación con fusariotoxinas dermonecróticas.

MATERIALES Y MÉTODOS

En dos parvadas comerciales de aves reproductoras pesadas de 31 semanas de edad de la misma empresa, en la misma granja y que consumían el mismo alimento, que presentaban lesiones dermonecróticas en picos y lenguas, clínicamente causadas por fusariotoxinas del tipo tricotecenos, se utilizó en un periodo continuo de ocho semanas un A-AM en el alimento (Mycoad[®]-ZT) y se valoró su efecto sobre la presencia de lesiones en cavidad oral, calificando el grado de lesión en picos y lenguas en una escala de 0 a 3, correspondiendo el 0 a aves sin lesiones, 1 a aves con lesiones ligeras, 2 a aves con lesiones moderadas y 3 a aves con lesiones severas. La adición del A-AM se hizo únicamente en uno de los lotes de reproductoras a razón de 1 Kg por tonelada de alimento. La otra parvada permaneció como control sin tratamiento alguno de acuerdo a indicaciones del propietario.

Se realizaron 4 valoraciones de las lesiones, a las semanas 1 (inicio), 2, 5 y 7 de iniciado el tratamiento, revisando 100 aves por parvada en cada ocasión, revisando siempre la misma caseta, a la misma hora del día, y fue realizada siempre por la misma persona. Para fines comparativos y con base en el número de lesiones observadas y severidad, se calculó un Índice de Lesiones de cada observación, derivado de multiplicar el número de lesiones por el grado observado en cada edad (0 al 3), haciendo la sumatoria y dividiendo el resultado entre 100. Esto para fines prácticos comparativos.

RESULTADOS

Los resultados de las lesiones en cavidad oral y lengua que fueron evaluados en cuatro ocasiones se resumen en el cuadro 1. Se observan diferencias importantes en las lesiones observadas a partir de la segunda observación, en donde el grupo tratado muestra una importante reducción de las lesiones en cavidad oral y en la lengua.

El análisis comparativo de los Índices de Lesiones (Cuadro 2), muestra las grandes diferencias encontradas en ambas parvadas a partir del segundo monitoreo.

DISCUSIÓN

Como se puede observar en los resultados, en este estudio de campo se encontró una disminución muy significativa en la presencia de lesiones orales en las aves que recibieron el tratamiento en alimento con el A-AM. Lo anterior fue notorio a partir del segundo monitoreo que corresponde a una semana de iniciado el tratamiento y se hizo más evidente en la quinta semana. En general las lesiones en cavidad oral remitieron un poco más rápido que las lesiones en lengua, quizás por el tiempo fisiológico natural de reparación del organismo de las aves. En el grupo control no tratado, se notó una mejoría ligera en la presencia de lesiones a partir de la quinta semana, lo cual puede ser indicativo de que disminuyó el grado de contaminación del alimento con fusariotoxinas, tipo tricotecenos en algún punto entre la primera y quinta semana de observación.

CONCLUSIÓN

El A-AM purificado utilizado en esta prueba demostró su efectividad en el control de lesiones orales inducido por micotoxinas en las aves.

REFERENCIAS

1. Campbell, M L (1983) Evaluation of immunity of young broiler chickens during simultaneous aflatoxicosis and ochratoxicosis. *Poultry Science* 62: 2138-2144.
2. Corrier, D E (1991) Mycotoxicosis: mechanisms of immunosuppression. *Vet. Immunol. Immunopathology*. 30: 73-87.
3. Gimeno A y Martins M L (2000) Problemas de micosis y micotoxicosis en polllos. In: www.mycotoxin.com p 1-44.

4. Leeson S, Diaz G J and Summers J D (1995) Poultry metabolic disorders and mycotoxins. University Books. Guelph, Ontario, Canada.

5. Zaviezo D (2004) Impact of molds and mycotoxins in poultry nutrition. Veterinaria Feed Hygiene. Monografía IV Miedzynarodowa Conferencia Naukowa 29-33 p. Uniwersytet Warminsko-Mazurski. Olsztynie, Poland.

Cuadro 1. Lesiones orales (picos y lenguas).

Escala de Lesión	Número y grado de lesiones orales en grupo control							
	Lesiones en Cavidad Oral				Lesiones en Lengua			
	1 sem	2 sem	5 sem	7 sem	1 sem	2 sem	5 sem	7 sem
Grado 0	30	22	29	43	0		7	12
Grado 1	0	18	27	32	0	3	9	37
Grado 2	49	43	31	19	35	34	23	22
Grado 3	21	17	13	6	65	63	51	29
Índice	1.61	1.55	1.28	0.88	2.65	2.60	2.08	1.68

Escala de Lesión	Número y grado de lesiones orales en grupo tratado							
	Lesiones en Cavidad Oral				Lesiones en Lengua			
	1 sem	2 sem	5 sem	7 sem	1 sem	2 sem	5 sem	7 sem
Grado 0	35	78	95	97	0	4	43	75
Grado 1	0	19	5	2	0	71	47	25
Grado 2	45	0	0	1	39	20	10	0
Grado 3	20	3	0	0	61	5	0	0
Índice	1.50	0.28	0.05	0.04	2.61	1.26	0.67	0.25

Cuadro 2. Índice de lesiones comparativo.

Escala de Lesión	Número y grado de lesiones orales							
	Lesiones en Cavidad Oral				Lesiones en Lengua			
	Inicial	1 sem	5 sem	7 sem	Inicial	1 sem	5 sem	7 sem
	0	P-Tx	P-Tx	P-Tx	0	P-Tx	P-Tx	P-Tx
Grupo Control	1.61	1.55	1.28	0.88	2.65	2.60	2.08	1.68
Grupo A-AM	1.50	0.28	0.05	0.04	2.61	1.26	0.67	0.25
Diferencia	-0.11	-1.27	-1.23	-0.84	-0.04	-1.34	-1.41	-1.43

OLEORESIN BASED FEED ADDITIVE – A NATURAL GROWTH PROMOTER WITH ANTICOCCIDIAL PROPERTIES

ADITIVO DE ALIMENTO BASADO EN OLEORRESINA - UN PROMOTOR DE CRECIMIENTO NATURAL CON EFECTOS ANTICOCCIDIANOS

P. Mishra, A. Casarin, and I. Cabrera

Euronutec Premix S.A de CV, Queretaro Mexico

RESUMEN

La creciente preocupación por el uso de antibióticos en la industria de alimentos para animales y sus efectos nocivos relacionados con la salud humana han obligado a la comunidad científica a buscar otras opciones saludables. En el presente trabajo se reporta que el alimento para aves adicionado con una mezcla de dos oleorresinas naturales presenta un efecto sinérgico contra la coccidiosis aviar y también mejora el rendimiento de pollos de engorda. Los efectos de las oleorresinas naturales se analizaron en la presencia y ausencia de diferentes coccidostáticos. Las pruebas muestran que la mezcla de oleorresinas aumentó la ganancia diaria de peso corporal y disminuyó el índice de conversión alimenticia y la tasa de mortalidad en los pollos de engorda desafiados con *Coccidia*. Los recuentos de ovocitos para *Eimeria maxima*, *Eimeria acervulina* y *Eimeria tenella* fueron los mismos en la presencia de diferentes coccidostáticos. El posible mecanismo de acción de estas oleorresinas es mediante la protección de los microflora intestinal y la mejora de las respuestas inmunológicas de los animales

SUMMARY

Growing concerns about the use of antibiotics in animal feed industries and their related harmful effects on human health have forced the scientific community to look for other healthy options. In the present work we report that poultry feed added with a mixture of two natural oleoresins exhibits a synergic effect against avian coccidiosis and also enhances the performance of broilers. Effects of the natural oleoresins were analyzed in the presence and absence of different coccidostats. The trials show that the mixture of oleoresins increased the daily body weight gain and decreased the feed conversion ratio and mortality rate in coccidiosis challenged broilers. The oocyte counts for *Eimeria maxima*, *Eimeria acervulina*, and *Eimeria tenella* were the same as in the presence of different coccidostats. The possible mechanism of action of these oleoresins is by protecting the gut micro flora and by enhancing the immunological responses of the animals.

INTRODUCTION

Present day global poultry industry finds it difficult to confront avian coccidiosis as there are fewer anticoccidial drugs available. However, the effect of coccidia is reduced to some extent by the use of different antibiotics like virginiamycin and flavomycin among others as growth promoters in combination with anticoccidial programs. Recent studies have clearly shown that indiscriminate uses of antibiotics have deleterious effects in poultry industry and thus affecting the human health also. This has resulted ban on the use of different antibiotics in European Union and opened debate on the use of antibiotics in other countries also. In recent years major emphasis has been laid on the use of different alternatives as prebiotics, probiotics and phytobiotics. Currently, phytobiotics or plant extracts have drawn a lot of attention in animal feed industries. In comparison to synthetic growth promoters or inorganic chemicals, these plant extracts (mainly the essential oils) have proven to be natural, no or less toxic, and residue free. With evolutionary advances in chemistry and identification of plant compounds which are effective in treatment of certain diseases have renewed interest in different plant extracts as feed additives. Till now several beneficial effects of bioactive plant substance in animal nutrition has been reported. These include stimulation of appetite and feed intake, immune modulation, improved endogenous digestive enzyme secretion, antibacterial, antiviral, antioxidant action and protection of gut micro flora. Several plants, like garlic, thyme, clove, anise, ginger, cinnamon, capsicum, curcuma etc. have been extensively reported in literature with all the above mentioned beneficial effects. In the present work we investigated the effect of a mixture of two oleoresins (OR) in broilers as a natural growth promoter with anticoccidial effect in challenged and non challenged chickens with coccidiosis.

MATERIALS AND METHODS

This trial was conducted at IIIA (International Institute of Animal Research) located in El Marqués, Querétaro, México at 1800 meters above sea level. A total of 1920 one d old broilers sex mixed from a commercial hatchery were used in a floor pen of 4 m². Four hundred and eighty broilers were trialed per treatment, 10 replicates per treatment were produced with 48 birds per replicate. Broilers were vaccinated against Marek Disease at d one and NCD at d 12 and 24 and against coccidia at day one (Coccivac®B Schering-Plough). At 14 d age coccidiosis challenge was done by Spray inoculation with a pool of Eimeria culture was used in a litter with 70% moisture. Each mL contained- *E. acervulina*: 300,000 oocysts, *E. maxima* 10,000 oocysts, *E. tenella* 10,000 oocysts Feeding program was divided in four different phases- starter (0-14 d), grower (15-28 d), finisher (29-42 d) and withdrawal (43-52 d) with 0.450, 1.50, 2.40 and 1.85 Kg of feed per bird respectively. The following four treatment were used- where NI: 125 PPM, NICARBAZINE, BA: 50 PPM BACITRACINE ZN, SA: 65 PPM, SALINOMYCIN, OR: 100 PPM OLEORESIN Body Weight Gain (BWG), Feed conversion ratio (FCR) and body weight (BW) were registered in two periods - 0 - 14 d old (Pre-Challenge) and 15 - 52 d old (Post-Challenge)

RESULTS AND CONCLUSION

Treatments (T2a and T2b) with OR showed better results than T1a and T1b for BWG (+8.2%), FCR (-5.5%) and BW (+6.9%), showing the positive effect on stimulating innate immunity on growth performance. T2a and T2b had similar BWG, FCR and BW, (P>0.7) confirming that vaccination did not affect growth performance without challenge. During the post-challenge period: T2a and T2b showed same BWG, FCR and final BW (p>0.7) as well as T1a and T1b (P>0.5). This demonstrated that OR with vaccination can maintain the performance of challenged birds at the same level as non challenged birds. BW in T2a and T2b was 3.7% higher than in T1a and T1b, suggesting that using PF during the whole growing period improved final BW of birds. The present study clearly shows that plant oleoresins can be excellent tools to improve performance in pre and post challenge periods and also can be included in coccidia vaccine program.

REFERENCES

1. Kim D.K, H.S Lillehoj y D. Bravo, Abst. Poult.Sci. 2009.
2. Mackling K.S y J.B Hess. Abst. Poult. Sci. 2009.
3. Reisinger N, Steiner T y TJ Applegate. Abst. Poult. Sci 2009.
4. Ricke, et al.. Poultry Sci. 84, 667-675. 2005.
5. Zentek y Mader,. Word Nutrition Forum. Biomin Sept 7th-8th. Pp 75-86. 2006,
6. Sivropoulou A, et.al.. J. Agric. Food Chem. 44, 1202 – 2205.1996.
7. Hammer KA, et.al.. J. Appl. Microbiol. 86, 985 – 990. 1999.
8. Chami N, et.al.. Oral Microbiol. Immunol. 20, 106 – 111. 2005.

Table 1. Different treatments.

TREAT	VACCINATED	CHALLENGED	0-14 d	15-28 d	29- 42 d	43- 52 d
T1 a	NO	NO	NI + BA		SA+BA	
T1 b	NO	YES	NI + BA		SA+ BA	
T2 a	NO	NO	OR		OR	
T2 b	YES	YES	OR		OR	

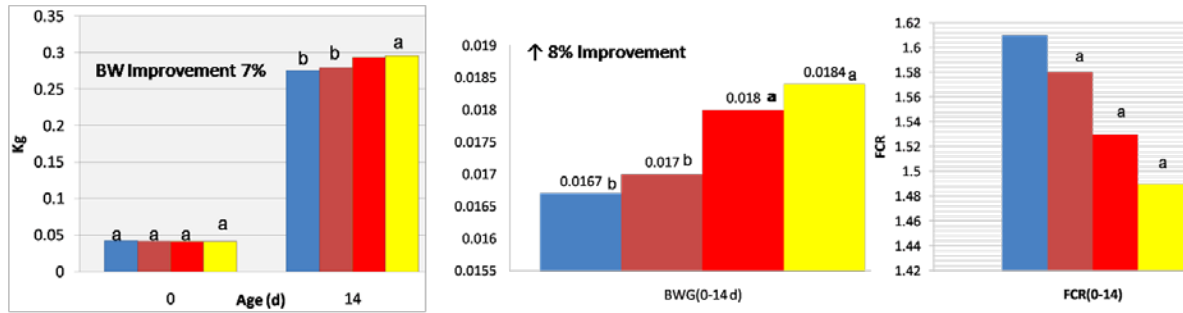


Figure 1a Graphs showing different zootechnical parameters under 4 different treatments in prechallenge (0-14 days old) broilers

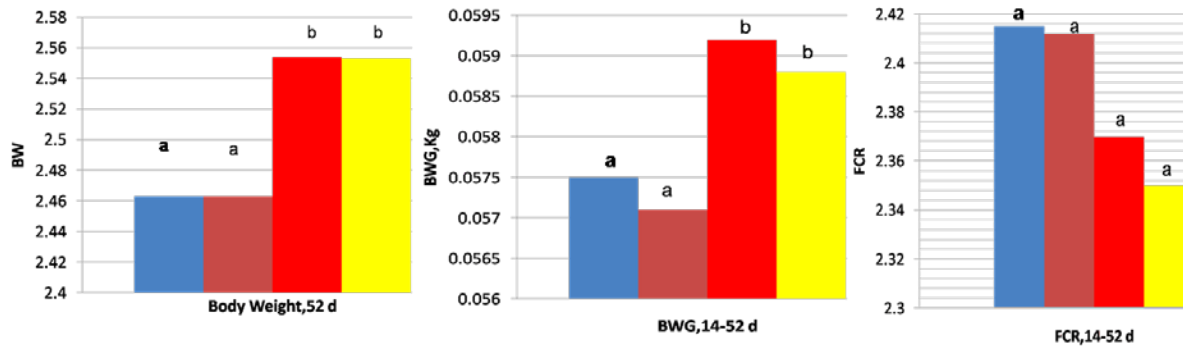


Figure 1b Graphs Showing different zootechnical parameters under 4 different treatments in postchallenge (14-52 days old) broilers
Means with different literals are different P<0.05

■ T1 a ■ T1b ■ T2a ■ T2b

APPLICATIONS FOR A NOVEL COMMERCIAL FOWL ADENOVIRUS (FAdV) ELISA TEST KIT

APLICACIONES EN CAMPO PARA UN KIT DE LA PRUEBA DE ELISA PARA EL ADENOVIRUS DE LAS AVES DOMÉSTICAS (FADV)

R. Monleon^A, G. Slacum^B, and B. van Leerdam^A

^ABioChek B.V., Fokkerstraat 14, 2811 ER Reeuwijk, The Netherlands

^BBioChek USA Corp., 3 Southgate Road, Scarborough, ME 04074, USA

RESUMEN

El adenovirus de las aves domésticas (FadV) es un Adenovirus Grupo 1 que pertenece a uno de los tres géneros de la familia Adenoviridae. Son ubicuos alrededor del mundo, infectan una amplia gama de especies y producen patologías en pollos como la hepatitis con cuerpos de inclusión, síndrome de hepatitis con cuerpos de inclusión/hidropericardio y erosiones en la molleja. Los síntomas clínicos incluyen postración, depresión, anorexia y lesiones incluyendo hepatitis, hidropericardio, nefritis y erosiones en la molleja entre otros. La enfermedad frecuentemente se manifiesta con una alta mortalidad y una alta morbilidad. La virulencia es específica de cada cepa y muy variable. El diagnóstico ha sido tradicionalmente apoyado por histopatología, seroneutralización, aislamiento viral y herramientas moleculares (por ejemplo PCR y secuenciación). A través de los años, ELISA ha sido propuesta como una alternativa adecuada dentro de ciertas condiciones; sin embargo, pocos kits de pruebas comerciales han estado disponibles a nivel mundial. En este trabajo se presentarán aplicaciones de campo para un nuevo kit comercial de la prueba de ELISA para el FadV en una amplia gama de escenarios como exploración en animales libres de patógenos específicos (SPF), seroconversión natural e inducida, monitoreo de vacunación e infecciones de campo.

SUMMARY

Fowl adenoviruses (FAdV) are Group I Aviadenovirus, belonging to one of the three genus of the family Adenoviridae. They are ubiquitous around the world infecting a wide array of species, and produce economic damage with pathologies in chickens such as inclusion body hepatitis, hepatitis-hydropericardium syndrome and gizzard erosions. Clinical symptoms include prostration, depression, anorexia, and lesions that include hepatitis, hydropericardium, nephritis, and gizzard erosions among others. The disease often manifests itself with high morbidity and high mortality. Virulence is strain specific and very variable. Diagnosis has been traditionally supported by histopathology, serum neutralization test, virus isolation, and molecular tools (i.e. PCR and sequencing). Over the years, ELISA has been proposed as a suitable alternative within certain conditions; however few commercial test kits have been made available worldwide. Recently a novel FAdV ELISA test kit (Biochek B.V., Reeuwijk, The Netherlands) has become commercially available. To demonstrate the range of applications of this test, samples were collected from four differently expected serological groups: specific pathogen free (SPF), naturally exposed (NE), vaccinated (V), and clinically affected chickens (CA). Results showed various degrees of variation on titer values between serological groups (SPF, NE, V, CA). Interpretation of these variations suggest that this novel FAdV ELISA test kit can be successfully used for a range of applications such as specific pathogen free screening, monitoring of natural sero-conversion, monitoring of vaccination, and presumptive diagnosis of clinical outbreaks.

The detailed results will be discussed during the presentation.

EFFECTO DEL USO DE GENTAMICINA EN COMBINACIÓN CON VACUNA CONTRA LA ENFERMEDAD DE MAREK EN POLLITOS DE UN DÍA DE EDAD

EFFECT OF GENTAMICIN ON THE VACCINE AGAINST MAREK'S DISEASE IN CHICKENS VACCINATED AT ONE DAY OF AGE

L. Montesinos^A, N. Ledesma^A, R. Alonso^B, Á. Aguilar^C y F. Ríos^D

^ADepartamento de Medicina y Zootecnia de Aves, FMVZ- UNAM, Distrito Federal, México

^BDepartamento de Genética y Bioestadística, FMVZ-UNAM, Distrito Federal, México

^CUnidad de Investigación Médica en Inmunología, Hospital de Pediatría, Centro Médico Nacional Siglo XXI, Instituto Mexicano del Seguro Social, Distrito Federal, México

^DMSD Salud Animal, Estado de México, México

SUMMARY

In commercial poultry, it is common to use an antibiotic gentamicin administration in combination with Marek's disease vaccine, as well as the use of half doses of the vaccine. There is inconsistency in the scientific literature regarding the action of this antibiotic on Marek's vaccine, since some authors refer that gentamicin does not affect the vaccine titers, while others mention that it does. This project, investigated the vaccinal virus presence and its concentration in feathers collected at 14, 21 and 28 d post- vaccination from broilers vaccinated at one d old. Two types of vaccines were used; serotype 1 vaccine and bivalent vaccine with serotype 2 and serotype 3, from which only serotype 3 was evaluated. The results indicated that both vaccines group which had a smaller number of positive samples, a further delay in the maximum value of the relative concentration of viral DNA or a lower relative concentration of viral DNA was the group of half dose with gentamicin, because of this, the broiler can be susceptible to a field virus.

RESUMEN

En la avicultura comercial es común la administración del antibiótico gentamicina en combinación con vacuna contra la enfermedad de Marek al igual que el uso de medias dosis de vacuna. Existe inconsistencia en la publicaciones científicas respecto a la acción de este antibiótico sobre la vacuna de Marek, ya que algunos autores mencionan que la gentamicina no afecta el título de la vacuna mientras otros mencionan que si lo hace. En el presente estudio se determinó la presencia del virus vacunal y su concentración de plumas colectadas a los días 14, 21 y 28 post-vacunación de aves de engorda vacunadas al día de edad, se emplearon 2 vacunas; vacuna conteniendo el serotipo 1 y vacuna bivalente conteniendo serotipo 2 y serotipo 3. De esta última solo se evaluó el serotipo 3. Los resultados obtenidos en ambas vacunas indicaron que el grupo en el cual se presentó un menor número de muestras positivas, un mayor retraso en alcanzar el valor máximo de la concentración relativa de ADN viral o bien una menor concentración relativa de ADN viral fue el grupo de media dosis con gentamicina, por lo que el ave pudiera estar susceptible a la infección por virus de campo.

La enfermedad de Marek (EM) es causada por un Herpesvirus altamente contagioso, asociado a células y oncogénico. Su distribución es mundial. En aves susceptibles y expuestas al virus de la enfermedad de Marek (VEM) puede resultar en un debilitamiento progresivo llevando a una alta mortalidad, baja en la producción del huevo e inmunodepresión (1).

La eliminación del virus es mediante descamaciones cutáneas de aves infectadas formando una parte muy importante del polvo dentro de las casetas avícolas por lo que su eliminación del ambiente es muy difícil, debido a esto la vacunación se utiliza como la mejor estrategia de control de esta enfermedad (2).

Entre las posibles causas de fallas en la vacunación se menciona a la combinación de antibióticos con la vacuna contra enfermedad de Marek. Petrone *et al.* (3) menciona a la gentamicina como un antibiótico que disminuye la viabilidad de la vacuna contra EM. Mientras que Gimeno (4) menciona a la gentamicina, oxitetraciclina, eritromicina y clorotetraciclina como antibióticos capaces de inactivar al virus vacunal e inutilizar la

vacuna. Sin embargo existen otras publicaciones en las que el empleo de gentamicina no reporta un efecto negativo sobre el título de la vacuna (5, 6). Por lo que no queda del todo claro si la gentamicina afecta o no al virus vacunal.

En el presente estudio se planea evaluar el efecto *in vivo* de la gentamicina sobre la vacuna contra enfermedad de Marek en dosis completa y media dosis, evaluando la concentración de ADN del virus vacunal presente en la pulpa de la pluma mediante técnica de PCR en tiempo real. Se emplearon muestras de pluma debido a que es donde el virus de Marek termina su ciclo en el huésped y por la relación que existe entre la concentraciones de ADN viral vacunal con protección contra virus de campo.

MATERIAL Y MÉTODOS

Se emplearon 90 aves comerciales Ross 308 de un día de edad. Se utilizaron 2 vacunas comerciales, una conteniendo el serotipo 1 y otra bivalente recombinante conteniendo los serotipos 2 y 3.

Las aves fueron divididas en cuatro grupos de 10 individuos para cada una de las vacunas y 10 aves más como control negativo. Los tratamientos fueron los siguientes: Dosis completa de vacuna contra la enfermedad de Marek (DC), media dosis de vacuna contra la enfermedad de MD, dosis completa de vacuna contra la enfermedad de Marek con sulfato de gentamicina (DC+G) y media dosis de vacuna contra la enfermedad de Marek con sulfato de gentamicina (MD+G).

Cada grupo fue vacunado al día de edad vía subcutánea (región posterior en el tercio medio del cuello), 0.2 mL a los grupos de dosis completa y 0.1 mL a los grupos de media dosis, los grupos con gentamicina a una dosis de 0.25 mg/ave. Posteriormente a los tiempos de 14, 21 y 28 días post-vacunación fueron tomadas cuatro plumas de la región del húmero, conservándolas a -20°C hasta su procesamiento.

Extracción del ADN. La extracción del ADN a partir de pluma fue mediante modificación de la técnica de Higuchi *et al* (7).

PCR Tiempo Real. Los iniciadores empleados fueron las siguientes:

Serotipo 1: Región Meq

F: 5'-GGAGCCGGAGAGGCTTTATG-3'

R: 5'-ATCTGGCCCGAATACAAGGAA-3'

Serotipo 3: Región SORF1

F: 5'-GGCAGACACCGCGTTGTAT-3'

R: 5'-TGTCCACGCTCGAGACTATCC-3'

Colágena pollo $\alpha 2$ (IV)

F: 5'-GGGAAGTGGAGAACCCAATTTT-3'

R: 5'-CGTGCCGCTGTCTCTACCAT-3'

Las sondas empleadas fueron las siguientes:

Serotipo 1: Región Meq:

5'(FAM)CGTCTTACCGAGGATCCCGAACAGG(BHQ-1)3'

Serotipo 3: Región SORF1:

5'(FAM)AACCCGGGCTTGTGGACGTCTTC(BHQ-1)3'

Colágena pollo $\alpha 2$ (IV):

5'(HEX)CCCTTAAGTGGAGTTCAGCTACTGCAG (BHQ-1)3'

El volumen final por reacción para el PCR-TR fue de 20 μ L, conteniendo 10 μ L de la muestra a analizar y 10 μ L del master mix. Los componentes del master mix por reacción fueron los siguientes: buffer Taq Polimerasa 1X, dNTP's 0.2mm, MgCl₂ 3mm, iniciadores F+R del virus 0.5 μ m, sonda del virus 0.1 μ m, iniciadores F+R del gen de referencia (colágena pollo $\alpha 2$) 0.5 μ m, sonda del gen de referencia 0.1 μ m, Taq polimerasa 1u, agua cpb 10 μ L. En el caso de la vacuna monovalente se analizó el serotipo 1 y en el caso de la vacuna bivalente solo se analizó el serotipo 3.

La amplificación-detección del ADN se llevó a cabo en termociclador de PCR-TR (Corbett Rotor-Gene 6000) con la siguiente programación: 95°C por 10 min, 40 ciclos de 95°C por 15 segundos y 60°C por 45 segundos.

Se llevó a cabo la cuantificación relativa a partir de las concentraciones de ADN detectadas por el programa del equipo del PCR-TR. Para la obtención de las concentraciones de ADN presente en la muestra se empleó el método de la curva estándar.

RESULTADOS

En la vacuna serotipo 1. En el muestreo a los 14 y 21 días el grupo con menor número de muestras positivas fue el de media dosis con gentamicina, encontrándose diferencia estadísticamente significativa respecto a los demás

grupos mediante prueba de ANOVA. (Cuadro 1). Los grupos que presentaron la media aritmética con los valores más bajos de concentración relativa de ADN viral en el muestreo a los 14 días fueron los grupos de media dosis y media dosis con gentamicina siendo sus valores de 0.14205 y 0.0503 respectivamente, sin encontrarse diferencia estadísticamente significativa. La fecha de muestreo en la cual se encontró el valor máximo de la media aritmética de la concentración relativa de ADN viral fue para el grupo de dosis completa y dosis completa con gentamicina a los 14 días, en el grupo de media dosis a los 21 días y en el grupo de media dosis con gentamicina a los 28 días.

En la vacuna bivalente únicamente se analizó el serotipo 3. En todos los muestreos el grupo con menor número de muestras positivas fue el de media dosis con gentamicina, encontrándose diferencia estadísticamente significativa mediante prueba de ANOVA en los muestreos a los 21 y 28 días (Cuadro 2). El grupo que presentó la media aritmética con los valores más bajos de concentración relativa de ADN viral en todos los muestreos fue el de media dosis con gentamicina, sin embargo, no se encontró diferencia estadísticamente significativa. Los valores máximos encontrados de las medias aritméticas de la concentración relativa de ADN viral fue para el grupo de dosis completa de 0.00005058 en el muestreo a los 21 días, en el grupo de media dosis de 0.00012803 en el muestreo a los 28 días, para el grupo de dosis completa con gentamicina de 0.00012973 en el muestreo a los 28 días y para el grupo de media dosis con gentamicina de 0.00001593 a los 28 días (Cuadro 2).

DISCUSIÓN

Vacuna serotipo 1. En un estudio realizado por Baigent *et al.* (8) demostró que al diluir una vacuna contra la EM se disminuye la concentración del virus vacunal presente en muestras de pluma y estas aves con una menor concentración de virus vacunal en pluma presentaron mayor mortalidad ante un desafío por virus de campo. En el presente estudio los grupos que obtuvieron en el muestreo a los 14 días su valor más alto de media aritmética de la concentración relativa de ADN viral fue el de dosis completa y dosis completa con gentamicina, significando esto, que la gentamicina por sí sola en dosis completa no parece afectar la viabilidad de la vacuna. El grupo de media dosis tuvo su valor máximo de media aritmética a los 21 días, este retraso de una semana en relación a los grupos de dosis completa y dosis completa con gentamicina indica que por sí solo el hecho de aplicar media dosis vacunal afecta directamente en la cantidad de virus presente en el folículo de la pluma.

Vacuna bivalente. En un estudio realizado por Islam y Walkden-Brown (9) estimaron la excreción del ADN del serotipo 3 de aves inmunizadas con vacuna bivalente (serotipos 2 y 3) en la incubadora, reportando que la concentración máxima del ADN viral del serotipo 3 se encuentra alrededor del día 28 post-vacunación. En el presente estudio, los grupos que mostraron una cinética similar fueron los grupos de media dosis y dosis completa con gentamicina. El grupo de dosis completa mostro valores en la concentración de ADN viral por debajo de lo esperado, a diferencia de lo encontrado en la vacuna del serotipo 1, en cada uno de los muestreos su media aritmética estuvo debajo de los grupos de dosis completa con gentamicina y media dosis, sin embargo no se encontró diferencia estadísticamente significativa. El grupo de media dosis con gentamicina al igual que en la vacuna de serotipo 1, fue el grupo que mostró la menor cantidad en la concentración de ADN viral y además fue el grupo que presentó una menor cantidad de muestras positivas, encontrándose diferencias estadísticamente significativas mediante prueba ANOVA en los muestreos a los 21 y 28 días, lo que sugiere mayor susceptibilidad a desafío por virus de campo. En este caso aparentemente el uso de la gentamicina por sí solo no está afectando la excreción del virus vacunal, sin embargo su combinación con la administración de medias dosis indica lo contrario.

CONCLUSIÓN

La administración del antibiótico gentamicina en combinación con media dosis de vacuna es una práctica que debe evitarse debido a los efectos negativos sobre la vacunación contra la enfermedad de Marek. En el caso de que se desee aplicar un antibiótico en combinación con una vacuna debe confirmarse primero que existan estudios de laboratorio y de campo que avalen su eficacia sin interferir con la efectividad de la vacuna.

REFERENCIAS

1. Sharma JM. Marek's disease. En Swayne DE, Glisson JR, Jackwood, Pearson JE, Reed WM. A laboratory manual for the isolation and identification of avian pathogens. 4ta edición. Kennet Square, Pennsylvania. EU: American Association of Avian Pathologists, 1998: 116-124.
2. Nair V. Evolution of Marek's disease – A paradigm for incessant race between the pathogen and the host. *The Veterinary Journal*. 2005. 170: 175-183.
3. Petrone GV, Hernández VX, Téllez IG. Enfermedad de Marek. *Vet. Méx.* 2000. 31 (4), 355-369.

4. Gimeno IM. Actualidades en el control de la enfermedad de Marek. Asociación Española de Ciencia Avícola. World's Poultry Science Association. Disponible en URL: www.wpsa-aeca.es/aeca_imgs_docs/04_10_37_GIMENO.pdf.

5. Eidson CS, Page RK, Kleven SH. *In vivo* and *in vitro* studies on the effect of gentamicin sulfate on the efficacy of the turkey herpesvirus vaccine. *Poult. Sci.* 1978; 57(6):1519-1525.

6. Chacón JL, Pimentel M, Pedroso A, Ferreira AJP, Martínez D, Ruelas C. Evaluación *in vitro* del efecto de ceftiofur sódico y de una nueva formulación de sulfato de gentamicina sobre la viabilidad del virus de la enfermedad de Marek. XX Congreso Latinoamericano de Avicultura. Brasil. 2007.

7. Higuchi R, von Beroldingen C, Sensabaugh GF, Erlich HA. DNA typing from single hairs. *Nature.* 1988; 332, 543-546.

8. Baigent SJ, Smith LP, Currie RJW, Nair VK. Correlation of Marek's disease herpesvirus vaccine genome load in feather tips with protection, using an experimental challenge model. *Avian Pathol.* 2009; 36:6, 467-474.

9. Islam A, Walkden-Brown SW. Quantitative profiling of the shedding rate of the three Marek's disease virus (MDV) serotypes reveals that challenge with virulent MDV markedly increases shedding of vaccinal viruses. *J. Gen. Virol.* 2007; 88, 2121-2128.

Cuadro 1. Porcentaje de muestras positivas de vacuna serotipo 1 y análisis de varianza entre grupos.

	Muestreo 14 días	Muestreo 21 días	Muestreo 28 días
Grupo	% muestras positivas	% muestras positivas	% muestras positivas
DC	90 ^{a*}	90 ^a	90 ^a
MD	70 ^a	88.8 ^a	90 ^a
DC+G	90 ^a	70 ^{ab}	80 ^a
MD+G	20 ^b	40 ^b	90 ^a

DC (dosis completa), MD (media dosis), DC+G (dosis completa con gentamicina), MD+G (media dosis con gentamicina)

*Literales diferentes indican diferencia estadísticamente significativa. $p \leq 0.05$

Cuadro 2. Porcentaje de muestras positivas de vacuna bivalente (serotipo 3) y análisis de varianza entre grupos.

	Muestreo 14 días	Muestreo 21 días	Muestreo 28 días
Grupo	% muestras positivas	% muestras positivas	% muestras positivas
DC	40 ^{a*}	50 ^{ab}	100 ^a
MD	20 ^a	60 ^a	80 ^a
DC+G	50 ^a	70 ^a	75 ^a
MD+G	10 ^a	10 ^b	30 ^b

DC (dosis completa), MD (media dosis), DC+G (dosis completa con gentamicina), MD+G (media dosis con gentamicina)

*Literales diferentes indican diferencia estadísticamente significativa. $p \leq 0.05$

USE OF ARTIFICIAL NEURAL NETWORKS TO CLASSIFY THE PATHOGENICITY OF AVIAN PATHOGENIC *ESCHERICHIA COLI*

EL USO DE REDES NEURONALES ARTIFICIALES PARA CLASIFICAR LA PATOGENICIDAD DE *ESCHERICHIA COLI* AVIAR PATÓGENA

T. Moreira Tejkowski^A, B. Guimarães de Brito^B, S. Luis da Silveira Rocha^A, G. Fonseca de Souza^A,
H. Luiz de Souza Moraes^A, and C. Tadeu Pippi Salle^A

^ACenter of Diagnosis and Research in Avian Pathology (CDPA), Veterinary Faculty, Federal University of Rio Grande do Sul, Porto Alegre, Brazil; thiago.mt@veterinario.med.br

^BVeterinary Research Institute Desidério Finamor, Eldorado do Sul, RS, Brazil; benitobrito@gmail.com

RESUMEN

Las Redes Neuronales Artificiales (ANN) han demostrado ser una herramienta de gran alcance para una amplia gama de aplicaciones. En este trabajo, el enfoque en las aplicaciones de ANN es en la predicción (índice de 0 a 10) de la patogenicidad de los aislamientos de *Escherichia coli* aviar patógena (APEC). En 489 aislamientos de APEC se analizaron: 38 genes asociados con la virulencia, el índice de patogenicidad (PI) in vivo y la motilidad de las cepas. Se contruyeron dos ANNs utilizando el software NeuroShell clasificador. Se utilizó como capa de entrada, información acerca de la presencia o ausencia de los 38 genes asociados con la virulencia y la motilidad de cada una de las muestras, con una capa de salida formada por un PI previamente determinado in vivo. Los ANNs mostraron una correcta clasificación de PI por encima de 90 %, siendo que la red 1 tenía una calificación de 91,62 % y la red 2 de 99,03 %. Esto demuestra que el método propuesto puede eliminar la inoculación de los animales en el futuro.

SUMMARY

Artificial Neural Networks (ANN) has shown to be a powerful tool for a wide range of applications. In this paper, the focus on ANN applications is on the prediction (index of 0-10) of the pathogenicity of isolates avian pathogenic *Escherichia coli* (APEC). Four hundred eighty nine APEC isolates were analyzed: 38 virulence-associated genes, the Pathogenicity Index (PI) *in vivo* and motility of the strains. Two ANNs were constructed using the software Neuroshell Classifier. We used as input layer, information about the presence or absence of the 38 virulence-associated genes and the motility of each of the samples, with an output layer formed by a previously-determined PI in vivo. The ANNs showed a correct classification of the PI above of 90%, being that the network 1 had a rating of 91.62% and the network 2 of 99.03%. This demonstrates that the method proposed may eliminate the inoculation of animals in the future.

INTRODUCTION

There is no denying the significant presence that *E. coli* has in the poultry industry. We know that economic losses measured to date are far from the realities on the field, and present very significant revenue losses. Barnes *et al.* reported that APEC are the cause of extraintestinal diseases in birds (1). It has been reported that only specific strains of *E. coli* are endowed with virulence factors, allowing them to cause disease (2). This disease manifests itself as localized or systemic infections, so-called colibacillosis, as highlighted by Barnes *et al.* (1).

The virulence mechanisms of APEC isolates have been continuously studied and it is supposed that they are of multifactorial cause. Molecular biology has helped us to better understand the mechanisms of the pathogenicity of *E. coli*, and increasingly, it has demonstrated the great importance of the interaction of several virulence factors in the determining of pathogenicity. Delicato *et al.* and Ewers *et al.* showed that the factors most frequently associated with pathogenicity include: fimbriae adhesion F1 and Tsh (Temperature-sensitive hemagglutinin); the system siderophore aerobactin, which enables the capture of Fe³⁺ by the bacteria in poor tissues of this ion; the Iss protein (Increased serum survival), purportedly involved in resistance to serum bactericidal effect; the capsule K and the production of colicin V (2,3)..

Salle *et al.* showed that the difficulty regarding the *E. coli* is in their classification as pathogenic (7); the differentiation between pathogenic and apathogenic strains remains a problem after the bacteriological diagnosis

and, consequently, in decision-making by the field veterinarian. Most likely this still occurs because of the complex interactions that exist between the virulence factors of *E. coli* and the fact that conventional procedures used to determine the pathogenicity of *E. coli*, in which animals are inoculated, are time-consuming, expensive and ethically-challenged by the international community.

We believe that one of the tools with the potential to aid in the resolution of ethical problems involving the use of animals, as well as the ability to establish a diagnosis that includes the pathogenicity index of *E. coli*, is the use of mathematical modeling, particularly artificial neural networks. The objective of this paper is to show that it is possible to perform pathogenicity prediction through the use of artificial neural networks – without using animals – and, thus, provide field veterinarians with reports that include the degree of pathogenicity of isolates, in order to enable their decisions to be more objective and accurate.

MATERIALS AND METHODS

Database. In this study, 487 APEC isolates were analyzed for the presence of genes responsible for adhesion capacity (*afa/draB*, *crl*, *fimC*, *fimH*, *hra*, *iha*, *papC*, *papG*, *sfa/focC*, *tsh*, *mat e felA*), invasins (*gimB*, *ibeA*, *tia e cvaC*), iron acquisition (*chuA*, *fyuA*, *ireA*, *ironA*, *irp2*, *iucD*, *sitD chr*, *SitD ep e iutA*), serum resistance (*cvi/cva*, *iss*, *neuC*, *kpsMT II*, *ompA e traT*), toxins (*astA*, *cnf1/2*, *sat*, *vat e hlyA*), a serin protease autotransporter (*pic*) and a pathogenicity-associated island marker CFT073 (*malX*). All the genes were studied by six multiplex-PCR protocols, where the presence of 33 genes was investigated in accordance with four multiplex-PCR protocols developed by Ewers *et al.*, three genes were investigated by the multiplex-PCR of the Rocha (2008), and the *fimH* and *papG* genes were investigated by a multiplex-PCR developed by the CDPA (4). The reaction mixture of this multiplex is 25 μ L, including 2.5 μ L 10X PCR buffer, 1.25 μ L 2,5mM MgCl₂, 1,5U Taq DNA polymerase, 0,5 μ L of each 2,5 mM dNTP, 2 μ L (20 pmol) oligonucleotide primer pair and 5 μ L template DNA, supplemented with appropriate volumes of Mili-Q water. In addition, each APEC strain was classified according to its pathogenicity index (PI) *in vivo* (0-10) developed by Souza and motility according Seeley *et al* (8).

Artificial Neural Network (ANN). An ANN was constructed using the software Neuroshell Classifier 2.1 (Ward Systems Group, Inc., Frederick, MD, USA) in two distinct phases: training and validation. Because the 487 APEC strains have shown different PIs in the *in vivo* test, we decided to choose 28 random samples per PI, in order to build a network with the same number of strains per index, a total of 308 samples. The network shown is constituted by an input layer which includes information about the presence or absence of the 38 virulence-associated genes and the motility of each of the strains, with an output layer formed by predetermined PI *in vivo*. We have called “input layer” the set of variables presented for model calculation and “output layer” the variable to be predicted.

RESULTS AND DISCUSSION

For a better understanding of the presented model, we determined sensitivity as "the ratio of true positives" and specificity as "the ratio of true negatives". The results of our study were surprising: the ANN constructed to determine the IP of 0-10 showed a correct classification of 99.03%, a specificity greater than 99.64% in all categories and a sensitivity in 9 of the 11 categories of 100%, and to PI 2 and PI 10, a sensitivity of 96.43% and 92.86%, respectively. Rocha developed three ANNs with the use of seven virulence-associated genes to perform the prediction and classification of the pathogenicity of 293 *E. coli* strains (6). The results obtained were: 54.27% accuracy in the network 1, which used 11 categories of PI (0-10); 80.55% accuracy in the network 2, which used three categories of PI (apathogenic/low pathogenicity (0-3.99), intermediate pathogenicity (4-6.99), high pathogenicity (7-10); and 83.96% accuracy in the network 3, with only two categories of PI (apathogenic/low pathogenicity (0-3,99) and pathogenicity intermediate/high pathogenicity (4-10).

This tool is of greater importance, when you consider the experience of veterinarians who work in the field, who, in general, are only offered the name of the bacteria and possibly an antibiogram in laboratory tests. Thus, the various technologies represented by the molecular biology, in this case the PCR assays, have remained limited to laboratories and have not represented a useful tool for field work. On top of that, a greater resistance to the use of animals in experimental models completes the setting. Therefore, the offer of a decision-making support method to poultry veterinarians will bring reflections on the cost/benefit ratio of drug treatments, particularly in reducing antimicrobial resistance and residues of those drugs in meat and eggs.

CONCLUSION

By reaching correct classification percentages higher than 99%, the method proposed here is able to predict the pathogenicity of the APEC strains. The characteristics of this model allow the classification of APEC isolates pathogenicity with a good degree of reliability, considering the sensitivity and the specificity.

FINANCIAL SUPPORT

CNPq (National Council for Scientific and Technological Development).

REFERENCES

1. Barnes, H. J.; Nolan, L. K.; Vaillancourt, J. P. (2008) Colibacillosis. In. *Diseases of Poultry*. 12th ed. Ed. Blackwell Publishing Professional. pp. 691-738.
2. Delicato E. R., De Brito B. G., Gaziri L. C., Vidotto M. C. (2003) Virulence-associated genes in *Escherichia coli* isolates from poultry with colibacillosis. *Veterinarian Microbiology*, 94: pp. 97-103.
3. Ewers, C., Janssen, T., Kiessling, S., Philipp, H. C. & Wieler, L. H. (2004) Molecular epidemiology of avian pathogenic *Escherichia coli* (APEC) isolated from colisepticemia in poultry. *Veterinarian Microbiology*, 104, pp. 91-10.
4. Ewers, C., Li, G., Wilking, H., Kiessling, S., Alt, K., Antao, E. M., Lanturnus, C., Diehl, I., Glodde, S., Homeier, T., Bohnke, U., Steinruck, H., Philipp, H. C. & Wieler, L. H. (2007) Avian pathogenic, uropathogenic, and newborn meningitis-causing *Escherichia coli*: how closely related are they? *International Journal of Medical Microbiology*, 297 (3): pp. 163-176.
5. Rocha, A. C. G. P. (2006) Utilização de Inteligência artificial (redes neurais artificiais) para classificação de patogenicidade de amostras de *Escherichia coli* isoladas de frangos de corte. Tese (*Doutorado em Ciências Veterinárias*), Universidade Federal do Rio Grande do Sul.
6. Rocha, S. L. S. (2008) Detecção de fatores de virulência de amostras de *Escherichia coli* isoladas de granjas avícolas do RS através do Multiplex-PCR. Dissertação (*Mestrado em Ciências Veterinárias*), Universidade Federal do Rio Grande do Sul.
7. Salle, C. T. P.; Rocha, A. C. G. P.; Souza, G. F.; Salle, F. O.; Moraes, L. B.; Nascimento, V. P.; Moraes, H. L. S. (2011) Use of Artificial Intelligence (Artificial Neural Networks) to classify the pathogenicity of *Escherichia coli* isolates from broilers. *60th Western Poultry Disease Conference*, March 20-23, Sacramento, Ca, USA.
- Seeley, J. R., H. W.; Vandermark, P. J.; Lee, J. J. (1991) *Microbes in action. A Laboratory Manual of Microbiology*, 4 th ed. New York: W H. *Freeman and Company*.
8. Souza, G. F. (2006) Estabelecimento de uma nova metodologia para cálculo do índice de patogenicidade em amostras de *Escherichia coli* provenientes da produção de frangos de corte. Porto Alegre: UFRGS. Dissertação (*Mestrado em Ciências Veterinárias*), Faculdade de Veterinária, Universidade Federal do Rio Grande do Sul.

RATIONAL REDUCTION IN ANTIBIOTIC DEPENDENCE BY TOTAL *MYCOPLASMA* CONTROL

REDUCCIÓN RACIONAL EN LA DEPENDENCIA DE LOS ANTIBIÓTICOS POR CONTROL TOTAL DE *MICOPLASMA*

C.J. Morrow

Bioproperties, 36 Charter St, Ringwood, Vic. 3134 Australia

Corresponding author: chris.morrow@bioproperties.com.au

RESUMEN

Se pueden producir pollos de engorda sin infección vertical de MG y MS sin la necesidad de regímenes de antibióticos de rutina, en especial de medicamentos en el período de 18 a 22 d. Esto también permite la utilización de vacunas respiratorias más fuertes (La Sota por ejemplo). La transmisión horizontal en los pollos de engorda no parece ser lo suficientemente potente como para requerir antibióticos de rutina. Las gallinas de postura, especialmente las que se crían en jaulas, también pueden tener reducciones masivas en la dependencia de los antibióticos por el control de MG y MS. Esto ayudará a maximizar el rendimiento biológico y satisfacer las demandas emergentes de los clientes. Donde la libertad no es práctica para MG y MS, la vacunación contra micoplasma de reproductoras y gallinas de postura se ha utilizado con ts-11 y vacunas MSH. Otros beneficios incluyen expresiones menos complicadas de diversos virus (virus de influenza aviar, enfermedad de Newcastle, APMV y IBV) y las infecciones bacterianas (coriza y cólera aviar), pero es posible la aparición de la enfermedad clínica de *Brachyspira*.

SUMMARY

Broilers without vertical contamination with MG and MS can be produced without the need for routine antibiotic regimes, especially medication in the 18 to 22 d period. This also allows stronger respiratory vaccines (La Sota for example) to be used. Horizontal transmission to broilers does not seem to be potent enough to require routine antibiotics. Layers, especially cage layers can also have massive reductions in antibiotic dependence by control of MG and MS. This will help maximize biological performance and meet emerging customer demands. Other benefits include less complicated expressions of various viral (AIV, NDV, APMV and IBV) and bacterial co-infections (coryza and fowl cholera) but without antibiotics there maybe the emergence of clinical *Brachyspira* disease. Where freedom by exclusion only is not practical mycoplasma vaccination of breeders and layers with ts-11 and MSH vaccines can be used.

INTRODUCTION

The simplest approach to decrease dependence on routine antibiotic regimes in animal production is to implement alternative methods to control the bacterial challenges that the antibiotics are modulating (and not look at antibiotics as non-specific production enhancers). The chronic nature of mycoplasma infections and vertical transmission in poultry are the reasons for the strategy of mycoplasma freedom but this is often very difficult to implement at the final production level due to scale, the need to source mycoplasma free stock, economic barriers, lack of insurance, existing infrastructure and practises, and/or current antibiotic usage. Mycoplasma freedom has a fundamental problem that the birds are totally susceptible to infection (and breaks may require culling).

Synergistic effects of mycoplasma infections with other “simple/uncomplicated” infections have been long recognised but perhaps forgotten (4). The chronic nature of mycoplasma infections in chickens and their propensity to make infections with NDV, IBV, AIV (especially H9), and APMV virus to trigger diseases has been demonstrated in laboratories. Indeed it is very hard in the laboratory to produce respiratory disease with *Mycoplasma synoviae* without adding respiratory viruses or vaccines. The effects of bacterial infections in chickens have also been potentiated by mycoplasma infections. In the field often many potential pathogens are present and can be identified but their role in disease is difficult to ascertain. For example, in broilers in Germany “cheesy broilers” (airsacculitis in the slaughter house) have been considered to be ORT for a long time but the potentiating

effect of MS has recently been considered. Thus improvement of mycoplasma status can be seen as a massive improvement in the overall health status of breeders, layers or broilers (by eliminating vertical transmission as no useful immunity is passed to the broilers).

A good example is the effect of LaSota NDV in broilers in the field. The use of LaSota at 10 d will need antibiotic administration at 18 d in mycoplasma positive chicks to dampen down post vaccinal reactions. Obviously here the antibiotics are not directly affecting the viral infection component. Similarly in long lived birds coryza and fowl cholera are more chronic in mycoplasma infected birds. These synergistic effects are seen with either MG and/or MS.

MG and MS field strain freedom has been successfully achieved by biosecurity in many areas including UK, USA, and NZ. Usually this has been in broiler segments although MG freedom in egg production units is seriously attempted in some areas. Some places have only effectively controlled MG including Israel, Iran, Brazil, Germany, France, the Netherlands and in the field by individual producers elsewhere. In some areas they have controlled MG by ts-11 vaccination of breeders (best if they are MG free as DOC). MG only control can lead to MS potentially causing problems. The MS status in many operations is hard to tell because of antibiotic usage especially in lay.

Mycoplasma vaccines that interfere with wild strain spread and maintenance will be more useful than ones that just ameliorate clinical signs (probably vaccines that induce mucosal immunity are more efficient than those predominately inducing humoral antibody). A useful way to look at the effects of these vaccines is that they increase the resistance of the birds to infection with field strains. If some producers are unwilling to participate in pathogen control programmes they can become significant pathogen reservoirs (example MS in layers). Because of the large scale of poultry units sterilizing effects (for example total prevention of vertical transmission) are more useful than reduction of vertical transmission (1). These live mycoplasma vaccines differed from previous generations of vaccines in that they can displace wild strains from farms; not always predicted in the laboratory where they can be overwhelmed in some challenge systems. Although vertical transmission of ts-11 has been suspected once it is not the usual experience with ts-11(2,1).

MATERIALS AND METHODS

MG and MS control by combined vaccination with ts-11 and MSH has been used in Australia, South Africa, Japan, Philippines, Argentina (layers only), and Indonesia. This strategy is particularly attractive as both mycoplasma infections have the same control strategy (antibiotic strategy for MS control may be incompatible with live vaccination for MG).

RESULTS AND DISCUSSION

In Australia the strategy to develop mycoplasmal vaccines was not an active decision to decrease antibiotic usage but a response to the emergence of tylosin resistance in MG in some large broiler integrations in the mid 1980s (7). The vaccines ts-11 (MG) and MSH (MS) have been used extensively in layers and breeders in Australia for the last twenty years and now most chickens (layers, breeders or broilers never have antibiotic at therapeutic levels even when *in ovo* vaccinated). Concurrently coryza was controlled by a vaccine; this vaccine is no longer available but coryza has not re-emerged as a big problem. Fowl cholera is still a problem on some sites especially those with earthen floors (layers and breeders) and emerging in free range layers. Control of fowl cholera in organic broilers has been done by vaccination with killed vaccine at day old and no antibiotics (6). Some other problems are re-emerging in free range layers including erysipelas and spotty liver disease.

A Japanese trial successfully controlled egg apical abnormality (EAA) and improved production parameters in layers by adding MSH to a vaccination programme already containing ts-11 (5). No antibiotic was used. This was more effective than predicted in a laboratory challenge trial presumably as the field challenge was lower (3).

In some areas where MG is effectively controlled by a freedom strategy the addition of MSH vaccination has a similar impact (Arkansas trial, EU, Mexico and Iran) allowing massive antibiotic reduction. F strain vaccination of breeders is not done in the USA and the addition of MSH to F strain could still see the vertical transmission of F strain and the continued need for antibiotics around the third week in the broiler progeny.

Mycoplasma vaccination with these live vaccines will only control mycoplasma infection and disease but clinicians in Australia, South Africa report that other infections behave more like uncomplicated diseases in mycoplasma vaccinated stock. During a field trial in Indonesia I saw a ts-11 and MSH vaccinated flock with an egg production drop associated with avian metapneumovirus (AMPV) seroconversion that had minimal other clinical effects and did not require antibiotic treatment.

As producers decrease antibiotic usage sometimes some previously unidentified problems can emerge. Most commonly egg production drops that responded to tylosin coming into lay may not be mycoplasma (in Argentina these egg drops responded to amoycillin in mycoplasma vaccinated birds). Avian intestinal spirochaetosis (*Brachyspira* spp.) infections will do this with little increase in mortality and mild diarrhoea (increased second quality eggs with caramel shell stains). Indeed I believe that until *Brachyspira* in poultry recognized in a country then little effective limitation of antibiotic use has been done in layers. Routine antibiotics may be controlling/suppressing mycoplasma, salmonella, *E. coli*, *Pasteurella*, *Avibacterium*, “spotty liver disease,” and other infections (see Table 1).

CONCLUSION

The potentiating effects of MG and MS infections on the impact of respiratory viruses (NDV, APMV and AIV) and bacterial respiratory diseases (coryza, EPEC, ORT and fowl cholera) are well recognized. Effective control of wild type mycoplasma infections offers chicken and egg producers great advantages in decreasing the need for antibiotics and the impact of these infections. Although antibiotics are initially effective at controlling mycoplasma and bacterial respiratory diseases in poultry, the development of resistance means that this is not sustainable even in the medium term. The best long term strategies for mycoplasma control in sites with potential challenge are live vaccines that are safe and prevent vertical transmission. It is important to have criteria for judging success of mycoplasma control programme and realize that vaccination must take into account antibiotic interventions and other interactions. These criteria will include biological and economic parameters. The most important criteria for successful mycoplasma control in breeder operations is the ability of the next generation to be reared without routine antimycoplasmal antibiotics at d 18 to 23.

See <http://www.bioproperties.com.au/vaccines/documents/DOC-Bulletin-2012-01.pdf>

Increasingly, customers have an expectation that routine medication with antibiotics will not be used in the production of their food. In the Australian egg and poultry industries, MG and MS vaccination facilitated this aim on a country wide scale. Control of all the bacteria that had previously necessitated routine antibiotic administration was the final piece in the puzzle (often MS being the last) for these industries to really come of age and wean themselves from routine administration of antibiotics.

REFERENCES

1. Barbour, EK, Hamadeh, SK, & Eidt, A. Infection and immunity in broiler chicken breeders vaccinated with a temperature-sensitive mutant of *Mycoplasma gallisepticum* and impact on performance of offspring. *Poult Sci.* **79**:1730-5 2000.
2. El Gazzar, M, Laibinis, VA, & Ferguson-Noel, N. Characterization of a ts-11-like *Mycoplasma gallisepticum* isolate from commercial broiler chickens. *Avian Dis.***55**:569. 2011.
3. Feberwee A, Morrow CJ, Ghorashi SA, Noormohammadi A & Landman WJM. Effect of a live *Mycoplasma synoviae* vaccine on the production of eggshell apex abnormalities after a dual infection with M. synoviae and IBV D1466. *Avian Path.* **38**:333-40. 2009.
4. Kleven, S. H., *Multicausal Respiratory Diseases* in “Diseases of Poultry” Saif, Y. M., *et al* editors 12th edition p. 1262-6. 2008.
5. Ouchi, T., Munakata, Y., & Sakamoto, H. Application of *Mycoplasma synoviae* vaccine (MSH) in layers 58th WPDC p.111-4, 2009.
6. Remington, B, Blackall, P. & Turni, C. Control of fowl cholera mortality in a broiler operation. Proceedings of the 61st WPDC p2 2012.
7. Whithear, KG, Bowtell, DD, Ghiocas, E, & Hughes, KL. Evaluation and use of a micro-broth dilution procedure for testing sensitivity of fermentative avian mycoplasmas to antibiotics. *Avian Dis.* **27**:937-49. 1983.

Table 1. Common reasons for antibiotic therapy in chickens.

Disease/pathogen	Antibiotic use	Alternatives	Comments
<i>Mycoplasma gallisepticum (MG)</i> (CRD & suboptimal production)	Routine administration in lay and day 20-22 in broilers (not penicillins or phosphomycin)	MG free replacement stock and vaccination where necessary	ts-11 in Breeders and layers Antibiotic resistance
<i>M. synoviae (MS)</i> (CRD, EAA, Peritonitis & suboptimal production)	Routine administration in lay and day 20-22 in broilers (not penicillins or phosphomycin)	MS free replacement stock and vaccination where necessary	MSH in breeders and layers Antibiotic resistance
Coryza (<i>A. paragallinarum</i>)	Antibiotics when clinical signs appear.	Vaccination	Synergistic effect with mycoplasma
Fowl cholera (<i>P. multocoda</i>)	Antibiotics supplementing vaccination.	Vaccination, concrete floors and rodent control. Stress minimization	Not all sites have this problem. Better understanding and vaccines needed.
<i>Salmonella</i>	Suppression	Freedom (Biosecurity) and vaccination	Antibiotic resistance is problem
<i>E. coli</i> and others	Suppression	Hygiene and perhaps vaccination	Antibiotic resistance is problem
<i>Respiratory viruses and vaccines</i> NDV (esp LaSota), APMV, IBV, H9,	Control of secondary bacterial infections including vaccine reactions.	Better or more appropriate vaccines	Synergistic effect with mycoplasma infections Routine antibiotics 8-10 days post vaccination
<i>Brachyspira</i> spp. (egg drop and diarrhoea)	Cryptic; often controlled by antibiotics targeting other infections.	Water acidification?	Emergence with decreased antibiotic usage
<i>Immunosuppressive viruses</i>	Control of secondary bacterial infections	Biosecurity and vaccination	MDV, IBD, CAV, REV and others.

USO PREVENTIVO DE UN PROGRAMA CON ADITIVO ANTI-MICOTOXINAS (A-AM) EN POLLO DE ENGORDA COMERCIAL

PREVENTIVE USE OF A PROGRAM BASED IN AN ANTI-MYCOTOXINS PROGRAM IN COMMERCIAL BROILER CHICKENS

M. Murillo, E. Camacho, E. Soto, D. Sarfati y B. Lozano

Laboratorio Avimex S.A. de C.V. J.I. Bartolache 1862. Colonia del Valle.
Delegación Benito Juárez. 03100. México, D.F., México

SUMMARY

During the first 21 days of life of broiler chickens (PE), important events such as the development of immune and digestive systems occur. Damage to these organs and systems produced by the action of mycotoxins can impact their health and productive efficiency. The objective of the present work is to present field results of the use of an anti-mycotoxins additive (A-AM) in the feed of PE contaminated with mycotoxins. Results of mycotoxins monitoring, productive development, post-vaccine serological response and histopathological damage in lymphoid organs of birds fed a treated feed compared to birds fed a non-treated feed until 28 d of age are presented. It is concluded that the use of the A-AM in initial stages of the development of broiler chickens improved birds' health and in turn their productivity.

RESUMEN

Durante los primeros 21 días de vida del pollo de engorda (PE) ocurren eventos importantes como lo son el desarrollo del sistema inmune y del aparato digestivo. Los daños a estos órganos y sistemas producidos por la acción de las micotoxinas pueden repercutir en su salud y eficiencia productiva. El objetivo de este trabajo es presentar resultados de campo del uso de un aditivo anti-micotoxinas (A-AM) en alimento de PE contaminado con micotoxinas. Se presentan los resultados del monitoreo de micotoxinas, del desarrollo productivo, de la respuesta serológica postvacunal y del daño histopatológico en órganos linfoides comparando las aves con alimento tratado y sin tratamiento hasta los 28 días de edad. Se concluye que el uso de este A-AM en etapas iniciales de desarrollo en pollo de engorda mejoro la salud de las aves y con ellos su productividad.

INTRODUCCIÓN

Las micotoxinas son metabolitos de hongos toxigénicos que se desarrollan en los cereales y oleaginosas con los que se elaboran los alimentos balanceados de las aves. Estas varían en toxicidad y tropismo para la afección de tejidos y órganos blanco de organismo, y existen factores que influyen el impacto de las micotoxinas en las aves domésticas, tales como: el tipo y concentración de las micotoxinas en la ración, duración de la exposición, el sinergismo entre ellas, el fin zootécnico, la raza, etapa de producción y otros como la nutrición, el estado de salud, condiciones de producción y otros. Se ha reportado que las aves jóvenes son más susceptibles a la exposición a niveles bajos y continuos de micotoxinas que las aves adultas, quizás debido a la carga metabólica a la que está sometida este tipo de aves.

Durante los primeros 21 a 25 días de vida del pollo de engorda ocurren eventos importantes en el organismo de las aves, como lo son el desarrollo del sistema músculo-esquelético, del sistema inmune y del aparato digestivo, por lo que si se ocasionan daños a estos tejidos, órganos y sistemas durante esta fase de desarrollo acelerado, estos repercutirán en la salud y eficiencia productiva de las aves y con ello en su rentabilidad.

OBJETIVO

Valorar el efecto de la adición de un aditivo anti-micotoxinas (A-AM) en el alimento pre-iniciador e iniciador de parvadas de pollo de engorda comercial, sobre la integridad de sus órganos linfoides, respuesta serológica y parámetros productivos.

MATERIALES Y MÉTODOS

Se trabajó con dos parvadas comerciales de pollo de engorda, donde a una de ellas se le adicionó un producto comercial aditivo anti-micotoxinas (Mycoad[®] ZT, Special Nutrientes, Inc.), en el alimento. Se consideró un grupo control negativo (sin A-AM) con una población de 400,000 aves, así como un grupo en tratamiento en su alimento con una población de 80,000 aves, donde se utilizó el A-AM de 0 a 21 días de edad, equivalente a consumo de 1.0 kg de alimento / ave, a dosis de 0.5 kg de A-AM / Ton de alimento. Se realizó el manejo zootécnico habitual de la granja y se utilizaron programas preventivos y de inmunización similares para ambos grupos.

Pruebas de laboratorio. Muestreo serológico, 15 sueros por grupo a 21 y 28 días de edad, para correr pruebas de inhibición de la hemoaglutinación de enfermedad de Newcastle (HI-EN). Muestreo histopatológico, de cinco aves recién sacrificadas a 7, 14, 21 y 28 días de edad, con muestras de: timo, bolsa de Fabricio, bazo, médula ósea, hígado, riñón y duodeno. Pruebas de ELISA para micotoxinas (R-biopharm): ocratoxina A (OCRA); T2 toxina (T-T2); vomitoxina (DON) y fumonisina B1 (FB1).

Medición de parámetros productivos. Para cada grupo se pesaron 100 aves de forma semanal y se obtuvo la ganancia diaria de peso (GDP) a la tercera y cuarta semanas de edad. Se registró el consumo de alimento y con el peso corporal se determinaron la eficiencia alimenticia (EA) y la conversión alimenticia a la tercera y cuarta semanas de edad.

RESULTADOS

Los resultados serológicos a la prueba de HI-EN expresados en Log₂, reportaron para el grupo control negativo títulos promedio a 21 y 28 días de edad de: 3.7 y 3.6 Log₂ respectivamente, mientras que el grupo en tratamiento con el A-AM reportó títulos de 5.6 y 7.1 Log₂ a las mismas edades.

Los estudios histopatológicos a 21 días de edad reportaron en el grupo control negativo, irregularidad en la cantidad del tejido linfóide maduro en los timos, mientras que los otros órganos muestreados no se observaron cambios patológicos aparentes. El grupo con tratamiento con A-AM no mostró cambios patológicos aparentes en ninguno de los órganos muestreados a las distintas edades.

A la prueba de ELISA con los kits de R-biopharm, se reportaron los siguientes niveles de micotoxinas tanto en alimento pre-iniciador como en el iniciador (Cuadro 1).

Los resultados de los parámetros productivos entre los distintos grupos, se describen en el siguiente cuadro (Cuadro 2).

DISCUSIÓN

Los resultados de ELISA mostraron la presencia de diferentes niveles de micotoxinas en los alimentos pre-iniciadores e iniciadores, principalmente del tipo fusariotoxinas, que la literatura tradicionalmente considera como niveles bajos o aceptables en los alimentos para las aves. No obstante, en nuestra práctica profesional hemos observado que estos niveles de contaminación representan riesgos y pérdidas para las granjas avícolas, quizás por no analizar otras micotoxinas presentes en los alimentos, o bien, porque los niveles “reales” de micotoxinas en los alimentos son superiores a los encontrados en las pruebas. Por lo anterior, cuando encontramos niveles de micotoxinas de algún tipo, lo interpretamos como indicador de que esos insumos o alimentos terminados tuvieron las condiciones necesarias para la proliferación fúngica y para la síntesis de micotoxinas, por lo que puede haber mayores contaminaciones a las encontradas en los análisis de escrutinio.

En cuanto a los parámetros zootécnicos medidos, el grupo control sin A-AM, presentó menor productividad al juzgar por la ganancia diaria de peso, la eficiencia y la conversión alimenticia. Así mismo, este mismo grupo control presentó menor respuesta serológica (HI-EN) y daño histopatológico en órganos linfoides, especialmente en timos a 21 días de edad. Adicionalmente en las observaciones de campo, se reportaron lesiones en cavidad oral (tipo T-T2 o tricoticenos), de moderadas a graves muy evidentes en el grupo control desde los 15 días de edad, mismas que no se reportaron en el grupo en tratamiento con el A-AM.

CONCLUSIÓN

El uso del A-AM empleado en esta prueba de campo en las etapas iniciales de desarrollo en el pollo de engorda, previno el daño por micotoxinas presentes en alimento y con ello, mejoró su productividad.

REFERENCIAS

1. Campbell, M.L. Evaluation of immunity of young broiler chickens during simultaneous aflatoxicosis and ochratoxicosis. *Poultry Science* 62: 2138-2144.
2. Corrier, D.E. Mycotoxicosis: mechanisms of immunosuppression. *Vet. Immunol. Immunopathology*. 30: 73-87. 1983.
3. Gimeno, A. y Martins, M.L. Problemas de micosis y micotoxicosis en polllos. In: www.mycotoxin.com p 1-44. 2000.
4. Hoerr, F.J. Micotoxicosis. In: *Diseases of Poultry*. 12th edition. Edited by Y.M. Saif, A.M. Fadly, J.R. Glisson, L.R. McDougald, L.K. Nolan and D.E. Swayne. Iowa State University Press. pp 1197-1229. 2008.
5. Leeson, S, Diaz, G.J. and Summers, J.D. *Poultry metabolic disorders and mycotoxins*. University Books. Guelph, Ontario, Canada. 1995.
6. Zaviero, D. Impact of molds and mycotoxins in poultry nutrition. *Veterinaria Feed Hygiene. Monografía IV Miedzynarodowa Conferencia Naukowa* 29-33 p. Uniwersytet Warminsko-Mazurski. Olsztynie, Poland. 2004.

Cuadro 1.

Tipo de Alimento	Niveles y tipos de Micotoxinas							
	Grupo Control Negativo				Grupo en tratamiento con A-AM			
	T-T2 ppb	OCRA ppb	DON ppb	FB1 ppb	T-T2 ppb	OCRA ppb	DON ppb	FB1 ppb
Alimento Pre-iniciador	10.37	1.38	760	1250	28.40	2.82	770	1060
Alimento Iniciador	18.12	1.32	520	1050	35.76	5.19	480	2330

Cuadro 2.

EDAD (días)	Resultados Productivos							
	Grupo Control Negativo				Grupo en tratamiento con A-AM			
	Peso g	GDP g	E.A.	C.A.	Peso g	GDP g	E.A.	C.A.
21 días	755	35.9	0.54	1.41	828	39.4	0.67	1.24
28 días	1223	43.8	0.71	1.72	1337	47.8	0.85	1.57

INFLUENZA AVIAR A/H7N3 DE ALTA PATOGENICIDAD EN ZANATES (*QUISCALUS MEXICANUS*) EN LA REGIÓN DE LOS ALTOS DE JALISCO, MÉXICO

HIGH PATH AVIAN INFLUENZA A/H7N3 IN GREAT-TAILED GRACKLES IN THE ALTOS DE JALISCO REGION, MEXICO

Navarro-López, R.^A, Vázquez-Mendoza, L.F.^A, Villarreal Chávez, C. L.^A, Casaubon y Huguenin, M. T.^B y Márquez Ruiz, M. A.^{B*}

^ADirección General de Salud Animal del SENASICA/SAGARPA

^BFacultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia de la UNAM

*Autor encargado de la correspondencia

SUMMARY

The present report describes by the first time the presence of an infection in wild endemic birds and particularly in the Great-tailed Grackle (*Quiscalus mexicanus*), produced by a high path avian influenza orthomyxovirus Type A, Subtype H7N3, during the avian influenza epizootic occurred in June-October, 2012 in Los Altos de Jalisco region, Mexico, which is a highly significant poultry area. The Great-tailed Grackle population has been largely increased due to the intense agricultural and livestock activities and by the human activity, situation that has facilitated its expansion throughout North, Central America and Northern South America in diverse ecological systems. The infectious-epidemiological role of the Great-tailed Grackle is unknown, as well as, its role as avian influenza virus reservoirs and as other infectious diseases disseminators. Because the huge impact that avian influenza has on food production, on the economic activity of the effected countries and on the animal and human public health, it is necessary to learn more, in order to clarify the significance of wild bird population living in the vicinity and around the commercial poultry farms and in the backyard poultry population.

RESUMEN

El presente reporte científico describe por vez primera la infección en aves silvestres endémicas en México, en particular el caso del pájaro zanate o quiscal mexicano (*Quiscalus mexicanus*), por el orthomyxovirus de Influenza Aviar, Tipo A Subtipo H7N3 de alta patogenicidad (IAAP), durante la epizootia de IA de 2012 ocurrida en Los Altos de Jalisco, zona avícola de gran importancia en México. La población de zanates ha sido favorecida por las actividades agropecuarias y por la actividad humana, lo que le ha permitido extenderse territorialmente en numerosos y diversos ecosistemas de Norte, Centroamérica y Sudamérica. Se desconoce el papel infecto-epidemiológico de los zanates y de la población de aves nativas no migratorias de la región, como posibles reservorios del virus de influenza aviar (IA) y como diseminadores de enfermedades infecciosas. Debido la enorme importancia que la IA ostenta en la producción de alimentos, la economía y la salud pública animal y humana, es necesario profundizar su conocimiento con nuevos estudios que permitan esclarecer su papel epidemiológico, al igual que el de otras aves residentes silvestres que viven en los alrededores de las granjas y que entran en contacto con aves explotadas industrialmente y con aves de corral de traspatio.

INTRODUCCIÓN

En junio de 2012 se presentó en México un brote muy importante de influenza aviar altamente patógena causada por el virus H7N3, el cual afectó severamente la industria avícola de la zona con mayor producción de huevo para plato de México, conocida como Los Altos, en el estado de Jalisco (1). Después de un silencio epidemiológico de 17 semanas, en enero de 2013 la epizootia reemergió en una segunda ola epizootica, extendiéndose a los estados de Aguascalientes, Guanajuato, Tlaxcala y Puebla afectando aves criadas industrialmente y en aves de traspatio, es decir, en parvadas de pollo de engorde, en

gallinas ponedoras de huevo para el plato, reproductoras pesadas, aves de traspatio, gallos de combate y codornices.

Las medidas de control del brote implementadas por los servicios veterinarios fueron el sacrificio de aves y su disposición sanitaria, limpieza, desinfección, vacío sanitario, control de la movilización de animales, sus productos y subproductos. Además, de una campaña de vacunación controlada con cepa homóloga de origen pato inactivada y emulsionada en aceite.

La región de los Altos de Jalisco comprende 46 municipios en 19,599 km² (Figura 2), siendo la zona productora de huevo más importante del país. Cuarenta y dos de sus municipios fueron declarados en Cuarentena Interna conforme a las disposiciones oficiales emitidas por la SAGARPA el 8 de junio de 1998 (2). Existen en esta zona gran cantidad de granjas avícolas y abundantes cuerpos de agua, tanto natural como artificial, donde aves acuáticas migratorias que entre otoño y primavera habitan buscando alimento, dirigiéndose a territorios de cría, o viajando a sitios de invernación por la ruta migratoria del Pacífico (3). De igual forma existe una población importante de aves residentes silvestres que visitan las granjas avícolas en busca de alimento.

En la semana epidemiológica 31 y 36 de 2012, en la población de Tepatitlán de Morelos, Jalisco, municipio donde se presentaron el mayor número de brotes IAAP H7N3 en aves reproductoras y de postura de huevo comercial, se presentó mortalidad de pájaros silvestres conocidos como zanate mexicano (*Quiscalus mexicanus*). Esta ave se clasifica en el orden passeriforme de la familia icteridae (4). Originaria de la vertiente del Golfo de México, se sabe fue introducida al centro del país en la época del octavo emperador azteca Ahuítzotl, entre los años 1486 y 1502 (5). Dicha especie se ha extendido a toda la República Mexicana, a 21 estados de la Unión Americana y a tres provincias Canadienses (6,7). Asimismo, se halla a todo lo largo de Centroamérica llegando hasta Colombia, Venezuela, Ecuador y Perú (8). Existe consenso que su amplia dispersión se debe a su gran adaptabilidad y tolerancia a las condiciones urbanas. Otras fuentes de accesibilidad a alimento están asociadas con la producción agrícola y animal, donde hay abundancia de granos y otros alimentos lo cual les permite una alimentación segura y continua (9). Otros lugares donde se alimentan son los tiraderos de basura y la comida arrojada en la calle. Los estudios sobre la historia natural del zanate demuestran que es un gran oportunista y que puede alimentarse de vertebrados, invertebrados, crustáceos pequeños y otros animales marinos, así como de granos y frutos. Tiene preferencia por cuerpos de agua como presas, bordos, diques y pantanos, porque les proporcionan una fuente de alimento constante. Se ha demostrado que el *Quiscalus mexicanus* puede ser portadores de la salmonella (10) y que presentan seroconversión a los virus de influenza aviar de baja patogenicidad H5 y enfermedad de Newcastle (11). En México, esta especie se vio involucrada en la transmisión del virus del Oeste del Nilo (12).

MATERIALES Y MÉTODOS

Durante el brote del año 2012 en Jalisco, en las semanas 31 y 36 en un parque deportivo público de la ciudad de Tepatitlán de Morelos, de nombre "Unidad Deportiva Morelos" con Coordenadas LN 20° 48'17.22" LW 102° 45'48.12" se identificó por las autoridades veterinarias del Servicio Nacional de Sanidad Inocuidad y Calidad Agroalimentaria (SENASICA) la presencia de aves silvestres muertas y aves enfermas con dificultad para volar. En la investigación epidemiológica se comprobó que las aves correspondían a la especie *Quiscalus mexicanus*. De acuerdo a la historia clínica con número de casos CPA-16126-12 y 16172-12 se encontraron diez aves, de las cuales ocho estaban muertas, una presentaba signos de enfermedad y la otra solo estaba impedida para volar. Las aves muertas no se consideraron para la toma de muestra por su estado deplorable de conservación. El ave enferma presentó edema en la cabeza, cianosis, tortícolis y diarrea. Ambas aves se sacrificaron para hacer el estudio post mortem. No se reportaron lesiones macroscópicas. Se tomaron muestras de órganos e hisopos traqueales y cloacales que se remitieron a los laboratorios oficiales de diagnóstico de sanidad animal del SENASICA en Jalisco y ciudad de México.

En la semana 36 del 2012, durante una nueva investigación oficial en el parque deportivo de Tepatitlán donde se habían presentado cinco semanas antes casos de IAAP, se detectó otro zanate adulto enfermo, el cual se encontraba postrado, con incapacidad para volar, incoordinación, dificultad para respirar (boqueo) y diarrea color café oscuro. En esta investigación se localizó también otra ave muerta conocida como tordo (*Molothrus* sp) del orden Passeriformes (13) en la cancha de fútbol. Ambos ejemplares fueron llevados bajo estrictas medidas de bioseguridad al Laboratorio de Patología en el municipio de El Salto, en Jalisco para hacer la necropsia y tomar muestras para estudios virológicos e histopatológicos. El zanate murió durante el traslado. Posterior a la necropsia, se remitieron muestras de diez órganos en formalina al 10% (encéfalo, pulmón, tráquea, hígado, corazón, proventrículo, molleja, duodeno, intestino, páncreas) al Laboratorio de Patología

Aviar de la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia de la Universidad Nacional Autónoma de México correspondientes al caso 1056-12.

En entrevista, personas responsables del parque y jardineros señalaron la detección frecuente de zanates enfermos y muertos en el parque deportivo y sus inmediaciones desde hacía seis semanas aproximadamente. Esta instalación se encuentra cercada en su totalidad y existe un solo acceso principal al público. El parque colinda en su parte posterior con un río en donde abundan los árboles denominados Ahuehuetes o Sabinos (*Taxodium mucronatum*). En la cerca del parque existen árboles denominados Benjamins (*Ficus benjamins*) donde los zanates tienen sus nidos. Entre el río y el campo deportivo existe un andador que lleva a una escuela de educación preescolar. En los árboles Ficus y en el piso se observaron depósitos abundantes de excremento de zanate y plumas, confirmando que correspondían a los nidos donde pernoctan estas aves. Al estudiar la relación epidemiológica de granjas avícolas en el área perifocal, existen dos granjas de gallinas de postura comercial de huevo para plato y una de pollo de engorda en un radio menor a dos kilómetros (figura 4). La población de aves de postura en ese momento era de 63 mil aves y 295 mil, ambas vacunadas contra el virus H7N3.

RESULTADOS

Se logró el aislamiento del virus H7N3 en embrión de pollo a partir de muestras de órganos e hisopo traqueal del ave enferma y de órganos del ave impedida para volar de los casos CPA-16126-12 y 16172-12 de la semana epidemiológica 31. Se llevaron a cabo las pruebas de secuenciación, identificación viral e índice de patogenicidad intravenosa, habiéndose confirmado que se trató de una infección por el virus H7N3 de alta patogenicidad. El virus resultó idéntico al aislado en gallinas afectadas por la epizootia de IAAP.

En el ave de la investigación de la semana 36 caso CPA-19955-12 y 1056-12 de histopatología la FMVZ de la UNAM. El examen post-mortem reveló en el pájaro zanate, congestión y sufusiones en corazón y enteritis (figura 3). El resto de los órganos no revelaron lesiones macroscópicas. El resultado de la necropsia del pájaro tordo evidenció solamente un fuerte traumatismo craneoencefálico.

Los resultados de los estudios de histopatología en el pájaro zanate determinaron una encefalopatía no supurativa, hepatitis grasa severa y enteritis supurativa moderada con presencia de coccidias en cantidad moderada. El resto de los órganos no presentaron cambios patológicos significativos.

Los resultados de los estudios de histopatología en los órganos del pájaro tordo mostraron un proceso linfocítico de probable etiología neoplásica en hígado y proventrículo. Se encontró obstrucción intestinal por nematodo y presencia de coccidias en duodeno.

Muestras de los mismos órganos conservados en refrigeración se remitieron por separado con la finalidad de conocer en qué órganos se encontraba el virus. Los laboratorios oficiales LSB2 y LSB3 del SENASICA confirmaron el aislamiento viral de IAAP H7N3 de la muestra de corazón del zanate. Los resultados de virología del tordo fueron negativos.

Los estudios de laboratorio confirmaron la infección por este virus en dos episodios con una diferencia de cinco semanas en aves silvestres residentes conocidas como zanate mexicano (*Quiscalus mexicanus*) en un parque público en la cabecera municipal de Tepatitlán de Morelos de nombre “Unidad Deportiva Morelos” con Coordenadas LN 20° 48'17.22" LW 102° 45'48.12".

Los estudios epidemiológicos no encontraron evidencia que las granjas avícolas cercanas hubieran estado infectadas. Las aves de engorda no se vacunaron contra esta enfermedad y no se reportaron casos en aves de esta función zootécnica durante la primera ola epizootica.

CONCLUSIONES

Se confirmaron en dos semanas epidemiológicas 31 y 36 que las aves de la especie *Quiscalus mexicanus* enfermaron y murieron por el virus de influenza aviar H7N3 de alta patogenicidad. No fue posible demostrar que las granjas avícolas más cercanas fueran la fuente de infección. Sin embargo el virus H7N3 AP causó una severa epizootia en el municipio, lo que hace pensar, que los pájaros zanates se desplazan muchos kilómetros hacia las granjas o que en basureros se encontrara el virus por desechos de aves entre otras posibilidades sabiendo los variados hábitos alimenticios del zanate. El último caso registrado de IAAP H7N3 en 2012 en la primera ola epizootica, se detectó en esta especie silvestre (Figura 1).

En general las aves silvestres han sido involucradas en la transmisión de diversas enfermedades, ya sea como reservorio o simplemente como transmisores mecánicos de agentes infecciosos y parasitarios (14). Pero

en el caso de la influenza aviar se ha demostrado que aves silvestres nativas residentes no migratorias pueden albergar orthomyxovirus de baja patogenicidad (15).

El presente estudio señala por primera vez la afectación por virus de influenza aviar de alta patogenicidad en aves de la especie *Quiscalus mexicanus*. Se demuestra que el virus hace estados virémicos pues se pudo aislar de órganos y a partir de hisopos traqueales y cloacales. Se asume que la cadena de transmisión de la enfermedad está cerrada, debido a que contiene los elementos necesarios para afirmar que existe el mecanismo adecuado de transmisión de agentes infecciosos de aves enfermas a aves sanas. En este caso, al menos de cinco semanas. Por lo tanto, el virus de la IA y posiblemente otros agentes infecciosos tienen la capacidad para diseminarse por esta especie a las aves domésticas con los riesgos que esto implica para la avicultura. El *Quiscalus mexicanus*, por los hábitos y características ya señaladas, es un asiduo visitante de las granjas avícolas en México junto a otras aves residentes (16).

Actualmente persiste la circulación del virus de IAAP en cuatro entidades del país, por lo que es necesario profundizar en la investigación del papel infecto-epidemiológico del zanate y su posible participación como reservorio del virus, al igual que otras aves nativas residentes que viven en los alrededores de las granjas avícolas. Se sabe que el riesgo de transmisión de la IA depende de la prevalencia del virus en los hospedadores reservorio (17), por lo que es urgente la necesidad de identificar y entender cómo participan los pájaros zانات y posiblemente otras aves silvestres residentes en la transmisión de la enfermedad, elemento epidemiológico fundamental para el diseño de estrategias de control y erradicación de la influenza aviar en México.

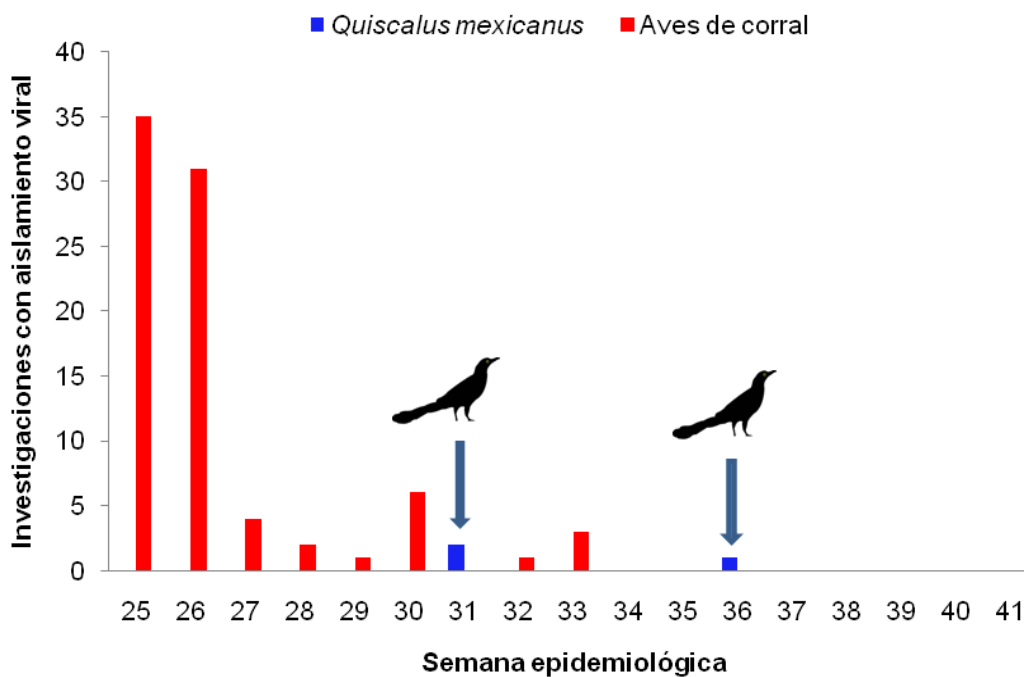
REFERENCIAS

1. UNA. (2013). Unión Nacional de Avicultores. Recuperado el 23 de Agosto de 2013, de Situación de la Avicultura Mexicana: <http://una.org.mx/2013/avicultura-mexicana.html>
2. SAGARPA. (8 de junio de 1998). Establecimiento de cuarentenas para animales y sus productos. Norma Oficial Mexicana NOM-054-ZOO-1996. Diario Oficial de la Federación.
3. Western Hemisphere Shorebird Reserve Network. (2009). Shorebird migration flyways. Recuperado el 22 de Agosto de 2013, de <http://www.whsrn.org/western-hemisphere-shorebird-reserve-network>.
4. CONABIO. (19 de Agosto de 2009). *Quiscalus mexicanus (zanate mexicano) residencia permanente. Distribución*. Recuperado el 22 de Agosto de 2013, de Catálogo de metadatos geográficos. Comisión Nacional para el Conocimiento y Uso de la Biodiversidad: http://www.conabio.gob.mx/informacion/metadatos/gis/quis_mexigw.xml
5. Gurrola Hidalgo, M., Sánchez Hernán, C., & Romero Almaraz, M. (2009). Dos nuevos registros de alimentación de *Quiscalus mexicanus* y *Cyanocorax sanblasianus* en la costa de Chamela, Jalisco, México. *Acta zoológica mexicana*, Acta Zool. Mex v.25 n.2 Xalapa.
6. Wehtje, W. (26 de Septiembre de 2003). *The range expansion of the great-tailed grackle (Quiscalus mexicanus) in North America since 1880*. Recuperado el 22 de Agosto de 2013, de Journal of Biogeography: <http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1046/j.1365-2699.2003.00970.x/abstract>
7. Geoffrey S. LeBaron, What we're learning: Range Expansion of Boat-tailed and Great-tailed Grackles, The Christmas Bird Count, National Audubon Society. In <http://web4.audubon.org/bird/cbc/WWL-Grackles.html>
8. BirdLife International 2012. *Quiscalus mexicanus*. In: IUCN 2013. IUCN Red List of Threatened Species. Version 2013.1. www.iucnredlist.org. Downloaded on 21 October 2013.
9. Instituto Nacional de la Biodiversidad de Costa Rica *Quiscalus mexicanus* (Gmelin, 1788) In <http://darnis.inbio.ac.cr/FMPro?-DB=ubipub.fp3&-lay=WebAll&-Format=/ubi/detail.html&-Op=bw&id=3393&-Find>
10. Minott Picado P., Caballero Castillo M. Determinación de Salmonella Spp. y Endoparásitos en Zanates (*Quiscalus Mexicanus*) del Parque de Cañas, Guanacaste Rev. costarric. salud pública, dic. 2007, vol. 16 no. 31 p. 27-35. ISSN 1409 – 1429.
11. Escobar, Luis E. Anticuerpos circulantes contra Influenza Aviar y Newcastle en zanates (*Quiscalus mexicanus*) de la ciudad de Guatemala. REDVET. Revista electrónica de Veterinaria 1695-7504 2011 Volumen 12 Número 3 <http://www.veterinaria.org/revistas/redvet/n030311.html>
12. Guerrero-Sánchez, S., Cuevas-Romero, S., Nemeth, N. M., Trujillo-Olivera, M., Worwa, G., Dupuis, A., y otros. (2011). West Nile Virus Infection of Birds, Mexico. *Emerging Infectious Diseases*, Vol. 17, No. 12.
13. Hubálek, Z. (2004). An Annotated Checklist of Pathogenic Microorganisms Associated With Migratory Birds. *Journal of Wildlife Diseases*, 40(4), 2004, pp. 639–659.

14. Hénaux V, Samuel, V., Samuel, M., Dusek, R., Fleskes, J., & Ip, H. (2012). Presence of Avian Influenza Viruses in Waterfowl and Wetlands during Summer 2010 in California: Are Resident Birds a Potential Reservoir? PLoS ONE, Volume 7 Issue 2 e31471.
15. García Espinoza, G. (2007). *Papel de las Aves Silvestres en la Bioseguridad de las Granjas*. México: FMVZ - UNAM.
16. CONABIO <http://avesmx.conabio.gob.mx/verave?ave=1860>
17. Garamszegi, L. Z., & Pape Møller, A. (2007). Prevalence of avian influenza and host ecology. *Proceedings of the Royal Society . B*, 274, 2003–2012.

Figura 1.

Actividad Viral en aves de corral y silvestres durante el brote de IAAP H7N3 en Los Altos de Jalisco, México 2012



Fuente: SENASICA-DGSA-CPA-SINEXE

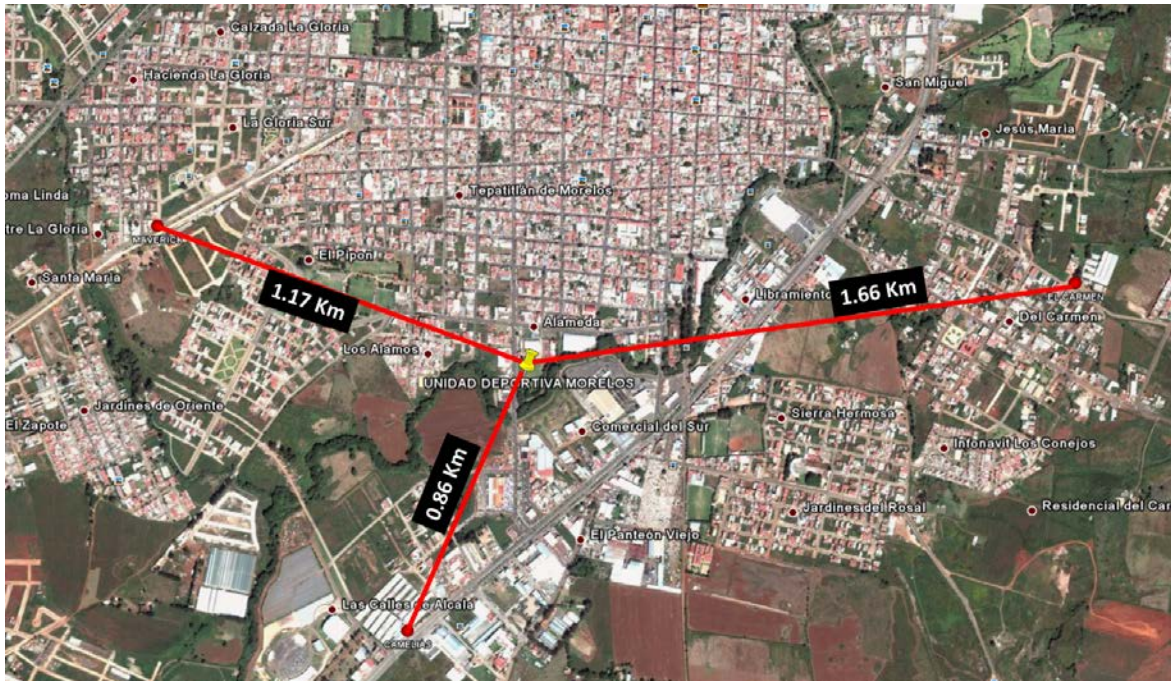
Figura 2.



Figura 3. a) Hábitat del zanate. b) Zanate enfermo. c) Revisión clínica. d) Transporte al laboratorio. e) Inicio de necropsia. f) Toma de muestra con hisopo cloacal. g) Molleja y proventrículo SCPA. h) Intestino delgado con edema y hemorragia. i) Corazón con congestión y zonas hemorrágicas de donde se aisló IAAP A/H7N3.



Figura 4. Relación epidemiológica del hábitat de zanates infectados con IAAP H7N3 y granjas avícolas comerciales de Tepatlilán de Morelos, Jalisco.



CHARACTERIZATION OF BACTERIAL COMMUNITIES AND *CLOSTRIDIUM PERFRINGENS* POPULATIONS IN THE INTESTINES OF BROILER CHICKENS FED DIETS SUPPLEMENTED WITH VIRGINIAMYCIN OR BACITRACIN METHYLENE DISALICYLATE USING 454 PYROSEQUENCING AND QUANTITATIVE PCR

CARACTERIZACIÓN DE LAS COMUNIDADES BACTERIANAS Y LAS POBLACIONES DE *CLOSTRIDIUM PERFRINGENS* EN LOS INTESTINOS DE LOS POLLOS DE ENGORDA ALIMENTADOS CON DIETAS SUPLEMENTADAS CON VIRGINIAMICINA O METILENO DISALICILATO DE BACITRACINA (BMD) UTILIZANDO 454 PIROSECUENCIACIÓN Y PCR CUANTITATIVA

A. P. Neumann and G. Suen

Department of Bacteriology, University of Wisconsin – Madison, Madison, WI 53706, United States

RESUMEN

Quinientos (500) pollos de engorda Cobb se criaron en condiciones simuladas de producción comercial, y recibieron una de tres dietas: control sin medicación, complementada con BMD o complementada con virginiamicina. Se colectaron tractos gastrointestinales de diez pollos de engorda de cada dieta a los 45 días después del nacimiento durante tres ciclos de engorda consecutivos para obtener un total de 90 aves analizadas. El ADN genómico fue extraído de contenido intestinal muestreado de una región de aproximadamente seis pulgadas que rodea el divertículo de Meckel y ambos lóbulos cecales. PCR se utilizó para amplificar la región V6 -V8 del gen 16S rRNA utilizando primers universales con códigos de barras, y Taq polimerasa de alta fidelidad. Los amplicones fueron evaluados posteriormente para la calidad, purificados y utilizados como plantilla para emPCR seguido por la recuperación de las cuentas (beads) y pirosecuenciación. Los ADN de las 180 muestras (90 aves x 2 secciones intestinales) también fueron analizados mediante PCR cuantitativa específica de *Clostridium perfringens*. Se observaron diferencias significativas en la abundancia de los principales géneros, así como *C. perfringens*.

SUMMARY

Cobb 500 broiler chickens were raised under simulated commercial production conditions, and received one of three diets; unmedicated control, BMD supplemented, or virginiamycin supplemented. GI tracts were harvested from ten broilers from each diet at 45 d post-hatch during three consecutive grow-out cycles to give a total of 90 birds analyzed. Genomic DNA was extracted from intestinal contents sampled from an approximately six inch region surrounding the Meckel's diverticulum and both cecal lobes. PCR was performed to amplify the V6 - V8 region of the 16S rRNA gene followed by high-throughput DNA sequencing of the resulting amplicons using 454 pyrosequencing. DNAs from the samples, 90 birds x 2 gut sections, were also analyzed using quantitative PCR specific for *Clostridium perfringens*. The feeding of virginiamycin resulted in significant reductions in jejunal bacterial community diversity compared to BMD, and significant reductions in cecal bacterial community diversity compared to the unmedicated control. Additionally, *C. perfringens* levels in the ceca of BMD treated broilers were significantly reduced compared to those receiving the virginiamycin treatment.

Commercial broiler chickens are often fed diets supplemented with FDA approved antibiotics in order to promote intestinal health and function leading to improvements in production performance (5). Two such antibiotics commonly in use today are virginiamycin (VM) and bacitracin. Both of these compounds preferentially target Gram-positive bacteria, but act via entirely different mechanisms (1). Recently, a feeding trial was conducted to examine the effects of raising consecutive flocks of broilers under built-up litter conditions where the previous flock had received the same antibiotic as the current flock (7). Although significant increases in feed efficiency associated

with VM compared to bacitracin methylene disalicylate (BMD) were observed during the first flock, a trend toward comparatively better performance associated with BMD supplementation was evident by flock three. These effects could be explained in part by significantly higher late mortality in the VM fed broilers during the third grow-out coinciding with significantly higher levels of *C. perfringens* in the litter of those pens. From these results, it was hypothesized that VM has a broader range of activity, compared to BMD, against bacterial populations that are important for protecting the host from opportunistic pathogens and that these effects are exacerbated in subsequent flocks raised in the same environment. The purpose of this work was to test that hypothesis by characterizing the gastrointestinal tract bacterial community of mature broilers raised under the same conditions as the previous study using 454 pyrosequencing and quantitative PCR.

MATERIALS AND METHODS

Animal treatments. Three consecutive 45 d simulated commercial grow-outs were conducted at Colorado Quality Research, Inc. (CQR) (Wellington, CO) between September 2012 and February 2013 with a down time of approximately two wk between flocks. For each grow-out at day zero, five hundred and forty one d old straight-run broiler chickens (Cobb 500) were randomly allocated among three experimental groups (180 birds/group). The three experimental groups were maintained in three individual floor pens within one environmentally controlled building. For all subsequent grow-outs, associations between each pen and its assigned experimental group were strictly maintained and no further manipulations of the litter by the experimenters were performed other than occasional sample collections. Chickens were fed basal starter (d 0 – 17), grower (d 17 – 30) and finisher (d 30 – 45) diets manufactured at the CQR feed mill using standard CQR formulated corn-soy diets representative of commercial broiler production diets (Agristats Middle 50%). Experimental groups consisted of these diets supplemented with either; 50 g/ton bacitracin methylene disalicylate (BMD 50, Alpharma, Inc., Fort Lee, NJ), 20 g/ton virginiamycin (Stafac, Phibro Animal Health, Teaneck, NJ), or un-supplemented (unmed). Feed and water were provided ad libitum throughout and all groups were administered Inovocox EM-1 (Zoetis, Florham Park, NJ) vaccine in ovo for coccidia control.

Sample collection. At d 45 of each grow-out 10 broilers were randomly selected from each of the three experimental groups for sampling and euthanized via cervical dislocation. Gastrointestinal tracts, from the duodenal loop to just past the ileocecal junction, were removed from each chicken prior to further dissection. Contents were collected from the jejunum and cecum diluted 5X in sterile 50 mM Tris-HCl + 50 mM EDTA + 15 % sucrose buffer (pH = 8.0), thoroughly mixed, and frozen at -20°C. In total, 180 samples (two intestinal sections times 30 birds times 3 grow-outs) were collected and subjected to further analysis by pyrosequencing and quantitative PCR.

DNA extraction. DNA extraction was performed on 1 mL of diluted intestinal contents using bead-beating, phenol:chloroform, and alcohol precipitation based upon procedures previously described (15).

16S library preparation and pyrosequencing. PCR amplification of the variable V6-V8 region of the 16S rRNA gene for amplicon pyrosequencing was achieved using custom designed primers containing the Roche 454 A or B Titanium sequencing adaptors as described previously (10).

Quantitative real-time PCR. Two distinct probe-based quantitative real-time PCR (qPCR) assays were employed to quantify the abundance of bacteria (17) and specifically *Clostridium perfringens* (16) in each sample of intestinal contents in order to estimate the relative abundance of *C. perfringens* in each sample. Relative abundance of *C. perfringens* in a sample was determined by dividing the average amount of *C. perfringens* target observed for a given sample by the average amount of Bacterial target observed.

Processing and analysis of pyrosequencing data. Sequence processing was performed using the program mothur v.1.31.2 (11). All subsequent OTU-based analyses were performed using a label of 0.03, meaning that sequences represented by a single OTU exhibited greater than or equal to 97% nucleotide identity. Classification of OTUs was achieved using the Greengenes database (4) with a confidence level of at least 60 percent. The following analyses and statistical tests were performed within MOTHUR: Good's coverage, calculation of Shannon's and Inverse Simpson's diversity indices, Bray-Curtis Index, unweighted pair group method with arithmetic mean (UPGMA) clustering, and principal component analysis (PCA).

Statistical analysis. Pairwise comparisons of the mean diversity indices were performed using Student's t-test in Microsoft® Excel 2010. Pairwise comparisons of the distributions of *C. perfringens* relative abundances were performed using the Mann-Whitney (Sum of Ranks) test with the aid of the online tools at vassarstats.net.

RESULTS

A total of 1,075,264 analyzable sequences were recovered from 179 total samples after processing using mother, with one sample removed due to anomalous results (11). These sequences were approximately evenly distributed among the three dietary treatments and three different grow-outs. Average Good's coverages of 99.7% and 98.4% were observed for the jejunum and cecum samples respectively indicating sufficient sampling depth for both anatomical locations.

Community profiles, consisting of the complete set of sequences and their relative abundances, from each of the 89 jejunum and 90 cecum samples were compared by both constructing a dendrogram using hierarchical clustering and a scatterplot based upon principal component analysis (data not shown). A clear segregation depending on anatomical origin was observed using both methods indicating distinct bacterial communities in the jejunum and cecum regardless of any other factor. Neither method identified an association between community profile and experimental treatment or grow-out. *Lactobacillus* was observed to be the most abundant of the major genera observed in the jejunum. Three families of bacteria, classified as *Ruminococcaceae*, *Lachnospiraceae*, and *Lactobacillaceae*, consistently accounted for approximately 90% of the total community in the cecum.

Bacterial community diversity for each individual sample was assessed using two common metrics that account for ecological richness and evenness, the Shannon index and Inverse Simpson index. These results, in the form of means for each gut section from each treatment are presented in table 1. For both of these indices greater values correspond to higher diversity, or community complexity. Statistical testing provided evidence in support of differences between certain groups of samples (Table 1). One such difference was observed in jejunum samples from the VM treated groups, mean Shannon = 0.452, and jejunum samples from the BMD treated groups, mean Shannon = 0.704 (p-value = 0.045). Strong evidence for reduced diversity in cecal bacterial communities of broilers fed VM compared with those receiving the unmed diet was also observed (p-values of 0.0002 and 0.0012 for differences in mean Shannon and Inverse Simpson values respectively).

Despite the lack of specific community profile associations with particular experimental treatments, differences in *C. perfringens* populations among the groups were observed using quantitative PCR (16). To determine whether these differences were significant, rank based statistics were performed. A relative abundance of *C. perfringens* was determined for each sample and the sample distributions for each of the different gut sections and experimental groups can be found in Figure 1. Strong statistical evidence for less *C. perfringens* in the ceca of broilers fed BMD compared to broilers fed VM (p-value = 0.0035) was observed. Weak statistical evidence for less *C. perfringens* in the ceca of broilers fed the BMD supplemented diet versus the unmedicated diet was also observed (p-value = 0.0891).

DISCUSSION

Increased livestock feed efficiency associated with dietary antibiotic administration is well established (3, 5-9, 13, 14), but exactly how this enhanced performance is connected to alterations in the composition of the gastrointestinal (GI) microbial community remains an open question. Furthermore, studies aimed at elucidating the effects on subsequent flocks raised under built-up litter conditions are relatively rare. These studies are important because of the links between the litter and gastrointestinal microbiotas and performance (2, 12, 14). In this study, several interesting differences were observed among the GI bacterial communities of broilers receiving VM, BMD, or an unmed diet.

As has been reported previously for mature broilers (2, 5, 6), the results of this analysis clearly support distinct bacterial communities native to the small intestine compared with the cecum. These differences were readily apparent in the abundances of major bacterial groups, and consisted of the numerical dominance of *Lactobacillus* in the jejunum while the cecum harbored two major families of Clostridia as well as a reduction in the abundance of *Lactobacillus*. An increased number of less abundant taxa was also observed in the ceca of the chickens examined providing further evidence for the greater overall community diversity reported previously for the cecum compared with the more proximal regions of the GI tract (6).

Differences in total community diversity among the three dietary treatments were observed in addition to the anatomical differences mentioned above. Based upon previous observations, it was hypothesized that VM has a broader antimicrobial effect on the GI microbiota (7). The observations obtained here are generally supportive of this prediction as diversity was statistically reduced in the jejunum and ceca of VM fed birds compared with those fed BMD and the unmed diet respectively. Despite these statistical differences, unique community profiles associated with either antibiotic or the unmed group were not identified. This may be explained by the considerable inter-individual variation observed, particularly in the presence and abundance of minor bacterial groups.

An organism of considerable concern for poultry producers is the opportunistic pathogen, *Clostridium perfringens* (14). Previous work examining the effects of VM and BMD on consecutive flocks of broilers implicated *C. perfringens* as potentially contributing to significantly greater late mortality in the third flock of broilers fed virginiamycin (7). We utilized quantitative PCR to specifically detect and quantify this important pathogen in contents from the jejunum and cecum (16). The results indicated a significant reduction in the relative abundance of *C. perfringens* in the ceca of BMD treated broilers compared to the unmed and VM groups (Figure 1). *C. perfringens* is believed to reside primarily in the ceca of healthy broilers and our results are in agreement with what has been reported previously for bacitracin and its effect on *C. perfringens* levels in broilers (14).

ACKNOWLEDGMENTS

This study was funded with an industrial grant from Zoetis Animal Health. The authors would like to thank the staff at Colorado Quality Research who assisted with sample collection and members of the Suen lab, particularly Kelsea Jewell and Kim Dill-McFarland, who provided advice regarding sequence processing and analysis.

REFERENCES

1. Butaye, P., L. A. Devriese, and F. Haesebrouck. Antimicrobial growth promoters used in animal feed: effects of less well known antibiotics on gram-positive bacteria. *Clin. Microbiol. Rev.* 16: 175–188. 2003.
2. Cressman, M. D., Z. Yu, M. C. Nelson, S. J. Moeller, M. S. Lilburn, and H. N. Zerby. Interrelations between the microbiotas in the litter and in the intestines of commercial broiler chickens. *Appl. Environ. Microbiol.* 76: 6572–6582. 2010.
3. Danzeisen, J. L., H. B. Kim, R. E. Isaacson, Z. J. Tu, and T. J. Johnson. Modulations of the chicken cecal microbiome and metagenome in response to anticoccidial and growth promoter treatment. *PLoS ONE* 6: e27949. 2011.
4. DeSantis, T. Z., P. Hugenholtz, N. Larsen, M. Rojas, E. L. Brodie, K. Keller, T. Huber, D. Dalevi, P. Hu, and G. L. Andersen. Greengenes, a chimera-checked 16S rRNA gene database and workbench compatible with ARB. *Appl. Environ. Microbiol.* 72: 5069–5072. 2006.
5. Dibner, J. J., and J. D. Richards. Antibiotic growth promoters in agriculture: history and mode of action. *Poult. Sci.* 84: 634–643. 2005.
6. Dumonceaux, T. J., J. E. Hill, S. M. Hemmingsen, and A. G. Van Kessel. Characterization of intestinal microbiota and response to dietary virginiamycin supplementation in the broiler chicken. *Appl. Environ. Microbiol.* 72: 2815–2823. 2006.
7. LaVorgna, M., J. L. Schaeffer, D. Bade, J. Dickson, K. Cookson, and S. W. Davis. Performance of broilers fed a broader spectrum antibiotic (virginiamycin) or a narrower spectrum antibiotic (bacitracin methylene disalicylate) over 3 consecutive grow-out cycles. *J Appl Poult Res* 22: 574–582. 2013.
8. Lu, J., C. Hofacre, F. Smith, and M. D. Lee. Effects of feed additives on the development on the ileal bacterial community of the broiler chicken. *Animal* 2: 669–676. 2008.
9. Miles, R. D., G. D. Butcher, P. R. Henry, and R. C. Littell. Effect of antibiotic growth promoters on broiler performance, intestinal growth parameters, and quantitative morphology. *Poult. Sci.* 85: 476–485. 2006.
10. De Oliveira, M. N. V., K. A. Jewell, F. S. Freitas, L. A. Benjamin, M. R. Tótola, A. C. Borges, C. A. Moraes, and G. Suen. Characterizing the microbiota across the gastrointestinal tract of a Brazilian Nelore steer. *Vet. Microbiol.* 164: 307–314. 2013.
11. Schloss, P. D., S. L. Westcott, T. Ryabin, J. R. Hall, M. Hartmann, E. B. Hollister, R. A. Lesniewski, B. B. Oakley, D. H. Parks, C. J. Robinson, J. W. Sahl, B. Stres, G. G. Thallinger, D. J. Van Horn, and C. F. Weber. Introducing mothur: open-source, platform-independent, community-supported software for describing and comparing microbial communities. *Appl. Environ. Microbiol.* 75: 7537–7541. 2009.
12. Stanley, D., M. S. Geier, S. E. Denman, V. R. Haring, T. M. Crowley, R. J. Hughes, and R. J. Moore. Identification of chicken intestinal microbiota correlated with the efficiency of energy extraction from feed. *Vet. Microbiol.* 164: 85–92. 2013.
13. Thibodeau, A., S. Quessy, E. Guévremont, A. Houde, E. Topp, M. S. Diarra, and A. Letellier. Antibiotic resistance in *Escherichia coli* and *Enterococcus* spp. isolates from commercial broiler chickens receiving growth-promoting doses of bacitracin or virginiamycin. *Can. J. Vet. Res.* 72: 129–136. 2008.
14. Wei, S., A. Gutek, M. Lilburn, and Z. Yu. Abundance of pathogens in the gut and litter of broiler chickens as affected by bacitracin and litter management. *Vet. Microbiol.* 166: 595–601. 2013.

15. 15. Weimer, P. J., D. M. Stevenson, D. R. Mertens, and E. E. Thomas. Effect of monensin feeding and withdrawal on populations of individual bacterial species in the rumen of lactating dairy cows fed high-starch rations. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 80: 135–145. 2008.
16. 16. Wise, M. G., and G. R. Siragusa. Quantitative detection of *Clostridium perfringens* in the broiler fowl gastrointestinal tract by real-time PCR. *Appl. Environ. Microbiol.* 71: 3911–3916. 2005.
17. 17. Yu, Y., C. Lee, J. Kim, and S. Hwang. Group-specific primer and probe sets to detect methanogenic communities using quantitative real-time polymerase chain reaction. *Biotechnol. Bioeng.* 89: 670–679. 2005.

Table 1. Mean Shannon and Inverse Simpson diversity among the three dietary treatments and statistical pairwise comparisons.

Mean diversity (All 3 Grow-outs)					Pairwise Comparisons (p-values)				
Index	J		C		Index	J		C	
	shannon	Invsimp	shannon	Invsimp		shannon	Invsimp	shannon	Invsimp
unmedicated	0.47328	1.44804	2.21290	4.14345	unmed vs. VM	0.85814	0.84759	0.00019	0.00120
Virginiamycin	0.45214	1.41758	2.00021	3.54295	unmed vs. BMD	<i>0.08398</i>	<i>0.06354</i>	<i>0.05021</i>	0.14166
BMD	0.70435	1.81774	2.09416	3.87130	VM vs. BMD	0.04456	0.02899	0.11237	<i>0.06820</i>

J = jejunum, C = cecum

VM = virginiamycin (20 g/ton), BMD = bacitracin methylene disalicylate (50 g/ton)

p-value ≤ 0.05 in **bold** font (at least moderate evidence against $H_0: \mu_1 = \mu_2$)

0.05 < p-value ≤ 0.10 in *italicized* font (weak evidence against $H_0: \mu_1 = \mu_2$)

Fig. 1. Distributions of *C. perfringens* relative abundance in jejunum (J) and cecum (C) samples from broilers receiving unmedicated feed (unmed) or feed supplemented with virginiamycin (vir) or bacitracin methylene disalicylate (bmd). Significant differences were observed between cecal samples from broilers receiving bmd compared to broilers receiving vir or unmedicated feeds (see text for details). LOW indicates samples for which at least one replicate, but not all three, was positive for *C. perfringens* while ND indicates samples where none of the three replicate reactions were positive.

J	unmed	vir	bmd	C	unmed	vir	bmd
$10^{-2} - 10^{-3}$	1			$10^{-2} - 10^{-3}$		1	
$10^{-3} - 10^{-4}$	3	2		$10^{-3} - 10^{-4}$	1	4	
$10^{-4} - 10^{-5}$	3	2	6	$10^{-4} - 10^{-5}$	3	8	3
$10^{-5} - 10^{-6}$	4	10	4	$10^{-5} - 10^{-6}$	10	3	4
$10^{-6} - 10^{-7}$	12	12	14	$10^{-6} - 10^{-7}$	2	2	2
$10^{-7} - 10^{-8}$	2	1	4	$10^{-7} - 10^{-8}$			
LOW	4	2	2	LOW	1	2	
ND	1	1		ND	13	10	21

IMPACT OF LATE VS EARLY SUBCLINICAL COCCIDIOSIS ON ECONOMIC PARAMETERS IN BROILER PRODUCTION

L. Newman^A, L. Etcharren^A, J. Arce^B, R. Teeter^C, and J. Arceo^A

^AMerck Animal Health, Summit, NJ

^BUniversidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo, Michoacán, México

^CEmeritus Oklahoma State University, Stillwater, OK

ABSTRACT

The impact of the timing of a mild, subclinical coccidiosis insult (average Johnson and Reid lesion score less than 1.0) on economically significant production parameters was investigated. Birds subjected to early subclinical coccidiosis (peak lesions prior to 28 d of age) and late subclinical coccidiosis (lesions at 35 d and older) were compared with respect to weight gain, feed conversion, feed cost per kg, energy utilization per kg, and the yield of boneless breast and abdominal fat pad adjusted to target weight. At a target weight of 2.5 kg (5.5 lbs), the late subclinical coccidiosis group had significantly lower body weight, longer days to weight, higher feed conversion, and higher feed cost/kg compared to the early subclinical coccidiosis group. At a target weight of 2.72 kg (6.0 lbs) the late subclinical coccidiosis group had significantly lower breast yield (as a percent of live weight) and significantly higher abdominal fat pad weight compared to the early coccidiosis group. Very mild coccidiosis lesions during the final weeks before slaughter have an adverse impact on weight gain, feed conversion, feed cost and breast yield.

INTRODUCTION

The ability of the broiler industry to control clinical coccidiosis depends upon either complete or partial development of immunity to important *Eimeria* spp. (*E. acervulina*, *E. maxima*, *E. tenella*) that are ubiquitous in broiler production. Complete immunity is developed through live *Eimeria* vaccination programs, while ionophore anticoccidial programs often depend upon a combination of immunity¹ and suppression of *Eimeria* growth through transmembrane ion concentration disruption in the parasite² to control clinical infection.

Both coccidiosis control methods result in low-level, subclinical coccidiosis with potential to induce a mild, transient depression of growth and feed efficiency at different time points in the broiler growth curve. Live *Eimeria* vaccination can subtly slow growth during the first three wk, followed by compensatory gain during the fourth wk and beyond, creating a steeper growth curve. Ionophore medication programs are subject to *Eimeria* that escape the suppressive effects of the drugs and build to levels that can slow growth in a portion of the broiler population after the first four wk. The interaction of the timing of a mild, transient subclinical coccidiosis infection and broiler weight gain and feed efficiency has previously been described by Teeter but the impact on other important profitability variables such as carcass quality has not been previously investigated (3).

MATERIALS AND METHODS

Nine hundred female Ross 308 broilers were randomly divided into two treatment groups in a randomized block design with nine replicate pens of 50 birds per treatment group. Half of the birds were vaccinated at one d of age with a live coccidiosis vaccine (Coccivac[®]-B, MSD Animal Health) to induce mild, transient, subclinical coccidiosis lesions in the first four wk of growth, and half of the birds were subjected to a very mild mixed coccidia challenge at 28 d of age, to slow growth during the final wk before slaughter at 49 d of age. All birds were fed the same unmedicated starter, grower and finisher rations. Early exposure to coccidiosis in the late subclinical challenge group was prevented by the use of toltrazuril in the drinking water until 28 d of age.

Body weight and feed consumption were calculated weekly by pen. Coccidiosis lesion scores (Johnson & Reid⁴ gross lesions and microscopic *E. maxima*) were determined in two random birds per pen each wk from d seven through slaughter (5). At 21, 28, 35 and 42 d of age, the same two birds were also weighed and breast muscle and abdominal fat pad grams were determined. At 49 d of age, all birds were individually weighed. Two random birds per pen were subjected to yield determination, including the weights of carcass, breast with and without bone, leg and thigh with and without bone, wing, abdominal fat, neck, and head.

STATISTICAL ANALYSIS

Statistical analysis was performed using Least Squares Means and Duncans Multiple Range Test via SAS statistical software. Weight and feed efficiency analyses were adjusted to common target weights based upon regression analysis of pens over all age groups. Carcass composition for breast and abdominal fat were adjusted to common target weights using regression analysis of birds selected for carcass composition determination over weekly age groups beginning at 21 d of age.

RESULTS AND DISCUSSION

Two different coccidiosis lesion patterns were successfully induced, with mild peak *Eimeria* lesion scores of less than 1.0 based upon the Johnson and Reid gross lesion score system, or the *Diseases of Poultry* microscopic lesion score system (Figures 1 and 2). Both treatment groups were subjected to a management irregularity that resulted in a suppression of gain from d 14 to d 21 followed by compensatory gain from d 21 to d 35. The early subclinical coccidiosis group developed a greater suppression of gain during the 14 to 21 d period, but by d 35, there was no statistical difference in the weight of both treatment groups.

From d 35 onward, the rate of gain slowed ($p < 0.05$) for the late subclinical coccidiosis group compared to the early subclinical coccidiosis group. The 49 d final weight of the late subclinical cocci group was 97% of the weight of the early subclinical cocci group (2670g vs 2746g). Data was adjusted to a common target weight of 2.5 kg by regression using weekly pen data. The days to target weight were significantly longer for the late cocci group (45.8 d vs. 44.9 d), and the feed conversion at the 2.5 kg target weight was significantly higher for the late cocci group (1.83 vs 1.78). Correspondingly, the feed cost per kg was significantly higher for the late cocci group (\$0.8442 vs. \$0.8210). The energy consumption (kcal / kg) was significantly higher for the late cocci group (5867 vs 5845).

The carcass composition was adjusted to a common 2.72 kg (6.0 lb) target weight by regression of the weekly data by the selected birds. The boneless breast yield in grams was numerically lower for the late cocci group (585g vs 637g), while the boneless breast as a percent of live weight was significantly lower for the late cocci group (20.82% vs 23.32%). Abdominal fat pad weight was significantly higher for the late cocci group (77.87g vs. 63.88g). Boneless thigh weight could not be adjusted to a common weight by regression because this figure was only analyzed at 49 d. At 49 d, the boneless thigh weight was significantly lower in the late cocci group (221g vs, 248g).

While the body weight of the late cocci group was 3% lower than the body weight of the early cocci group, the late cocci group breast mass was 12% lower than of that of the early cocci group, reflecting the late onset of breast tissue mass relative to the growth curve. Even adjusted by regression to the same body weight, the breast mass was 8% lower in the late subclinical cocci birds. Thigh mass was 11% lower, while abdominal fat pad was significantly heavier in the late cocci group. Even very mild late subclinical coccidiosis alters the partitioning between protein and fat in the broiler carcass, resulting in lower meat yield and higher fat pad weight.

Coccidiosis monitoring and adjustment of coccidiosis control programs to avoid mild late subclinical coccidiosis is essential to maximize the profitability of an integrated broiler company. Subclinical coccidiosis with lesion scores less than 1.0 during the final weeks before slaughter has significant adverse effect on weight gain, days to market, feed conversion, feed cost per kg, breast yield and thigh yield.

REFERENCES

1. Chapman, H. D. 1999. Anticoccidial drugs and their effects upon the development of immunity to *Eimeria* infections in poultry. *Av. Path.* 28:6, 521-535.
2. Kant, Vinjay, P.Singh, P.K. Verma, I. Bais, M. S. Parmar, A. Gopal and V. Gupta. 2013. Anticoccidial Drugs used in the Poultry: An Overview. *Science International*, 1: 261-265.
3. Teeter, R.G., A. Beker, C. Brown, C. Broussard, S. Fitz-Coy, J. Radu and L. Newman. 2010. Production and managerial factors influencing the caloric efficiency of growing broilers. *Proceedings of the Poultry Science Association Joint Annual Meeting*, July 11 – 15, Denver, CO.
4. Johnson, J., and W. M. Reid. 1970. Anticoccidial drugs: Lesion scoring techniques in battery and floor-pen experiments with chickens. *Exp Parasitol* 28:30-36.
5. McDougald, L. and S.H. Fitz-Coy. Chapter 28 Coccidiosis of Chickens. *Diseases of Poultry* (13th ed.) (p. 1149) Ames, IA: John Wiley & Sons, Inc, 2013.

Figure 1. Subclinical coccidiosis lesion scores and timing.

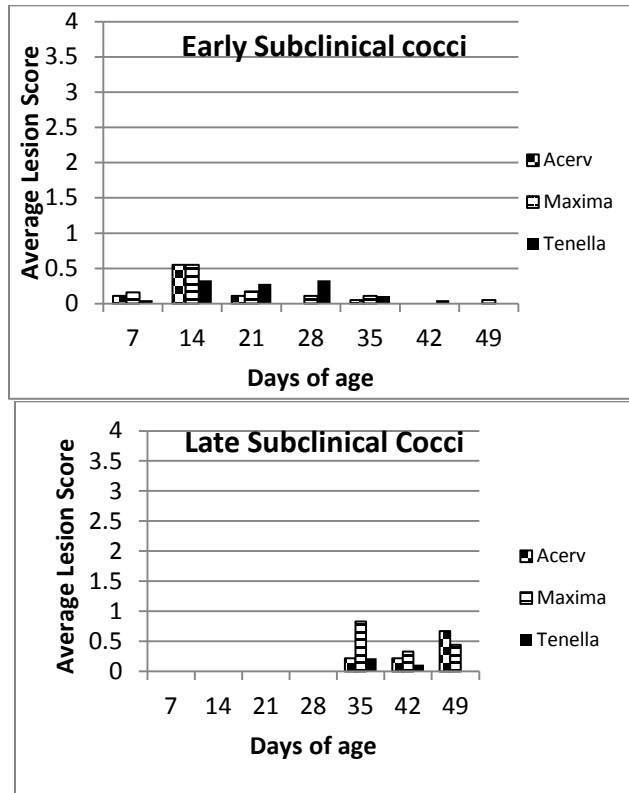
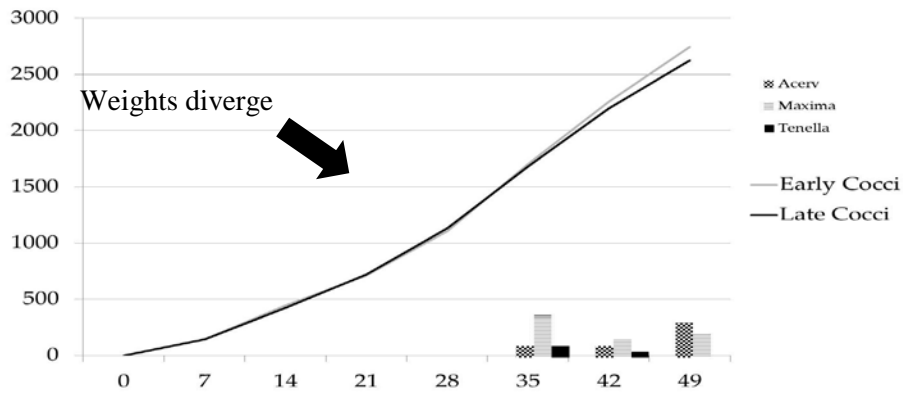


Figure 2. Growth vs. late subclinical lesion score.



EVALUACIÓN DE LA VIABILIDAD DEL VIRUS VACUNAL DE MAREK AL COMBINARSE CON ANTIBIÓTICOS COMERCIALES A BASE DE GENTAMICINA

EVALUATION OF THE VIABILITY OF THE MAREK VACCINE VIRUS WHEN COMBINED WITH COMMERCIAL ANTIBIOTICS BASED ON GENTAMICIN

M. Nieto, D. Marrufo y E. Lucio

Investigación Aplicada S. A. Tehuacán, Puebla, México

SUMMARY

The effect of three commercial antibiotics with gentamicin on the viability of the Marek vaccine virus at four different times (0, 30, 45 and 60 min) was evaluated. In each case the pH before and after add it to the vaccine was measured. The pH of gentamicin 1 and 2 was neutral while the pH of gentamicin 3 was more acid. Decreased viability of the vaccine virus was observed when using gentamicin 3 (statistically significant difference), so it appears that the pH and time consumption directly affect viability. However, the vaccine remains viable as specified by the manufacturer. The use of 10% gentamicin with neutral pH does not affect the viability of the Marek's vaccine virus significantly, being recommended for use within 45 min.

RESUMEN

Se evaluó el efecto de tres antibióticos comerciales a base de gentamicina sobre la viabilidad del virus vacunal de Marek a cuatro diferentes tiempos (0, 30, 45 y 60 min). En cada caso se midió el pH antes y después de adicionarlo a la vacuna. El pH de la gentamicina A y B es neutro mientras que el pH de la gentamicina C es más ácido. Se observó menor viabilidad del virus vacunal al emplear la gentamicina C (diferencia estadística significativa), por lo que se deduce que el pH y tiempo de consumo influyen directamente en la viabilidad. Sin embargo la vacuna permanece viable de acuerdo a lo especificado por el fabricante. El uso de gentamicina al 10% con pH neutro no afecta la viabilidad del virus vacunal de Marek de forma significativa, siendo recomendable su uso antes de 45 min.

INTRODUCCIÓN

La enfermedad de Marek es causada por un herpes virus que afecta a las aves domésticas y tiene gran importancia en la industria avícola porque con la ausencia de medidas de control es capaz de producir grandes pérdidas en lotes de aves comerciales. La enfermedad de Marek se evita mediante la vacunación con vacunas mono o polivalentes de virus vivos, sin embargo a lo largo de estos años se han desarrollado varios tipos de vacunas debido a la aparición de cepas más virulentas y la necesidad de controlarlas. La vacuna de Marek es administrada al nacimiento porque la inmunidad temprana es esencial para prevenir la enfermedad.

Los laboratorios productores de la vacuna recomiendan no mezclarla con algún antibiótico, sin embargo es una práctica común que en las incubadoras se administre la vacuna de Marek junto con un antibiótico para la prevención de infecciones en pollitos de un día de edad. El uso conjunto de antibióticos como gentamicina, oxitetraciclina, eritromicina o clortetraciclina con la vacuna de Marek, inactivan al virus y pueden inutilizar la vacuna (2). El pH y molaridad de algunos antibióticos como la gentamicina, pueden disminuir el título viral de la vacuna (Petrone). Sin embargo, se han hecho estudios con ceftriaxona, gentamicina y ceftiofur sódico en los que se ha probado que el título vacunal no disminuye, en condiciones de laboratorio (4,5).

MATERIAL Y MÉTODOS

Se utilizó la vacuna congelada conteniendo virus vivo de la enfermedad de Marek (Serotipo 3), la cual fue reconstituida de acuerdo a las indicaciones del fabricante en 198 mL de diluyente comercial al cual se agregaron 2

mL de antibiótico. Se midió el pH de cada antibiótico antes de su adición al diluyente de la vacuna y posteriormente en la vacuna reconstituida. Se utilizaron tres antibióticos comerciales a base de gentamicina al 10%, los cuales fueron adicionados a la vacuna de Marek (3 tratamientos, 1 control y 2 repeticiones). Se determinó el título de la vacuna de Marek después de su reconstitución en cuatro tiempos (min 0, 30, 45, 60). Para determinar el título de la vacuna, se calcularon las Unidades Formadoras de Placa por dosis (UFP) en del cultivo celular de acuerdo a las indicaciones del Supplemental Assay Method 406 (SAM 406).

Se utilizó un Diseño de factoriales de 4x2, se realizó el análisis de varianza y prueba de Tukey para determinar si existe diferencia entre los tratamientos.

RESULTADOS

El tratamiento 1 al ser el control, tiene el título más alto (mayor cantidad de Unidades Formadoras de Placa) en comparación con el resto de los tratamientos. Los tratamientos A y B no tienen diferencia estadística significativa, el tratamiento C sí tiene diferencia estadística significativa con respecto al resto de los tratamientos presentando el menor título.

DISCUSIÓN

Los resultados obtenidos son similares a los encontrados por Eidson *et al.*, (4) y Chacón *et al.*, (5), quienes no encontraron reducción significativa del título de la vacuna de Marek al minuto 60 después de preparada la solución vacunal. La viabilidad del virus en la vacuna de Marek depende además de otros factores como la técnica al momento de reconstituir la vacuna, el pH como en este caso, en donde la gentamicina con el pH más ácido obtuvo el menor título, así como lo demostrado por Geerligts y Hoogendam (8), quienes realizaron un estudio en donde compararon el título de la vacuna de Marek utilizando diluyentes a diferentes temperaturas. Existen otros factores físicos que afectan la viabilidad del virus en la vacuna como el tiempo prolongado de conservación de la vacuna, temperatura de incubación elevada, manipulaciones físicas, incluyendo la mezcla utilizando una jeringa y aguja, ya que tienen un efecto adverso sobre la presión osmótica en la vacuna, como lo demostraron Colwell *et al.* (7).

CONCLUSIONES

En la práctica es importante que la vacuna tenga un título alto, se recomienda su aplicación 45 min posteriores a su reconstitución. Si el margen del título es mayor, la vacuna contendrá el título adecuado al momento de la aplicación. El uso de los antibióticos en conjunto con la vacuna de Marek reduce la viabilidad del virus, sin embargo el pH del antibiótico empleado es fundamental como se pudo demostrar en este experimento, el pH neutro del antibiótico ayuda a mantener la viabilidad del virus por consiguiente cada dosis vacunal tendrá el título adecuado al momento de la aplicación, capaz de montar una respuesta inmune en los pollitos de un día de edad.

REFERENCIAS

1. Petrone V, Hernández X, Téllez G, Enfermedad de Marek, Departamento de Producción Animal: Aves, Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia, UNAM, México, D. F. 2000.
2. Gimeno I. Actualidades en el control de la Enfermedad de Marek. USDA-ARS Avian Disease and Oncology Laboratory.
3. Petrone V, Méndez A, Fehervari T, Evaluación del efecto de la Ceftriaxona sobre las unidades formadoras de placa en diferentes cepas vacunales de Marek. Memorias de la XXIII Convención Anual ANECA, 1998 mayo 6-9, Puerto Vallarta (Jalisco) México.
4. Eidson C, Page R, Kleven S, In vivo and in vitro studies on effect of gentamicin sulfate on the efficacy of the turkey herpesvirus vaccine. Poultry Science 57 (6): 1519-1525, 1978.
5. Chacón J, Pimentel M, Pedroso A, Evaluación in vitro del efecto de Ceftiofur Sódico y de una nueva formulación de sulfato de gentamicina sobre la viabilidad del virus de la enfermedad de Marek. XX Congreso Latinoamericano de Avicultura Brasil 2007, mayo 25-28, Porto Alegre, Brasil.
6. Supplemental Assay Method for Titration of Monovalent, Cell Associated Marek's Disease Vaccines of Serotypes 1, 2, or 3. United States Department of Agriculture Center for Veterinary Biologics, Testing Protocol, SAM 406. Marzo 2011.
7. Colwell W., Simmons D., Horns V. Influence of Some Physical Factor son Survival of Marek's Disease Vaccine Virus. Avian Diseases 19 (14): 781-790. 1975.

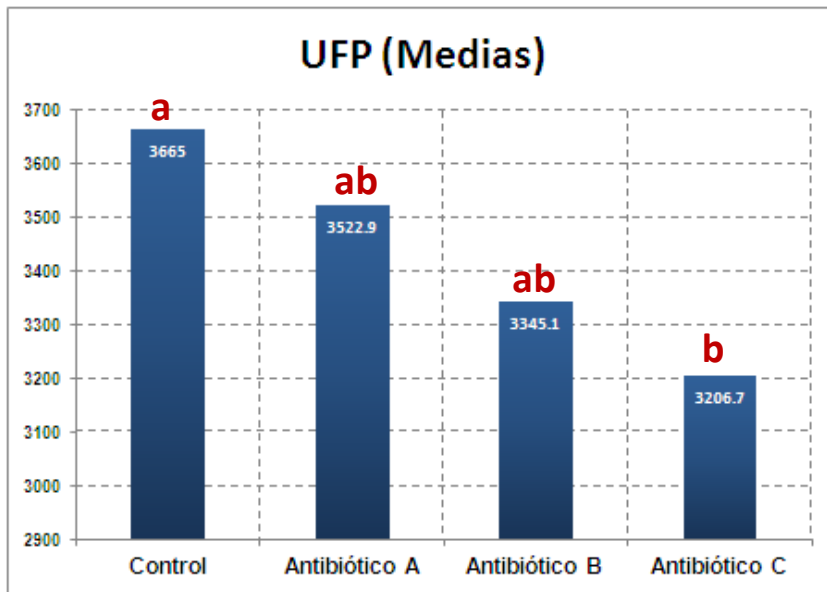
8. Geerligs H., Hoogendam A. Determination of optimal conditions for thawing and diluting cell bound CVI988 Marek's Disease Vaccine and stability of the diluted vaccine. Avian Diseases. 51 (4): 969-973.

Tabla 1. Lectura del pH de cada antibiótico y lectura del pH de la vacuna en combinación con cada antibiótico.

Tratamiento	I		II	
	Antibiótico	Antibiótico+HVT	Antibiótico	Antibiótico+HVT
1.Control HVT	-	7 (Sólo vacuna)	-	6.95 (Sólo vacuna)
2.HVT+antibiótico A	7.08	6.9	6.91	6.84
3.HVT+Antibiótico B	7.01	6.81	7.36	6.9
4.HVT+Antibiótico C	5.31	6.81	5.17	6.7

Con el análisis de varianza se observó que existe diferencia estadística significativa entre los tratamientos

Gráfica 1. Prueba de Tukey.



* Diferentes letras son estadísticamente diferentes (P<0.05)

EFFECT OF BIOESTIMULANT ON THE IMMUNE SYSTEM AND ITS TRANSMISSION TO THE PROGENY BREEDER HENS IN MEXICO

EFFECTO DE UN BIOESTIMULANTE SOBRE EL SISTEMA INMUNE Y SU TRANSMISIÓN A LA PROGENIE E GALLINAS REPRODUCTORAS PESADAS EN MÉXICO

L. Ocampo Camberos^A and M. Gómez Domínguez^B

^ADepto. de Fisiología y Farmacología, FMVZ, UNAM. Ciudad Universitaria. Del. Coyoacán. CP 04510. Mex. DF

^BDpto. Técnico Catalysis México. Calle La quemada No. 240, Col. Narvarte. Del. B. Juárez CP 03020. Mex. DF

RESUMEN

Mejorar la respuesta inmune a las vacunaciones y la transmisibilidad al pollito repercute en parvadas de pollitos más sanos generando obviamente mayor eficiencia, productividad y beneficios económicos para las empresas avícolas de reproductoras pesadas en México. Para el estudio se aplicó un bioestimulante a 115,514 aves reproductoras con su respectivo grupo control (115,165 aves) durante ocho semanas vía agua de bebida bajo condiciones de ambiente controlado en donde se obtuvo mejor calidad de pollito, mejores niveles de anticuerpos para ENC, BI, Reovirus, IBF y Anemia infecciosa aviar tanto en gallina reproductora como en la progenie de las aves tratadas con el bioestimulante, medidos por medio de la prueba de ELISA.

SUMMARY

Enhance the immune response to vaccinations and transmissibility of chicken flocks affects healthier chicks obviously generating greater efficiency, productivity and economic benefits of heavy poultry breeding companies in Mexico. For the study, a bio-stimulant to 28,042 breeding birds was applied to the respective control group (28,094 birds) for eight wk via drinking water under controlled environment conditions where better chick quality, higher levels of antibodies to ENC, BI were obtained reovirus, IBF and avian infectious anemia both breeding hen and the chick from birds treated with biostimulant measured by ELISA.

INTRODUCTION

Poultry dedicated to the production of fertile eggs, faces new challenges daily productivity that allow survival in a highly competitive market. Some of these challenges involve optimal vaccination programs, transmission of antibodies to chick and products that enhance the immune response. In this sense, the bioestimulante offers the possibility to optimize the immune response of breeding birds, efficiency in transmission of immunity to chicken, consequently improving their health (2,3).

The bioestimulante is a nutritional preparation, anti-oxidants, vitamins, trace elements, and active product of the extraction from licorice (glycyrrhizinic acid) with antiviral activity and stimulating the immune system (1,4,5).

OBJECTIVE

The objective of this study was to evaluate the efficacy of biostimulant, by measuring its effect on humoral immune level and its transmission to progeny.

MATERIAL AND METHODS

Installation. Commercial poultry farm located in Durango, Mexico in broiler breeder hens controlled environment with automatic systems. The animals used were 62,079 44 wk old Cobb 500 strain of FF. They were divided into two groups: (A) with 28,094 birds and (B) with 28,042 birds. The ratio of male/female was 10.29 %.

All animals received food and so far limited based on age and weight. Water intake was ad libitum. They were also vaccinated in accordance with timetables established on the farm.

Treatments. Control group (A) was considered the booths, 1, 3 and 5 without application of biostimulant. Treated group (B): the houses 2, 4 and 6 biostimulant treated at a rate of 0.1 mL product / 1 kg body weight in drinking water for 14 wk were considered.

Humoral immune response. Antibodies in chicken breeder: blood samples were taken at wk 44 and 52 weeks of age (18 samples/replication) and then determine serum antibody titers to the virus of Newcastle (ND), infectious bronchitis (IB), reovirus (REO), infection of the bursa (IBF) and infectious anemia (CAV) by ELISA. 5.2 Antibodies in chicken were followed to chicks three d old and identified by shelter group (A and B). The same tests were determined Hen.

RESULTS

Breeder, serological results (Figure 1). ELISA serologic results of chicks (Figure 2).

CONCLUSIONS

The biostimulant stimulates the production of higher titers of antibodies in breeding: ENC, BI, IBF, REO and CAV. 7.2. The biostimulant favors the transmission of antibody titers to the progeny: ENC, BI, IBF, REO and CAV.

REFERENCES

1. Badam, L. In Vitro Studies of the effect of glycyrrhizin from the Indian Glycyrrhiza glabra Linn on some RNA and DNA virus, Indian-J-Pharmacology. 1994.
2. Chavali, S.R. *et al.* An *in vitro* study of immunomodulatory effects of some saponins. Int. J. Immunopharmacol 9 (6) 675-83. 1987.
3. Hoever, G. *et al.* Antiviral activity of glycyrrhizinic acid derivatives against SARS-coronavirus. J. Med. Chem. 48 (4):1256-1259. 2005.
4. Krausse, R.M. *et al.* In vitro anti-Helicobacter pylori activity of extractum liquiritiae, glycyrrhizin and its metabolites. J. Antimicrob Chemother. 54 (1) 243-246. 2004
5. Lin, J.C. Mechanism of action of glycyrrhizinic acid in inhibition of Epstein-Barr virus replication in vitro. Antiviral. Res: 59 (1) 41-47. 2003.

Figure 1. Humoral immunity breeding hen. Serology results for ENC, BI, IBF, REO and CAV ELISA at 52 weeks of age.

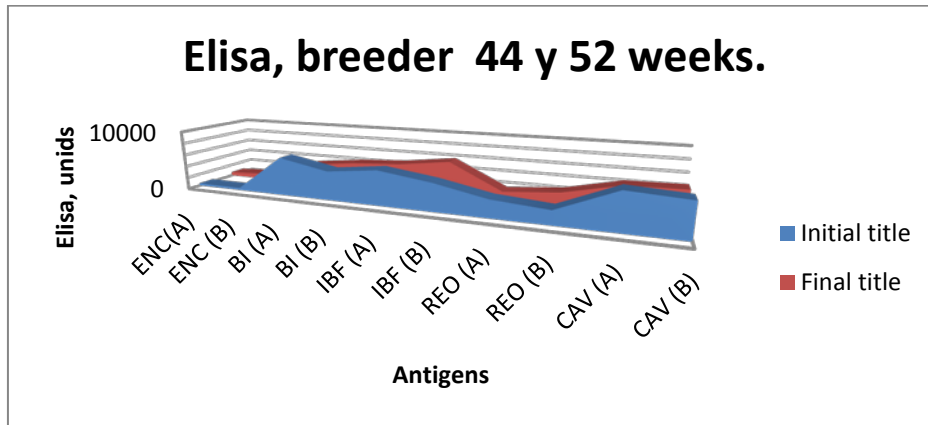
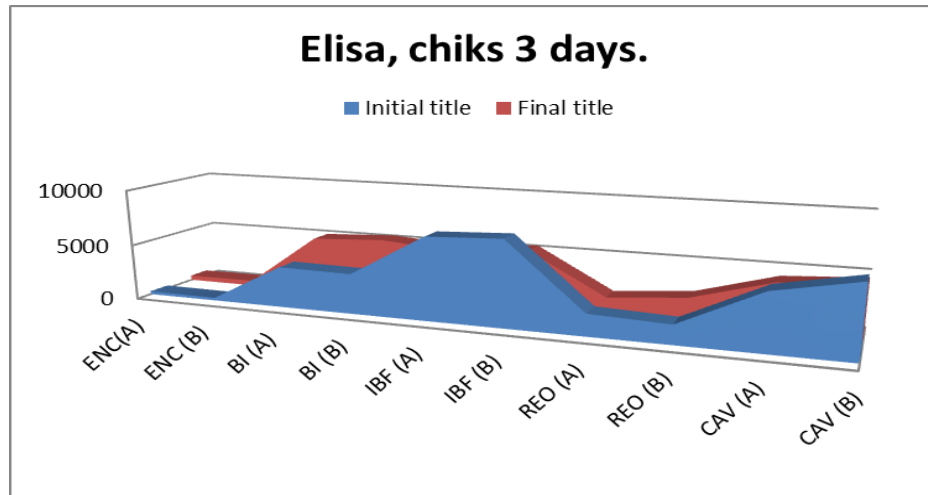


Figure 2. Chicks, serological results ELISA.



REOVIRUS AND LEG PROBLEMS IN ONTARIO BROILERS

REOVIRUS Y PROBLEMAS DE LAS PIERNAS EN POLLOS DE ENGORDA DE ONTARIO

E. Martin, M. Brash, S. Hoyland, C. Sandrock, and D. Ojic

RESUMEN

Un mayor número de casos de pollos de engorda con problemas de las piernas fue enviado al Laboratorio de Salud Animal en Ontario en 2012. Pruebas de múltiples agentes infecciosos se llevaron a cabo y se identificó un reovirus aviar (ARV) a partir de articulaciones cerradas del tarso, a menudo en combinación con otras causas de cojera (por ejemplo, bacterias, raquitismo, TD). Por lo tanto, se considera que la presencia de ARV es una de las posibles etiologías de la cojera.

Clinicamente los signos de cojera iban desde una leve dificultad para caminar hasta piernas ensanchadas o deformadas. Para los 14 días o más de edad, la parvada afectada se volvería coja de repente, a menudo con solo un piso o una caseta afectada. Más aves se vieron afectadas cuando la cojera se identificó más temprano. Las aves podían tener lesiones histológicas en los tendones y podrían identificarse ARV, pero los signos clínicos pueden o no haber sido evidentes. Las parvadas que fueron afectadas clinicamente podrían tener pérdidas de hasta 15% debido a la eliminación selectiva (desechos) con títulos mayores de ELISA ARV a partir de sangre tomada en el procesamiento.

Se obtuvo el genotipo de cuarenta y tres aislamientos de ARV del 2012 por medio de la secuenciación del segmento S1 y se comparó con 32 ARVs de años anteriores (2 del 2003, 2007 y 2008, 10 de 2010 y 7 de 2011). Treinta y tres ARVs de 2012 formaron dos grupos distintos por genotipo y fueron 40-50% diferentes de los virus aislados en los años anteriores. La primera detección de estas dos variantes de ARV en Ontario se produjo a mediados de 2012. Los 10 ARVs restantes de 2012 fueron similares a los aislamientos de ARV de años anteriores.

SUMMARY

An increased number of cases of Ontario broilers with leg problems were submitted to the Animal Health Laboratory in 2012. Testing for multiple infectious agents was conducted and avian reovirus (ARV) was identified from closed hock joints, often in conjunction with other causes of lameness (e.g. bacteria, ricketts, TD). Therefore, the presence of ARV was considered to be one of multiple possible etiologies of the lameness.

Clinically, the signs of lameness ranged from slight difficulty walking to splay leg or leg deformity. By 14 d or older an affected flock would become suddenly lame, often with only one floor or one barn affected. The earlier the lameness was identified the more birds become affected. Birds could have histologic lesions in the tendons and ARV could be identified but clinical signs may or may not have been evident. Flocks that were clinically affected could have losses of up to 15% due to culling with increased ARV ELISA titers from blood taken at processing.

Forty-three ARV isolates from 2012 were genotyped by S1 segment sequencing and compared to 32 ARVs from previous years (2 from each 2003, 2007 and 2008, 10 from 2010 and 7 from 2011). Thirty-three ARVs from 2012 formed two distinct clusters by genotyping and were 40-50% different from viruses isolated in previous years. The first detection of these two ARV variants in Ontario occurred mid-2012. Remaining 10 ARVs from 2012 were similar to ARV isolates from previous years.

USE OF ARTIFICIAL INTELLIGENCE (ARTIFICIAL NEURAL NETWORKS) TO CLASSIFY THE PATHOGENICITY OF *ESCHERICHIA COLI* ISOLATED FROM CHAUÁ PARROT (*AMAZONA RHODOCORYTHA*)

USO DE INTELIGENCIA ARTIFICIAL (REDES NEURALES ARTIFICIALES) PARA ESTABLECER UN ÍNDICE DE PATOGENICIDAD A PARTIR DE MUESTRAS DE *ESCHERICHIA COLI* NATIVAS DEL PERICO AMAZONA CORONA ROJA (*AMAZONA RHODOCORYTHA*)

F. de Oliveira Salle^A, D. Azeredo Bonissi^B, D. Tonini da Rocha^A, S. Luís da Silveira Rocha^A, H. Luiz de Souza Moraes^A, and C. Tadeu Pippi Salle^B

^ACenter of Diagnosis and Research in Avian Pathology (CDPA), Veterinary Faculty, Federal University of Rio Grande do Sul (UFRGS), Porto Alegre, Brazil.

^BUniversitary Center of Espírito Santo (UNESC), Veterinary Faculty, Colatina, Espírito Santo, Brazil

RESUMEN

La información disponible para este estudio fueron 14 muestras de *Escherichia coli* aislado de pericos amazona corona roja (*Amazona rhodocorytha*). Se crearon redes neurales artificiales haciendo asociaciones entre variables introducidas, con el fin de ajustar mejor el modelo. Los resultados se compararon a la base de datos real de muestras aisladas de pollos de engorda. El 85.71% de las muestras se relacionaron con una resistencia al suero y una producción de toxina; 87.71% de las muestras se relacionaron con la capacidad de adhesión; 57.14% de las muestras se relacionaron con la adquisición del hierro. Los resultados obtenidos del índice de patogenicidad (PI) fueron: 7.14% (PI=0); 14.2% (PI=1); 7.14% (PI=3); 50% (PI=6); 14.2% (PI=8); 7.14% (PI=10). La capacidad de zoonosis de este agente antimicrobiano reveló que genes con un alto PI también están presentes en humanos con meningococo (gen mat) así como en aves silvestres, con lo cual se refleja la importancia de este estudio.

SUMMARY

The data available for this study were 14 samples of *Escherichia coli* isolated from Chauá parrot (*Amazona rhodocorytha*). Artificial neural networks were created making associations between the input variables in order to find the best adjusted model. The results were compared to the actual database of samples isolated from broilers. In 85,71% of the isolates were related to serum resistance and toxin production; 87,71% of the isolates were related to responsible for adhesion capacity; 57,14% of the isolates were related to iron acquisition. The results of pathogenicity index (PI) obtained were: 7,14%(PI=0); 14,2%(PI=1); 7,14%(PI=3); 50%(PI=6); 14,2% (PI=8); 7,14%(PI=10). The potential of zoonosis of this microbial agent unveiled that genes with high PI are also present in humans with meningitides and in wild birds as well elucidating the importance of this study.

INTRODUCTION

E.coli is considered secondary to other agents, and it is the cause of avian extra-intestinal diseases. According to Rocha *et al.*(4), the virulence factors most frequently detected in respiratory isolates of *E. coli*, isolated in Rio Grande do Sul were serum resistance and colicins production. Virulence mechanisms of *E.coli* isolates potentially pathogenic for broilers avian pathogenic *Escherichia coli* (APEC) have been continuously studied and it is supposed to be of multifactorial cause. Different pathogens have been associated with food borne diseases, such as *E. coli* serotype O157: H7, *Salmonella*, *Campylobacter* and *Shigella* spp. (3). *E.coli* O157: H7 causes hemorrhagic colitis in humans and uremic syndrome, a disease of great gravity that leads to renal failure and death (2). The results of these authors also support the idea that certain human extraintestinal pathogenic *Escherichia coli* (ExPEC) and APEC may be zoonotic and APEC can be considered as a reservoir for genes associated with the virulence of ExPEC human having or comprising a high pathogenic potential for humans (1).

MATERIALS AND METHODS

Each inoculated sample was plated onto eosin methylene blue (EMB), incubated in the greenhouse where they remained for 24 h at 37°C. The first part was made with an aliquot of each sample was reactivated directly on MacConkey agar, seeded by exhaustion and incubated at 37°C for 24 h in a bacteriological incubator.

A bacterial colony was solubilized in 200 µL ultra-pure water in a 1 mL microtube (Eppendorf®) after it was cooled to -20°C for 10 min and then concentrated by centrifugation (12,000 rpm for two min). The supernatant discarded and the pellet resuspended with over 200 µL ultra-pure water. The material was kept in a water bath at 100°C for 10 min and the supernatant transferred to another microtube (Eppendorf).

This analysis detected 33 virulence genes, including genes responsible for the adhesion capacity, invasion, acquisition were surveyed iron, serum resistance, toxins production, a serine protease autotransporter and a pathogenicity island associated with the marker 73 CFTO.

The detection of 33 virulence genes was performed in six multiplex PCRs (4 multiplex-PCR protocols developed by Ewers *et al.*(1), 3 genes by multiplex PCR by Rocha *et al.*(4) and multiplex 6 for papG and fimH genes were investigated by a multiplex PCR developed by CDPA. The reaction mixture multiplex contains 25µL, including 2.5 µL buffer 10X, 1.25 µL of MgCl₂ 2.5mM, 0.3 µL of Taq DNA polymerase (1.5 U), 0.5 µL of each dNTP (2.5 mM), 2 µL of each primers (20 pmol) and 5 µL of bacterial DNA, supplemented with the appropriate volume of ultra-pure water.

The data used in this study were collected in a database, as follows. Characterization of genes associated with pathogenicity (afa/draB, crL, fimC, hrlA, ihA, papC, sfa/focCD, tsH, maT, gimB, ibeA, tia, chuA, fyuA, ireA, iroN1, irP2, iucD, sitD, sitDep, cvi/cvA, isS, neuC, kpsMTII, ompA, traT, cnF1/2, saT, vaT, hlyA, piC, malX, EAST1); Pathogenicity index (0 to 10); 14 antibiotics (amikacin, amoxicillin/clavulanic acid, ampicillin, cephalixin, ceftiofur, cefuroxime, ciprofloxacin, clindamycin, cotrimoxazole, enrofloxacin, gentamicin, norfloxacin, ofloxacin and tetracycline).

The artificial neural networks (ANNs) were previously constructed using the Neuroshell Classifier 2.1 software. The results available were transformed into a binary form. The negative results are represented by number 0 and the positive ones by 1. The first neural network model ranked the pathogenicity index from the characterization of 33 genes associated with virulence. The second neural network model predicted antimicrobial resistance and used as inputs characterization of 33 genes associated with virulence and pathogenicity index. This criterion was used for sensitivity 0 or resistance 1 to the 14 antibiotics studied, to the absence 0 or presence 1 of genes associated with pathogenicity. The outputs were resistance or sensitivity to 14 antibiotics obtained by Salle, 2009 (5).

RESULTS

The 14 strains of *E.coli* used in this study displayed 0-10, from 33 virulence genes investigated, with an average of 5.21 for pathogenicity index genes isolated, and a coefficient of variation 55.88. In 87.71% of the isolates was detected at least one related to adhesion (afa/draB, crL, fimC, hrlA, ihA, papC, sfa/focCD, tsH and maT) factor, in 57.14% isolates were detected at least one related to the invasion (gimB, ibeA and tia) factor, in 57.14% of the isolates was detected at least one factor related to iron acquisition (chuA, fyuA, ireA, iroN1, irP2, iucD, and sitD sitDep), 85.71% of the isolates was detected at least one related to serum resistance (cvi/cvA, isS, neuC, kpsMT II, ompA and traT). In 85,71 % of the isolates was detected at least one factor related to the production of toxins (cnF1/2, saT, vaT, EAST1 and hlyA).

From the results obtained through the joint Multiplex PCR performed in this study, and analysis of the data obtained through this on ANNs, it was possible to measure the pathogenicity index (PI) of each sample. The results obtained were PI=0(7% of the isolates); P=1(14% of the isolates); PI=3(7% of the isolates); PI=6(50% of the isolates); PI=8(14% of the isolates) and PI=10(7% of the isolates).

The antimicrobial analysis of the 14 *E.coli* strains predicted the follows results: amikacin (100% of the isolates was sensible); amoxicillin/clavulanic acid (100% of the isolates was sensible), ampicillin (85,71% of the isolates was sensible and 14,29% of the isolates was intermediate); cephalixin (100% of the isolates was sensible); ceftiofur (85,71% of the isolates was sensible and 14,29% of the isolates was intermediate); cefuroxime (100% of the isolates was sensible); ciprofloxacin (92,86% of the isolates was sensible and 7,14% of the isolates was intermediate); clindamycin (100% of the isolates was resistant); cotrimoxazole (64,29% of the isolates was sensible and 35,71% of the isolates was resistant); enrofloxacin (100% of the isolates was sensible), gentamicin (92,86% of the isolates was sensible and 7,14% of the isolates was resistant); norfloxacin (92,86% of the isolates was sensible and 7,14% of the isolates was resistant); ofloxacin (100% of the isolates was sensible) and tetracycline (42,86% of the isolates was

sensible, 21,53% of the isolates was intermediate, and 35,71% of the isolates was resistant). The statistical analysis performed to assess the relationship between PI and resistance to 14 antibiotics also showed that these variables are independent, and the results of the PI obtained using 14 antimicrobials tests were: 7% with PI=0; 14,2% with PI=1; 7% with PI=3; 50% with PI=6; 14,2% with PI=8; 7% with PI=10.

DISCUSSION

The improvements reached by research in general and the tools which have been used resulted in a better comprehension of the mechanisms of pathogenicity of *E. coli*. However, the differentiation of virulent from non-virulent samples is still a problem for veterinarians to come to a diagnosis and, as a consequence, to make decisions. By reaching correct classification percentages higher than 90%, the method proposed here has proved to be a powerful tool to support the veterinarian's decisions in the field. The characteristics of these modeling allowed the correct classification of the pathogenicity index and antimicrobial profile of the 14 isolates with a good degree of reliability, considering the sensitivity and the specificity.

Finally, with this methodology, the potential of zoonosis of this microbial agent unveiled that genes with high pathogenicity index are also present in humans with meningitides and in wild birds as well elucidating the importance of this study. Given the repeated references, it was found that *E.coli* is a normal pathogen of the intestinal microbiota of both man and animal, and deserves greater attention and study about its potential ability to transmit zoonosis. The possibility occurrence of zoonosis shall be a public health problem and end up messing with all the financial gearing of a country.

The results were compared to the actual database of samples isolated from broiler (which are part of this research line) and showed that the artificial neural networks were able of performing correct classification of the behavior of the samples, thereby making it possible to predict the antibiotic resistance of *E.coli*, and pathogenicity index using ANN's modeling, without the need for inoculating animals or antimicrobial susceptibility testing.

REFERENCES

1. Ewers, C. *et al.* Avian pathogenic, uropathogenic, and newborn meningitis-causing *Escherichia coli*: how closely related are they? *International Journal of Medical Microbiology*, v. 297, n. 3, 2007.
2. Nataro, J. P., Kaper, J. B. Diarrheagenic *Escherichia coli*. *Clin Microb Rev.* v. 11, p. 142-201, 1998.
3. Ribeiro, M. G. *et al.* De hambúrguer, leite e outros gêneros alimentícios à colite hemorrágica e síndrome urêmica-hemolítica. *Higiene alimentar.* v. 13, p. 88-97, 1999.
4. Rocha, A.C.G.P.*et al.* Genes associated with pathogenicity of avian *Escherichia coli* (APEC) isolated from respiratory cases of poultry. *Pesq. Vet. Bras.* v. 28. n. 3. 2008.
5. Salle, F.O. Utilização de inteligência artificial (redes neurais artificiais) para a classificação da resistência a antimicrobianos e do comportamento bioquímico de amostras de *Escherichia coli* isoladas de frangos de corte. Tese (Doutorado em Ciências Veterinárias) - Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2009.

PROSPECTIVA DE LA AVICULTURA MEXICANA VISIÓN 2014-2024

Ortega Sánchez de Tagle José, Ortiz Muñiz Ariel, Castaño Meneses Víctor, Carmona Medero Miguel Ángel,
Gurria Treviño Francisco, García Gómez Fernando y Zúñiga Quintanar Vanessa

sistemaproductoavesjosdt@live.com.mx

RESUMEN

Prospectiva de la avicultura mexicana visión 2014-2024. La metodología más conveniente y actual para estimar y prospectar la avicultura mexicana hacia el 2024 es la técnica de prospectiva en base a modelos econométricos. La prospectiva aporta elementos conceptuales y teóricos para una mejor comprensión del mundo y sus tendencias más relevantes. Esto permite ampliar el horizonte del pensamiento para actuar individual o colectivamente. En el ámbito de las actuaciones, posibilita establecer de manera realista qué cosas son ejecutables o no, en horizontes de corto y largo plazo.. Sobre la definición más simple de Prospectivo, Relativo al futuro: *presupuesto prospectivo*. Conjunto de análisis y estudios sobre las condiciones técnicas, científicas, económicas y sociales de la realidad futura con el fin de anticiparse a ello en el presente (*Diccionario de la lengua española* © 2005 Espasa-Calpe) Algunas semejanzas de la prospectiva con la planeación estratégica son: Priorizan los elementos relevantes, Planean para la toma de decisiones, Buscan resultados concretos. Las diferencias más significativas son:

Prospectiva	Planeación estratégica
Marco teórico global	Marco teórico específico
Incorpora Megatendencias	Incorpora micro tendencias
Proyecta a largo plazo	Proyecta a mediano plazo
Metodología interdisciplinaria	Metodología administrativa
Va de lo general a lo particular	Va de lo particular a lo general
Es deductiva	Es inductiva

Econometría. La econometría como disciplina forma parte de las matemáticas aplicadas, al utilizar conceptos matemáticos y estadísticos en la economía, ha resultado de gran utilidad para el estudio sobre el comportamiento actual y futuro de los fenómenos económicos, así como para identificar y cuantificar las relaciones estructurales que éstos mantienen entre sí, al igual que para expresar matemáticamente sus teorías y para verificarlas con el instrumental que les proporciona la estadística.

Al integrar en forma sistematizada los conocimientos sobre esta disciplina; describe los conceptos teóricos y la aplicación de las técnicas mediante las cuales es posible:

1. Realizar el análisis estructural de las relaciones entre variables independientes y dependientes.
2. Estimar a partir de información histórica la evolución futura de ciertas variables.
3. Hacer planeación micro y macroeconómica; y
4. Evaluar la aplicación de políticas de producción, comercialización, legislación, etc.

Como se indicó, dichas técnicas se aplican en la presentación matemática y en la verificación de cierta teoría económica, ya que mediante el análisis funcional se establecen las relaciones entre un fenómeno y las causas que hipotéticamente lo determinan, relaciones que posteriormente se comprueban, preferentemente, mediante el uso de los métodos de la estadística inferencial. Una vez que se comprueba que existen estas relaciones, se puede decir que se está en condiciones de estimar el comportamiento futuro del fenómeno.

Diseño experimental. Al ser la econometría la disciplina que expresa una teoría económica a través de las matemáticas y de verificarse con métodos estadísticos, es conveniente señalar que la expresión matemática adopta la forma de modelos.

Para su formulación se requiere metodológicamente de las siguientes etapas de trabajo:

1. Evolución de la teoría o hipótesis,
2. Elaboración de la base de datos,
3. Variables de modelaje,
4. Especificaciones: es la exposición de la teoría económica con símbolos matemáticos, es decir, la definición del modelo econométrico dirigido a probar la teoría económica.

5. Estimación: la determinación del valor numérico de los parámetros del modelo.
6. Verificación: Es la aceptación o el rechazo de la teoría económica mediante el método de pruebas de hipótesis estadísticas.
7. Predicción: Se evalúan relaciones estructurales y futuros resultados con base en el modelo establecido.
8. Utilización del modelo para fines de control, formulación o evaluación de parámetros.

MARCO DE REFERENCIA

Megatendencias en alimentación. El análisis de la Tendencia en el consumo global de proteína: El consumo mundial de proteína animal está aumentando en todos lados, se estima un consumo de carne de 43 Kg per cápita a nivel mundial, el incremento en ingreso genera demanda de proteína animal inmediatamente. Actualmente la producción de proteína animal esta en base a maíz y soya principalmente Con un 35 % de la cosecha de grano del mundo (de 2051, hasta 2012 se creció a 860 millones de toneladas), pero se requiere incrementar un 70 % para los próximos 20 años usada para producir proteína animal, El consumo de la carne tiene un gran impacto en el consumo final de grano y por tanto en la seguridad alimentaria global. En 1961, el 84,7% de la ingesta media de energía alimentaria de la población mundial llegó a partir de productos vegetales. En 2013, este porcentaje se redujo al 72,8%. *Desouzart. 2012*, Las primeras estimaciones del 2013 demuestran que ha sido el año cuando la producción mundial de carne de pollo superó los 100 millones de toneladas métricas por primera vez en la historia. *Organización para la Alimentación y la Agricultura de las Naciones Unidas*, Para la producción de huevos, un total de 2013 de aproximadamente 74 millones de toneladas métricas parece probable. Por lo tanto, la producción de carne de ave puede decir que ha expandido a nivel mundial en aproximadamente un 43% desde el año 2000, mientras que la producción de huevos ha crecido en más del 25% durante el mismo período. *Organización para la Alimentación y la Agricultura de las Naciones Unidas* La industria avícola mundial debe ser capaz de aprovechar su habilidad de conversión alimenticia superior de mercado en el futuro respecto a sus competidores de carne roja. Pollo proporción 2-a-1 conversión de alimento se compara favorablemente con la de la carne roja, que tienen relaciones de alimentación de conversión de 4-a-1 y de cerdo 3-a-1, *World market projections 2012* A medida que más de la población mundial vive en países menos desarrollados comienza a consumir más proteínas de ave, ya que cuesta menos. *Poultry USDSA, November. ©Copyright 2012, All Rights Reserved*. Para ser un actor global, no podemos ignorar las tendencias futuras hacia los productos que requieren menos recursos naturales (tierra, granos, agua, etc.) como es el caso de aves de corral y de la acuicultura", *Desouzart. 2012*

ABSTRACT

The important question is whether this trend will keep 2024 and relevant activities or strategies; this is obtained by econometric modeling technique, and the variables that can positively or negatively alter this trend. Approaches to econometric forecasting: Generally speaking, there are four approaches to economic forecasting based on time series : (1) Unlecuacionals regression models , (2) regression models of simultaneous equations , (3) autoregressive integrated moving average (ARIMA) And (4) autoregressive vector models (VAR) . They all are used. Publication of E.P.E. Box and G.M. Jenkins on time series analysis: forecasting and control (Time Series Analysis: Forecasting and Control Established a new generation of predictive tools . Popularly known as Box- Jenkins methodology (b) , but technically known as ARIMA methodology , the emphasis of this new method of prediction is unlecuacionals building or simultaneous equations but in the properties probabilistic or stochastic series of economic type themselves under the philosophy of allowing << that the information speak for itself >> Unlike regression models , in which is explained by the k regressors $x_1, X_3, X_3 \dots X_k$, in time series models BJ type, Y_1 can be explained by past or lagged values of itself and stochastic error terms. Therefore, ARIMA models are sometimes called - theoretical models, because they cannot be derived from any economic theory and theories often economic base of simultaneous equations models. Given the circumstances the Mexican poultry opportunities will be: Determine the growth of the Mexican poultry by 2024, Attend internal demand, Generate quality and competitiveness to export , Focus on globalization, Strengthen the habits and customs of the people , because today is a powerful non-tariff barrier .Support of research institutes .Biosecurity , traceability, food safety, Limit the importation .New marketing , competitiveness and value added niches, Develop and generate export capacity and skilled human resources, Search for export subsidies and be more competitive, legislate good production practices, is a priority and strategic resolve health disorders such as avian influenza H7N3. And use econometric formulation to maximize the profits of the farming. (*Econometría De Series De Tiempo Damodan N. Gujarati, Página 718*) Index.

MARCO CONCEPTUAL

Situación de la Avicultura Mexicana. La avicultura mexicana durante 2012, aportó el 0.77% en el PIB total, el 19.7% en el PIB agropecuario y el 40.9% en el PIB pecuario. El sector avícola mexicano participa con el 63% de la producción pecuaria; 34.6% aporta la producción de pollo, 27.9% la producción de huevo y 0.10% la producción de pavo. De 1994 al 2012 el consumo de insumos agrícolas, ha crecido a un ritmo anual de 2.8%, y cabe destacar que la avicultura es la principal industria transformadora de proteína vegetal en proteína animal. Para el 2013, se proyectó, que la avicultura generará 1 millón 188mil empleos, en 2012 la avicultura generó 1 millón 167mil empleos. Cabe mencionar que el 60 % de los empleos los genera la rama avícola de pollo, el 38% la de huevo y solo un 2% la de pavo. La parvada nacional avícola en México decreció 2.45% en 2012, respecto al crecimiento obtenido en 2011, por lo tanto la parvada es la siguiente: 466 millones de aves, 137 millones de gallinas ponedoras, 270 millones de pollos al ciclo y 512 mil pavos al ciclo. **Producción de carne durante el 2012:** Se produjeron 3.002 millones de toneladas de carne de pollo, muy por encima de los demás cárnicos, la producción de huevo fue de 2.386 millones de toneladas y la de pavo 9 mil toneladas. La producción de pollo en México, durante el periodo de 1994 a 2012 ha aumentado a un ritmo de crecimiento anual del 4.3 por ciento. Durante el 2012, el 94% de la producción de carne de pollo en México se concentró en los siguientes estados y regiones de la República Mexicana: La Laguna, Veracruz, Querétaro, Jalisco, Aguascalientes, Nuevo León, Puebla, Chiapas, San Luis Potosí, Michoacán, Yucatán, Estado de México, Sinaloa, Guanajuato y Morelos. Las importaciones mexicanas de carne de ave, se han incrementado gradualmente. En 2012 se importó 14.2% más que el año anterior, pero lo doble de los últimos 15 años, lo que significa que la Tasa de Crecimiento Anual de 1996 al 2010 es de 10.2 por ciento. La comercialización de pollo en México se lleva cabo de la siguiente manera: Vivo 33%, rosticero 26%, mercado público 19%, supermercado 15%, piezas 6% y productos de valor agregado 4 por ciento. Por lo que se refiere a la producción de huevo, de 1994 a 2012 creció a un ritmo anual de 2.8%, lo que significa que en dicho lapso, su crecimiento fue de 63%. **La producción de huevo en México durante el año 2012** fue de 2.38 millones de toneladas (108.5 millones de cajas anuales). México se ubicó como el sexto productor de huevo a nivel mundial, después de China (1,090 millones de cajas), EUA (218 millones de cajas), La Unión Europea (181 millones de cajas), India (178 millones de cajas) y Japón (114 millones de cajas). Cada caja de huevo consta de 360 unidades (30 docenas de huevos se produjo fundamentalmente en los siguientes estados y regiones del país como: Jalisco, Puebla, Sonora, la Laguna, Nuevo León, Yucatán y Guanajuato. La comercialización del huevo para consumo humano, conocido también como huevo para plato*, suele hacerse a través de tres vías principales: el 80% se comercializa a granel en los mercados tradicionales y centrales de abasto, el 14% en tiendas de autoservicio en envases cerrados y el 6% restante, se destina al uso industrial. En los últimos años, los precios del huevo han estado por debajo de los índices de inflación. **La producción de pavo en México durante 2012:** El 90% de la producción de carne de pavo en México se localiza en 8 estados: Chihuahua (24%), Yucatán (21%), Estado de México (12%), Puebla (11%), Tabasco (6%), Guerrero (5%), Veracruz (5%), Hidalgo (5%) y en otros estados tan solo el 11%. La producción de pavo fue de 8,190 toneladas anuales en 2012, con una tasa media de crecimiento anual de 1994-2010 del 0.9%.

Consumo humano. En la alimentación del mexicano, el sector avícola juega un papel importante, ya que 6 de cada 10 personas incluyen en su dieta productos avícolas (huevo y pollo), esto se debe, en parte, a que los precios de huevo y pollo se han reducido en términos reales en la última década, y también a que ambos son alimentos nutritivos y versátiles en su preparación. En México el consumo per-cápita de pollo ha aumentado de 15.83 Kg. en 1994 a 25.8 kg. Durante 2012, para el 2013, se estima que el consumo de pollo alcance los 25.9 kg. El principal consumidor de huevo a nivel mundial es México. El consumo per cápita del mexicano es de 20.8 Kg de huevo; casi un huevo diario. En segundo lugar se encuentra China con 20.4 Kg; en tercer lugar Singapur con 18,8 kg; Japón en cuarto lugar con 16.3 Kg, y en quinto Estados Unidos con 15.5 Kg. Por lo que se refiere al pavo, los productores están haciendo esfuerzos para acercar el producto al consumidor, *(Fuente, UNA Unión Nacional de avicultores, SIAP, SAGARPA hasta Dic de 2012 elaborado con datos reales).*

HIPÓTESIS

- I. La rectoría se establece en los procesos enfocados y estimados o calculados hacia el futuro.
- II. Es factible establecer modelos econométricos que permitan estimar el futuro del sistema producto “huevo para plato”
- III. Es factible establecer modelos econométricos que permitan estimar el futuro del sistema producto “Carne de pollo, gallina y pavo”

OBJETIVOS

- I. Generar un documento o Plan rector para los sistemas producto “Huevo para plato” y “Carne de ave” con técnicas de modelaje econométrico

- II. Estimar las variables que permitan generar rectoría en el sector o sistema
- III. Identificar y estimular áreas y métodos de difusión que permitan clarificar a los productores y consumidores sobre el beneficio de ingesta de los productos del sistema elegido

PROBLEMÁTICA A ESTIMAR PARA GENERAR RECTORÍA HACIA EL 2024

Somos el SEXTO país productor de carne de pollo, Mantenemos un crecimiento sostenido de 4.1 anual TMA en carne de ave. La avicultura Aporta el 63 % de la proteína animal que consume un mexicano con huevo. Del 100% de la carne de ave el pollo aporta el 78 % y aves de desecho el 20 % y pavo 2%.

Definición. Econometría es la disciplina que en el ámbito económico mide las relaciones que existen entre un fenómeno bajo estudio y las variables que lo explican. La medición se hace con el instrumental matemático y las relaciones se verifican, generalmente, con las técnicas de la estadística inferencial. El fenómeno económico se estudia a través de la observación y su comportamiento, se registra preferentemente con datos cuantitativos (en ocasiones con cualitativos, expresados a través de variables llamadas categóricas, dicotómicas, ficticios o dummy). La matemática permite expresar su comportamiento a través de ecuaciones que pretenden describir determinada teoría económica, misma que en turno permite a la estadística indicar si es o no verídica. Así, una vez que se expresa la teoría económica en forma uniecuacional o multiecuacional, la estadística proporciona los métodos para corroborar si se prueba o no con rigor técnico.

Propósito. Con base en la definición, puede decirse que la econometría tiene tres propósitos fundamentales:

1. Hacer el análisis estructural de las relaciones económicas.
2. Predecir a partir de valores observados o históricos de ciertas variables económicas, su evolución futura.
3. Evaluar la aplicación de políticas microeconómicas (a nivel de empresa) y/o macroeconómicas (a nivel de los grandes agregados de un país).

EJES RECTORES DE LA POLÍTICA SAGARPA VISION 2014-2024

- I. Prospectiva global y local Tendencias de producción en pollo, huevo y pavo en función de indicadores de demanda y consumo y tendencias socioeconómicas
- II. Tendencia en el costo y disponibilidad de Materias primas
- III. Sustentabilidad, competitividad, Innovación, cadena de valor, alimentos funcionales y ovoproductos y posicionamiento en Sistema producto: “Huevo para plato”, “Carne de Ave”
- IV. Normas inocuidad alimentaria para exportar y equivalencias para importar
- V. Recomendaciones de Bienestar en producción avícola y Bienestar humano
- VI. Campaña de desmitificación para productos avícolas, huevo y pollo
- VII. Solución a desordenes de salud y sanitarios en producción avícola, Financiamiento para contingencias sanitarias y exportación
- VIII. Estimar huella de carne o huella de carbón en avicultura
- IX. Posibles usos de la nanotecnología en producción avícola

BIBLIOGRAFÍA Y FUENTES

- I. Damodan N. Gujarati Econometría De Series De Tiempo , Página 718.
- II. Diccionario de la lengua española © 2005 Espasa-Calpe.
- III. Economía del Futuro.
- IV. La economía del bien común: <http://www.gemeinwohl-oekonomie.org/es/>.
- V. Servicio de Información Agroalimentaria y Pesquera, México - © - 2014, <http://www.siap.gob.mx/>.
- VI. SAGARPA-SENASICA Secretaria De Agricultura, Ganadería, Desarrollo Rural, Pesca y Alimentación “Programa Sectorial de Desarrollo Agropecuario, Pesquero y Alimentario 2013-2018”. <http://senasica.gob.mx/>.
- VII. UNA Unión nacional de avicultores <http://una.org.mx/2013/>.
- VIII. América Latina: Visiones de desarrollo prospectivo.

THE EFFECT OF CHICKEN PARVOVIRUS ON SPECIFIC PATHOGEN FREE WHITE LEGHORN CHICKENS

EFFECTO DEL PARVOVIRUS AVIAR EN POLLOS WHITE LEGHORN LIBRES DE PATÓGENOS ESPECÍFICOS

N. Ortega-Heinly^{AB}, T. Girshick^A, M. Khan^B, G. Risatti^B, and L. Zsak^C

^ACharles River Laboratories Avian Vaccine Services, 67 Baxter Road, Storrs, CT 06268

^BDepartment of Pathobiology and Veterinary Science, University of Connecticut, Storrs, CT

^CSoutheast Poultry Research Laboratory, USDA-ARS, Athens, GA

RESUMEN

Las enfermedades entéricas virales han causado pérdidas económicas en la industria aviar a nivel mundial. La principal enfermedad entérica viral que afecta a los pollos de engorda es el síndrome runting-stunting (RSS). Los síntomas de RSS incluyen retraso en el crecimiento y falla para alcanzar el peso al mercado. Estudios previos en pollos de engorda mostraron que el parvovirus aviar (ChPV) puede ser una de las causas de RSS. Hasta la fecha, el ChPV no ha sido estudiado por completo en pollos White Leghorn libres de patógenos específicos.

Para demostrar el efecto del ChPV en pollos, hembras SPF White Leghorn de 6 semanas de edad fueron infectadas oralmente con el ChPV, y la eliminación del virus fue medida a diferentes tiempos hasta el día 28. Para observar si el virus podía ser detectado en secciones del duodeno y el yeyuno por medio de inmunohistoquímica, pollos hembras SPF White Leghorn de 6 semanas de edad fueron inoculadas con ChPV. A los días 7, 14 y 21, las secciones de intestino se removieron y se filtraron para detectar la presencia del virus. En ambos casos, los resultados fueron comparables con aquellos observados en pollos de engorda.

INTRODUCTION

Viral enteric disease has caused an economic loss in the poultry industry worldwide due to diseased birds not reaching proper market weight. The major viral enteric disease effecting broiler chickens is runting-stunting syndrome (RSS). Symptoms of RSS include stunted growth and watery diarrhea. Birds become stunted due to the lack of nutrients absorbed. Upon necropsy, thin-walled intestines filled with a watery content are seen (1). Previous studies in broilers show chicken parvovirus (ChPV) may be a major factor in the cause of RSS (2). More studies are needed in understanding the viral protein roles of ChPV in RSS which can lead to the development of a proper vaccine. Because most of the specific pathogen free (SPF) broilers have been exposed to ChPV, a proper study model needs to be established. The SPF white leghorn chickens provided by Charles River are ChPV negative. Although they are layer chickens, viral shedding and immunohistochemistry can be compared to previous studies using broilers infected with ChPV.

MATERIALS AND METHODS

To measure virus shedding, cloacal swabs were collected from 10 six wk old female SPF White Leghorn chickens. The inoculum used, ABU-P2, was made from homogenized intestines of ABU-P1ChPV infected chickens. Each bird was inoculated via oral route with 0.1mL of ABU-P2. Cloacal swabs were collected at 0, 4, 7, 10, 14, 21, and 28 d post inoculation. Each swab was DNA extracted and amplified by ChPV PCR. Primers were developed following Zsak, *et al.* publication using PCR for the detection of ChPV (3).

To see whether the virus can be detected in the duodenum and jejunum sections by immunohistochemistry, 20 six wk old SPF female chickens were inoculated with 0.1ml ABU-P2, orally. At d 0, 7, 14, and 21, the intestinal sections were removed and screened for the presence of virus using antibodies against the viral protein VP2.

RESULTS AND DISCUSSION

When comparing viral shedding between ChPV infected broilers and SPF white leghorn chickens, 100% of the white leghorns were shedding at d 10 post inoculation while the broilers were at d 14 post infection. At 14 d post inoculation, the SPF white leghorns continued at 100% while the broilers dropped to 80%.

During harvest of the SPF white leghorn duodenum and jejunum sections, intestinal walls appeared thin and filled with excessive amounts of fluid. Immunohistochemistry shows presence of ChPV in the intestinal epithelium, similar to that of infected broilers. Therefore, when not factoring in differences in bird weight, SPF white leghorn chickens can be used in place of SPF broilers when studying the roles of ChPV viral proteins in the cause of RSS.

REFERENCES

1. Zavala, G., and Sellers, H. Runting-Stunting Syndrome. *The Poultry Informed Prof.* 85:1-4. 2005.
2. Zsak, L., Cha, R.M., and Day, J.M. Chicken parvovirus-induced Runting-Stunting Syndrome in young broilers. *Avian Dis.* 57:123-127. 2013.
3. Zsak, L., Strother, K.O., and Day, J.M. Development of a polymerase chain reaction procedure for detection of chicken and turkey parvoviruses. *Avian Dis.* 53:83-88. 2009.

LOS SISTEMAS PRODUCTO AVÍCOLAS MEXICANOS “CARNE DE AVE” Y “HUEVO PARA PLATO”

Ortega Sánchez de Tagle José, Ortiz Muñiz Ariel, Castaño Meneses Víctor, Gurria Treviño Francisco, García Gómez Fernando y Zúñiga Quintanar Vanessa

sistemaproductoavesjosdt@live.com.mx

ABSTRACT

Livestock Committee System Product. The product systems emerge as a need within livestock development, planning and its integration with the livestock production-consumption chains. Therefore one of the goals is to develop the agriculture sector in economic and financial terms , integrating the primary producer to the supply chain that culminates in the consumer and government efforts to steer producers to offer healthy agroproducts and quality food for whole society.

The mission of the livestock section of this program is "To design, implement and operate the policy of the livestock sector to promote the consolidation and development of livestock production sector; increase its modernization , productivity and competitiveness , and improve producers revenue by promoting , regulating and organizing the activity and better linkage with transformation processes , marketing and consumption as well as to prevent diseases in this area and ensure that foods are handled with quality procedures and safety , to increase their participation in national and international markets through the promotion, regulation and certification of production processes and raw ingredients that are used in them, and to contribute to the preservation of the environment ". Part of the livestock section establishes "promoting the producer organization and integration of livestock food chains which will be improved by: Articulating the actions of the various players involved production processes and consumption of food and livestock products and increase Participatory Committees by - product species and its relationship with the State Committees livestock Promotion and Protection, so to act as consultation bodies for management of livestock development."

INTRODUCCIÓN

Los sistemas producto surgen como una necesidad dentro de la planeación del desarrollo ganadero y avícola y su integración con las cadenas de Producción-consumo pecuario.

Por lo tanto uno de los objetivos es desarrollar el sector agroalimentario en términos económicos y financieros, integrando al productor primario a la cadena productiva que culmina en el consumidor así como dirigir los esfuerzos gubernamentales para que los productores oferten alimentos sanos y agroproductos alimenticios de calidad para toda la sociedad. El apartado de ganadería de este Programa, se establece como Misión para el sector “Diseñar, instrumentar y operar la política del sector pecuario para promover la consolidación y desarrollo de la producción ganadera; elevar su tecnificación, productividad y competitividad, así como mejorar los ingresos de los productores, mediante el fomento, regulación y organización de la actividad y su mejor vinculación con los procesos de transformación, comercialización y consumo, así como la de proteger a este sector de enfermedades y asegurar que los alimentos sean manejados con procedimientos de calidad e inocuidad, a fin de incrementar su participación e los mercados nacionales e internacionales, a través de la promoción , regulación y certificación de los procesos productivos y de los insumos que son utilizados en los mismos, así como para contribuir a la preservación del medio ambiente”.

Como parte del apartado de ganadería del Programa Sectorial establece “Promover la organización de productores e integración de cadenas agroalimentarias pecuarias” lo cual se impulsara “Articulando las acciones de los diferentes agentes económicos que participan e los procesos producción consumo de alimentos y productos pecuarios e impulsando los Comités Participativos por Especie-Producto y su vinculación con los Comités Estatales de Fomento y Protección Pecuaria, para que funjan como organismos de consulta y gestión de fomento ganadero”.

MISIÓN

Propiciar la integración de los agentes económicos que conforman las cadenas producción-proceso-comercialización consumo de las especies pecuarias y definir acciones consensuadas para su fortalecimiento.

VISIÓN

Ser foros de análisis y concertación para la vinculación de los eslabones de las cadenas productivas, así como para la solución eficiente y eficaz de la problemática que las afecta, con el fin elevar la producción y productividad a lo largo de las cadenas, para ofrecer productos de origen animal suficientes, de calidad y a precios competitivos, promoviendo una rentabilidad equitativa.

OBJETIVO

Propiciar la integración de los agentes económicos que participan en las diferentes fases de las cadenas productivas mediante foros permanentes de consulta y análisis de la situación ganadera que permitan la definición de medidas de fomento para el fortalecimiento de la planta productiva primaria y en los que se establezcan medidas conjuntas para dar solución a la problemática.

FUNDAMENTO JURÍDICO

Constitución Política de los Estados Unidos Mexicanos, Artículos 25, 26 y 27, Ley Orgánica de la Administración Pública Federal.

Artículos 9 y 35, Ley de Desarrollo Rural Sustentable, Artículos 149, 150, 151, 152, 153 y 179.

INTEGRACIÓN DE COMITÉS POR SISTEMA –PRODUCTO

La ganadería enfrenta diversos niveles de tecnificación y productividad, de integración vertical u horizontal y problemáticas específicas originadas por la disposición de insumos, características de la demanda y la incidencia de la oferta ya sea nacional o internacional de productos iguales o sucedáneos, entre otros.

Por lo tanto surge la necesidad de impulsar la operación de Comités Participativos Nacionales que se aboquen al análisis y resolución de problemas de índole general (programas de fomento, normalización de productos, esquemas de régimen comercial y arancelario, entre otros), a la conjunción y análisis de propuestas emanadas de los Comités Regionales, así como a la definición de esquemas de integración vertical y apoyos para su impulso, los que serán impulsados por los Comités Regionales.

Por su parte, cada región federativa presenta un diferente potencial de producción pecuaria, así como una problemática específica, de acuerdo a las especies que en ella se desarrollan y por ello, debe ser objeto de atención por las autoridades estatales, Delegaciones del Gobierno Federal, productores y demás agentes locales, cuya injerencia se circunscriba a este ámbito; de esta manera se apoya el proceso de Federalización que impulsa el Ejecutivo Federal.

Bajo la premisa de que en el país existen diversas entidades cuyas características presentan similitudes en los sistemas de producción pecuaria, en aspectos zoonosanitarios, de complementación, se efectuará una regionalización, tomando en cuenta las propuestas de productores, industriales, agentes comerciales y autoridades estatales, a fin promover la vinculación de los grupos o subcomités, para propiciar el intercambio de experiencias, y en su caso, la definición de acciones conjuntas, bajo la figura de Comités Regionales por Sistema-Producto.

FUNCIONES DE LOS COMITÉS POR SISTEMA-PRODUCTO

Concertar los programas de producción agropecuaria del país

Establecer los planes de expansión y repliegue estratégicos de los volúmenes y calidad de cada producto de acuerdo con las tendencias de los mercados y las condiciones del país.

Establecer las alianzas estratégicas y acuerdos para la integración de las cadenas productivas de cada sistema.

Establecer las medidas y acuerdos para la definición de normas y procedimientos aplicables en las transacciones comerciales y la celebración de contratos sin manejo de inventarios físicos.

Participar en la definición de aranceles, cupos y modalidades de importación y generar mecanismos de concertación entre productores primarios, industriales y los diferentes órdenes de gobierno para definir las características y cantidades de los productos, precios, formas de pago y apoyos del Estado.

Difundir información sobre producción, comercialización, transformación y consumo de productos, subproductos e insumos pecuarios.

Examinar la situación de las cadenas producción-consumo pecuaria en el ámbito nacional, regional y estatal.

Analizar los programas de fomento y protección pecuaria, con la finalidad de proponer su adecuación y complementación, para la obtención de mejores resultados.

Difundir programas y acciones de apoyo para el fomento ganadero y agroindustrial.

Definir y proponer esquemas para la vinculación de los agentes económicos de las cadenas productivas pecuarias e impulsar su aplicación.

Consensar los requerimientos de tecnología ganadera y agroindustrial, con el objetivo de proponer ante las instancias correspondientes, su generación, validación y transferencia, así como el impulso de sistemas integrales de asistencia técnica.

Inducir la aplicación de medidas para la conservación y mejoramiento de los recursos naturales y de disminución del impacto ambiental por las unidades de producción pecuaria y agroindustrial.

Determinar e impulsar acciones de apoyo a la transformación y comercialización de productos ganaderos.

Analizar la evolución del intercambio comercial, para proponer las adecuaciones de los regímenes comercial o arancelario de productos, subproductos e insumos ganaderos, que propicien una mayor competitividad de la producción nacional.

Impulsar la inversión y capitalización de las explotaciones ganaderas, a través de la promoción de la certificación de la pequeña propiedad ganadera. Apoyar la consecución de los acuerdos y compromisos emanados de los Comités.

Artículo 149. La Comisión Intersecretarial promoverá la organización e integración de Sistemas- Producto, como comités del Consejo Mexicano, con la participación de los productores agropecuarios, agroindustriales y comercializadores y sus organizaciones, que tendrán por objeto:

I. Concertar los programas de producción agropecuaria del país;

II. Establecer los planes de expansión y repliegue estratégicos de los volúmenes y calidad de cada producto de acuerdo con las tendencias de los mercados y las condiciones del país;

III. Establecer las alianzas estratégicas y acuerdos para la integración de las cadenas productivas de cada sistema;

IV. Establecer las medidas y acuerdos para la definición de normas y procedimientos aplicables en las transacciones comerciales y la celebración de contratos sin manejo de inventarios físicos;

V. Participar en la definición de aranceles, cupos y modalidades de importación; y

VI. Generar mecanismos de concertación entre productores primarios, industriales y los diferentes órdenes de gobierno para definir las características y cantidades de los productos, precios, formas de pago y apoyos del Estado.

Los Comités Sistema-Producto constituirán mecanismos de planeación, comunicación y concertación permanente entre los actores económicos que forman parte de las cadenas productivas.

La Comisión Intersecretarial promoverá el funcionamiento de los Sistemas-Producto para la concertación de programas agroindustriales y de desarrollo y expansión de mercados.

A través de los Comités Sistema-Producto, el Gobierno Federal impulsará modalidades de producción por contrato y asociaciones estratégicas, mediante el desarrollo y adopción, por los participantes, de términos de contratación y convenios conforme a criterios de normalización de la calidad y cotizaciones de referencia.

Artículo 150. Se establecerá un Comité Nacional de Sistema-Producto por cada producto básico o estratégico, el cual llevará al Consejo Mexicano los acuerdos tomados en su seno.

Para cada Sistema-Producto se integrará un solo Comité Nacional, con un representante de la institución responsable del Sistema-Producto correspondiente, quien lo presidirá con los representantes de las instituciones públicas competentes en la materia; con representantes de las organizaciones de productores; con representantes de las cámaras industriales y de servicio que estén involucrados directamente en la cadena producción-consumo y por los demás representantes que de conformidad con su reglamento interno establezcan los miembros del Comité.

Los comités de Sistema-Producto estarán representados en el Consejo Mexicano mediante su presidente y un miembro no gubernamental electo por el conjunto del Comité para tal propósito.

Artículo 151. Se promoverá la creación de los comités regionales de Sistema-Producto, cuyo objetivo central es el de planear y organizar la producción, promover el mejoramiento de la producción, productividad y rentabilidad en el ámbito regional, en concordancia con lo establecido en los programas estatales y con los acuerdos del Sistema-Producto nacional.

Artículo 152. Los Sistema-Producto en acuerdo con sus integrantes podrán convenir el establecimiento de medidas que, dentro de la normatividad vigente, sean aplicables para el mejor desarrollo de las cadenas productivas en que participan.

Artículo 153. La Comisión Intersecretarial, con la participación del Consejo Mexicano, establecerá los lineamientos para el Programa Nacional de Fomento a la Organización Económica del Sector Rural.

Artículo 179. Se considerarán productos básicos y estratégicos, con las salvedades, adiciones y modalidades que determine año con año o de manera extraordinaria, la Comisión Intersecretarial, con la participación del Consejo Mexicano y los Comités de los Sistemas-Producto correspondientes, los siguientes:

- I. Maíz;
- II. Caña De Azúcar;
- III. Frijol;
- IV. Trigo;
- V. Arroz;
- VI. Sorgo;
- VII. Café;
- VIII. Huevo;
- IX. Leche;
- X. Carne De Bovinos, Porcinos, Aves; y
- XI. Pescado.

REFERENCIAS

1. Lineamientos de Integración y Operación, Comités Sistema-Producto Pecuario, Coordinación General de Ganadería, 2002.
 2. Reglamento Interno de los Comités Nacionales Sistema-Producto Pecuario, Coordinación General de Ganadería, 2005.
 3. Plan rector.
 4. Ley de Desarrollo Rural Sustentable, 7 de Diciembre 2001.
- ANEXO I Ley de Desarrollo Rural Sustentable.

HIGH LEVEL OF PROTECTION ACHIEVED BY VACCINATION WITH A RECOMBINANT HVT-NDV VECTOR VACCINE AGAINST DIFFERENT GENOTYPES OF NEWCASTLE DISEASE VIRUS PRESENT IN LATIN AMERICA

NIVEL ALTO DE PROTECCIÓN ALCANZADO MEDIANTE LA UTILIZACIÓN DE UNA VACUNA RECOMBINANTE VECTOR HVT-NDV CONTRA DISTINTOS GENOTIPOS DE VIRUS DE LA ENFERMEDAD DE NEWCASTLE PRESENTES EN LATINOAMÉRICA

V. Palya^A, T. Tatár-Kis^A, T. Mató^A, B. Felföldi^A, E. Kovács^A, and Y. Gardin^B

^AScientific Support and Investigation Unit, Ceva-Phylaxia, Ceva Animal Health, 5 Szállás utca, Budapest, Hungary, H-1107

^BCeva Animal Health, Libourne, France

RESUMEN

La enfermedad de Newcastle (ND) es una de las enfermedades más importantes que causan grandes pérdidas a la industria avícola. En décadas pasadas, ha habido un cambio importante en los genotipos del virus de la ND (NDV) que han sido identificados como los prevalentes en la avicultura. La vacunación juega un papel importante en la prevención de la enfermedad. Se probó la eficacia de una vacuna recombinante del herpesvirus de pavos (HVT) que expresa el gen F de una cepa genotipo I del NDV contra cepas del NDV velogénicas que representan a los genotipos presentes en Latinoamérica (Por ejemplo Genotipos V, VII y VIId). Pollos SPF de un día de edad fueron vacunados y desafiados a las 4 semanas de edad con una de las tres cepas velogénicas de NDV pertenecientes a (A) genotipo V (muestra mexicana), (B) genotipo VIIb (muestra peruana) o (C) genotipo VIId (muestra asiática). La evaluación de la protección se realizó en base a la presencia o ausencia de signos clínicos y la reducción de la eliminación del virus. El uso de la vacuna recombinante previno los signos clínicos y redujo de manera significativa tanto la eliminación oro nasal como la cloacal de todas las cepas utilizadas en el desafío. Se resultados detallados.

SUMMARY

In the past decades, there has been a major shift in the genotypes of velogenic NDV strains responsible for severe epidemics in different parts of the world. Vaccination plays an important role in the prevention of the disease. Efficacy of a recombinant turkey herpesvirus (rHVT) vaccine expressing the F-gene of a genotype I NDV strain was tested against velogenic NDV strains representing the genotypes present in Middle and South America (i.e.: genotype V and VII). SPF chicks had been vaccinated at one d old and challenged at four wk of age with one of three velogenic NDV strains belonging to (A) genotype V (Mexican isolate), (B) genotype VIIb (Peruvian isolate) or (C) genotype VIId (Asian isolate). Level of protection was evaluated on the basis of clinical signs and mortality as well as reduction of challenge virus shedding. Vaccination with the recombinant vaccine prevented clinical signs and reduced significantly both oro-nasal and cloacal shedding of all tested challenge strains.

Velogenic strains of ND virus (NDV) cause a devastating disease of poultry in Middle and South America, Asia, Africa and Middle East, till today. Considerable genetic diversity has been shown among NDV strains. The genotype of velogenic NDV strains shows geographical region specific occurrence and temporal distribution with apparent links to well-defined epizootics (2,4). Genotype V, VII and VIII are the predominant genotypes of velogenic NDV causing the recent epidemics in poultry. Among them genotype VII is the most widespread, it has been associated to many outbreaks in Asia, Africa, Middle East and some South American countries (3).

Velogenic NDV strains from Mexico (1998-2006) were characterized as members of genotype V (7), while the strains detected in Venezuela and Peru belong to genotype VII. The Venezuelan isolates are grouping together with genotype VIId strains from China (8), while the Peruvian ones are most closely related to a Malaysian strain BMYBU87078, described as lineage 5b (genotype VIIb) by Aldous *et al.* (1).

Control of Newcastle disease, in addition to good biosecurity practices, primarily relies on preventive vaccination. Most vaccination programmes for ND include the use of live or inactivated vaccines. The continuous occurrence of ND outbreaks in commercial poultry flocks in many parts of the world indicates that routine vaccination in the field often fails to induce adequate immunity to control ND. The presence of maternally derived antibodies (MDA) also interferes with the establishment of an early and persisting immunity after single or even repeated vaccination during the first 2 to 3 weeks of life.

Another option for vaccinal protection against ND is the application of recombinant HVT vaccines, expressing the F gene of NDV (rHVT-NDV vaccines). There are several advantages of this type of vaccines, such as safety (i.e. lack of post-vaccinal respiratory reactions, good hatchability after *in ovo* vaccination) efficacy even in the presence of MDA to NDV and life-long immunity with a single application (5,6).

Efficacy of a rHVT-NDV vaccine, expressing F gene from a serotype I NDV strain was tested against three different NDV strains representing the genetic groups present in Latin America (i.e. genotype V, VIIb and VIIId) under controlled experimental conditions.

MATERIALS AND METHODS

Chickens. One day old SPF layer-type chickens were used for the experiment. The chicks were kept in isolated animal rearing house during the immunization period. Challenge infections and post-challenge observations were conducted in isolators.

Vaccine and challenge viruses. The cryo-preserved cell-associated rHVT-NDV vaccine (Vectormune[®] ND, Ceva Animal Health) expressing the F protein of the avirulent D26/76 genotype I NDV strain was used in the study. The vaccine was diluted to dose in the corresponding diluent. The challenge virus strains were isolated from field ND cases and propagated in embryonated SPF hens' eggs. All of them proved to be free from extraneous agents. The isolate representing genotype V originated from Mexico, 2008 (identification: D516/1 MX, GenBank accession number JQ002630, (5)). As the representative of genotype VIIb, a Peruvian NDV strain from 2005 (D575/6 PE) was selected. This challenge strain shows 98% nucleotide homology on the partial F gene sequence with the Poultry/Peru/1918-03/2008 strain (3). Genotype VIIId strain used in the study, that represents the genotype reported from Venezuela, was a Chinese isolate from 2010 (D1500/2/1). The Venezuelan NDV isolate described by Perozo et al. (8) shows high homology with the genotype VIIId isolate (BLAST Search) used in our experiment.

Study design. One d old chicks were assigned to two groups: one was vaccinated with one dose of the rHVT-NDV vaccine s.c., the other group remained untreated. At 28 d of age, 30 vaccinated and 30 control chickens were submitted to challenge infection (3 subgroups were set from both groups according to the challenge virus used; number of birds/subgroup was 10). Infection was performed with a dose of 5.0 log₁₀ ELD₅₀/chicken via intra-nasal route. During the post-challenge observation period clinical signs and mortality were monitored daily. Oro-nasal (choanal slit) and cloacal swabs were collected at 2, 4, and 7 d post-challenge.

Measurement of NDV RNA load in the swab samples. RNA was extracted from the swab samples by QIAextractor Virus kit (Qiagen) according to the manufacturer's instructions. Then quantitative real-time one-step RT-PCR, amplifying a fragment of M gene (TaqMan[®] NDV reagents and controls, Life Technologies[™]) was performed. Internal positive control supplied by the manufacturer was included. Titer equivalent unit was calculated by extrapolation from sample Ct to the Ct of standard (total RNA extracted from tenfold dilution series of the relevant challenge virus strain with known ELD₅₀ titer).

RESULTS

All non-vaccinated control chickens died due to the challenge infection between 4 to 6 d post-infection, while all vaccinated chickens proved to be protected both against clinical signs and mortality attributable to challenge. Challenge virus RNA load measurement results are summarized in Table 1.

NDV RNA load in the oro-nasal swabs of the non-vaccinated control birds was higher compared to the cloacal swabs at 2 days post-challenge (dpch), but the level of shedding via the two routes became comparable and very high at 4 dpch, when mortality started. No data available for the control group since all control birds died by 7 dpch. There was a very strong, significant effect of vaccination on the shedding of challenge virus. Only limited shedding was detected via the oro-nasal route of vaccinated chickens (3.5-5.5 log₁₀ reduction compared to the controls was achieved at 4 dpch). Cloacal shedding was more efficiently suppressed resulting in no detectable NDV RNA in the cloacal swabs in the great majority of samples (only a few samples contained very low level of NDV RNA at a single sampling date in the subgroup challenged with the genotype VIIId strain). Challenge virus RNA load of the

cloacal samples in the vaccinated subgroups was by 5.5-6.6 log₁₀ lower compared to the corresponding control subgroup.

DISCUSSION

Efficacy of a recombinant HVT-NDV vaccine, expressing the F-gene of a NDV strain belonging to genotype I was tested against three different NDV challenge strains. The challenge strains represent all those genetic groups of velogenic NDV which are prevalent in Middle and South America. Although the insert in the vaccine was heterologous to the challenge strain (the donor strain belongs to a very distinct genotype), a single vaccination with one dose at day-old provided not only full protection against clinical signs and mortality, but strongly reduced (by the oro-nasal route) or even totally prevented (by the cloacal route) the shedding of challenge virus. The strong immunity which developed in the vaccinated birds was able to prevent the dissemination of challenge virus in the body (no cloacal shedding), and very strongly suppressed its local replication in the oro-nasal mucosa. Our results indicate that very high level of protection can be achieved with the tested rHVT-NDV vaccine against genetically divergent velogenic NDV strains circulating in Middle and South America.

REFERENCES

1. Aldous, E. W., J. K. Mynn, J. Banks and D. J. Alexander. A molecular epidemiological study of avian paramyxovirus type 1 (Newcastle disease virus) isolates by phylogenetic analysis of a partial nucleotide sequence of the fusion protein gene. *Avian Pathol.* 32: 239-257. 2003.
2. Czeglédi, A., D. Ujvári, E. Somogyi, E. Wehmann, O. Werner, B. Lomniczi. Third genome size category of avian paramyxovirus serotype 1 (Newcastle disease virus) and evolutionary implications. *Virus Res.* 120: 36-48. 2006.
3. Diel, D. G., L. Susta, S. C. Garcia, M. L. Killian, C. C. Brown, P. J. Miller and C. L. Afonso. Complete genome and clinicopathological characterization of a virulent Newcastle disease virus isolate from South America. *J. Clin. Microbiol.* 50:378-387. 2012.
4. Miller, P. J., E. L. Decanini and C. L. Afonso. Newcastle disease: Evolution of genotypes and the related diagnostic challenges. *Infect. Genet. Evol.* 10:26-35. 2010.
5. Palya, V., I. Kiss, T. Tatár-Kis, T. Mató, B. Felföldi and Y. Gardin. Advancement in vaccination against Newcastle disease: Recombinant HVT NDV provides high clinical protection and reduces challenge virus shedding with the absence of vaccine reactions. *Avian Dis.* 56:282-287. 2012.
6. Palya, V., T. Tatár-Kis, T. Mató, B. Felföldi, E. Kovács and Y. Gardin. Onset and long-term duration of immunity provided by a single vaccination with a turkey herpesvirus vector ND vaccine in commercial layers. *Vet. Immunol. Immunopathol.* In press, available online.
7. Perozo, F., R. Merino, C. L. Afonso, P. Villegas and N. Calderon. Biological and phylogenetic characterization of virulent Newcastle disease virus circulating in Mexico. *Avian Dis.* 52:472-479. 2008.
8. Perozo, F., R. Marcano and C. Afonso. Biological and phylogenetic characterization of a genotype VII Newcastle disease virus from Venezuela: Efficacy of field vaccination. *J. Clin. Microbiol.* 50: 1204-1208. 2012.

Table 1. ND challenge virus RNA load in the oro-nasal and cloacal swabs.

challenge virus	group	titer (lg ELD ₅₀ /0.1 ml; mean and STD or difference between the two groups)			equivalent			units
		oro-nasal swab			cloacal swab			
		2 dpch	4 dpch	7 dpch	2 dpch	4 dpch	7 dpch	
Genotype V (strain D516/1)	vaccinated	0.8 ^b ±0.9	1.3 ^b ±1.3	0.9 ±1.0	0.0 ^b ±0.1	0.0 ^b ±0.0	0.0 ±0.0	
	control	3.9 ^a ±0.6	6.8 ^a ±0.4	NA -	1.2 ^a ±1.2	6.4 ^a ±0.5	NA -	
	reduction vaccination	by	3.1	5.5	NA	1.2	6.4	NA
Genotype VII PE (strain D575/6)	vaccinated	2.9 ^b ±0.5	3.5 ^b ±0.5	1.2 ±1.3	0.0 ^b ±0.0	0.0 ^b ±0.0	0.0 ±0.0	
	control	4.8 ^a ±0.3	7.0 ^a ±0.3	NA -	1.1 ^a ±1.5	6.6 ^a ±0.4	NA -	
	reduction vaccination	by	1.9	3.5	NA	1.1	6.6	NA
Genotype VIId (strain D1500)	vaccinated	2.2 ^b ±1.3	1.8 ^b ±1.4	0.6 ±1.1	0.0 ^b ±0.0	0.2 ^b ±0.5	0.0 ±0.0	
	control	4.8 ^a ±0.5	5.8 ^a ±0.5	NA -	2.3 ^a ±0.6	5.7 ^a ±0.7	NA -	
	reduction vaccination	by	2.6	4.0	NA	2.3	5.5	NA

Different superscript letters indicate statistically significant difference between the vaccinated and the corresponding control group (Kruskal-Wallis test, p<0.05)

Results from the same type of samples collected at the same date were compared

NA: not applicable

COMPARING THE EFFICACY OF KILLED ND VACCINES CONTAINING ANTIGEN PREPARED FROM GENOTYPE II, V OR VII STRAINS AGAINST CHALLENGE WITH HOMOLOGOUS OR HETEROLOGOUS VELOGENIC NDV STRAINS

COMPARACIÓN DE LA EFICACIA DE VACUNAS MUERTAS DE LA ENFERMEDAD DE NEWCASTLE QUE CONTIENEN ANTÍGENO PREPARADO DE CEPA DE GENOTIPO II, V O VII CONTRA UN DESAFÍO CON CEPAS VELOGÉNICAS HOMÓLOGAS O HETERÓLOGAS DEL VIRUS DE LA ENFERMEDAD DE NEWCASTLE

V. Palya^A, T. Tatár-Kis^A, T. Mató^A, B. Felföldi^A, E. Kovács^A, and Y. Gardin^B

^AScientific Support and Investigation Unit, Ceva-Phylaxia, Ceva Animal Health, 5 Szállás utca, Budapest, Hungary, H-1107

^BCeva Animal Health, Libourne, France

RESUMEN

La enfermedad de Newcastle (ND) es una de las principales enfermedades que causan grandes pérdidas a la industria avícola. Las cepas velogénicas de campo en Latinoamérica pertenecen a los genotipos V o VII, mientras que las vacunas muertas convencionales contienen antígenos de cepas vacunales pertenecientes al genotipo II. El objetivo de nuestro estudio fue comparar la inmunogenicidad y la eficacia de tres vacunas muertas experimentales preparadas a partir de antígenos de los genotipos II, V ó VII del virus de la ND. Pollos SPF de un día de edad fueron vacunados y a las cuatro semanas de edad fueron desafiados con el genotipo V (muestra mexicana), o el genotipo VII (muestra asiática). La evaluación de la protección se llevó a cabo en base a la presencia o ausencia de signos clínicos y la reducción de la eliminación del virus. Pruebas cruzadas de inhibición de la hemaglutinación mostraron pequeñas diferencias entre las vacunas sin importar la antigenicidad. La inmunización con cualquiera de las vacunas previno la presencia de signos clínicos y redujo de manera significativa tanto la carga viral oro nasal como la cloacal para las dos cepas utilizadas en el desafío. Se presentan resultados detallados.

SUMMARY

The velogenic field NDV strains in Latin America belong to genotype V or VII, while the conventional killed vaccines contain antigen of vaccine strains belonging to genotype II. The aim of our study was to compare the immunogenicity and efficacy of three different experimental killed vaccines prepared from antigens of genotype II, or genotype V or genotype VII NDV. SPF chicks vaccinated at day-old with the different experimental vaccines were challenged either with genotype V, or genotype VII NDV. Evaluation of protection was performed on the basis of the presence or absence of clinical signs and reduction in the level of challenge virus shedding. Cross-haemagglutination-inhibition test showed differences among the vaccines regarding antigenicity. Immunization with any of the vaccines prevented clinical signs and reduced significantly the challenge virus shedding both by the oronasal and cloacal routes.

Velogenic strains of Newcastle disease virus (NDV) cause important economic losses for the poultry industry. The predominant genotypes of velogenic NDV causing the recent epidemics are genotype V, VII and VIII. Among them genotype VII (G-VII) is the most widespread, it has been associated to many outbreaks in Asia, Africa, Middle East and South America (1, 8). The presence of the other two genotypes is restricted to certain geographical areas: genotype V (G-V) is endemic in Middle America and has also been responsible for exotic ND in North America (7), while genotype VIII (G-VIII) is prevalent in South Africa.

Preventive vaccination plays a key role in the control of ND. Most of the vaccine strains used belongs to genotype II (G-II) or G-I, which are heterologous to the recent field strains. Publications are in agreement regarding the good efficacy of heterologous vaccines in the prevention of clinical signs and mortality (1,3,4,8). On the other

side, there are contradictory conclusions on the possibility to improve reduction of challenge virus shedding with genotype-matched vaccines (2,3,4,5).

The aim of our study was to compare the efficacy of killed vaccines prepared from G-II, G-V or G-VII NDV antigens against challenge with G-V or G-VII NDV strain in a well-controlled experimental set-up. Evaluation of vaccine efficacy was based on clinical signs, reduction of challenge virus shedding and on the effect of challenge virus spreading to contact birds.

MATERIALS AND METHODS

Chickens. Day old SPF layer-type chickens were used for the experiment. The chicks were kept in isolated animal rearing house during the immunization period. Challenge infections and post-challenge observations were conducted in isolators.

Vaccine and challenge viruses. Experimental killed vaccines were prepared either from LaSota strain or a Mexican G-V strain (D516/1 MX, (6)) or a representative G-VII strain (D1524/1/1,2/MY/10 originated from Malaysia). All strains were propagated and titrated in embryonated hens' eggs. After inactivation water-in-oil type emulsion vaccine was formulated. Amount of NDV antigen in each vaccine was set to be the same calculated on the bases of the pre-inactivation titer ($8.6 \log_{10}$ EID₅₀/dose). The same strains of velogenic NDV were used for the vaccine preparation and challenges.

Study design. Day old chicks were assigned to four groups: three of them were vaccinated with one of the killed vaccines (0.2 mL, s.c.), the fourth group remained untreated. At 28 d of age, groups of 20 chickens from each vaccinated group and 15 control chickens were submitted to challenge either with the Malaysian strain (G-VII), or with the Mexican strain (G-V). Challenge infection was performed with a dose of $5.0 \log_{10}$ ELD₅₀/chicken via intra-nasal route. During the 14 d long post-challenge observation period clinical signs and mortality were monitored daily. Oro-nasal (choanal slit) and cloacal swabs were collected at 3, 5, and 7 d post-challenge. In case of the Mexican strain, two susceptible SPF sentinels were introduced at five dpch to the 20 vaccinated and challenged chickens to monitor the possible spreading of challenge virus.

Measurement of NDV RNA load in the swab samples. Amount of challenge virus RNA was measured by real-time one-step RT-PCR amplifying a fragment of M gene (TaqMan[®] NDV reagents and controls, Life Technologies[™]). Positivity limit was set at less than 36 Ct.

Hemagglutination inhibition test. Standard method was used, with four HA unit of the antigen. The same antigens were used for the HI test and vaccine preparation. Humoral immune response to vaccination was measured with all the three antigens in the pre-challenge samples.

RESULTS

Serological results. HI test results obtained at 28 d post-vaccination with HI antigens homologous to the vaccines showed comparable antibody level in all the three vaccinated groups (\log_2 HI titer mean and STD 8.1 ± 0.7 , 7.9 ± 0.6 or 8.2 ± 0.7 in the groups immunized with G-II, G-VII or G-V antigen, respectively). Cross-HI test revealed serological differences among the vaccines. Relatedness (R-value) calculated by the Archetti-Horsfall formula was 0.73 between the G-II and the G-VII strains, but markedly lower (0.26) between the G-II and the G-V strains.

Clinical protection. All challenged control chickens died due to the challenge infection between four to five d or four to six d post-challenge (dpch) in case of the Mexican or Malaysian challenge strain, respectively. On the contrary, each of the vaccinated chickens was protected against clinical signs and mortality, regardless the vaccine and the challenge strain used.

CHALLENGE VIRUS RNA LOAD MEASUREMENT

Results are summarized in Table 1. After challenge with G-VII (Malaysian) NDV strain, very high RNA load was measured in the control group both in the oro-nasal and the cloacal swabs (equivalent to the RNA amount in the challenge virus suspension having a titer of 7.4 or 8.5-8.6 \log_{10} ELD₅₀/mL at 3 or 5 dpch, respectively). Vaccination suppressed the challenge virus replication significantly. At 5 dpch, when the highest virus loads were found in the birds, 2.6-3.6 \log_{10} reduction was measured in the oro-nasal swabs, while the reduction in the cloacal swabs was much stronger (6.2-7.4 \log_{10}). This resulted in no detectable or very limited virus RNA amount in the cloacal swabs. Comparison of the different vaccines showed that their efficacy in reducing cloacal shedding was the same and only slight difference could be detected in the shedding by the oro-nasal route.

In case of the G-V (Mexican) NDV challenge, the amount of NDV-specific RNA in the control chickens was

equivalent to the RNA content of the challenge virus suspension with a titer of 6.5/8.2 or 5.8/7.5 log₁₀ ELD₅₀/mL at 3 dpch/5 dpch in the oro-nasal or cloacal swabs, respectively. All the three vaccines reduced challenge virus replication significantly. Cloacal shedding was very efficiently controlled by vaccination, resulting in no positive result. Reduction of oro-nasal shedding in the vaccinated groups was 3.1-5.1 log₁₀ compared to the control group at 5 dpch. Significantly stronger suppression of challenge virus shedding through the oro-nasal route was achieved by the homologous vaccine, however the spreading of challenge virus to susceptible chickens was equally controlled by all the three vaccines. None of the co-mingled sentinels showed clinical signs or seroconverted and all the oro-nasal swabs collected at nine days post-exposure proved to be negative with PCR.

DISCUSSION

Efficacy of a conventional, LaSota strain-based killed vaccine (G-II) was compared with killed vaccines prepared from genotype V (G-V) and VII (G-VII) NDV. Cross-serological results showed close relatedness between the LaSota strain and the tested G-VII strain, while the G-V strain differed markedly from both of them. All the vaccines provided complete clinical protection against both challenge viruses (G-V or G-VII). Results indicate strong control on the dissemination of challenge virus in the body (no cloacal shedding), regardless the vaccine and the challenge strain used. Local replication of both challenge viruses in the oro-nasal mucosa was reduced significantly by all vaccines. In case of the challenge with G-VII strain, the homologous vaccine was slightly (not significantly) superior to the LaSota vaccine, while in case of G-V challenge there was a marked difference in favour of the homologous vaccine. However, both the heterologous and the homologous vaccines showed similar efficacy in preventing the G-V challenge virus spreading to sentinels. Our results support published field experiences and results of experiments with conventional live vaccines (2) or rHVT-NDV vaccines (6) which showed that immunization programmes based on genotype I and II NDV strains are suitable for the efficient control of ND, including the suppression of virus shedding, following field challenge with any genotype of NDV strains if the quality of vaccine and its application are adequate.

REFERENCES

1. Diel, D. G., L. Susta, S. C. Garcia, M. L. Killian, C. C. Brown, P. J. Miller and C. L. Afonso. Complete genome and clinicopathological characterization of a virulent Newcastle disease virus isolate from South America. *J. Clin. Microbiol.* 50:378-387. 2012.
2. Dortmans, J. C. F. M., B. P. H. Peeters and G. Koch. Newcastle disease virus outbreaks: Vaccine mismatch or inadequate application? *Vet. Microbiol.* 160: 17–22. 2012.
3. Hu, S., H. Ma, Y. Wu, W. Liu, X. Wang, Y. Liu and X. Liu. A vaccine candidate of attenuated genotype VII Newcastle disease virus generated by reverse genetics. *Vaccine* 27: 904–910. 2009.
4. Kapczynski, D. R., and D. J. King. Protection of chickens against overt clinical disease and determination of viral shedding following vaccination with commercially available Newcastle disease virus vaccines upon challenge with highly virulent virus from the California 2002 exotic Newcastle disease outbreak. *Vaccine* 23:3424–3433. 2005.
5. Miller, P. J., D. J. King, C. L. Afonso, and D. L. Suarez. Antigenic differences among Newcastle disease virus strains of different genotypes used in vaccine formulation affect viral shedding after a virulent challenge. *Vaccine* 25: 7238–7246. 2007.
6. Palya, V., I. Kiss, T. Tatár-Kis, T. Mató, B. Felföldi and Y. Gardin. Advancement in vaccination against Newcastle disease: Recombinant HVT NDV provides high clinical protection and reduces challenge virus shedding with the absence of vaccine reactions. *Avian Dis.* 56:282–287. 2012.
7. 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.
8. Perozo, F., R. Merino, C. L. Afonso, P. Villegas and N. Calderon. Biological and phylogenetic characterization of virulent Newcastle disease virus circulating in Mexico. *Avian Dis.* 52:472–479. 2008.

Table 1. ND challenge virus RNA load in the oro-nasal and cloacal swabs.

challenge virus	group	Amount of NDV RNA (Ct values; mean and STD)						Reduction by vaccination compared to the corresponding control group (log ₁₀ copy number)			
		oro-nasal swab			cloacal swab			oro-nasal swab		cloacal swab	
		3 dpch	5 dpch	7 dpch	3 dpch	5 dpch	7 dpch	3 dpch	5 dpch	3 dpch	5 dpch
Genotype VII	Vaccinated 1 (GII antigen)	28.5 ^b ±3.5	25.7 ^{bc} ±1.7	31.0 ^a ±2.3	40.0 ^b ±0.0	36.2 ^b ±4.5	36.4 ^a ±4.2	2.8	3.1	6.3	6.2
	Vaccinated 2 (GVII antigen)	29.9 ^b ±2.7	27.1 ^c ±3.0	35.8 ^b ±4.3	39.8 ^b ±0.5	40.0 ^b ±0.0	35.9 ^a ±5.3	3.3	3.6	6.2	7.4
	Vaccinated 3 (GV antigen)	26.9 ^b ±2.4	24.1 ^b ±1.1	29.7 ^a ±3.6	40.0 ^b ±0.0	38.0 ^b ±4.3	37.3 ^a ±4.5	2.3	2.6	6.3	6.8
	control	19.1 ^a ±1.3	15.3 ^a ±1.6	NA	19.1 ^a ±1.6	15.5 ^a ±0.5	NA	-	-	-	-
Genotype V	Vaccinated 1 (GII antigen)	30.6 ^b ±2.3	26.8 ^b ±2.8	33.6 ^a ±5.4	40.0 ^b ±0.0	40.0 ^b ±0.0	39.7 ^a ±1.0	2.7	3.1	4.8	6.4
	Vaccinated 2 (GVII antigen)	30.4 ^b ±2.5	28.7 ^b ±2.4	34.8 ^a ±2.4	39.7 ^b ±0.8	40.0 ^b ±0.0	39.4 ^a ±1.4	2.6	3.7	4.7	6.4
	Vaccinated 3 (GV antigen)	33.4 ^c ±3.1	33.2 ^c ±3.7	37.5 ^a ±2.3	40.0 ^b ±0.0	40.0 ^b ±0.0	39.7 ^a ±0.8	3.6	5.1	4.8	6.4
	control	21.6 ^a ±1.9	16.4 ^a ±0.6	NA	24.0 ^a ±3.6	18.6 ^a ±1.4	NA	-	-	-	-

Different superscript letters indicate statistically heterologous groups (Kruskal-Wallis test, p<0.05)

Results from the same type of samples collected at the same date were compared among the groups challenged with the same virus

KINETICS OF THE ANTIBODY RESPONSE TO VACCINATION WITH AN IMMUNE COMPLEX IBD VACCINE IN BROILERS USING A COMMERCIAL ELISA

CINÉTICA DE LA RESPUESTA INMUNE A LA VACUNACIÓN CON UNA VACUNA CONTRA EL COMPLEJO INMUNE IBD EN POLLOS DE ENGORDA UTILIZANDO UN ELISA COMERCIAL

M. Paniago, C. Cazaban, F. Lozano, B. Alva, and Y. Gardin

Ceva Santé Animale, 10 Avenue de la Ballastière, Libourne, France

RESUMEN

Observaciones de la cinética de la respuesta inmune a la Enfermedad Infecciosa de la Bolsa (IBD) en 2972 parvadas saludables de pollos de engorda vacunadas con una vacuna contra el complejo inmune IBD al día de edad durante un período de 4.5 años (Febrero/2009 a Julio/2013), y criadas en diferentes regiones del mundo, fueron evaluadas para la respuesta de anticuerpos a diferentes edades de procesamiento (de 25 a 60 d de vida) utilizando un kit comercial de ELISA.

Las parvadas vacunadas se convirtieron gradualmente en serológicamente positivas después de 26 d de vida lo cual refleja el momento en que el virus de la vacuna llegó a la bolsa de Fabricio. A partir de los 38 d en adelante casi todas las parvadas vacunadas fueron positivas.

El porcentaje de parvadas serológicamente positivas sacrificadas a edades que varían de 40 a 60 d fue de 98.4 % y la presencia de la cepa de la vacuna (W2512) se confirmó al azar por RT-PCR.

SUMMARY

Observations of the kinetics of the immune response to infectious bursal disease (IBD) in 2972 healthy commercial broiler flocks vaccinated with an immune-complex IBD vaccine at day of age during a four and a half year period (February/2009 to July/2013), and raised in different regions of the world, was assessed for antibody response at different processing ages (Ranging from 25 to 60 d of life) using a commercial ELISA test kit. The vaccinated flocks gradually turned serologically positive after 26 d of age reflecting the timing when the vaccine virus reached the bursa of Fabricius. From around 38 d onwards, nearly all vaccinated flocks were positive. The percentage of serologically positive flocks slaughtered at ages varying from 40 to 60 d was 98.4% and the presence of the vaccine strain (W2512) was randomly confirmed by RT-PCR.

INTRODUCTION

Infectious bursal disease (IBD) is a disease of chickens caused by an Avibirnavirus. From its first description in the early 60's, the disease spread out to almost all chicken producing countries in the world and the it still remains as one of the major concerns for producers.

Its prevention basically depends on the association of biosecurity and vaccination. The introduction of IBD vaccines that can be injected through *in ovo* or subcutaneous routes in the hatcheries has greatly changed the vaccination procedures all over the world.

This article summarizes a study conducted over a period of four and a half years in which the kinetics of the antibody response to IBD was assessed in nearly 3,000 commercial broiler flocks vaccinated with an Immune Complex IBD vaccine in the hatcheries.

MATERIALS AND METHODS

Flocks. Two thousand nine hundred and seventy two clinically healthy broiler flocks raised in different countries (Spain, Turkey, Malaysia, France, Romania, Ukraine, and Egypt) and under various conditions were included in this study which was carried out from February/2009 to July/2013.

Vaccine. All flocks included in this study were vaccinated against Gumboro Disease only with an Immune Complex IBD vaccine either through *in ovo* or subcutaneous route of injection in the hatcheries. This vaccine contains the intermediate plus Winterfield 2512 strain of IBD live virus in complex with specific IBD immunoglobulins.

Serology. Serum samples were taken at the depletion time which varied from 25 to 60 d of age and assessed for antibody response using a commercial ELISA test kit. The results were expressed as Arithmetic Mean titers (AMT) and the cut-off value used was according to the manufacturer's recommendation (≥ 391). Flocks with AMT above this value were considered positive.

Vaccine take. Bursa samples from randomly chosen flocks were sent to the laboratory for detection and characterization of the IBDV. The sequence was based on the 408 base pairs long (721-1128 bp) nucleotide sequence of the hypervariable region of the vp2 gene of IBDV.

RESULTS

The vaccinated flocks started to become serologically positive at the end of the fourth wk of age. The percentage of positive flocks steadily increased and, from around 38 days onwards, nearly all vaccinated flocks were positive by the commercial ELISA test. Graphic 1 shows the kinetics of the antibody response to vaccination with an Immune Complex IBD vaccine expressed as Positive/Negative ratio per age.

In order to assess which IBD virus (field or vaccine) induced the active immunity, bursa samples from randomly selected flocks from each country were sent to the same laboratory for detection and further characterization of the IBDV. In all flocks evaluated by these methods, the W2512 vaccine strain was detected in the bursa samples.

DISCUSSION

This large scale serological assessment of broiler flocks vaccinated with an Immune Complex IBD vaccine demonstrates that the active antibody response starts to be detected by a commercial ELISA test between four and five wk of age and there is a gradual and steady increase of the percentage of positive flocks as they get older. Nearly all vaccinated flocks were positive from around 38 d onwards.

These results are in agreement with Palya *et al.* (3) and Herczeg *et al.* (1) who demonstrated that, in controlled conditions, an active immune response detected by virus neutralization was evidenced from three to four wk of age onwards. Laboute *et al.* (2) working under field conditions, also detected active immune response by a commercial ELISA test between three to four wk of age. In fact, the gradual increase in the percentage of positive flocks occurs due to the mechanism of action of the Immune Complex IBD vaccine. The vaccine viruses which are complexed with the specific immunoglobulins are protected against neutralization by maternally derived antibodies anti-IBDV (MDA_{IBD}). However, these exogenous antibodies are progressively catabolyzed during the first wk of life and the vaccine viruses progressively released. Immunization will occur when the level of the MDA_{IBD} has reached a level that is low enough to permit the vaccine to reach the bursa and start replicating. This process occurs in every chicken so that replication starts at the optimum time in an individual manner.

Palya *et al.* (3) demonstrated that flocks with lower maternal antibody titer to IBDV at hatch have an earlier antibody response than birds with higher maternal antibodies to IBDV at hatch.

From all flocks included in this study, 1,770 of them were slaughtered with ages varying from 40 to 60 d of age. At this age, the vaccine virus (W2512) from the Immune Complex vaccine would have already reached the bursa of Fabricius and induced measurable levels of antibodies by ELISA test irrespective of the level of passive immunity anti-IBDV at hatch. Among these 1,770 flocks, no positive antibody titers were detected in only 25 of them, i.e., 1.6% of the total. The reasons might be related to poor vaccine application, problems in the cold chain, poor sampling technique, bad management of the assay, etc.

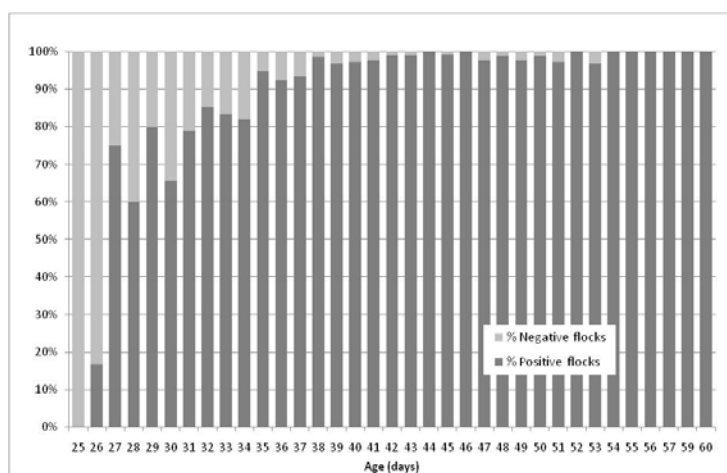
ACKNOWLEDGMENTS

The author would like to thank the Ceva's teams in Spain, Turkey, Malaysia, France, Romania, Ukraine, and Egypt for their active participation in this study.

REFERENCES

1. Herczeg, J., Nagy, M., Makranszki, L., Balla, E., Kustos, K., deFoucauld, J., Thevenon, J. Alva, B. (2011). Laboratory efficacy testing of subcutaneously administered Cevac Transmune vaccine in broiler chickens. Proceedings of the XVII Congress of the World Veterinary Poultry Association, Cancun, Mexico, 512-520, 2011.
2. Laboute, M., Albaric, O., Cazaban, C., Palya, V., Alva, B., Jacquinet, C., Ramon, G., Gardin, Y. Kinetics of the development of immunity following the vaccination with an infectious bursal disease immune-complex vaccine. Proceedings of the XVIII Congress of the World Veterinary Poultry Association, Nantes, France, 583, 2013.
3. Palya, V., Forgách, K., Süveges, T., Kelemen, M., Mészáros, J., Benyeda, J. Control of infectious bursal disease by an immune complex vaccine. Proceedings of the 22nd World's Poultry Congress, June 8-13, Istanbul, Turkey, 2004.

Graphic 1. Kinetics of the immune response to vaccination with an ICx IBV vaccine.



VALIDATION OF A MODIFIED USDA H5 RRT-PCR ASSAY FOR DETECTION OF H5N2 LOW PATHOGENIC AVIAN INFLUENZA (AI) VIRUSES OF MEXICAN LINEAGE

VALIDACIÓN DE UNA PRUEBA MODIFICADA H5 RT-PCR DE USDA PARA LA DETECCIÓN DEL VIRUS DE LA INFLUENZA AVIAR (IA) DE BAJA PATOGENICIDAD H5N2 DE LINAJE MEXICANO

J. Pedersen^{*A}, C. Philibert^A, M. Kim Torchetti^A, M. Solís Hénandez^B, B. Huerta Lozano^B, I. Tiburcio Sanchez^B, J. Dinorah Lozano Alvarado^B, M. Amalia Mercado Pezzat^C, and J. Ramirez Torrez^C

^AU. S. Department of Agriculture, Animal and Plant Health Inspection Service, Veterinary Services, National Veterinary Services Laboratories, Ames, IA, USA

^BComisión México-Estados Unidos para la Prevención de la Fiebre Aftosa y Otras Enfermedades Exóticas de los Animales, Mexico City, Mexico

^CEl Centro Nacional de Servicios de Diagnóstico en Salud Animal, Mexico City, Mexico

RESUMEN

La prueba actual de influenza aviar H5 RT -PCR (RT - PCR) en tiempo real del departamento de Agricultura de los Estados Unidos (USDA) se utiliza para la detección de IA H5 en aves comerciales, mercado de aves vivas, avicultura de patios traseros y aves silvestres. La prueba es un método semi - multiplex con iniciadores específicos para la detección de linajes europeos / asiáticos y norteamericanos de IA H5. Una colaboración entre laboratorios para la armonización de los diagnósticos de IA identificó un linaje de IABP que no fue detectado por la prueba actual de USDA H5 RT- PCR.

La alineación de la secuencia entre los virus de México y los iniciadores y sondas de USDA identificó desajustes múltiples en los iniciadores y sonda directos resultando en una falta de detección de los virus mexicanos IA H5. Un iniciador directo y sonda adicionales se multiplexaron en la prueba junto con reactivos de control positivo interno. Las pruebas de validación que incluyeron límite de detección, eficiencia de la prueba, repetibilidad, sensibilidad analítica y de diagnóstico y especificidad se llevaron a cabo en la prueba modificada H5. Las pruebas de validación se realizaron en plataformas de equipos ABI- 7500 y LightCycler.

SUMMARY

The current United States Department of Agriculture (USDA) H5 AI real-time RT-PCR (rRT-PCR) assay is used for the detection of H5 AI in commercial, live bird market, backyard poultry and wild birds. The assay is a semi-multiplex method with primers targeted for detection of European/Asian and North American lineages of H5 AI. An interlaboratory collaboration for the harmonization of AI diagnostics identified a lineage of LPAI that was not detected by the current USDA H5 rRT-PCR assay.

Sequence alignment between the Mexican viruses and USDA primers and probes identified multiple mismatches in the forward primers and probe resulting in a lack of detection for Mexican H5 AI viruses. An additional forward primer and probe were multiplexed into the assay along with internal positive control reagents. Validation testing including limit of detection, assay efficiency, repeatability, analytical and diagnostic sensitivity and specificity has been conducted for the modified H5 assay. Validation testing has been conducted on ABI-7500 and LightCycler equipment platforms.

INTRODUCTION

This report updates the development and validation of an rRT-PCR assay targeting influenza A subtype H5. Validation data include limit of detection, assay efficiency, analytical and diagnostic sensitivity and for the modified H5 assay. Validation testing was conducted on the Life Technologies Applied Biosystems[®] ABI-7500 Fast real-time PCR platform.

The real-time RT-PCR (rRT-PCR) assay currently in use for the detection of influenza A virus (IAV) subtype H5 in poultry and wild birds by the United States Department of Agriculture (USDA) National Animal Health Laboratory Network (NAHLN) and National Veterinary Services Laboratories (NVSL) was developed and modified by Spackman *et al.* (3,4) The assay is a semi-multiplex procedure with primers targeting North American and Eurasian lineages of IAV subtype H5. The USDA/NAHLN assay (H5 NA/EA 2008) has been in routine use for both wild bird (U.S. Departments of Agriculture and Interior/State Wildlife Agencies 2006-2010 surveillance) and poultry samples submitted through the USDA National Poultry Improvement Plan and Live Bird Market poultry surveillance programs since 2002. The assay is routinely evaluated by tracking assay control data and evaluation of H5 viruses isolated from wild birds and poultry in the U.S. A lineage of subtype H5 low pathogenic avian influenza (LPAI) detected by IAV matrix gene diagnostics, but not detected by the current H5 assay was identified as the result of an interlaboratory collaboration for the harmonization of IAV diagnostics between Mexico, Canada, and U.S. To address this gap, the H5 NA/EA 2008 assay was updated for detection of the Mexican (MX) lineage H5s by the addition of a forward primer and probe (H5 AM/EA 2014), as well the inclusion of an internal positive control (IPC). Validation testing was conducted following NAHLN Methods Technical Working Group and World Organisation of Animal Health (OIE) guidelines (1,2).

RESULTS

Nucleotide analysis was conducted to evaluate 14 H5N2 IAV isolated from MX poultry, to compare to the H5 NA/EA 2008 assay primers and probes, and to identify target regions for assay update. The MX viruses had increased variability in the HA2 region of the hemagglutinin (HA) gene segment, a traditionally more conserved portion of the HA, and multiple mismatches were identified in the H5 NA/EA 2008 assay forward primers and probe resulting in a lack of detection. No mismatches were identified in the reverse primer. Major considerations for updating the H5 NA/EA 2008 assay included current chemistry, thermocycling parameters, and methodology as well as cost and ease of implementation into diagnostic laboratory networks. The updated multiplex H5 AM/EA 2014 assay has an additional forward primer and second probe for detection of MX H5s.

Concentration of detection enhancer and inclusion of IPC were optimized for the assay by conducting standard curves using two synthetic constructs for evaluation of limit of detection (LOD) and amplification efficiency (AE). The AE and LOD for the AM/EA 2014 multiplex assay was 104.2%, and 10 copies/ μ L for the MX component and 99.1% and 100 copies/ μ l for the NA/EA 2008 component. No decrease in sensitivity was observed when comparing the LOD for the MX and NA/EA 2008 single-plex and semi-multiplex assays with the H5 AM/EA 2014 multiplex assay using standard curve testing with MX and NA reference viruses (Table 1). The multiplex assay was 2-7% higher in efficiency with equal or 1 \log_{10} increase in LOD when compared to the MX and NA/EA 2008 assays.

The analytical specificity was evaluated with 31 different H1-H16 isolates and 32 different non-influenza avian viral pathogens including avian paramyxovirus type-1, infectious laryngotracheitis virus, avian metapneumovirus, and infectious bronchitis virus. Diagnostic sensitivity (SN) and specificity (SP) testing was conducted with tracheal/oropharyngeal and cloacal swabs, tissue and culture specimens (n=550) from gallinaceous birds and domestic ducks submitted to the NVSL for confirmation testing, bird movement and active surveillance testing, and swab material from experimentally infected ducks (wild bird lineage H5N3 LPAI) and chickens (three different strains of MX H5 LPAI). Based upon this testing, the diagnostic SN and SP were calculated for poultry to be 97.53 and 99.34%, respectively. The analytical and diagnostic sensitivity and specificity for the AM/EA 2014 multiplex assay is comparable to the H5 NA/EA 2008 assay, includes an IPC for detection of PCR inhibitors and has been updated for detection of the MX lineage of subtype H5 LPAI.

REFERENCES

1. Principles and Methods of Validation of Diagnostic Assays for Infectious Diseases. In: World Organisation for Animal Health Manual of Diagnostic Tests and Vaccines for Terrestrial Animals Manual 2013, 8th ed. OIE, Paris, France. Pp 34-51. 2013.
2. Reising, M. M., K. R. Schumann, B. M. Crossley, P. S. Glas, R. H. Jacobson, K. L. Toohey-Kurth, J. C. Pedersen, D. Siev, B. M. Martin, Methods Comparison, An Alternative Approach for Evaluating the Impact of a Modification to a Validated Assay. Submitted to JVDI for publication.
3. Spackman, E, D. A. Senne, T. J. Myers, L. L. Bulaga, L. P. Garber, M. L. Perdue, K. Lohman, L. T. Daum, D. L. Suarez. Development of a real-time reverse transcriptase PCR assay for type A influenza virus and the avian H5 and H7 hemagglutinin subtypes. J Clin Microbiol. 2002 Sep; 40(9):3256-60.

4. Spackman, E., and D.L. Suarez. Detection and identification of the H5 hemagglutinin subtype by real-time RT-PCR. *Methods Mol Biol* 436:27-33. 2008.

Table 1. PCR slope, amplification efficiency (AE), r^2 coefficient, and limit of detection (LOD) for the H5 NA/EA 2008 semi-multiplex, MX single-plex, and AM/EA 2014 multiplex assays for MX 08-1433-1, MX 08-1433-5, and TY/WI/68 H5N9 viruses.

Target	Mexican 08-1433-1 virus			Mexican 08-1433-5 virus		NA TY/WI/68 H5N9 virus	
PCR features	H5 NA/EA 2008 SM ^a	H5 MX SP ^b	H5 AM/EA 2014 MP ^c	H5 MX SP ^b	H5 AM/EA 2014 MP ^c	H5 NA/EA 2008 SM ^a	H5 AM/EA 2014 MP ^c
slope	-3.4175	-3.4398	-3.3655	-3.5587	-3.3796	-3.4477	-3.3498
AE %	96.2%	95.3%	98.2%	90.9%	97.6%	95.0%	98.8%
r^2	0.997619	0.998093	0.99610	0.996937	0.990758	0.997802	0.99448
LOD	10 EID ₅₀ ²	10 EID ₅₀ ²	10 EID ₅₀ ¹	10 EID ₅₀ ¹	10 EID ₅₀ ¹	10 EID ₅₀ ¹	10 EID ₅₀ ¹

^aH5 NA/EA 2008 SM – North American/Eurasian semi-multiplex assay

^bH5 MX SP – Mexican single-plex assay

^cH5 AM/EA 2014 MP – H5 Americas/Eurasian multiplex assay

NEWCASTLE DISEASES CONTROL: ASSESSMENT OF VACCINATION PROTOCOLS IN PLACE FOR ENDEMIC COUNTRIES

CONTROL DE LAS ENFERMEDADES DE NEWCASTLE: EVALUACIÓN DE LOS PROTOCOLOS DE VACUNACION QUE SE UTILIZAN EN LOS PAISES ENDEMICOS

F. Perozo^A, R. Marcano^A, M. Trujillo^B, F. Rojo^C, and R. Fernández^C

^AUniversity of Zulia Veterinary College, Maracaibo, Zulia Venezuela

^BInstituto Nacional de Investigaciones Agropecuarias, Maracay Venezuela

^CMerial, Gainesville, GA USA

RESUMEN

La enfermedad de Newcastle (ND) es una preocupación principal para los países endémicos y se busca su control con protocolos múltiples de vacunación. El objetivo de este trabajo fue evaluar la protección que ofrecen las vacunas concomitantes contra ND de virus vivos- más –muertos (Avinew[®] y GALLIMUNE ND[®]) que se aplican por vía subcutánea (SQ) en la incubadora en comparación con los protocolos que incluyen las vacunas comerciales vectorizadas HVT- ND en pollos de engorda. Se utilizaron siete grupos (24 pollos de engorda de un día de edad). Se desafiaron los grupos vacunados por vía SC contra ND vivo y muerto en la incubadora con y sin refuerzo, los de dos vacunas comerciales vHVT - ND con y sin refuerzos de NDV vivo y un grupo control sin vacunar. La protección en las aves vacunadas por vía SC fue de 100 y 95,8 %, respectivamente. Las dos vacunas comerciales contra vHVT - ND sólo alcanzaron 83,4 y 79,2 %. Después de dos revacunaciones con NDV vivo, la protección de vacunas de vector fue de 91,6 %. Los resultados sugieren la conveniencia de la vacunación por vía SC con virus vivos y muertos para áreas endémicas y la necesidad de ND vivo para complementar la protección de las vacunas vectorizadas comerciales.

SUMMARY

Newcastle disease (ND) is a main concern for endemic countries and its control is attempted with multiple vaccination protocols. The aim of this work was to assess the protection provided by concomitant subcutaneous (SQ) hatchery application of live-plus-killed ND vaccines (AVINEW[®] and GALLIMUNE ND[®], registered trademarks of Merial in the United States of America and elsewhere) compared with protocols including commercial vector HVT-ND vaccines in broilers. Seven groups (24 one-day-old broilers) were used. Hatchery SQ live plus killed ND vaccination with and without boost, two commercial vHVT-ND vaccines with and without live NDV boosts and an unvaccinated control group were challenged. The protection in the SQ vaccinated birds was 100 and 95.8%, respectively. The two commercial vHVT-ND vaccines only reached 83.4 and 79.2%. After two live NDV revaccinations the vector vaccines protection was 91.6%. The results suggest the suitability of live plus killed SQ vaccination for endemic areas and the need of live ND to increase protection in the commercial vector vaccines.

Vaccination strategies and protocols differ among countries and even among companies within the same geographical region based on environmental, epidemiological and technical factors. Hence, the best recommendation is to design and implement a vaccination program suitable for each company or region. The Villegas-Glisson/University of Georgia (VG/GA) NDV strain included in the AVINEW vaccine tested here, replicates both in the respiratory and intestinal tract with preference for the intestinal epithelia (2). This intestinal tropism and the consequent induction of local immunity may be important for protection against virulent viscerotropic strains of NDV.

Hatchery vaccination if of foremost importance, handling of one d old chicks represents (based on expected strict control measures) the most homogenous and controlled segment of the poultry production chain, therefore it is in the industry best interest to take advantage and generate a successful immunization of the birds at this moment. Single needle concomitant SQ application of IBD/MD and killed ND and/or the use of novel HVT vector vaccines is a current trend in the industry. It has been reported that live in oil vaccines prepared immediately prior to the

vaccination were shown to be 30 to 50 times more effective than either the same vaccines reconstituted in water or killed in oil vaccines (1). Additional reports indicate that the use of oil adjuvant together with live viruses potentiate the immune response based on the premise of live virus escaping the oil induces active immune stimulation at tissues, rather than only the killed antigen recognition pathway. This work aims to assess the efficacy of adding live SQ ND vaccine (AVINEW) to the hatchery protocol in broilers challenged with a vvNDV and compare this protocol with the protection provided by vector HVT-ND vaccination.

MATERIALS AND METHODS

A total of seven groups (24 one-day- old broilers) were used. Hatchery SQ and spray live + killed ND vaccination with and without LaSota boosts at day 10, two commercial vHVT-ND vaccines with and without boost and one unvaccinated control group were challenged at 28 days of age with a Venezuelan velogenic viscerotropic NDV strain belonging to genotype VII. Serological response and percentage of survival were used as efficacy criteria.

RESULTS

Significantly higher ($P < 0.05$) ND antibody titers at the challenge age were observed when SQ live ND vaccine was added to the standard vaccination protocol (Figure 1). The control group died within five d after challenge validating the experiment. The protection in the SQ vaccinated birds was of 100 and 95.8% with and without field boost, respectively (Figure 2). No adverse effects were observed with concomitant day-old SQ HVT-IBD and killed + live ND vaccination. HVT-ND vector vaccines I and II failed to provide full protection and reached 83,4 and 79,2%, respectively. After live revaccinations the vector vaccines group's protection reached 91.6%. Overall, the use of the VG/GA strain applied SQ observed improved the serological response and allowed for 100% protection (above 95% without field boost) against a virulent NDV challenge, suggesting the suitability of the vaccine strain to be applied by the SQ route and representing an alternative vaccination protocol that showed a robust protection against NDV provided by Gallimune ND + two doses of AVINEW (spray and SQ), even without field revaccination.

CONCLUSIONS

The observed protection levels and the differences in serological responses suggest the suitability of including the AVINEW strain SQ vaccination for endemic areas with high field challenge and the necessity of live boosts to complement protection in vector the commercially available vector vaccines.

REFERENCES

1. Peleg B, Samina I, Brenner J. Immunization of chickens with live Newcastle disease vaccine adjuvanted with oil. *Vaccine*. 1993. 11(10):1074-1076.
2. Perozo, F., P. Villegas., L. Purvis., R. Dolz and Afonso, C.L. The VG/GA strain of Newcastle disease virus: mucosal immunity, protection against lethal challenge and molecular analysis. *Avian Path*. 2008.

Figure 1. Serological response to NDV vaccination.

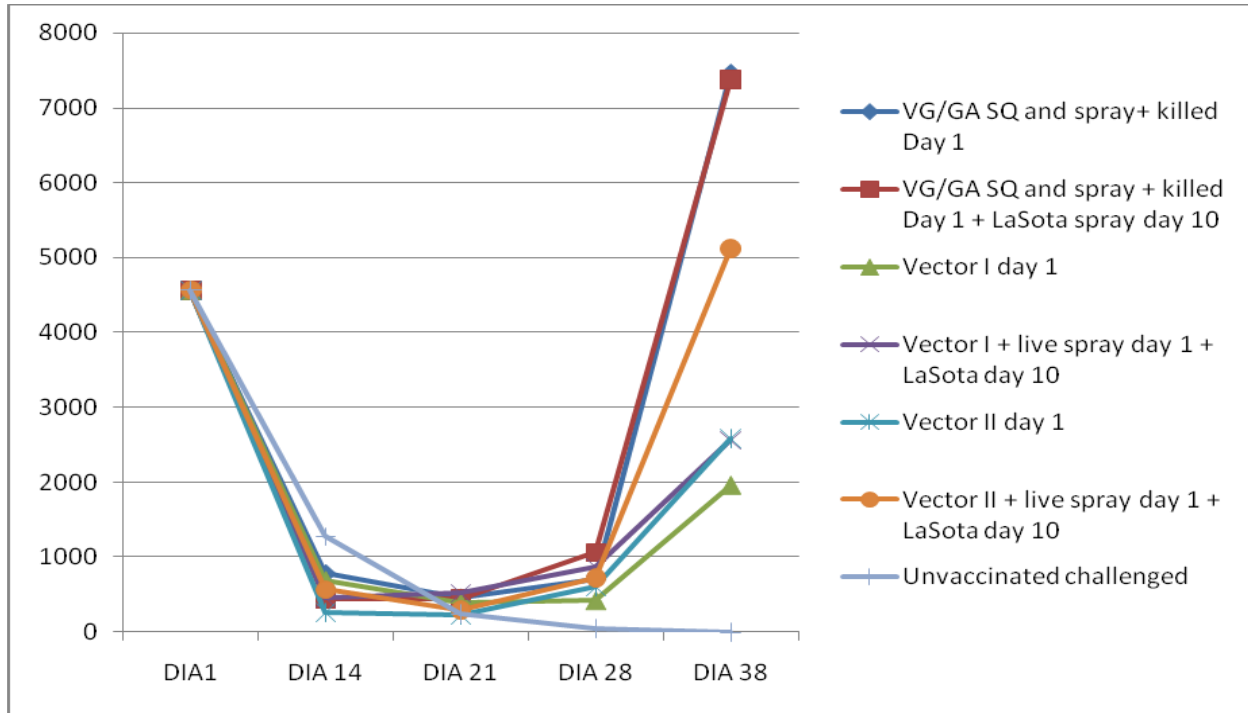
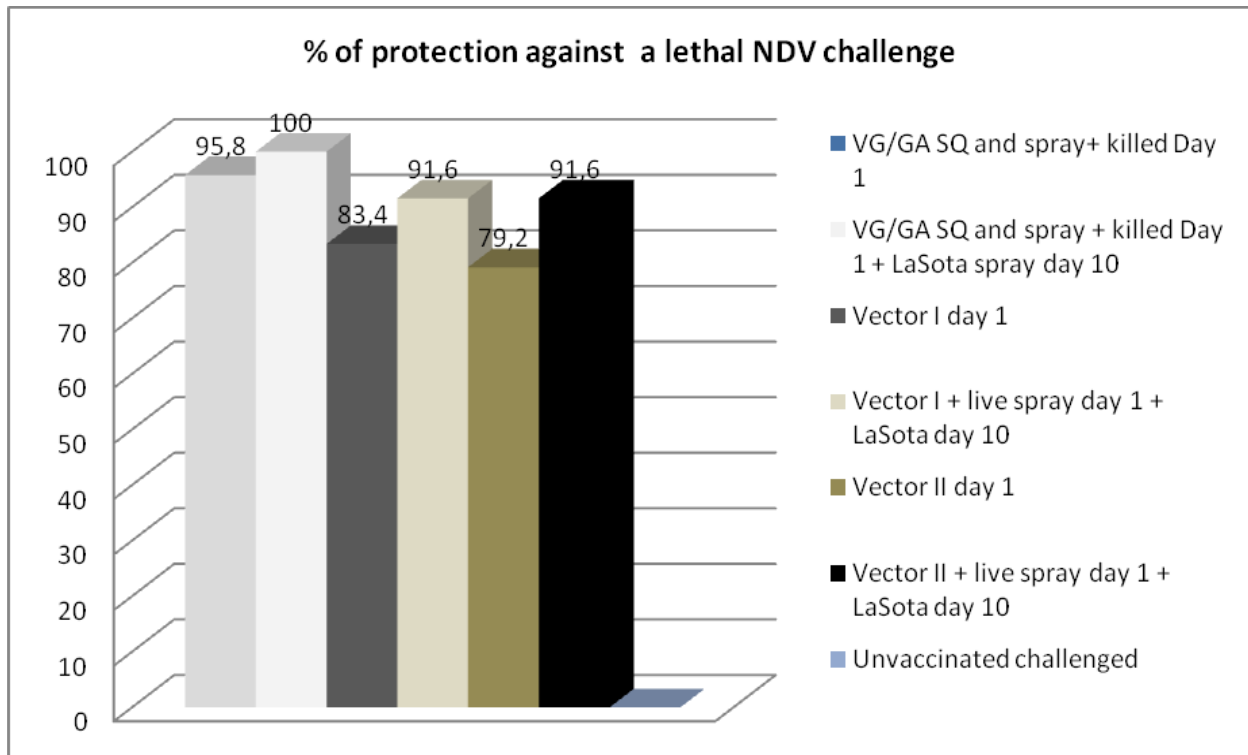


Figure 2. Protection against lethal challenge.



MULTIDRUG RESISTANCE IN PATHOGENIC AND COMMENSAL *ESCHERICHIA COLI* FROM POULTRY

RESISTENCIA MULTIDROGAS DE *ESCHERICHIA COLI* PATÓGENA Y COMENSAL EN AVES

A. Piccirillo^A, D. Giovanardi^B, M. Franciosini^C, G.Grilli^D, C. Montesissa^A, and M. Giacomelli^A

^ADepartment of Comparative Biomedicine and Food Science, University of Padua. Viale dell'Università, 16 - 35020 Legnaro (PD), Italy

^BLaboratorio Tre Valli, Viale A. Veronesi, 5 - 37132 San Michele Extra (Verona).

^CDepartment of Biopathologic Science and Hygiene of Food and Animal Production, University of Perugia. Via San Costanzo, 4 - 06126 Perugia, Italy

^DDepartment of Veterinary Science and Public Health, University of Milan. Via Celoria, 10 - 20133 Milan, Italy

RESUMEN

Un total de 355 *E. coli* (299 APEC y 56 AFEC) fueron aisladas en pollos de engorda (110), en pavos (188) y gallinas de postura (57), y se les realizaron pruebas de susceptibilidad a 21 antimicrobianos perteneciendo a ocho clases diferentes: Aminoglicósidos, cefalosporinas, quinolonas, fencolas, penicilinas, tetraciclinas, sulfonamidas, polimixinas. El método de difusión de disco se empleo de acuerdo con el estándar CLSI. La resistencia a Multidrogas(RMD) de tres a siete clases antimicrobianas se detectó en 65 cepas resistentes a todos los antimicrobianos con la excepción de las polimixinas. Realmente, el 90.1% de las cepas APEC y AFEC fueron RMD (APEC 84.5% en pollos, 87.1% en ponedoras, 94.4% en pavos; AFEC 76.9% en ponedoras y 100% en pavos). Más de 50 patrones RMD, aminoglicósidos + fencolas + penicilinas + cefalosporinas + fluoroquinolonas + sulfonamidas potenciadas + tetraciclinas fueron las más comúnmente detectadas (18.6%) en todas las cepas APEC y AFEC y en todas las especies de aves. Los resultados sugieren que la RMD está muy difundida en *E.coli* patógenas y comensales en aves.

SUMMARY

A total of 355 *E. coli* (299 APEC and 56 AFEC) isolated from broilers (110), turkeys (188) and layer hens (57) were tested for their susceptibility to 21 antimicrobials belonging to eight different classes: aminoglycosides, cephalosporins, quinolones, phenicols, penicillins, tetracyclines, sulphonamides, polymyxins. The disk diffusion method was performed according to the CLSI standard (2008). Multidrug resistance (MDR) was detected against three to eight antimicrobial classes, with seven strains resistant to all. Indeed, 90.1% of APEC and AFEC strains was MDR (APEC: 84.5% in chickens, 87.1% in layers, 94.4% in turkeys; AFEC: 76.9% in layers, 100% in turkeys). Out of 50 MDR patterns, AmPhPenCepFluSulTe was the most frequently detected (20.6%). Results suggest that MDR is widespread among pathogenic and commensal *E. coli* from poultry.

INTRODUCTION

Resistance to multiple classes of antimicrobials, including tetracycline, sulphonamides and streptomycin have been documented since the earliest studies to demonstrate resistance among *E. coli* isolates from poultry (8,9). In the last years, it has been reported that antimicrobial resistance of avian *E. coli* has dramatically increased and the multidrug resistance has become widespread (5,7). Within scientific community, special attention has been addressed to the potential transfer of multidrug resistant bacteria from animals to humans and this is now considered a real threat for public health (4). Also poultry have been considered a potential source of resistant bacteria for humans, due to the intensive use of antimicrobial agents to prevent and treat bacterial diseases. Therefore, monitoring the antimicrobial resistance of avian *E. coli* is fundamental to control both the efficacy of pharmacologic treatments of bacterial infections in poultry flocks and the diffusion of resistant bacteria or genetic determinants of resistance from poultry to humans.

The aim of this study was to determine the antimicrobial resistance profiles of avian pathogenic (APEC) and avian faecal (AFEC) *Escherichia coli* isolated from poultry (i.e. turkeys, chickens, and layer hens) in Italy.

MATERIALS AND METHODS

Strains. A total of 355 *E. coli* (299 APEC and 56 AFEC) collected between 2010 and 2012 in industrial poultry farms throughout Italy were examined. One hundred and eighty-eight *E. coli* (156 APEC and 30 AFEC) were from meat turkeys, 110 (APEC) from broilers and 57 (31 APEC and 26 AFEC) from layer hens.

Antimicrobial susceptibility testing. All *E. coli* strains were tested for antimicrobial susceptibility by the disk diffusion method, according to CLSI (2) standards, against 21 antimicrobial drugs belonging to eight classes: aminoglycosides (apramycin, 15 µg, APR; gentamicin, 10 µg; streptomycin, 10 µg; kanamycin, 30 µg), cephalosporins (cephalotin, 30 µg; ceftiofur, 30 µg; cefotaxime, 30 µg; ceftazidime, 30 µg), fluoroquinolones (nalidixic acid, 30 µg; enrofloxacin, 5 µg; ciprofloxacin, 5 µg; norfloxacin, 10 µg), penicillins (ampicillin, 10 µg; amoxicillin + clavulanic acid, 30 µg), phenicols (chloramphenicol 30 µg; florfenicol, 30 µg), potentiated sulphonamides (triple sulphonamides 300 µg; trimethoprim + sulfamethoxazole, 25 µg), tetracyclines (tetracycline, 30 µg; doxycycline, 30 µg) and polymyxins (colistin, 10 µg). All antimicrobial-containing disks were obtained from OXOID (Basingstoke, UK). *E. coli* ATCC 25922 was used as quality control strain. MDR was defined as resistance to ≥ 3 different antimicrobial classes where resistance was detected to at least one antimicrobial agent.

RESULTS AND DISCUSSION

Antimicrobial resistance testing showed that 90.4% of isolates were resistant to tetracycline, followed by 85.9% to ampicillin, 80.6% to doxycycline, 80.3% to triple sulphonamides, 74.4% to nalidixic acid, 67.0% to streptomycin, 53.9% to trimethoprim/sulfamethoxazole, 50.1% to cephalotin, 40.3% to chloramphenicol, 31.0% to enrofloxacin, 25.1% to amoxicillin/clavulanic acid, 24.5% to norfloxacin, 23.9% to ciprofloxacin, 16.9% to kanamycin, 16.1% to gentamicin, 15.2% to ceftiofur, 9.0% to cefotaxime, 5.1% to ceftazidime, 3.4% to apramycin, 2.8% to colistin, and 1.4% to florfenicol.

Three hundred and twenty strains (90.1%) showed multidrug resistance against three up to eight antimicrobial classes, with seven strains resistant to all classes (Table 1). The majority of strains (27.5%) were resistant to six antimicrobial classes with the predominance of the following pattern: AmPenCepQuSulTet. Resistance to five antimicrobial classes was the second most frequently detected (25.3%), with the AmPenQuSulTet pattern prevalent. Overall, out of 50 multidrug resistance patterns, AmPhPenCepFluSulTe was the most frequently detected (20.6%).

Among poultry species, MDR predominated in turkey isolates (95.7%), followed by chicken isolates (84.5%) and layers (82.5%). Considering APEC and AFEC, MDR was detected in 94.4% of APEC and all AFEC from turkeys, in 87.1% of APEC and 76.9% of AFEC from layers, and 84.5% of APEC from chickens. In turkey isolates, the most frequent MDR patterns comprised 5 (31.1% of isolates) and 6 (31.1%) antimicrobial classes, of which AmPenQuSulTet and AmPenCepQuSulTet were the most common. In chickens, the AmPhePenCepQuSulTet pattern was predominant (34.4% of isolates). In layer hens, MDR to 4 antimicrobial classes (PenQuSulTet) was the most widespread (23.4% of isolates).

A very high level of antimicrobial resistance and multidrug resistance was detected among APEC and AFEC from Italian poultry. This finding is in accordance with the resistance situation reported worldwide (1,5,6). Indeed, in the current study the highest levels of resistance were detected against tetracyclines, penicillins and sulphonamides, the most commonly antimicrobials used in the poultry industry worldwide. A decreased susceptibility to cephalosporins was also detected, whereas a prevailing susceptibility against colistin and several members of the aminoglycoside family was found. In contrast to nalidixic acid, moderate levels of resistance to fluoroquinolones were detected in strains examined in this study. Finally, low to moderate levels of resistance to phenicols were detected. Resistances against all these antimicrobial classes reflected their usage pattern in the poultry industry.

In the present study, MDR was more common in turkey isolates than in those from the other poultry species. This finding is in accordance to previous studies (3,10), which showed that multidrug resistance was more frequent in APEC and AFEC from turkeys than those from broilers and layer hens. In contrast, MDR patterns including the highest number of antimicrobial classes were detected mostly among chicken strains.

In conclusion, the results presented in this study indicate that poultry may play a role in the dissemination of antimicrobial resistance among bacterial populations and considerable efforts need to be made with regard to the use of antimicrobials in poultry production and to the control of antimicrobial resistance both for animal and human health concerns.

REFERENCES

1. Apata, D.F. Antibiotic Resistance in Poultry. *Int. J. Poult. Sci.* 8:404-408. 2009.
2. Clinical and Laboratory Standards Institute. Performance standards for antimicrobial disk and dilution susceptibility tests for bacteria isolated from animals; 3rd Edition. M31-A3, vol. 28:8. Clinical and Laboratory Standards Institute, Wayne, PA. 2008.
3. Cormican, M., Buckley, V., Corbett-Feeney G., and F. Sheridan. Antimicrobial resistance in *Escherichia coli* isolates from turkeys and hens in Ireland. *J. Antimicrob. Chemother.* 48:587-595. 2001.
4. European Food Safety Authority and European Centre for Disease Prevention and Control. The European Union Summary Report on antimicrobial resistance in zoonotic and indicator bacteria from humans, animals and food in 2011. *EFSA Journal* 11:3196. 2013.
5. Gyles, C.L. Antimicrobial resistance in selected bacteria from poultry. *Anim. Health Res. Rev.*, 9:149-158. 2008.
6. Löhren, U., Ricci, A., and T.S. Cummings. Guidelines for antimicrobial use in poultry. In: *Guide to Antimicrobial Use in Animals*. L. Guardabassi, L.B. Jensen, and H. Kruse, eds. Blackwell Publishing Ltd, Oxford, UK. pp. 126-142. 2008.
7. Singer, R.S., and C.L. Hofacre. Potential impacts of antibiotic use in poultry production. *Avian Dis.* 50:161-172. 2006.
8. Smith, H.W. The incidence of infective drug resistance in strains of *Escherichia coli* isolated from diseased human beings and domestic animals. *J. Hyg. (Lond)*, 64:465-474. 1966.
9. Sojka, W.J., and R.B.A. Carnaghan. *Escherichia coli* infection in poultry. *Res. Vet. Sci.* 2:340. 1961.
10. Van den Bogaard, A.E., London, N., Driessen, C. and E.E. Stobberingh. Antibiotic resistance of faecal *Escherichia coli* in poultry, poultry farmers and poultry slaughterers. *J. Antimicrob. Chemother.* 48:587-588. 2001.

Table 1. Multidrug resistance of APEC and AFEC in each poultry species.

No. of classes	MDR pattern*	Total	Turkey		Chicken	Layer hen	
			APEC	AFEC	APEC	APEC	AFEC
3	PenSulTet	4	1	1	-	1	1
	PenQuTet	3	3	-	-	-	-
	AmPenTet	2	-	2	-	-	-
	AmSulTet	2	-	-	2	-	-
	QuSulTet	2	1	-	-	1	-
	PenCepQu	2	-	-	1	1	-
	PenCepTet	2	-	-	1	-	1
	PheQuTet	1	-	-	1	-	-
	AmCepSul	1	1	-	-	-	-
	PhePenSul	1	1	-	-	-	-
PenCepSul	1	-	-	1	-	-	
4	AmPenSulTet	13	5	7	1	-	-
	PenQuSulTet	11	3	-	4	-	3
	AmPenQuTet	8	6	1	1	-	-
	PheQuSulTet	4	-	-	-	2	2
	PenCepQuTet	4	3	-	1	-	-
	PenCepSulTet	3	1	-	-	2	-
	PhePenCepTet	2	1	-	-	1	-
	AmQuSulTet	2	-	-	1	1	-
	AmPheQuTet	1	-	-	1	-	-
	AmCepSulTet	1	1	-	-	-	-
	AmPheSulTet	1	-	-	1	-	-
	AmPenCepTet	1	1	-	-	-	-
	AmPenQuSul	1	-	-	1	-	-
	PheCepQuTet	1	-	-	1	-	-
	PhePenQuTet	1	1	-	-	-	-
	PenCepQuSul	1	1	-	-	-	-
PhePenCepSul	1	-	-	1	-	-	
5	AmPenQuSulTet	37	29	1	4	2	1
	PenCepQuSulTet	14	8	1	5	-	-
	AmPhePenSulTet	7	5	2	-	-	-
	AmPenCepSulTet	6	2	2	1	-	1
	PhePenQuSulTet	5	-	-	2	2	1
	AmPenCepQuTet	4	3	-	1	-	-
	AmCepQuSulTet	2	1	-	1	-	-
	AmPheQuSulTet	2	-	-	-	2	-
	AmPhePenQuTet	1	-	-	-	-	-
	AmPhePenQuSul	1	1	-	-	-	-
	CepQuSulTetPol	1	-	-	1	-	-
PheCepQuSulTet	1	1	-	-	-	-	
6	AmPenCepQuSulTet	44	28	4	10	1	1
	AmPhePenQuSulTet	23	12	2	8	1	1
	AmPhePenCepSulTet	10	4	2	1	-	3
	PhePenCepQuSulTet	5	2	-	1	2	-
	AmPhePenCepQuSul	2	-	-	2	-	-
	AmPheCepQuSulTet	2	-	-	1	-	1
	AmPhePenCepQuTet	1	1	-	-	-	-
AmPenQuSulTetPol	1	1	-	-	-	-	
7	AmPhePenCepQuSulTet	66	22	5	31	7	2
	PhePenCepQuSulTetPol	1	-	-	1	-	-
8	AmPhePenCepQuSulTetPol	7	-	-	4	1	2
		320	150	30	93	27	20

*Am = aminoglycosides; Phe = phenicols; Pen = penicillins; Cep = cephalosporins; Qu = quinolones; Sul = sulfonamides; Tet = Tetracyclines; Pol = polymyxins

A PRACTICAL GUIDE TOWARD USING GIS AND SPATIAL STATISTICS FOR UNDERSTANDING AVIAN DISEASES

GUÍA PRÁCTICA PARA EL USO DEL SISTEMA DE INFORMACIÓN GEOGRÁFICA (SIG) Y LA ESTADÍSTICA ESPACIAL PARA ENTENDER ENFERMEDADES AVIARES

M. Pitesky^A, R. Gallardo^B, M. Bland^C, and B. Charlton^D

^AUniversity of California Cooperative Extension, 1089 Veterinary medicine Dr. VM3B, Davis, CA, 95616

^BDepartment of Population Health and Reproduction, School of Veterinary Medicine, University of California, 1089 Veterinary Medicine Dr. VM3B, Davis CA, 95616

^CCulter Associates International, Napa, CA, 94558

^DCalifornia Animal Health and Food Safety Laboratory, 1550 Soderquest Rd, Turlock, CA 95381

RESUMEN

Las herramientas de mapeo basadas en el SIG combinadas con la estadística espacial son herramientas relativamente nuevas que tienen varios usos en la agricultura, la medicina veterinaria y la salud pública. En la avicultura, el SIG es una herramienta ideal para la vigilancia retrospectiva y prospectiva de enfermedades, control de brotes y manejo de emergencias. Además, herramientas nuevas incluyendo el análisis *hot-spot*, el análisis espacial medio central, la agrupación espacio-temporal, y el análisis de regresión espacial basado en el SIG pueden ahora ser utilizados de manera relativamente fácil para lograr un mejor entendimiento de la diseminación de las enfermedades. El resultado puede entonces ser utilizado para tomar decisiones con una base científica. En esta presentación abordaremos distintos enfoques y técnicas que hemos utilizado para entender las siguientes enfermedades aviares: bronquitis infecciosa, laringotraqueítis infecciosa, enfermedad infecciosa de la bolsa de Fabricio muy virulenta, e influenza aviar altamente patógena.

SUMMARY

GIS based mapping tools coupled with spatial statistics are relatively novel tools that have multiple uses in agriculture, veterinary medicine, and public health. In poultry, GIS is an ideal tool for retrospective and prospective disease surveillance, outbreak control and emergency management. In addition, newer tools including ‘hot-spot’ analysis, spatial median center analysis, spatial-temporal clustering, and GIS based spatial regression analysis can now be used relatively easily in order to better understand how diseases spread. The output can then be used for science based decision making. In this presentation we will focus on several approaches and techniques that we have used to understand the following avian diseases: infectious bronchitis (IB), infectious laryngotracheitis (ILT), very virulent infectious bursal disease (vviBDV), and highly pathogenic avian influenza (AI).

INTRODUCTION

The ability to visualize disease outbreaks in space and time are integral toward understanding the epidemiology of a disease. Historically, the analysis tools for this relatively simple visualization were often deemed too challenging with respect to time, cost, and difficulty. While some spatial analysis tools still fit that criteria, easy to use mapping software and free on-line analysis tools now exist that allow mapping of both vector datasets (i.e. points, lines, or polygons representing objects on the map) and raster datasets (i.e. grids of data, which can represent images such as satellite or aerial photography, continuous surfaces such as elevation models, or thematic classes such as land cover or habitat maps). Consequently, increased ease and access to these tools could allow for a greater understanding of the epidemiology of poultry diseases at a local, regional, national and global level.

Clustering of disease events in time, space and time and space simultaneously can provide clues to the epidemiology of a disease process and may assist in prevention and control programs. These types of analyses allow for the differentiation of statistically significant disease outbreaks from cases of disease due to chance, and they facilitate the creation of effective containment strategies (1,2). Therefore, while the above analyses are essential

toward understanding the epidemiology of a disease, further analyses including hot-spot analysis, and spatial, temporal, and spatial-temporal clustering are essential toward determining focal areas of disease and critical time-space boundaries for a disease (1). Consequently, opportunities exist for collaborations between stakeholders with a mutual interest in utilizing GIS to understand the epidemiology of multiple avian diseases.

MATERIALS AND METHODS

General spatial epidemiological approach. In order to visualize the distribution of IB, ILT, and vvIBDV, geocoding and geospatial mapping was done either via a licensed GIS program such as ArcGIS or via the online tool Google Earth or Google Earth Pro. For our analysis of IB, ILT, and vvIBDV, affected farms were defined as farms in which those diseases were detected at least once in the flock's lifetime. Therefore, multiple positive tests from the same flock were merged into a single accession or case. Consequently, a premise could be affected more than once if a separate or new flock was affected on the same premise that was previously identified as positive.

Using either mapping tool, the following GIS layers within California were added: counties, roads, locations of poultry operations, backyard operations, locations of flocks that tested negative, locations of flocks that tested positive, and locations of flocks that had not been tested. For AI work, layers included rice fields and lakes where water fowl exist.

Spatial, temporal, and space-time cluster analysis. To investigate global clustering (i.e. if any clustering is occurring), a Moran's I (ArcGIS® v10) test was applied to the geographical data. To investigate local clustering in space and time, statistical tests were performed using SaTScan™ version 9.1.1, (National Cancer Institute, Bethesda, Maryland, USA) (3). Likelihood functions were applied to various spatial windows in space or time in order to compare the number of observed and expected observations inside and outside the spatial or temporal window. The statistical significance of clusters was evaluated through Monte Carlo simulations (999 replications) and p-values < 0.05 were considered statistically significant to reject the null hypothesis of random distribution in time or space. Using the above described methods buffer analysis was done in order to define geographical risk areas.

RESULTS AND DISCUSSION

Mapping of farm premises that tested positive and negative for IB, ILT, and vvIBDV in California was performed. Results show different prevalences of time, space, and time-space clustering. For example with respect to ILT two high rate and one low rate temporal-spatial clusters were identified including one retrospective high rate spatial-temporal which accounted for 36.4% of all the ILT positive data Overall the two high rate spatial-temporal clusters accounted for 36.9 % of all the positives in the entire study. For vvIBDV spatial clustering was used to define surveillance buffers during future outbreaks. In addition, the lack of time-space clustering coupled with surveillance for vvIBDV in peri-domestic birds showed that avian wildlife do not appear to play a significant role in vvIBDV spread in California. Finally, spatial and temporal mapping of geographical areas where waterfowl interface with domestic poultry was done in order to focus AI surveillance efforts in California.

CONCLUSION

The first step in controlling the spread of a disease is to understand the relationship between the agent, host, and the environment. An understanding of this classic epidemiologic triad is essential toward breaking the transmission cycle of any infectious disease. Consequently, epidemiological tools including GIS and spatial statistics are essential toward understanding risk and how diseases may spread. Collaborative efforts between farmers, field veterinarians and researchers are essential toward maximizing the potential of these tools for disease surveillance and control.

REFERENCES

1. Kulldorff, M., R. Heffernan, J. Hartman, R. Assuncao, and M. F. A Space-Time Permutation Scan Statistic for Disease Outbreak Detection PLoS Medicien 2:216-224. 2005.
2. Blacker, H.P., N.C. Kirkpatrick, A. Rubite, D. O'Rourke, and A.H. Noormohammadi Epidemiology of recent outbreaks of infectious laryngotracheitis in poultry in Australia. Aust. Vet. J. 89:89-94. 2011.
3. Kulldorff, M. SaTScan User Guide for version 9.0. In., <http://www.satscan.org/>. p 109. July 2010.

ATOXOPLASMA IN EUROPEAN GOLDFINCH (*CARDUELIS CARDUELIS*) CLINICAL ASPECTS

ATOXOPLASMA EN JILGUERO (*CARDUELIS CARDUELIS*)

M. Pizarro^A, A. Bengoa^B, M. González^A, E. Tabanera^A, and A. Rodríguez-Bertos^{A,C}

^AService of Anatomic Pathology, Veterinary Clinical Hospital. Veterinary Faculty

^BService of Exotic Animals; Veterinary Clinical Hospital. Veterinary Faculty

^CAnimal Health Surveillance Center (VISAVET), Complutense University of Madrid, 28040 Madrid. Spain
mpizarro@ucm.es

RESUMEN

La atoxoplasmosis es una enfermedad parasitaria que afecta a aves paseriformes. Un criador de jilgueros, pardillos, verderones y mixtos remitió varios pájaros al Servicio de Animales Exóticos. El propietario indicó que había tenido muertes esporádicas de individuos de forma reiterada durante los últimos cinco o seis años. El único síntoma clínico descrito fue una disminución de peso. Un jilguero macho de dos años, con una historia de pérdida progresiva de peso, fue enviado para necropsia. Macroscópicamente, se observó un esternón más afilado y un abdomen distendido. Se observó una discreta hepatomegalia, así como un intestino distendido y enrojecido con contenido líquido. Microscópicamente, se observó en el hígado un infiltrado de células mononucleares. Se evidenciaron formas parasitarias similares a los merozoitos en el citoplasma de los macrófagos. La mucosa intestinal mostró una intensa congestión y un moderado infiltrado de células redondas en la lámina propia, principalmente linfocitos y macrófagos con formas parasitarias en el citoplasma. Se realizó un análisis coprológico que confirmó un resultado positivo a *Atoxoplasma*. Finalmente, se discute el tratamiento con medidas higiosanitarias y terapia medicamentosa.

SUMMARY

Atoxoplasmosis is a parasitic disease that affects passerine birds. A goldfinch, linnet, greenfinch, and crossbred breeder sent some birds to the Service of Exotic Animals. The owner reported sporadic deaths for five to six years. Weight reduction was the only clinical symptom described. A two year old, male goldfinch was submitted for necropsy with previous history of progressive weight loss. Macroscopically, the sternum appeared more prominent due to muscular atrophy and the abdomen distended. A slight hepatomegaly, distended and reddish intestine loops and fluid content was observed. Microscopically, mononuclear cell infiltrates could be seen in the liver. Parasitic forms similar to merozoites were evident in the cytoplasm of macrophages. Intestinal mucosa showed intense congestion and moderate infiltration of round cells in the lamina propria, mainly lymphocytes and macrophages with intracytoplasmic parasitic forms. A coprologic analysis was performed and was positive to *Atoxoplasma*. Further discussion is necessary concerning to treatment based on sanitary measures and drug therapy.

CASE REPORT

Atoxoplasmosis is a parasitic disease that affects passerine birds, like canaries, and it is caused by a protozoan of the Coccidium, *Atoxoplasma* order serini. This protozoan is host specific and its transmission is oro-fecal. In addition, oocysts are very resistant to the environmental conditions. A bird breeder sent some finches to the Clinical Service of Exotic Animals of the HCVC, from Toledo. The owner had 40 birds in total, including goldfinches, linnets, greenfinches and crossbred. The animals were kept in the same room, distributed in small individual cages and eight big flying cages with sand substrate. Animals were fed *ad libitum* with commercial seeds mixture.

The owner referred sporadic deaths for five to six years. He had tried different treatments with Baycox (guideline unknown) and metronidazole + sulfatrimethoprim, with no success. A two-year-old, male goldfinch with a history of progressive weight loss for a week and anorexia. On physical examination, there was a marked muscular atrophy in the breast (prominent sternum) and the abdomen appeared distended and congestive. Necropsy showed a slight hepatomegaly and distended intestine with reddish fluid.

Microscopically, mild mononuclear infiltrates of lymphohistiocytic type could be seen. Parasitic protozoan forms, similar to *Atoxoplasma* merozoites, were evident in the cytoplasm of macrophages. Proventriculus showed

discrete growth of hypha similar to *Candida* over the apical areas in the lining epithelium, with non inflammatory reaction (overgrowth). In the lamina propria of intestine, marked congestion and abundant inflammatory infiltrates of lymphohistiocytic type was observed. Similar parasitic findings described in the liver, were seen in the cytoplasm of intestinal macrophages. There were no other significant lesions throughout the animal body. A coprologic analysis was performed and was positive to *Atoxoplasma*. According to our results, the following were proposed: a) Sanitary measures: general disinfection including cages and materials, replacement of the sand of big cages and periodic cleaning of the facilities. b) Drug therapy: 50 Baycox (toltrazuril) mg/ml in drinking water during two days (rest five days between treatments). Follow this protocol four times for four weeks. It is recommended to repeat the coprology at the end of the treatment.

REFERENCES

1. Box E.D. *Isopora* as an extraintestinal parasite of passerine birds. J Protozool 28: 244-246. 1981.
2. Jamriška, J., L. A. Lavilla, A. Thomasson, A. R. Barbon, J. F. Lopéz, D. Modrý. Treatment of atoxoplasmosis in the Blue-crowned Laughing Thrush (*Dryonastes courtoisi*). Avian Pathol. 42(6): 569–571. 2013.
3. Levine, M.D. The genus *Atoxoplasma* (Protozoa, *Apicomplexa*). J Parasitol 68(4):719-723. 1982.
4. Norton, T.M. and col. Atoxoplasma Medical Protocols Recommended By The Passerine Atoxoplasma Working Group. www.riverbanks.org/subsite/aig/Atoxo-recommendations.htm.
5. Quiroga, M.I., N. Aleman, S.Vazquez, J.M.Nieto Diagnosis of atoxoplasmosis in a canary (*Serinus canaries*) by histopathologic and ultrastructural examination. Avian Dis. 44:465-469. 2000.
6. Sánchez-Cordón, P.J., J.C. Gómez-Villamandos, J. Gutiérrez, M. A. Sierra, M. Pedrera and M. J. Bautista. Atoxoplasma spp. Infection in Captive Canaries (*Serinus canaria*). J. Vet. Med. A 54: 23–26. 2007.
7. Soto Piñeiro, C. J. and I. Acosta Guevara. Hallazgo de *Atoxoplasma serini* en canarios (*Atoxoplasma serini* finding on canary birds). REDVET. Revista electrónica de Veterinaria 10 (7): 1-5. 2009.

INCLUSION BODY HEPATITIS IN BROILERS: EVOLUTION OF THE LESIONS

HEPATITIS CON CUERPOS DE INCLUSIÓN EN POLLOS DE ENGORDA: EVOLUCIÓN DE LAS LESIONES

M. Pizarro^A, M. González^A, E. Tabanera^A, and A. Rodríguez^{AB}

^APathology Service. Veterinary Clinical Hospital. Veterinary Faculty

^BAnimal Health Surveillance Center (VISAVET), Complutense University of Madrid, 28040 Madrid, Spain
mpizarro@ucm.es

RESUMEN

Se realiza la necropsia de broilers (n= 8) de veinte días de edad que eran sospechosos de padecer hepatitis vírica. Todos los animales mostraron ascitis, así como hígados pálidos con moteado rojizo. Los órganos linfoides (timo y bolsa de Fabricio) aparecían atrofiados. El estudio microscópico reveló una hepatitis subaguda con necrosis multifocal y presencia de cuerpos de inclusión por adenovirus. La bolsa mostró una extensa y grave necrosis de células linfoides en cuatro animales. Los hallazgos histológicos sugieren un diagnóstico final de hepatitis con cuerpos de inclusión (HCI). Fueron remitidas nuevas muestras de 8 aves del mismo lote de animales a los 42 días de edad, que incluían hígados, bazos, bolsas y tráqueas. El estudio patológico realizado reveló una atrofia severa de la bolsa de Fabricio con marcada depleción de tejido linfoide y hepatitis crónica en 4/8 hígados (no se observaron cuerpos de inclusión). Discutimos la infección por adenovirus en pollos como un patógeno primario, ya que también podría ser secundaria a otros agentes infecciosos, tales como el virus de la enfermedad de Gumboro, que provoca una inmunodepresión severa a los animales.

SUMMARY

Twenty day-old broilers (n= 8) with viral hepatitis suspected were necropsied. All animals show ascites and pale mottled reddish livers. Lymphoid tissues (thymus and bursa of Fabricius) were atrophied. Microscopic study revealed subacute hepatitis with multifocal necrosis and presence of inclusion bodies by adenovirus. Bursa displayed a severe and extensive necrosis of lymphoid cells in four animals. Histological findings suggested the final diagnosis of inclusion body hepatitis (IBH). Additional samples from eight birds (liver, spleen, bursa, and tracheae) at 42 d old, from the same flock were submitted. Pathological study revealed severe atrophy of the bursa of Fabricius with marked depletion of lymphoid tissue and chronic hepatitis in four of eight livers (inclusion bodies are not appreciated). We discussed the infection by adenovirus in chickens as a primary pathogen; however it can also be secondary with other infectious agents, such as virus of Gumboro disease, caused a severe immunosuppression of animals.

CASE REPORT

The disease inclusion body hepatitis (IBH) is an adenovirus infection described in young chickens, from four up to eight wk. Macroscopically, this disease is characterized by hepatomegaly, ascites and the presence of white or reddish multifocal areas (mottled). Histologically, multifocal necrosis of hepatocytes with inflammation is observed. Basophilic intranuclear inclusion bodies are often seen in the cellular elements around the necrotic focus. Chicken infection could be primary or secondary to an immunosuppression process due to other previous viral infections like Gumboro disease or infectious anemia, playing a role of secondary pathogen in these cases.

Eight broilers of 20 d old with viral hepatitis suspected are received in the Pathology Service. Significant mortality at 17-18 d of age was observed, reaching 10% of the flock. At necropsy, all animals displayed ascites, pale kidneys, yellowish livers with mottled reddish foci, as well as a bursa of Fabricius and thymus atrophy.

A subacute hepatitis with multifocal necrosis and presence of inclusion bodies by adenovirus in all animals were observed under a microscope. Marked necrosis of lymphoid tissue were observed in the bursa of the four animals. Therefore, the final diagnosis was a viral inclusion body hepatitis (adenovirus), possibly as consequence of a severe immunosuppression due to Gumboro virus.

Follow-up 42 days marked a high mortality, reaching 22% of animals (of a total of 33,000 animals, almost 7000 die to infectious process). Additional samples from livers, spleens, bursa, and tracheae fixed in formalin were submitted for histological examination. Microscopic diagnosis showed bursa of Fabricius with marked depletion of lymphoid cells and severe atrophy, chronic hepatitis in four of eight livers (inclusion bodies are not appreciated), and mild nonspecific diffuse tracheitis.

Our case described typical lesions of a severe immunodeficiency (suspect of Gumboro disease) with chronic course. Chronic hepatitis in some animals could be the result of the evolution of the infection by adenovirus (no intranuclear inclusion bodies were observed). Final conclusion is that of adenovirus induced hepatitis in chicken as primary pathogen, and can also be secondary or associated with other agents, such as Gumboro virus, giving place to clinical pictures with severe immunosuppression in birds.

REFERENCES

1. Alemnesh W., Hair-Bejo M., Aini I., Omar AR. Pathogenicity of fowl adenovirus in specific pathogen free chicken embryos. *J Comp Pathol.* 146(2-3):223-229. 2012.
2. Fitzgerald, S.D. Adenovirus infections. In: *Diseases of Poultry*, 12 th ed. Y.M. Sayf, ed. Blackwell publishing, Ames, Iowa, pp. 251-290. 2008.
3. Gomis S., Goodhope A.R., Ojkic A.D., Willson P. Inclusion body hepatitis as a primary disease in broilers in Saskatchewan, Canada. *Avian Dis.* 50(4): 550-555. 2006.
4. Mase M., Nakamura K., Minami F. Fowl adenoviruses isolated from chickens with inclusion body hepatitis in Japan, 2009-2010. *J Vet Med Sci.* 74(8): 1087-1089. 2012.

MATURE OVARIAN TERATOMA IN A DUCK

TERATOMA OVARICO MADURO EN UN PATO

M. Pizarro^A, A. Bengoa^B, M. González^A, E. Tabanera^A, and A. Rodríguez-Bertos^{AC}

^AService of Anatomic Pathology Veterinary Clinical Hospital Veterinary Faculty

^BService of Exotic Animals; Veterinary Clinical Hospital Veterinary Faculty

^CAnimal Health Surveillance Center (VISAVET), Complutense University of Madrid, 28040 Madrid. Spain
mpizarro@ucm.es

RESUMEN

Un pato hembra de 2,5 años de edad, que mostraba distensión abdominal, fue remitido para necropsia. El animal presentó una gran masa que ocupaba la cavidad celómica. Esta formación se caracterizaba por una estructura multilobular integrada por nódulos de diferentes tamaños y colores (zonas rojo oscuras y blancas). Al corte de la masa pudimos observar diferentes áreas que contenían plumas, cartílago y vasos sanguíneos. El estudio histológico reveló focos de cartílago hialino maduro con algunos focos de osificación, así como tejido hematopoyético. En otras áreas apareció tejido conjuntivo con abundantes fibras colágenas maduras y formaciones quísticas tapizadas por epitelio que recordaba a los folículos ováricos, también se observaron áreas vasculares con aspecto cavernoso, tejido adiposo y nervioso, folículos de plumas, y formación de perlas de queratina. Se diagnosticó un teratoma maduro en base a la presencia de tejidos procedentes de los tres orígenes embriológicos: epitelio glandular (endodérmico), cartílago, hueso y músculo (mesodérmico) y tejido nervioso y epitelio plano queratinizado (ectodérmico). Este tipo tumoral es muy raro en los patos.

SUMMARY

A two and a half year old female duck with abdominal distension was submitted for necropsy. The animal presented a large mass that occupies the abdominal cavity. This formation was characterized by a multinodular structure integrated by nodules of different sizes and colors (dark red and white areas). A mass opening was able to be observed in different areas, which contained feathers, cartilage and blood vessels. Histological examination revealed foci of mature hyaline cartilage with some focal ossification and hematopoietic tissue. Other areas displayed conjunctive tissue with abundant mature collagen fibers and cystic formations covered by epithelium that resembled ovarian follicles, vascular areas with cavernous appearance, adipose and nervous tissue, feather follicles and pearl-like keratin formations were seen. A mature ovarian teratoma was diagnosed based on the presence of tissue from three embryonic origins: glandular epithelium (endoderm), cartilage, bone and muscle (mesoderm) and nervous tissue and stratified squamous epithelium (ectoderm). This type of tumor is very rare in ducks.

CASE REPORT

A two and a half year old female duck with clinically evident abdominal dilatation was sent to the Service of Exotic Animal. Clinical suspicion of an abdominal mass was decided to perform echography and aspiration of the same. Ultrasound describes multinodular and hypervascular mass, however liver showed normal volume and echogenicity. Cytologically, compact groups of epithelial cells with cytoplasmic vacuoles are described compatible with glandular tissue. Nuclear atypia was not observed.

Abdominal dilatation is marked on the external survey of the necropsy and opening confirms the presence of a large mass that occupies the full cavity; the mass showed a multinodular appearance with spherical formations of different sizes and colors. Cut surface displayed a mottled characterized by dark-red and whitish areas with different consistency; even, areas similar to feathers, cartilage and vascular or cavernous type were observed. The rest of the viscera presented no alterations, with the exception of ileum that appeared very dilated and the heart which was deformed by pressure from the mass. Histologically there were areas with different aspect: foci of mature hyaline cartilage, occasionally with focal bone ossification and hematopoietic elements (bone marrow).

Connective tissue compound of mature collagen fibers was able to be observed. Other additional histological findings were cyst formations covered by epithelium which resembles ovarian follicles and vascular areas with cavernous appearance. On the other hand, there were areas with evident dermal component such as adipose

subcutaneous tissue, blood vessels, feather follicles, as well as in the periphery of mass, a squamous stratified epithelium with keratin formations (“pearls”). Structures with morphology similar to nerves associated with adipose and connective tissue were identified. Cellular malignancy criteria were not appreciated. Therefore, the presence in the mass of tissue from the three embryonic germ line cell regions, including glandular epithelium (endoderm), cartilage, bone and muscle (mesoderm) and neural epithelium and stratified squamous epithelium (ectoderm) is compatible with the final diagnosis of mature ovarian teratoma. These tumor types are very rare in ducks.

REFERENCES

1. Bolte A.L., Burkhardt E. A. teratoma in a Muscovy duck (*Cairina moschata*). Avian Pathol. 29(3): 237-239. 2000.
2. Fadly, A.M. Neoplastic Diseases. In: Diseases of Poultry, 12 th ed. Y.M. Sayf, ed. Blackwell publishing, Ames, Iowa, pp. 449-616. 2008.
3. Mutinelli F, Vascellari M. Thoracic teratoma in a white Pekin duck (*Anas platyrhynchos domesticus*). Avian Dis. 46(2): 493-496. 2002.
4. Palmieri C, Romanucci M, Loi P, Della Salda L. Intracoelomic teratoma in a domestic duck (*Anas platyrhynchos domesticus*): a case report including immunohistochemistry and electron microscopy. Res Vet Sci. 93(2): 862-864. 2012.

RESPUESTA PRODUCTIVA Y RENDIMIENTO EN CANAL DE VARIETADES DE CODORNIZ (*COTURNIX COTURNIX JAPONICA*)

PRODUCTIVE RESPONSE AND CARCASS YIELD IN TWO VARIETIES OF JAPANESE QUAIL

L. Portillo*, R. Ríos, T. Castro, M. Angulo, C. Martínez y L. Soto

Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia Universidad Autónoma de Sinaloa Carretera Internacional Km 3.5 Sur,
Apartado Postal 1057, Culiacán Sinaloa México Tel/Fax (667) 718-1650

*Autor para correspondencia: portillo6422@yahoo.com

SUMMARY

In order to compare the growth performance and carcass yield of the color varieties of the Pharaonic and Manchuria Japanese quail, 110 chicks of each variety were housed in 10 cages (90x90x60 cm) in conventional housing. The feed was in the form of flour with corn and soybean meal contributed 2833 kcal / kg ME and 27.96 % crude protein. Weight and consumption were recorded weekly and at 32 d of age. At d 33, 20 quails of each variety were slaughtered. Initial weight (9.51, 9.34 g) and final weight (227.1, 226.6 g), weight gain (215.8, 211.9 g), feed intake (593.4, 596.8 g), feed conversion (3.21, 3.44 g / g), mortality (7.3, 12.7%), hot carcass weight (139.1, 138.1 g) and yield (60.8, 60.4 %), were the same in the varieties ($P > 0.05$). We conclude that the varieties have similar productive response and carcass yield.

RESUMEN

Para comparar la respuesta productiva y el rendimiento en canal de dos variedades de codorniz (*Coturnix coturnix japonica*) según el color de la pluma: variedad tipo salvaje (VTS) y variedad tipo Manchuria (VTM), fueron alojados 110 pollitos de cada variedad en 10 jaulas (90x90x60cm) en una caseta convencional. El alimento en forma de harina con maíz y pasta de soya contenía 2833 kcal/kg de EM y 27.96% de proteína cruda. Se registró el peso y consumo cada semana y a los 32 días de edad. Al día 33 fueron sacrificadas 20 codornices de cada variedad. Los resultados de peso inicial (9.42) y final (226.85g), ganancia de peso (213.85 g), consumo de alimento (595.1 g), conversión alimenticia (3.32g/g), mortalidad (10%), peso de canal caliente (138.6g) y rendimiento (60.6%), para VTS y VTM, fueron iguales ($P > 0.05$). Se concluye que estas variedades tienen respuesta productiva y rendimiento en canal similar.

INTRODUCCIÓN

Varias razas, líneas y variaciones de color de codornices son utilizadas en la producción de huevos, carne o como aves de ornato. La codorniz amarilla es una de las variantes que puede ser muy atractiva para la producción a escala industrial de huevos y carne de codorniz japonesa. El color resultó de la mutación del color tipo salvaje (1). Las plumas son de color amarillo trigo pajizo y las codornices son heterocigotas para una mutación letal dominante Y (Yellow) (2).

Minvielle y col. (3) observaron que el crecimiento inicial fue más lento en codornices Manchuria con un peso corporal 2.4 % menor a la codorniz de tipo salvaje (149.3 g vs. 153.0 g) a 28 días de edad. Sin embargo el peso corporal de los machos fue similar entre variedades a los 35 días de edad y se mantuvo hasta los 120 días. Tarhuel y col. (7) indican efecto significativo del tipo de color en las características de la canal.

El objetivo de este trabajo fue comparar la respuesta productiva y el rendimiento en canal de la variedad amarilla con respecto a la variedad común utilizada tradicionalmente.

MATERIALES Y MÉTODOS

El trabajo se realizó en la Unidad Avícola de la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia de la Universidad Autónoma de Sinaloa, ubicada en Culiacán Sinaloa México.

Se utilizaron 110 pollitos de codorniz japonesa de la variedad común o tipo salvaje, que es la que se utiliza desde hace dos décadas en la región; y 110 pollitos de una variedad de codorniz japonesa con pluma amarilla o “arena” (tipo Manchuria) que se introdujo recientemente. Se formaron al azar cinco grupos de 22 pollitos de cada variedad que fueron alojados en jaulas de malla metálica que miden 90 x 90 x 60 cm, colocadas en el piso de una caseta avícola tipo convencional. La cama fue de heno de Sudán (*Sorghum vulgare* var. *sudanensis*), sobre la que se colocó un comedero tipo charola de 30 x 20 cm en los primeros 4 días de edad; a partir del tercer día fue colocado un comedero tipo tolva de piso semiautomático de 25 x 17.5 x 25 cm (Implementos Huacuja SA de CV, Tonalá, Jalisco, México) y un abastecedor automático de agua de 20 x 12 cm (Modelo AA, Sistemas Agropecuarios Jat S.A. de C.V., Zapopan, Jalisco, México). La temperatura en las jaulas se mantuvo de 35 a 37 °C en la primera semana, 32 a 35°C en la segunda semana, para ello se colocó hule en su perímetro y fueron utilizadas criadoras eléctricas con focos incandescentes de 75 w.

Las dietas para iniciación y finalización (Cuadro 1) se formularon con base en los requerimientos nutrimentales del NRC (4). Se preparó en forma de harina y se proporcionó *ad libitum*; al finalizar cada semana se calculó el consumo de alimento por ave (alimento servido menos alimento no consumido entre el número de codornices que finalizaron).

Cada codorniz se pesó a los 1, 7, 14, 21, 28 y 32 días de edad (Báscula OHAUS USA 3000 x 0.01 g). La ganancia de peso promedio por codorniz de cada jaula se calculó con el peso final menos peso inicial entre el número de codornices. Se estimó la conversión alimenticia por jaula, con base en el total de alimento consumido y la ganancia de peso por cada grupo.

A los 33 d de edad fueron tomadas al azar cuatro codornices de cada jaula (n=40; 20 hembras y 20 machos), a las que antes del sacrificio se les restringió el alimento durante dos horas. El procesamiento de las aves se realizó con base en la Norma Oficial Mexicana “Sacrificio humanitario de los animales domésticos y silvestres” (NOM-033-ZOO-1995) (5), previo registro del peso vivo. El faenado inició con el corte de las articulaciones radiocarpiana y tibiotarsiana, separación de la piel y plumas por tracción mecánica, extracción de vísceras, excepto corazón, pulmones y riñones; luego la canal se pesó.

Previo al análisis, los valores se probaron para normalidad e igualdad de las varianzas, con los métodos de Kolmogorov-Smirnov e intervalo de confianza del 95 % para la razón de varianzas. Luego se realizó la prueba de *t* de Student para la diferencia entre dos medias de muestras independientes. La proporción de mortalidad se analizó con la prueba de Ji cuadrada (6). En todos los análisis se consideró el nivel de alfa para aceptar diferencia estadística igual o menor que 0.05.

RESULTADOS

Los resultados para la respuesta productiva y el rendimiento en canal de dos variedades de codorniz japonesa se presentan en el Cuadro 2. Los indicadores de respuesta productiva como el peso final (226.83 g), ganancia de peso por codorniz (213.84 g), alimento consumido de 1 a 32 días de engorda (595.09 g) y conversión alimenticia (3.33 g/g), no mostraron diferencia estadística ($P > 0.10$). La mortalidad fue similar entre las variedades (10 %, $P = 0.18$). Al realizar el procesamiento, el peso al sacrificio (228.91 g), el peso de la canal caliente (138.62 g) y su rendimiento (60.59 %) fueron iguales entre variedades ($P > 0.10$).

DISCUSIÓN

La utilización de la VTM no mejoró los parámetros productivos que se tienen al utilizar la VTS. Minvielle y col. (3) al utilizar las dos variedades obtuvo el mismo resultado, aunque el peso a las cinco semanas de edad fue de 146.4 g y 148.4 para la VTM y VTS, respectivamente, que son menores a los registrados en el presente trabajo (226.83 g) y a 32 d de edad. Al utilizar el modelo mono molecular para la curva de crecimiento: $A - B \exp(-kt)$, los valores para los parámetros de peso asintótico (A), rango de peso desde el nacimiento hasta alcanzar el valor de A (B), y el valor para la tasa de crecimiento (k) a la edad en días (t), fueron de 0180.3 y 181.7 para A, 192.0 y 193.6 para B, y para k de 0.0512 y 0.0520, para VTM y VTS, respectivamente (3), sin observar diferencia estadística entre los coeficientes de los parámetros ($P > 0.05$).

Para el consumo de alimento el resultado coincide con el reportado por Minvielle y col. (3) con consumos diarios de alimento promedio de 17.86 y 17.09 g para la VTM y VTS, respectivamente.

Con respecto al peso al sacrificio en este trabajo (228.91 g), el resultado coincide con lo observado por Minvielle y col. (3) con pesos de 178.4 g para VTM y 179.6 g en la VTS, por lo que es posible inferir que el rendimiento en canal es similar, como se observó en este trabajo.

REFERENCIAS

1. Genchev, A. Egg production potential of Manchurian golden quail breeders. *Agricultural Science and Technology*. 3: 73-80. 2011.
2. Homma, K., S. Shumiya, and M. Jinno. 1967. Yellow-feathered Japanese quail (*Coturnix coturnix japonica*). *Jpn. J. Zootech.Sci.* 38:163-166. 1967.
3. Minvielle, F., D. Gourichon, S. Ito, M. Inoue-Murayama and S. Riviere. Effects of the dominant lethal Yellow mutation on reproduction, growth, feed consumption, body temperature, and body composition of the Japanese quail. *Poultry Science* 86:1646-1650. 2007.
4. National Research Council (NRC). Nutrient requirements of Ring-Necked Pheasants, Japanese Quail, and Bobwhite Quail. In: Nutrient requirements of poultry: 9th Rev. Ed. National Academy Press, Washington, D.C. Pp. 44-45. 1994.
5. Secretaría de Agricultura, Ganadería, Desarrollo Rural, Pesca y Alimentación. Norma Oficial Mexicana Sacrificio humanitario de los animales domésticos y silvestres. NOM-033-ZOO-1995. México, D.F. 17 pp. 1995.
6. Steel, R. G. D. y J. Torrie H. Bioestadística: Principios y Procedimientos. 2da. Edición. McGraw-Hill, México. 539 p. 1986.
7. Tarhyel, R., B.K. Tanimomo, S.A. Hena. Effect of sex, colour and weight group on carcass characteristics of Japanese quail. *Scientific Journal of Animal Science*. 1: 22-27. 2012.

Cuadro 1. Composición y aporte nutrimental calculado de las dietas experimentales.

Ingrediente	Edad de las codornices	
	1 a 14 días	15 a 32 días
Maíz	30.29	46.00
Pasta de soya	57.83	46.00
Aceite de soya	5.31	4.00
Azúcar	3.38	0
Sal de mar	0.30	0.34
Metionina	0.17	0.25
Lisina	0	0.04
Treonina	0	0.15
Piedra caliza molida	1.37	1.43
Ortofosfato	0.55	0.62
Vitaminas para pollo de engorda	0.20	0.30
Minerales para aves	0.05	0.07
Adsorbente de micotoxinas	0.15	0.40
Fitasa	0.20	0.20
Prebiótico	0.20	0.20
Total	100	100
Energía metabolizable kcal/kg	2883	2919
Proteína cruda %	27.96	24.21
Metionina %	0.51	0.52
Lisina %	1.55	1.30
Treonina %	1.08	1.07
Ca %	0.80	0.80
P no fitado %	0.30	0.30

^a Premezcla de vitaminas y minerales proporciona por kg de dieta: 3.75 mg retinol; 112 µg colecalciferol; 30 mg acetato de tocoferol; 3 mg bisulfuro sódico; 1.5 mg tiamina; 6 mg riboflavina; 3 mg piridoxina; 15 µg cianocobalamina; 1.5 mg ácido fólico; 55 mg niacina; 15 mg Ca pantotenato; 180 µg biotina; 600 mg colina; 75 mg Mn; 75 mg Zn; 75 mg Fe; 900 µg Mo; 750 µg Co; 1.6 mg Cu; 105 µg Se; 120 mg Banox (BHA +BHT)

Cuadro 2. Indicadores productivos y de la canal de variedades de codorniz japonesa en engorda.

Indicador	Variedad		EEM	P
	Común	Amarilla		
Peso inicial, g	9.51	9.34	0.08	0.13
Peso final, g	227.10	226.56	3.47	0.92
Ganancia de peso, g por ave	215.82	211.86	7.66	0.19
Alimento consumido, g por ave	593.41	596.77	6.60	0.67
Conversión alimenticia, g/g	3.21	3.44	0.22	0.53
Mortalidad ¹ %	7.27 (8/110)	12.73 (14/110)		0.18
Peso vivo al sacrificio, g	228.59	229.23	5.51	0.91
Peso de canal caliente, g	139.10	138.14	1.97	0.63
Rendimiento en canal, %	60.75	60.43	0.91	0.72

EEM = Error estándar de la media, P = probabilidad, ¹ Muertes de forma natural y por triaje

RESPUESTA PRODUCTIVA Y REPRODUCTIVA DE CODORNIZ (*COTURNIX COTURNIX JAPONICA*) AL INCLUIR EN EL ALIMENTO HARINA DE *JATROPHA CURCAS* VARIEDAD NO TÓXICA

PRODUCTIVE AND REPRODUCTIVE PERFORMANCE OF JAPANESE QUAIL WHEN INCLUDING IN THE FEED *JATROPHA CURCAS* NON-TOXIC VARIETY MEAL

L Portillo*, A. Estrada, C. Martínez, E. Angulo, M. Angulo, y T. Castro

Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia Universidad Autónoma de Sinaloa Carretera Internacional Km 3.5
Sur, Apartado Postal 1057, Culiacán Sinaloa México Tel/Fax (667) 718-1650

*Autor para correspondencia: portillo6422@yahoo.com

SUMMARY

In order to evaluate the productive and reproductive performance of Japanese quails when non-toxic *Jatropha curcas* (HJCNT) meal was included in their feed, 80 females and 20 males were housed in 20 cages (60X30 cm) in a conventional house. The feed (meal) corn and soybean meal-based had 2900 kcal/kg ME, 20% crude protein and 2.58% Ca. HJCNT without defatting was included at levels of 0% (control), 3% and 6%. Feed intake, number and weight of eggs, hatched chickens and their birth weight were registered, and an embryo diagnosis was made. Feed intake was similar (76.7%, $P=0.06$) as well as the birth weight (11.24g, $P=0.07$). Fertility was 76%, 95% and 77% and hatchability was 72%, 85% and 78% for 0%, 3% and 6% HJCNT groups respectively. It is concluded that the inclusion of levels up to 6% of HJCNT without defatting does not affect the productive and reproductive performance of Japanese quail.

RESUMEN

Para valorar la respuesta productiva y reproductiva de codorniz (*Coturnix coturnix japonica*) al incluir en el alimento harina de *Jatropha curcas* no tóxica (HJCNT), fueron alojadas 80 hembras con 20 machos en 20 jaulas (60x30cm) en caseta convencional. El alimento en forma de harina con maíz y pasta de soya aportó 2900 kcal/kg de EM, 20% de proteína cruda y 2.58% de Ca. Se incluyó HJCNT sin desgrasar en niveles de 3 y 6 % y el control (0%). Se registró el alimento consumido, número y peso de huevos, pollitos nacidos y su peso, y se realizó embriodiagnóstico. El consumo de alimento fue similar (31.49g, $P=0.61$), al igual que el porcentaje de postura (76.7%, $P=0.06$) y el peso del pollito (11.24g, $P=0.07$). La fertilidad fue de 76, 95 y 77%, y la incubabilidad de 72, 85 y 78% para 0, 3 y 6% de HJCNT, respectivamente. Se concluye que la inclusión de hasta 6 % de HJCNT sin desgrasar no disminuye la respuesta productiva y reproductiva de codorniz japonesa.

INTRODUCCIÓN

Jatropha es un miembro de la familia de las Euforbiaceas, crece en suelos de regiones tropicales y es resistente a la sequía. Las semillas en forma de harina contienen de 22 a 27 % de proteína y 57 a 63 % de lípidos (1), por ello el uso potencial como ingrediente en la alimentación animal. *Jatropha curcas* se ha identificado en dos variedades: toxica y no tóxica. La harina y aceite de la variedad tóxica ha sido incluida en el alimento de pollos, becerros, borregos, cabras y ratas. Los resultados indican que es necesario darle tratamiento para detoxificarla (4).

La variedad de *Jatropha curcas* de México según los resultados de Makkar y col (4) no es tóxica, ya que contiene 0.11 mg/kg de ésteres de forbol. Aunque contiene factores antinutricionales como antitripsina, lectina, fitatos y saponinas, algunos de los cuales se inactivan con el calor.

El objetivo del trabajo fue valorar la respuesta productiva y reproductiva de codorniz (*Coturnix coturnix japonica*) al incluir en el alimento harina de *Jatropha curcas* no tóxica.

MATERIALES Y MÉTODOS

El trabajo se realizó en la Unidad Avícola de la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia de la Universidad Autónoma de Sinaloa, ubicada en Culiacán Sinaloa México.

Se utilizaron 80 hembras y 20 machos de codorniz (*Coturnix coturnix japonica*) variedad común de 20 semanas de edad, para formar al azar 20 grupos de cuatro hembras con un macho y alojarlos en 20 jaulas de 60 x 30 cm en batería para codorniz en producción de huevo (Implementos Huacuja SA de CV, Tonalá, Jalisco, México), en una caseta avícola convencional. Un comedero de canaleta se colocó por jaula con un separador entre jaulas, y el bebedero de canaleta fue común para cuatro jaulas. Las codornices tuvieron 16 horas en total de luz con una hora de luz en la noche (1:00 a 2:00 horas). Durante las horas con temperatura ambiente elevada en la caseta se utilizó ventilación de aire forzada y cortina húmeda con dos equipos tipo cooler.

Para la formulación de las dietas experimentales con HJCNT (Cuadro 1) se tomaron los valores del análisis químico proximal realizado: proteína cruda 24.64 %, extracto etéreo 50.32 %, fibra cruda 5.05 %, carbohidratos 20.30 % y ELN 15.79 %, con estos valores se calculó la energía metabolizable (5). El contenido de Ca y P fue de 0.60 % y 0.86 %, respectivamente (2). Los requerimientos nutrimentales se tomaron del NRC (6).

Las codornices de cinco jaulas se asignaron al azar a uno de dos niveles de inclusión (3 ó 6 % de HJCNT) y el resto a la dieta control sin HJCNT. El periodo de adaptación a las dietas y al manejo experimental fue de dos semanas.

Se utilizó alimento en forma de harina *ad libitum*; al finalizar cada semana se calculó el consumo de alimento por ave (alimento servido menos alimento no consumido entre el número de codornices que finalizaron).

Durante cinco semanas cada día a las 19 horas se clasificó el huevo en una de tres categorías: El huevo para incubar fue elegido según el tamaño, forma y color, que estuviera limpio, y sin adherencias o quebrado. El huevo que no cumplió las especificaciones para incubar, limpio y no quebrado se clasificó para consumo, y el resto como huevo de desecho. Los huevos se pesaron según la categoría.

El huevo para incubar se conservó en filler de plástico entre 6 a 10°C y humedad relativa de 40 a 60%. Cada lote de huevo incubado fue la colecta de siete días, y hubo 23 horas entre la última colecta y la colocación en la incubadora.

En cada incubación el lote de huevo se sacó del equipo de refrigeración para atemperarlo hasta 23 a 25°C durante tres horas, luego se puso en filler para huevo de codorniz y se asperjó con un desinfectante orgánico (Virkon^{MR} Laboratorios Bayer) a dosis de 50 ppm, y se colocó en la incubadora de volteo automático (Implementos Huacuja SA de CV, Tonalá, Jalisco, México) a temperatura promedio de 37.6±0.3°C y HR de 67.1±5.6%. Al cumplir 336 h de incubación el huevo se colocó en la nacedora (Implementos Huacuja SA de CV, Tonalá, Jalisco, México) donde se mantuvo a temperatura promedio de 37.2 ± 1 °C y HR de 68 ± 6 %. El primer retiro de los pollitos de la nacedora se realizó de 11 a 13 horas a partir de iniciada la eclosión y cuando el plumón estaba seco, y se registró el peso de cada pollito (Báscula OHAUS USA 3000 x 0.01 g).

Cada huevo no eclosionado se quebró para observar alguna estructura compatible con el desarrollo de embrión y considerarlo como huevo fértil.

Para el análisis estadístico de los valores se comprobó la normalidad y homogeneidad de las varianzas con los métodos de Kolmogorov-Smirnov y Bartlett, respectivamente (8), enseguida se realizó el análisis de la varianza para medidas repetidas con el Proc MIXED de SAS (7) que incluyó el efecto de semana, nivel de HJCNT y la interacción entre semana y HJCNT, donde la jaula (codornices) se consideró como efecto aleatorio. Para la incubabilidad y fertilidad se realizó una prueba de Ji cuadrada (8). En todos los análisis se consideró el nivel de alfa para aceptar diferencia estadística igual o menor que 0.05.

RESULTADOS

Los resultados para la respuesta productiva y de incubación se presentan en el Cuadro 2. La inclusión de hasta 6% de HJCNT no afectó el consumo de alimento ($P = 0.61$), en promedio las codornices consumieron 31.49 g por día. La producción de huevo tuvo una tendencia ($P = 0.06$) a la diferencia estadística debido al valor alto en el nivel de 3% de HJCNT. Las codornices en el nivel de 6 % produjeron huevo más pesado ($P < 0.01$) que el control y 3%, aunque el peso del huevo clasificado para consumo no mostró diferencia entre niveles de HJCNT, que en promedio peso 14.16 g. El alimento consumido por huevo producido y huevo incubable, fue diferente entre niveles ($P < 0.01$), pero en los niveles de 0 y 6% no hubo diferencia ($P > 0.05$), y el nivel de 3% tuvo menor consumo. El alimento consumido por pollito nacido fue menor en los niveles con HJCNT ($P < 0.01$). El peso del pollito de codorniz al salir de la nacedora presentó tendencia a la diferencia entre niveles ($P = 0.07$), donde el nivel de 6% tuvo el peso más

alto, sin embargo esto se explica por el mayor peso del huevo incubable. La incubabilidad y fertilidad fue mayor en los huevos de codornices que se alimentaron con HJCNT ($P < 0.01$).

DISCUSIÓN

Los resultados del estudio indican que la HJCNT es un ingrediente que se puede incluir en el alimento de codorniz japonesa reproductora en los niveles utilizados. El primer indicador de ello es que las aves no modificaron su consumo, el peso del huevo incubable y para consumo no disminuyó. Cuando se incubaron los huevos no fue afectada la fertilidad e incubabilidad del huevo, ni el peso del pollito al nacer. Debido a que no se encontraron trabajos con aves reproductoras no es posible comparar los resultados obtenidos. En codornices en engorda Flores (2) utilizó harina de *Jatropha curcas* no tóxica extrudida en niveles de 10, 20 y 30 %, y observó que el consumo de alimento, la ganancia de peso y la conversión alimenticia mostraron diferencias mínimas con respecto a la dieta con pasta de soya. Gil (3) incluyó aceite de *Jatropha curcas* en el alimento de codorniz japonesa en engorda en sustitución de hasta 5 % de aceite de soya, observó que la sustitución no modificó la respuesta productiva ni el rendimiento de la canal.

REFERENCIAS

1. Aderibigbe, A.O., C.O.L.E. Johnson, H.P.S. Makkar, K. Becker and N. Foidl. 1997. Chemical composition and effect of heat on organic matter and nitrogen-degradability and some antinutritional components of *Jatropha* meal. *Animal Feed Science Technology*. 67: 223-243.
2. Flores, C. R. S., J. B. Valdez T., M. A. Angulo E., J. B. Heredia y J. J. Portillo L. Respuesta productiva de codorniz japonesa en engorda alimentada con harina de *Jatropha curcas* L no tóxica extrudida. En: Memorias de la XXXVII Convención Nacional ANECA. Puerto Vallarta Jalisco México. 2 al 6 de mayo. Pag. 329-338. 2012.
3. Gil. A. M. R. Efecto de la inclusión de aceite de *Jatropha curcas* no tóxica en el alimento para codorniz japonesa en engorda (*coturnix coturnix japonica*). Tesis Maestría. Centro de Investigación en Alimentación y Desarrollo. Culiacán Sinaloa México. 2013.
4. Makkar H. P. S. and K. Becker. Potential of *J. curcas* seed meal as a protein supplement to livestock fed, constraints to its utilization and possible strategies to overcome constraints. In. Gübtz, M. Mittelbach, M. Trabi. Editors. Symposium "Jatropha 97" Biofuels and Industrial Products from *Jatropha curcas*. Managua Nicaragua. Feb. 23-27. Pages. 190-205. 1997.
5. Moir, K. W., W. J. Yule and J. K. Connor. Energy losses in the excreta of poultry: a model for predicting dietary metabolizable energy. *Australian Journal Experimental Agricultural Animal Husbandry*. 20: 151-155.
6. National Research Council (NRC). Nutrient requirements of Ring-Necked Pheasants, Japanese Quail, and Bobwhite Quail. In: Nutrient requirements of poultry: 9th Rev. Ed. National Academy Press, Washington, D.C. Pp. 44-45. 1994.
7. SAS Institute. SAS/STAT: User's guide: Version 9.1. SAS Institute Inc. Cary, North Carolina. 2004.
8. Steel, R. G. D. y J. Torrie H. Bioestadística: Principios y Procedimientos. 2da. Edición. McGraw-Hill, México. 539 p. 1986.

Cuadro 1. Composición y aporte nutrimental calculado de las dietas experimentales.

Ingrediente	Harina de <i>Jatropha curcas</i> NT, %		
	0	3	6
Maíz	51.30	51.38	51.46
Pasta de soya	35.90	34.26	32.62
Aceite de soya	4.43	3.12	1.823
Harina de <i>Jatropha curcas</i>	0	3	6
Sal	0.30	0.30	0.30
Metionina	0.29	0.24	0.197
Piedra caliza molida	6.00	6.00	6.05
Ortofosfato	0.98	0.90	0.75
Vitaminas para gallina en postura	0.15	0.15	0.15
Minerales para aves	0.05	0.05	0.05
Pigmento vegetal	0.10	0.10	0.10
Prebiótico	0.20	0.20	0.20
Adsorbente de micotoxinas	0.10	0.10	0.10
Fitasa	0.20	0.20	0.20
Total	100	100	100
Energía metabolizable, Mcal/kg	2.902	2.903	2.906
Proteína cruda, %	20.06	20.06	20.06
Metionina, %	0.50	0.50	0.50
Calcio, %	2.58	2.58	2.58
Fósforo disponible, %	0.35	0.36	0.35
Extracto etéreo, %	6.67	6.86	7.06

^a Premezcla de vitaminas y minerales proporciona por kg de dieta: 3.75 mg retinol; 112 µg colecalciferol; 30 mg acetato de tocoferol; 3 mg bisulfuro sódico; 1.5 mg tiamina; 6 mg riboflavina; 3 mg piridoxina; 15 µg cianocobalamina; 1.5 mg ácido fólico; 55 mg niacina; 15 mg Ca pantotenato; 180 µg biotina; 600 mg colina; 75 mg Mn; 75 mg Zn; 75 mg Fe; 900 µg Mo; 750 µg Co; 1.6 mg Cu; 105 µg Se; 120 mg Banox (BHA +BHT)

Cuadro 2. Indicadores productivos de reproductores de codorniz japonesa con inclusión de harina de *Jatropha curcas* variedad no tóxica en el alimento.

Variable	HJCNT, %			EEM	P
	0	3	6		
Alimento consumido por día, g	30.97	31.79	31.72	0.58	0.61
Producción hembra día relativo, %	71.89	83.23	74.89	1.79	0.06
Peso del huevo para incubar, g	15.88 ^b	15.85 ^b	16.38 ^a	0.07	0.01
Peso del huevo para consumo, g	13.93	13.89	14.67	0.23	0.10
Alimento consumido por huevo producido, g	57.36 ^a	49.04 ^b	56.42 ^a	1.33	0.01
Alimento consumido por huevo incubable, g	119.98 ^a	98.35 ^b	120.35 ^a	4.29	0.01
Alimento consumido por pollito nacido, g	266.51 ^a	162.45 ^b	128.79 ^b	11.90	0.01
Peso del pollito, g	11.18	11.15	11.38	0.08	0.07
Incubabilidad sobre huevos totales, %	54.46		70.88		0.01
Fertilidad, %	76.29		86.90		0.01
Incubabilidad sobre huevos fértiles, %	71.80		82.39		0.01

^{a,b} Literales diferentes en renglón indican diferencia estadística ($P < 0.05$) Prueba de Tukey-Cramer

PÉRDIDA DE PESO DEL HUEVO INCUBABLE DE CODORNIZ (*COTURNIX COTURNIX JAPONICA*) DURANTE EL ALMACENAMIENTO É INCUBACIÓN Y SU RELACIÓN CON EL PESO DEL POLLITO

WEIGHT LOSS OF THE JAPANESE QUAIL HATCHING EGG DURING STORAGE AND INCUBATION AND RELATIONSHIP BETWEEN EGG WEIGHT AND CHICK WEIGHT

L. Portillo*, C. Martínez, T. Castro y R. Ríos

Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia Universidad Autónoma de Sinaloa Carretera Internacional Km 3.5
Sur, Apartado Postal 1057, Culiacán Sinaloa México. Tel/Fax (667) 718-1650

*Autor para correspondencia: portillo6422@yahoo.com

SUMMARY

To know the weight loss of the hatching egg (HI) of the Japanese quail during storage, and incubation and the weight ratio of the HI with the chick weight (PP), 1099 eggs in 18 batches (three batches every seven days) were hatched. The eggs were collected and weighed at 18:30 pm, and were stored for 7 to 10°C and 40 to 60 % RH. On incubation day, eggs were warmed 3 h at 23 to 25 °C, were weighed and sprinkled with organic disinfectant. They were incubated at 37.7 ± 1 °C and 65 to 70 % RH. On d 14 of incubation were weighed and placed in the hatcher at 37.2 ± 1 °C and RH 70-80 %. When chicks were dry they were weighed. Weight loss of egg lots during storage was 0.58% ± 1.68 and 8.39 ± 0.64% in the incubator. The weight of the HI had an r value of 0.61 with PP (P < 0.01), and accounted for 70.1 % of the average egg weight, but this value decreased 2.21% per gram of egg weight increase (r = -0.62, P < 0.01).

RESUMEN

Para conocer la pérdida de peso del huevo incubable (HI) de codorniz (*Coturnix coturnix japonica*) durante el almacenamiento é incubación y la relación del peso del HI con el peso del pollito (PP), fueron incubados 1099 huevos en 18 lotes (tres lotes cada siete d). El huevo se colectó y pesó a las 18:30 horas, fue almacenado de 7 a 10°C y 40 a 60% de HR. El día de incubación se atemperó 3h entre 23 a 25°C, fue pesado y se asperjó con desinfectante orgánico. Se incubaron a 37.6±0.3°C y HR 67.1±5.6% y al día 14 se pesó y colocó en la nacedora a 36.2±0.8°C y HR de 87.8±4.1%. Cuando los pollitos estuvieron secos fueron pesados. La pérdida de peso de los lotes de huevo en conservación fue de 1.68±0.58% y 8.39±0.64% en la incubadora. El peso del HI tuvo un valor de r de 0.61 con PP (P<0.01) y representó en promedio 70.1% del peso del huevo, sin embargo, este valor disminuyó 2.21% por cada gramo de aumento de peso del huevo (r = -0.62, P<0.01).

INTRODUCCIÓN

El peso y la calidad de los pollos para engorde al nacer dependen de factores como la edad de las reproductoras, las condiciones de almacenamiento pre incubación, y las condiciones de incubación. El almacenamiento del huevo seleccionado para incubar es una práctica necesaria y su duración depende del mercado, de la capacidad del equipo de incubación, de la cantidad de pollitos que nacen y la edad de las reproductoras (3). Durante el almacenamiento el pH de la albúmina se alcaliniza (9.2 a 9.7), sin embargo el pH óptimo para la gastrulación es de 8.2, otro cambio que ocurre es la desintegración de la membrana vitelina y las chalazas, lo que afecta el desarrollo del embrión (9).

Durante el almacenamiento é incubación el huevo pierde peso debido a la pérdida de agua, que ocurre principalmente durante la incubación (3). En 18 días de incubación el huevo de gallina registra una pérdida de 12% del peso pero se obtienen los mejores índices de incubación (7). El peso del pollito al nacimiento es importante por la relación de éste con los pesos subsecuentes, al tiempo que el peso del huevo determina el peso del pollito al nacer. Salah Udinn y col. (5) en huevo de codorniz estimaron una correlación de 0.547 y el peso del pollito representó el

70.02 % del peso del huevo. El objetivo del trabajo fue estimar la pérdida de peso del huevo en almacenamiento pre incubación de una semana y la relación entre el peso del huevo con el peso del pollito al nacimiento.

MATERIALES Y MÉTODOS

El trabajo se realizó en la Unidad Avícola de la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia de la Universidad Autónoma de Sinaloa, ubicada en Culiacán Sinaloa México. Se utilizaron 1099 huevos colectados para incubar durante seis semanas, agrupados en 18 lotes en seis incubaciones. Cada día a las 18:30 horas se clasificó el huevo en una de tres categorías: 1) huevo para incubar elegido según el tamaño, forma y color, limpio y sin adherencias o quebrado, 2) huevo que no cumplió las especificaciones para incubar, limpio y no quebrado clasificado para consumo, y 3) el resto identificado como huevo de desecho. Los huevos se pesaron según la categoría. El huevo para incubar fue colocado en filler de plástico entre 7 a 10°C y humedad relativa de 40 a 60%. Cada lote de huevo incubado fue resultado de la colecta de siete días, y hubo 23 horas entre la última colecta y la colocación en la incubadora.

En cada incubación el lote de huevo se sacó del equipo de refrigeración, fue pesado y se atemperó hasta 23 a 25 °C durante tres horas; al finalizar el proceso se pesó, luego fue colocado en filler para huevo de codorniz y asperjarlo con un desinfectante orgánico (Virkon^{MR} Laboratorios Bayer) a dosis de 50 ppm, luego se colocó en la incubadora de volteo automático (Implementos Huacuja SA de CV, Tonalá, Jalisco, México) a temperatura promedio de 37.61 ± 0.27 °C y HR de $67.09 \pm 5.60\%$. Al cumplir 14 días de incubación el huevo fue pesado y se colocó en la nacedora (Implementos Huacuja SA de CV, Tonalá, Jalisco, México), donde se mantuvo a temperatura promedio de 36.21 ± 0.75 °C y HR de 87.76 ± 4.14 %. El primer retiro de los pollitos de la nacedora fue realizado de 11 a 13 horas a partir de iniciada la eclosión y cuando el plumón estaba seco, en cada retiro se registró el peso de cada pollito (Báscula OHAUS USA 3000 x 0.01 g).

Para el análisis estadístico de los valores se comprobó la normalidad con el método de Kolmogorov-Smirnov (6). Se calculó la media y desviación estándar de la pérdida de peso del huevo durante el almacenamiento y en la incubación hasta los 14 días. Se realizó análisis de correlación lineal simple de Pearson y se calcularon los estimadores de los parámetros para el modelo de regresión lineal simple, así como el valor del coeficiente de determinación (6). En todos los análisis se consideró el nivel de alfa para aceptar diferencia estadística igual o menor que 0.05.

RESULTADOS

La pérdida de peso de los lotes de huevo en el almacenamiento pre incubación fue de $1.68 \pm 0.58\%$, mientras que en la fase de incubación hasta las 336 horas fue de $8.39 \pm 0.64\%$, por lo que desde la colección hasta la transferencia la pérdida de peso fue de 10.07%.

La relación entre el peso promedio del huevo a la colección con el peso promedio del pollito al retirarlo de la nacedora fue positiva (Gráfica 1). El modelo de regresión ajustado indica que el peso del pollito se incrementó en 0.35 gramos por cada gramo de aumento del peso del huevo ($r = 0.61$), aunque el valor del coeficiente de determinación ($R^2 = 0.38$) no es muy bueno. Con respecto a la proporción del peso del pollito en relación al peso del huevo, en promedio fue de 70.1%, aunque este valor disminuyó en 2.21 % por cada gramo de aumento del peso promedio del huevo ($r = -0.62$, $P < 0.01$), como se muestra en la Gráfica 2.

DISCUSIÓN

Debido al contenido de agua del huevo (75 %), a la necesidad de intercambio de oxígeno y bióxido de carbono y la existencia de poros en el cascarón, la pérdida de peso del huevo es un proceso normal favorecido por el gradiente de concentración de agua entre el medio interno del huevo y el área donde se almacena, sin embargo, cuando la pérdida coincide con los valores mínimos del rango, implica que la cámara de aire no incrementa su volumen y no favorece que el pollito inicie la respiración pulmonar, en cambio, valores altos de pérdida de peso resultan en una deshidratación del medio. Rahn y Paganelli (2) resaltaron la relevancia de la pérdida de peso del huevo como un parámetro importante para la incubación, ya que está relacionada con el intercambio de gases, que se ha correlacionado con el metabolismo del embrión y las tasas de desarrollo (1). En huevo de codorniz para producción de carne, Romao y col. (4) estimaron una pérdida lineal de peso de 0.2058% por cada día de almacenamiento, aunque la pérdida de peso durante la incubación fue de -0.8864% durante el mismo periodo, lo que indica que estuvo relacionada de forma inversa. Sin embargo, la pérdida de peso tanto en almacenamiento como en incubación depende de la temperatura y humedad relativa. Así a 20°C con 60% de HR, la pérdida de peso fue de

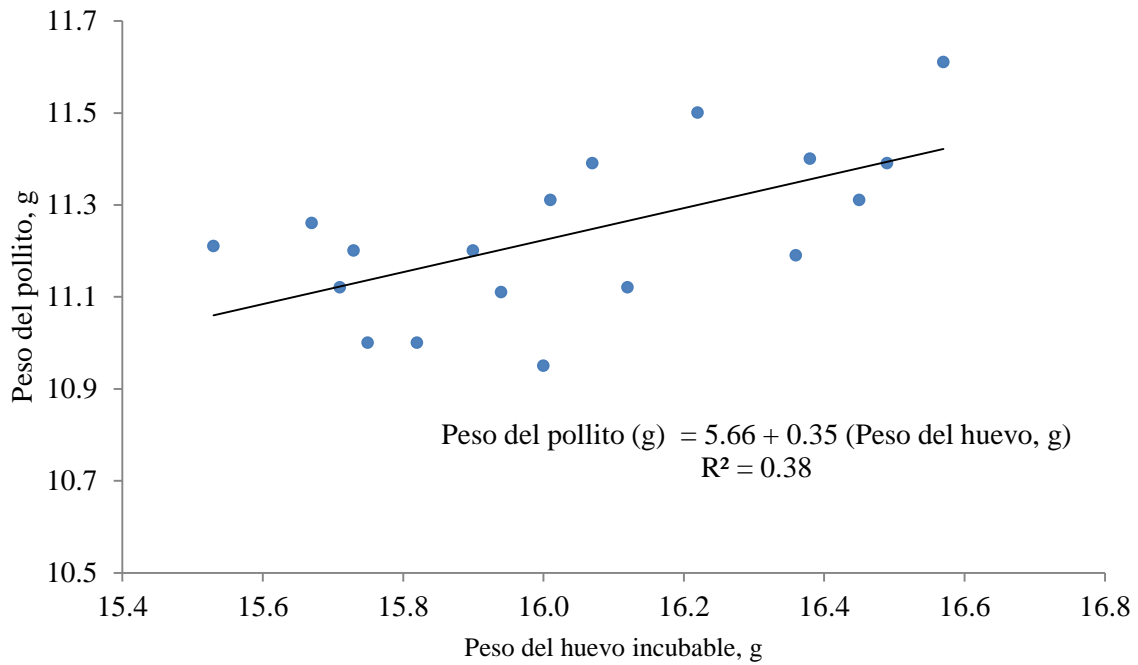
1.5%, y en la incubación a 37.6 °C con 60 % de HR la pérdida de peso fue de 4.7% cuando se almacenaron por siete días. En el presente trabajo la pérdida de peso fue superior a la estimada por Romao y col. (4). Es posible que la diferencia entre los valores de pérdida se deba a las condiciones externas al área de conservación y de incubación, ya que se ha observado que los valores registrados varían conforme lo hacen los valores externos al área donde está el huevo.

En este trabajo el peso del pollito representó el 70.1% del peso del huevo. Este valor coincide con el referido por Salah Udinn y col. (5), quienes al almacenar huevo durante siete días estimaron una proporción del peso del pollito de 70.02 % del peso del huevo. La correlación entre el peso del huevo con el peso del pollito fue cercana a la estimada por Salh Udinn y col. (5) de 0.547. El peso del pollito al nacer es importante ya que está relacionado con el crecimiento y otros parámetros como el peso final (8). Por ello es importante el peso del huevo a incubar. El peso del pollito está determinado principalmente por el peso inicial del huevo, y varía normalmente de 62 a 78% del peso del huevo, y se determina en segundo lugar por la pérdida de peso durante la incubación, peso de la cáscara y residuos, la tensión, el tiempo y las condiciones de incubación, la edad y el sexo de pollo (8).

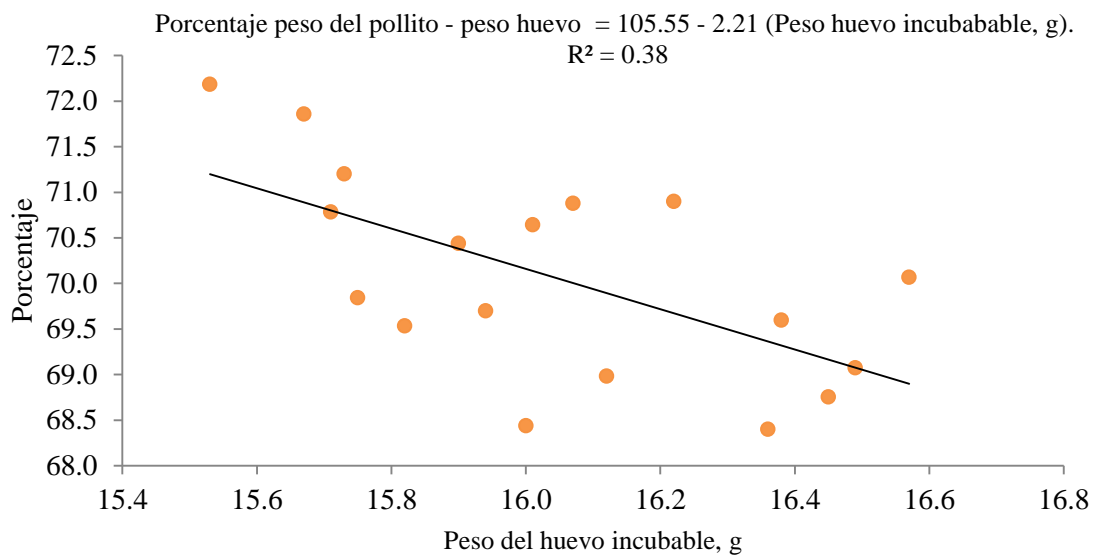
REFERENCIAS

1. Burton F. G. and S. G. Tullet. A comparison of the effect of eggshell porosity on the respiration and growth of domestic fowl, duck and turkey embryos. *Comparative Biochemistry and Physiology*. 75:167-174. 1983.
2. Rahn H. and A. Paganelli CV. How bird eggs breathe. *Scientific American*. 240:46-55. 1979.
3. Rocha, J. S. R. N. C, Bajao, V. M. Barbosa, M. A. Pompeu, M. N. S. Fernandes, L. J. C. Lara, C. F. Q. Matias and J. V. M. S. P. Batista. Negative effects of fertile egg storage on the egg and the embryo and suggested hatchery management to minimize such problems. *World's Poultry Science Journal*. 69(1): 35-44. 2013.
4. Romao JM, T. G. V. Moraes, R. S. C. Teixeira, W. M. Cardoso and C. C. Buxade. Effect of egg storage length on hatchability and weight loss in incubation of egg and meat type Japanese quails. *Brazilian Journal of Poultry Science*. 10: 143-147. 2008.
5. Salah-Udinn M., D. C. Paul and Q. M. E. Huque. Effect of weight and pre-incubation holding periods on hatchability of Japanese quail eggs in different seasons. *Australian Journal of Animal Science*. 7: 499-503.
6. Steel, R. G. D. y J. Torrie H. *Bioestadística: Principios y Procedimientos*. 2da. Edición. McGraw-Hill, México. 539 p.
7. Tullent, S. G. *Science and art of incubation*. *Poultry Science*. 69: 1-15. 1990.
8. Wilson, H. R. Interrelationships of egg size, chick size, posthatching growth and hatchability. *World's Poultry Science Journal*. 47: 5-20. 1991.
9. Xavier, I. M. C., S. V. Cancado, T. C. Figueredo, T. C. Lara, L. J. C. Lana, M. R. Souza and N. C. Bajao. Qualidade de ovos de consumo submetidos a diferentes condicoes de armazenamento. *Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinaria e Zootecnia*. 60: 953-959. 2009.

Gráfica 1. Relación del peso del huevo incubable con el peso del pollito de codorniz (*Coturnix coturnix japonica*) al nacimiento.



Gráfica 2. Relación entre peso de huevo incubable con peso del pollito en porcentaje.



EMERGENCE OF VARIANT REOVIRUS SEROTYPES IN NORTH AMERICA

LA APARICIÓN DE VARIANTES DE SEROTIPOS DE REOVIRUS EN AMÉRICA DEL NORTE

M. Putnam^A, A. Reilley^A, K. Jones^A, J. Rosenberger^B, S. Rosenberger^B, and M. Markis^B

^ACeva Animal Health 8735 Rosehill Rd. Suite 300 Lenexa, Kansas 66215

marshall.putnam@ceva.com

^BAviserve LLC

RESUMEN

Desde 2010 los productores han estado experimentando signos clínicos de artritis viral, tendinitis y sinovitis. Se ha determinado que los agentes causales son variantes de serotipos de reovirus claramente diferentes de los productos comerciales disponibles. La presentación describirá los signos clínicos, diagnóstico, caracterización viral y los esfuerzos para el control.

SUMMARY

In the summer of 2011, turkey flocks in the upper Midwestern states of the United States began to develop clinical signs similar to viral arthritis in chickens. In the fall of 2011 and early winter of 2012 broiler flocks began to develop a similar viral arthritis in the US and Canada. In these cases the clinical signs included edema and rupture of the digital flexor tendons and differed from rupture of the gastrocnemius tendon seen in classical reovirus viral arthritis. In each clinical presentation, variant reoviruses were isolated that differ antigenically from conventional reovirus S1133 based antigens.

INTRODUCTION

Clinical signs associated with reovirus infection in turkeys and chickens appeared in progeny from flocks vaccinated with conventional S1133 based reovirus antigens. Those clinical signs included edema and rupture of the digital flexor tendons, edema and rupture of the gastrocnemius tendons, synovitis, digital flexor tendons causing splayed legs, poor weight gain and increased culling. In some broiler flocks viral epicarditis and pericarditis was also seen in 3-5 d old chicks.

While not indicative of pathogenicity, the reovirus ELISA titers in the parent flocks greatly exceed the normal titer associated with a conventional pullet vaccination program. Progeny from all breed crosses were affected but progeny from certain breeder flocks were more heavily affected indicating vertical shed. Horizontal shed was also clinically documented in the hatchery and on the farms.

MATERIALS AND METHODS

Tendons and joint fluids were collected for virus isolation. Pathogenicity of the virus isolates was confirmed via foot pad inoculation test. Pathogenic isolates were then used to prepare polyclonal antisera in SPF chickens for micro neutralization assays to determine antigenic relatedness (1).

RESULTS

Most of the reoviruses separated out into three major serologic groups. Table 1 is a partial list of the antisera and reovirus virus isolates that shows the neutralization pattern.

DISCUSSION

While the reoviruses associated with the viral arthritis tend to fall into three broad serotype groups, there are pathogenic isolates that do not fall into these three groups. This indicates the reoviruses are continuing to evolve and requires continued monitoring. Killed vaccines from these isolates have been used and are successful in reducing or eliminating the clinical effects of these variant reoviruses.

REFERENCES

1. Aviserve LLC. Delaware Technology Park. 1 Innovation Way, Suite 100. Newark, DE 1971.

Table 1. Antigenic comparisons of reoviruses from chicken and turkey tendons.

Group	Reovirus	Antiserum										
		PA-5573	PA-7361	PA-11733	MTA-10015	KF 111	KF 112	GP Schl	Grgs Bry	WF CR	PA-3974	Turkey 2011
I	KF12-111	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-
	PA 5573	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-
	PA 7361	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-
	PA 11733	+/-	+/-	+	+/-	+/-	+/-	-	-	-	-	-
	MTA 10015	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-
	MTA PL	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-
	SMS GL	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-
	PA 5894	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-
	Canada 3088	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-
	Canada 4771	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-
	Canada 4932	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-
II	NJ Bvr	+/-	-	+/-	+/-	+	+	+/-	-	-	-	-
	KF12-112	-	-	-	-	+	+	+	-	-	-	-
	GP Schl	-	-	-	-	+	+	+	-	-	-	-
	KF Grif	-	-	-	-	+	+	+	-	-	-	-
	KF Wal	-	-	-	-	+	+	+	-	-	-	-
	KF Srey	-	-	-	-	+	+	+	-	-	-	-
	TY Pk	-	-	-	-	+	+	+	-	-	-	-
	TY Earl	-	-	-	-	+	+	+	-	-	-	-
	Ag St Gunder	-	-	-	-	+	+	+	-	-	+/-	-
	Ag St Lenth	-	-	-	-	+	+	+	-	-	+/-	-
PA 6500	-	-	-	-	+	+	+	-	-	-	-	
III	Canada Red C	-	-	-	-	-	-	-	+/-	+/-	-	+
	WF CR	-	-	-	-	-	-	-	+	+	-	-
	Grgs Bry	-	-	-	-	-	-	-	+	+	-	-
	PP G&J	-	-	-	-	-	-	-	+	+	-	-

EFFECTO TÓXICO DEL CONSUMO DE LA SEMILLA DE JATROFA (*JATROFA CURCAS*) EN POLLOS DE ENGORDE

TOXIC EFFECTS OF CONSUMING BARBADOS NUT SEED (*JATROFA CURCAS*) IN BROILER CHICKENS

Quezada-Tristán Teódulo^A, Guzmán-Maldonado Salvador Horacio, Ortiz-Calderón Ana Lilia, Montoya Navarrete Ana Luisa^A y Chávez González Leticia^A

^ADepartamento de Clínica Veterinaria del Centro de Ciencias Agropecuarias de la Universidad Autónoma de Aguascalientes, Ags., México. Av. Universidad 940, Cd. Universitaria CP 20131
Email: tquezada@correo.uaa.mx, tquezadaster@gmail.com

SUMMARY

The Barbados nut seed (*Jatropha curcas*) has a high protein content (24 to 30%). However, its use is limited due to the presence of toxic compounds (phorbol esters). The objective of the present work was to nutritionally characterize and evaluate the toxic effects of Barbados nut seed in broiler chickens. Nutritional and toxic properties of a toxic variety of Barbados seed were evaluated. Forty-five Ross-308 chickens one d old were selected and fed a diet with a 10% addition of Barbados nut seed meal. Productive, biochemical and histopathological parameters were evaluated. The seed presented phorbol esters, the birds showed toxic damage, ALT and AST enzymes indicated hepatic damage, and the histopathology showed toxic damage. The toxic variety of Barbados nut seed is not suitable to be used in poultry feeding due to the toxic level of the phorbol esters.

RESUMEN

La semilla de jatrofa (*Jatropha curcas*) posee un alto contenido de proteína (24 a 30%), sin embargo, su utilización es limitada debido a la presencia de compuestos tóxicos (ésteres de forbol). El objetivo de este trabajo fue realizar una caracterización nutricional y evaluar los efectos tóxicos de la semilla de jatrofa en pollos de engorda. Se utilizó una semilla de jatrofa variedad tóxica y no tóxica, se le evaluaron las propiedades nutricionales y tóxicas. Se seleccionaron 135 aves Ross-308 de un día de edad, se alimentaron con alimento adicionado con el 10% de harina de jatrofa tóxica y no tóxica. Se estudiaron parámetros productivos, bioquímicos e histopatológicos. La semilla presentó ésteres de forbol, las aves mostraron daño tóxico, las enzimas ALT y AST indicaron el daño hepático y la histopatología el daño tóxico. La semilla de jatrofa variedad tóxica no es apta para la alimentación de las aves por el nivel tóxico de los ésteres de forbol.

INTRODUCCIÓN

La especie conocida comúnmente como jatrofa (*Jatropha curcas*), es un arbusto es utilizado para el control de erosión de suelos, como cerco, leña, alimento para ganado, y usos medicinales. Existen dos tipos de jatrofa, la tóxica y la no tóxica, la diferencia entre estos dos tipos radica en el contenido de ésteres de forbol (compuestos tóxicos) (1). La torta de jatrofa es un subproducto obtenido de la semilla una vez que se le extrajo el aceite, el cual tiene poco valor comercial debido principalmente a la presencia de compuestos tóxicos (ésteres de forbol). Sin embargo, se sabe que su contenido y calidad de proteínas es alto (3). El contenido de proteína y grasa en jatrofa no tóxica es muy similar a las variedades tóxicas, pero la variedad toxica posee menor o nula cantidad de ésteres de forbol (<0.11 mg/g) (4). La toxicidad de los ésteres de forbol limita el uso de la jatrofa tóxica como alimento humano o animal ya que se ha reportado disminución del apetito, discapacidad, diarrea, respiración acelerada, dificultad para mantener su posición normal y el pelo rizado. Hallazgos macroscópicos en el intestino mostró enteritis catarral aguda y la extravasación de sangre en el lumen, se observó hígado congestionado, los riñones, el corazón y edema de pulmón. Además de que causan la promoción tumoral, proliferación celular, activación de las plaquetas, mitogénesis de linfocitos, eritema de la piel, producción de prostaglandinas y estimulación de la degranulación de los neutrófilos.

Dada la importancia actual que ha adquirido el cultivo de la jatrofa para la producción de biocombustible es necesario realizar estudios en modelos animales para aprovechar de alguna manera la jatrofa como una fuente proteica. Es por ello que en este trabajo se propusieron como objetivos el analizar, evaluar el efecto sobre los parámetros productivos y tóxico en pollos de engorda incluyendo en su dieta el 10% de la semilla de jatrofa de los dos ecotipos (toxica y no toxica) que se cultivan en México.

MATERIALES Y MÉTODOS

El presente estudio de laboratorio se llevó a cabo en las instalaciones del Instituto Nacional de Investigaciones Forestales Agrícolas y Pecuarias (INIFAP) de Celaya, Gto., México y la parte de campo en el Centro de Ciencias Agropecuarias de la Universidad Autónoma de Aguascalientes. Se utilizaron dos ecotipos de semillas de jatrofa una tóxica y otra no tóxica. Las semillas se descascarillaron y se molieron. La cuantificación de los ésteres de forbol se determinó a través de cromatografía líquida de alta resolución (HPLC) según el método descrito por Martínez Herrera y col., (2006).

Se utilizaron 135 pollos de engorde raza ROSS-308 de un día de edad, procedente de la incubadora Pollitos de Aguascalientes, con un peso promedio de 38.0 ± 3 g. Bajo un diseño completamente al azar (DCA) las aves fueron repartidas aleatoriamente en tres tratamientos, tratamiento uno control (alimento normal), tratamiento dos (dieta con el 10% de harina de jatrofa no tóxica) y tratamiento tres (Dieta con el 10% de harina de jatrofa tóxica) cada tratamiento con tres repeticiones de 15 aves cada uno. Se les administró el agua y alimento *at libitum*. Se manejaron con dos fases de alimentación: iniciador del día 1 al 28 de edad y finalizador de 28 a 42 días, las dietas fueron isoproteicas e isoenergéticas. Una hora después de su llegada a la caseta, se les suministró agua con azúcar más aminoácidos para contrarrestar el estrés del transporte. Semanalmente se determinaron los parámetros productivos: peso promedio (PP), consumo de alimento (CA), ganancia diaria de peso (GDP), índice de conversión (IC) e índice de productividad (IP), de acuerdo a lo descrito por Quintana (6). Se tomaron muestras de sangre quincenalmente, se centrifugaron y se obtuvo el suero sanguíneo. Se obtuvieron los parámetros bioquímicos (actividades enzimáticas de aspartato amino transferasa (AST) y alanino amino transferasa (ALT) y las concentraciones de proteínas y albúmina por métodos espectrofotométricos en un espectrofotómetro RA-50 de Bayer (2). Se sacrificaron al día uno y posteriormente cada 15 d tres aves con dislocación cervical de cada tratamiento, se disecaron los hígados y riñones.

Se tomaron muestras del lóbulo hepático derecho y el riñón derecho que, se colocaron en frascos con una solución fijadora (100 mL de formaldehído al 37%, 900 mL de agua destilada, 4.0 g/L de NaH_2PO_4 , 6.5 g/L de Na_2HPO_4 , pH 7.4) para su conservación y almacenamiento hasta su análisis histopatológico. Se tomaron muestras de hígado y riñón (1 cm^3) de cada tratamiento para ser lavadas, deshidratarlas (alcohol al 80%, 96% y 100%), aclararlas (Xilol) e infiltrarlas con parafina líquida en un procesador automático de tejidos (Histoquinet, Leica TP 1020). Se elaboraron los bloques de parafina de cada una de las muestras utilizando un centro de embebido de parafina y un enfriador. A partir de los bloques de parafina se realizaron los cortes histológicos de $5.0 \mu\text{m}$ de grosor usando un micrótopo de rotación, los cortes fueron extendidos en un baño de agua caliente ($50 \pm 5^\circ\text{C}$) cubiertos portaobjetos y se dejaron secar en la estufa por 24 horas a una temperatura de 60°C . Una vez secos estos fueron teñidos con hematoxilina/eosina (HE) con un equipo semiautomático. Una vez teñidos los tejidos se procedió a realizar su revisión en un microscopio compuesto con objetivos de 10x y 40x (5).

Los datos del experimento fueron sometidos a un análisis de varianza (ANDEVA) con un Modelo Lineal General y prueba de comparación de rangos múltiples de Tukey con un nivel de confianza de $P < 0.05$, en un programa de análisis estadístico (SAS, 2009) comparando los tratamientos con la inclusión de la harina de jatrofa con respecto al tratamiento control.

RESULTADOS

En el análisis de estos compuestos tóxicos presentes en las semillas de jatrofa considerada como ecotipo tóxico fue de 1.74 ± 0.17 mg/g de harina. Mientras que para el ecotipo no tóxico el contenido de ésteres de forbol fue de 0.11 mg/g de harina. Los resultados en este estudio demuestran que la adición del 10% de harina de semilla tóxica en la dieta comercial para pollos de engorda es altamente tóxica, ya que presentaron un alto porcentaje de mortalidad en las primeras dos semanas de vida (95.0%). Mientras que en el grupo de animales que recibieron la harina de semilla no tóxica y alimento comercial la mortalidad fue de 4%.

Los principales síntomas de intoxicación que se presentaron fueron somnolencia, letargo, postración, ataxia, polipnea, diarrea constante, empastamiento de la cloaca, plumas erizadas, pérdida de apetito, postración, despigmentación, resequedad en los tarsos y signos nerviosos (mostrando algunos ataques de convulsiones e incoordinación), coma y muerte de 8 a 10 días.

No se encontraron diferencias significativas en el contenido de proteínas en todos los tratamientos a los 15 días de vida (3.7 ± 0.4 , 4.8 ± 0.4 y 3.7 ± 0.1 , control, no tóxica y tóxica respectivamente). Sin embargo, si se observaron diferencias en el nivel menor de albúmina en las aves que consumieron la jatrofa tóxica (1.34 ± 0.01 , 0.74 ± 0.15 , 1.30 ± 0.16 , control, no tóxica y tóxica respectivamente). Igualmente en los grupos de animales que consumieron la dieta control y con 10% de la harina de jatrofa no se observaron diferencias a los 28 d de edad en los valores registrados de proteína (5.7 ± 0.1 y 4.8 ± 0.4 , respectivamente) y albúmina (1.53 ± 0.1 y 1.47 ± 0.1 respectivamente) los animales del grupo que recibieron el 10% de harina de jatrofa tóxica en su dieta tuvieron que ser sacrificados por sus condiciones de salud que mostraban.

Se observó a los 15 días que la actividad enzimática de la ALT no presentaron diferencias estadísticas entre los tratamientos del grupo que recibió alimento control y los que recibieron el 10% de la harina no tóxica ($17 \pm$

2.0 y 15 ± 1.7 U/L, respectivamente). Mientras que el grupo de pollos que recibió la dieta con el 10% de harina de jatrofa tóxica si mostraron diferencia estadística (35 ± 13.1 U/L). Por otra parte, la actividad enzimática de AST tampoco mostraron diferencias entre los tratamientos del grupo que recibió alimento control y los que recibieron el 10% de la harina no tóxica (121.3 ± 13.5 y 117.7 ± 15.8 U/L, respectivamente), pero si el grupo de pollos que recibió la dieta con el 10% de harina de jatrofa tóxica (181 ± 1.0 U/L).

A los 28 días que la actividad enzimática de la ALT no presentaron diferencias estadísticas entre los tratamientos del grupo que recibió alimento control y los que recibieron el 10% de la harina no tóxica (12.7 ± 3.5 y 12.7 ± 2.1 U/L, respectivamente). Por otra parte a los 42 días tampoco se presentaron diferencias estadísticas entre los tratamientos del grupo que recibió alimento control y los que recibieron el 10% de la harina no tóxica (12.7 ± 1.5 y 13.7 ± 5.1 U/L, respectivamente). Mientras que la actividad enzimática de AST a los 28 como a los 42 d, tampoco mostraron diferencias entre los tratamientos del grupo que recibió alimento control y los que recibieron el 10% de la harina no tóxica (131.6 ± 9.7 y 130.8 ± 4.2 U/L).

Los parámetros productivos evaluados no fueron completados dado a que los animales que consumieron la harina de jatrofa tóxica al 10% en la dieta tuvieron que ser sacrificados por sus condiciones de salud. Sin embargo, entre los grupos control y dieta con 10% de harina de jatrofa no tóxica los resultados fueron muy similares.

A los siete días de vida los animales del grupo que recibieron harina tóxica en la necropsia se encontraron lesiones hepática e infección del saco vitelino. A los 15 y 21 días se observó a la necropsia; peritonitis, pericarditis y perihepatitis fibrinopurulentas, deshidratación, diarreas, nefromegalia, uratosis, degeneración grasa del parénquima hepático, edema pulmonar, coloración anormal en tarsos, ulceraciones en molleja y hemorragia en diversos órganos.

En el hígado se observaron las siguientes lesiones histopatológicas: necrosis coagulativa, picnosis, cariorexis o cariólisis y el citoplasma intensamente eosinófilico. Mientras que en riñón las lesiones observadas fueron: el epitelio tubular impregnado de sales de calcio, carga de calcio excretado, coloración basófila, disminución del lumen de los túbulos, las células tumefactas con aspecto granular del citoplasma, células tubulares con degeneración, infiltración intersticial por mocitos, células plasmáticas y linfocitos.

REFERENCIAS

1. Becker, K. and Makkar, H. P. S. *Jatropha curcas*: A potential source for tomorrow's oil and biodiesel. *Lipid Technology*, 20:104-107. 2009.
2. Gornall, A. G., Bardawill, C. S. and David, M. M. Determination of serum proteins by means of the Biuret reaction. *Journal of Biological Chemistry*, 177:751-766. 1949.
3. Makkar, H. P. S., Aderibigbe, A. O., Becker, K. Comparative evaluation of nontoxic and toxic varieties of *Jatropha curcas* for chemical composition, digestibility, protein degradability and toxic factors. *Food Chem.* 62(2): 207-215. 1997.
4. Makkar, H. P. S., Becker, K., Schmook, B. Edible provenances of *Jatropha curcas* from Quintana Roo state of Mexico and effect of roasting on antinutrient and toxic factors in seeds. *Plant Foods for Human Nutrition*, 52:31-36. 1997.
5. Prophet, E. B., Mills, B., Arrington, J. B., Sobin, L. H. *Laboratory methods in histotechnology*. The American Registry of Pathology. Armed Forces Institute of Pathology. Washington, D.C. 1994.
6. Quintana, L. J. *Avitecnia manejo de las aves domésticas más comunes*. pp. 11 - 36. 2003.

ÁCAROS DE LA FAMILIA MACROCHELIDAE HACIA UN CONTROL BIOLÓGICO DE MOSCAS EN GRANJAS AVÍCOLAS

MITES FROM THE MACROCHELIDAE FAMILY IN CHICKEN FARMS FOR A FUTURE BIOLOGICAL CONTROL OF FLIES

Ma. Teresa Quintero, M. Elizabeth Mejía Moyo y Fabiola Nieto Rabiela

Laboratorio de Entomología, Departamento de Parasitología Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia, Universidad Nacional Autónoma de México

SUMMARY

In this study the presence of mites of the Macrochelidae family found in large numbers in an egg production farm is communicated. Macrochelidae family includes about 20 genera and about 500 species. They have been found in tropical and temperate climates. Mites from the Macrochelidae family belong to the suborder Mesostigmata; they belong to a range of different genera and species inhabiting various substrates such as feces of various animals, and poultry manure as well as on various social insects, beetles and flies (9). Due to this circumstance, some countries have tried to use Macrochelidae to implement a biological control of flies. As a result of this finding we are in the beginning of keeping the aforementioned mite cultures to benefit poultry.

RESUMEN

En el presente trabajo se comunica la presencia de ácaros de la familia Macrochelidae hallados en gran número en una granja productora de huevo. En la familia Macrochelidae se incluyen cerca de 20 géneros y cerca de 500 especies. Se les ha hallado en climas tropical y templado; Los ácaros de la familia Macrochelidae pertenecen al suborden Mesostigmata constituyen una gama de diversos géneros y especies que habitan en sustratos muy variados tales como excremento de diversos animales y también sobre gallinaza así como sobre diversos insectos sociales, escarabajos y moscas (9) debido a esta circunstancia en algunos países se ha intentado emplear a Macrochelidae para implementar el control biológico de moscas. Por lo que a raíz del presente hallazgo nos encontramos en el inicio de mantener cultivos de los ácaros mencionados para beneficio de la avicultura.

INTRODUCCIÓN

Los ácaros de la familia Macrochelidae, según la clasificación moderna pertenecen al orden Mesostigmata, Cohorte Gamasina, superfamilia Eviphioidea, familia Macrochelidae, en la que se encuentra el género *Macrocheles*, del que existen diversas especies reportadas en México, según Méndez Olivo se reportaron nueve especies en 1973 a saber: *Macrocheles dimidiatus*, *M. mexicanus*, *M. asutroamericanus*, *M. halffteri*, *M. hechti*, *M. boneti*, *M. hoffmannae*, *M. jalisciensis*, todas sobre diferentes especies de escarabajos y también *Macrocheles muscaedomesticae* que sólo se había mencionado sobre *Musca domestica*.

ANTECEDENTES

Axtell (1) se interesó en el control de moscas en granjas de gallinas por medio de los ácaros. Emberson (3) comentó que desde hace mucho tiempo se sabe que los ácaros Macrochelidae están asociados a moscas sinantrópicas, lo mismo fue mencionado por Krantz (6). Con respecto a experimentos: Halliday y Holm (5) en Australia realizaron una investigación a donde comunicaron cuales macrochélicos causaban daño sobre *Musca venustissima*, comprobando con esto, que ácaros de la familia Macrochelidae eran capaces de depredar estadios inmaduros de la mosca mencionada, *asimismo*, Walker y Doube (10) observaron únicamente a hembras adultas de los ácaros depredando sobre huevos de moscas.

Guanilo y Cordero (4) realizaron un estudio sobre el comportamiento depredador de Macrochelidae sobre *Musca domestica*, para ello emplearon envases en los que se colocaron las moscas y ahí mismo se pusieron ácaros

Macrocheles muscaedomesticae ; de este experimento se obtuvieron las siguientes observaciones: los ácaros se alimentan de huevos de la mosca dejándolos completamente vacíos, en cambio las larvas del ácaro no se alimentan de las moscas y si se vuelven a alimentar desde la fase de protoninfa hasta la fase de adulto, por lo que con este experimento se concluyó que los ácaros *Macrocheles muscaedomesticae* presentan numerosas adaptaciones que los convierten en un eficiente depredador y controlador biológico de *Musca domestica*; Beresford y Sutcliffe (2) estudiaron el efecto de la forosia por *Macrocheles muscaedomesticae* y *M. subbadius* sobre *Stomoxys calcitrans* comprobando una hipótesis referente a que las moscas que tenían ácaros macroquélidos presentaban efectos sobre las poblaciones de moscas reproduciéndose menos.

En México se ha mencionado la presencia de *Macrocheles muscaedomesticae* en granjas de gallinas Quintero (8, 9) así como también se han encontrado sobre otras moscas como *Stomoxys calcitrans* y *Ophyra* spp. pero esto en otros tipos de explotación pecuaria (8).

MATERIAL Y MÉTODOS

El material consistió en ácaros colectados de excremento de gallinas en una granja de postura, se separaron cerca de 30 ácaros, de los cuales se conservaron vivos 10 para iniciar un cultivo, el resto se sometió a aclaramiento con hidróxido de sodio al 2% después de este paso se montaron entre porta y cubre objetos para determinar su género y especie. Los ácaros vivos se colocaron en un frasco de boca ancha 7.5 cm en el mismo frasco se colocaron larvas de mosca para alimentación de los ácaros, así como un algodón empapado en agua purificada, el cultivo preliminar se mantuvo por espacio de 40 días, siendo este un primer ensayo para la obtención masiva de ácaros Macrochelidae.

DISCUSIÓN Y CONCLUSIONES

Se comunica la presencia de ácaros Macrochelidae obtenidos de excremento de gallinas ponedoras, se comunican también observaciones obtenidas de un ensayo preliminar de cultivo de los ácaros.

Se determinó que los ácaros aislados y cultivados correspondieron a *Macrocheles muscaedomesticae*

Se concluye que para inicio de 2014 se principiará a realizar un cultivo siguiendo el método de Guanilo y Cordero (4).

REFERENCIAS

1. Axtell, R. C. Status and potential of biological control agents in livestock and poultry pest management systems. *In*: Biological Control of Muscoid Flies (Patterson, R.S. and D.A. Rutz, editors). Misc. Publications Entomological Society of America. 61, p. 1-9. 1986.
2. Beresford, D. V., Sutcliffe, J. F. The effect of *Macrocheles muscaedomesticae* and *M. subbadius* (Acarina: Macrochelidae) phoresy on the dispersal of *Stomoxys calcitrans* (Diptera: Muscidae), Systematic & Applied Acarology Special Publications 23:1-30 2009.
3. Emberson E. M. Macrochelid mites in N.Z. (Acarina Mesostigmata, Macrochelidae) New Zeland Entomol 205-2-118-127. 1973.
4. Guanilo A. Cordero J. Comportamiento depredador de *Macrocheles muscaedomesticae* (Scopoli) sobre huevos de *Musca domestica* Linneus (Diptera Muscidae) Rev. Per Ent 43 137-142 2003.
5. Halliday R.B. and Holm E. Mites of the family Macrochelidae as predators of two species of dung-breeding pest flies Entomophaga 32: 332-338 1987.
6. Krantz, G. W. Observations on five rarely collected genera of Macrochelidae (Acari: Mesostigmata) associated with insects. Acarologia.39: 95-109 1998.
7. Méndez O. C., Notas sobre Macrochelidae de México (Acari: Macrochelidae) Anales de la Escuela Nacional de Ciencias Biológicas México 15: 135-183 1968.
8. Quintero, M. M.T. Current Status of the study of mites associated with flies in Mexico Proceedings of Acarology IX Ohio Biological Survey 125-127 (1996).
9. Quintero, M. M.T. Ácaros parásitos y de vida libre relacionados con la Avicultura trabajo publicado en Memorias del Curso Tendencias Avícolas Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán U.N.A.M. octubre de 2013
10. Walker, J.M., & Doube, B. M. 1984 Susceptibility to Drowning of eggs of the dung breeding flies *Haematobia irritans exigua* and *Musca venustissima*. Angew Entomology 98, 518-527.

SENSITIVITY OF FIELD ISOLATES OF *EIMERIA MAXIMA*, *E. ACERVULINA* AND *E. TENELLA* FROM COMMERCIAL BROILER OPERATIONS TO SOME OF THE MOST WIDELY USED ANTICOCIDIAL AGENTS IN NORTH AMERICA

SENSIBILIDAD DE MUESTRAS AISLADAS DE *EIMERIA MÁXIMA*, *E. ACERVULINA* Y *E. TENELLA* A PARTIR DE OPERACIONES COMERCIALES DE POLLO DE ENGORDA A ALGUNOS DE LOS AGENTES ANTICOCÍDICOS MÁS UTILIZADOS EN NORTEAMÉRICA

M. Quiroz, S. Clark, and J. Dickson

Zoetis Inc., 1040 Swabia Court, Durham, NC 27703

e-mail: marco.quiroz@zoetis.com

RESUMEN

La coccidiosis es una de las enfermedades más importantes desde el punto de vista económico en la producción avícola moderna. Los métodos de control de la misma incluyen la aplicación en el alimento de productos anticoccídicos, el uso de vacunas vivas *in ovo* o aplicadas vía spray al día 1 de edad en la incubadora, o la combinación de ambos métodos de control. Debido al uso extensivo de agentes anticoccídicos a través de los años, el tema de la resistencia al tratamiento es siempre una preocupación cuando los profesionales de la avicultura planean estrategias a largo plazo para el control de las coccidias en operaciones de pollos de engorda.

El propósito del presente artículo fue resumir la eficacia de los anticoccídicos más ampliamente utilizados en pollos de engorda en Norteamérica, en base a pruebas de sensibilidad anticoccídicas (AST) conducidas en muestras aisladas en campo de *E. acervulina*, *E. máxima* y *E. tenella* durante el periodo de 2010 a 2013.

SUMMARY

Coccidiosis is one of the most economically important diseases in modern poultry production. Coccidiosis control methods include in-feed application of anticoccidial products, the use of live vaccines *in ovo* or via spray application at one day of age at the hatchery or the combination of both control methods. Due to the extensive use of anticoccidial agents through the years, the subject of drug resistance is always a concern when poultry professionals plan long term cocci control strategies in broiler operations.

The purpose of the present paper is to summarize the efficacy of the most widely used anticoccidial drugs in broilers in North America, based on anticoccidial sensitivity tests (AST) conducted for field isolates of *E. acervulina*, *E. maxima*, and *E. tenella* during the period of 2010 to 2013.

PROVENTRICULAR-VENTRICULAR IMPACTION IN A 4-MONTH OLD OSTRICH (*STRUTHIO CAMELUS*): A CASE REPORT

IMPACTACIÓN PROVENTRICULAR-VENTRICULAR EN UN AVESTRUZ DE 4 MESES DE EDAD: PRESENTACIÓN DE UN CASO

A.A. Raji^A, M.B. Bello^A, Y.S. Baraya^A, and S. Garba^B

^AA A Raji, Department of Veterinary Pathology, Faculty of Veterinary Medicine, Usmanu Danfodiyo University, PMB 2346, Sokoto, Nigeria

^BVeterinary Teaching Hospital, Usmanu Danfodiyo University, Sokoto, Nigeria

RESUMEN

La impactación es una acumulación de alimentos o productos no alimentarios (palos, piedras, vidrio, etc) en el proventrículo, con el consiguiente bloqueo de la abertura en la molleja causando una falla en el movimiento del alimento a lo largo del tracto gastro-intestinal (7). La impactación es considerada como un síntoma de problemas de comportamiento tales como el estrés por desorientación, el estrés por deserción o la frustración con respecto a la búsqueda de alimentos (7).

SUMMARY

Impaction is an accumulation of food or non-food items (sticks, stones, glass, etc) in the proventriculus, with the subsequent blockage of the opening into the gizzard causing a failure of food to move along the gastro-intestinal tract (7). Impaction is regarded as a symptom of behavioral problems such as disorientation stress, desertion stress or frustration with regards to finding food (7).

ABSTRACT

A four month old ostrich (*Struthio camelus*) was brought to the Veterinary Teaching Hospital of Usmanu Danfodiyo University, Sokoto, Nigeria for necropsy examination. The Ostrich was raised with its pair in a semi-intensive system and it picked up sand and pebbles from a field where it was raised. The affected bird showed gradual anorexia, lethargy, weight loss, dehydration, weakness, sternal recumbence and finally death. Necropsy revealed impaction of gizzard and proventriculus with pebbles. Peritoneal cavity and pericardium contained serosanguineous fluid.

INTRODUCTION

Ostrich farming is a rapidly growing enterprise worldwide (2). South Africa, Egypt, Italy etc have raised these large birds intensively for over 100 years (1). In Nigeria, ostriches can be found in zoos, parks and farms. Few commercial and demonstration farms can be found in the Northern parts of the country (3). Ostriches are famous for curiosity and especially interest in brightly colored materials (6). If external materials are swallowed, depending on the size, hardness and neatness of edges could cause intensive troubles (6). Ostriches are highly sturdy, disease resistant and can withstand a wide range of climatic temperature. A common problem encountered in ostrich chicks is proventricular-ventricular impaction (2). Impactions due to ingestion of foreign material have been described by many authors. From Nigeria, such reports were neither available nor documented. Present case reports pathological (gross) findings in the organs of a four month old ostrich that died due to pebble impaction of proventriculus and ventriculus.

CASE REPORT

Mortality of a four month old ostrich was reported to Veterinary Teaching Hospital on 18th of August, 2013. The carcass (Photo 1) was submitted for necropsy at the post-mortem room of the Veterinary Pathology Department, Faculty of Veterinary Medicine, Usmanu Danfodiyo University, Sokoto, Nigeria the same day. The necropsy procedure was conducted by the pathologists on duty. Clinical data and information about management was collected and recorded. The clinical signs that persisted for weeks before the death included progressive loss of appetite, lethargy, constipation, weight loss, weakness, and abnormal position of the head. Later, the affected bird became recumbent and died.

Necropsy and gross pathology. The bird was subjected to necropsy examination and observed for gross alterations.

Gross lesions. The carcass was grossly emaciated (Photo 2). The gizzard was markedly enlarged, distended and occupied by most of the abdominal cavity. Peritoneal cavity contained serosanguineous fluid of about 40 mL on both sides. Pericardium contained straw-colored thin clear fluid of about 27 mL. Epicardial fat was scanty and gelatinized. The proventriculus and ventriculus were completely impacted with a solid mass of sand and pebbles (Photo 3). The intestines were empty of feed. Color was turgid and full of gas.

DISCUSSION

In ostriches, impaction is caused by excessive ingestion of materials which accumulate in the proventriculus and gizzard (2). Impaction is classified into three different categories (4). It could be acute (weak birds in a few days) or chronic (weak birds in weeks to months); hard (caused by hard materials such as pebbles, sand) or soft (caused by fibrous materials such as grass); partial or complete. Impaction occurs in Ostriches less than six months old (5). In the present study, the impaction was of hard type and occurred in a four month old Ostrich. The clinical signs seen in this study were similar to that of a previous case (2). The cause of impaction in the present case was mainly due to pebbles. The serosanguineous fluid seen in the pericardial sac and peritoneal cavity, serous atrophy of the epicardial, and emaciated condition of the carcass clearly indicates the catabolic effect due to starvation. It is concluded that the Ostrich died due to proventricular and gizzard impaction. Ostriches reared and maintained in an area which is relatively free from foreign materials and stress easily avoid this type of impaction.

REFERENCES

1. Jenson JM, Johnson JH, Weiner ST. Husbandry and Medical Management of Ostriches, Emus and Rheas. Wildlife and Exotics Animal Teleconsultants. 1992.
2. Nagarajan K, Selvaraj J, Balakrishnan G, Roy P, Selvan ST, Veeramani P, Balachandran C, Thyagarajan D, Muralimanohar B. Sand impaction in an ostrich (*Struthio camelus*): pathological and histopathological study. IJAVMS. 5(2): 64-72. 2011.
3. Ndelekwute, EK, UK Oke, HO Uzegbu, IR Igwe, UO Inyang, C Nwachukwu. Review of ostrich (*Struthio carmelis*) production and its adaptability to the Nigerian poultry industry. Animal Production Research Advances Vol 5, No 2 (2009)
4. Samson J. Prevalent diseases of ostrich chicks farmed in Canada. Canadian Veterinary Journal.; 38: 425-428. 1997.
5. Stewart JS. Ratites. In 'Avian Medicine: Principles and Application'. (Eds BW Ritchie, GJ Harrison, LR Harrison). 1284-1326. (Fort Worth, Florida: Wingers Publishing Inc., USA). 1994.
6. Zakeri, A. and P. Kashefi. Proventricular-ventricular Impaction in Ostrich (*Struthio camelus*). World Veterinary Journal of Zoology. 6 (4): 424-426. 2011
7. Huchzermeyer, 1997.

Photo 1. The ostrich carcass at presentation.



Photo 2. Prominent rib bones, evidence of emaciation.

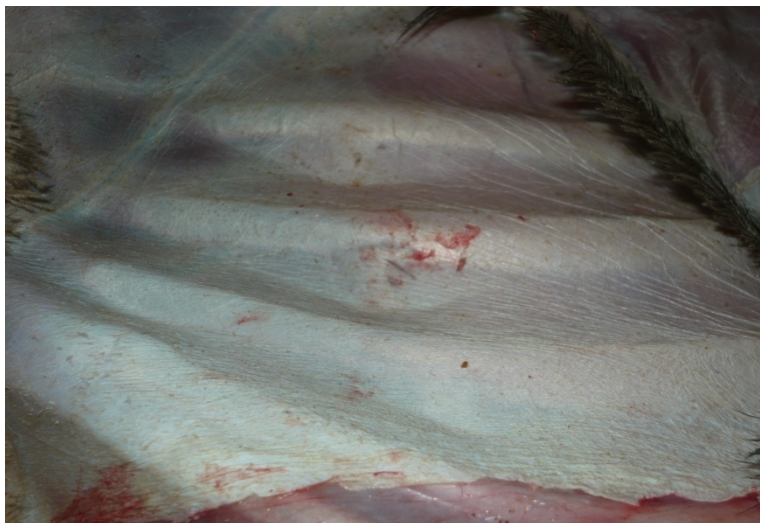


Photo 3. Pebbles in the proventricular and ventricular region.



FIELD EXPERIENCES IN JUDICIOUS USE OF ANTIMICROBIALS

EXPERIENCIAS DE CAMPO EN EL USO PRUDENTE DE ANTIMICROBIANOS

N. Reimers

Cutler Associates International, Gustine, CA

RESUMEN

La Asociación Americana de Medicina Veterinaria tiene quince Principios del uso prudente de antimicrobianos. En el campo, los veterinarios aplican medidas preventivas, evalúan las terapias alternativas y supervisan los protocolos terapéuticos utilizando la ley y la ciencia actuales. Un plan de prevención bien desarrollado aborda los retos bacterianos y por protozoarios y detiene la enfermedad clínica haciendo la intervención terapéutica más rara. Planes de prevención implementados correctamente aseguran la salud y bienestar animal y una abundancia de alimentos seguros y accesibles.

SUMMARY

Field veterinarians orchestrate the disease prevention first line of defense. Good management practices, nutrition, and vaccinations serve critical roles. Non-antibiotic feed and water additives support judicious use programs, aiding or replacing the antimicrobial's prevention and control of disease.

INTRODUCTION

In December 2013, the Food and Drug Administration implemented a new plan concerning anti-microbial use in food producing animals. CVM-GFI209 (1) contains two Principles of Judicious Use:

Principle 1: The use of medically important antimicrobial drugs in food-producing animals should be limited to those uses that are considered necessary for assuring animal health

Principle 2: The use of medically important antimicrobial drugs in food-producing animals should be limited to those uses that include veterinary oversight or consultation.”

In regards to Therapeutic Use of Antimicrobials, the American Veterinary Medical Association holds this position (2): “When the decision is reached to use antimicrobials for therapy, veterinarians should strive to optimize therapeutic efficacy and minimize resistance to antimicrobials to protect public and animal health.”

At the State and Federal levels, legislators seek to make Food and Drug Administration program provisions mandatory for all food animal production segments.

DISCUSSION

In poultry production, veterinarians apply preventative measures, evaluate alternative therapies, and oversee therapeutic protocols using the current law and science. Prevention plans address bacterial and protozoal challenges and stop most clinical disease, making therapeutic interventions rare. Properly-implemented plans ensure poultry health and welfare and abundant, safe, affordable food. Before choosing therapeutic antimicrobials, veterinarians follow several principles (2): “Preventive strategies, such as appropriate husbandry and hygiene, routine health monitoring, and immunization, should be emphasized. Other therapeutic options should be considered prior to antimicrobial therapy.”

Judicious use principles dovetail with preventative medicine practice; disease prevention eliminates therapeutic use of antimicrobials. Veterinarians examine field challenges. Challenges can include unique pathogens, worker practices, or housing or feeding system limitations. Some challenges dictate changes to protocols or to equipment design. Others require replacement or augmentation of existing antimicrobial or vaccination programs.

When prevention measures fail and laboratory findings and clinical signs dictate, veterinarians choose antimicrobials to preserve animal health under the following conditions (2):

Judicious use of antimicrobials, when under the direction of a veterinarian, should meet all requirements of a veterinarian-client-patient relationship. Prescription, Veterinary Feed Directive, and extralabel use of antimicrobials must meet all the requirements of a veterinarian-client-patient relationship. Extralabel antimicrobial therapy must be prescribed only in accordance with the Animal Medicinal Drug Use Clarification Act amendments to the Food, Drug, and Cosmetic Act and its regulations.

During antimicrobial therapy, veterinarians ensure treatment success through monitoring management factors and utilizing diagnostic information (2):

Veterinarians should work with those responsible for the care of animals to use antimicrobials judiciously regardless of the distribution system through which the antimicrobial was obtained. Regimens for therapeutic antimicrobial use should be optimized using current pharmacological information and principles. Antimicrobials considered important in treating refractory infections in human or veterinary medicine should be used in animals only after careful review and reasonable justification. Consider using other antimicrobials for initial therapy. Use narrow spectrum antimicrobials whenever appropriate. Utilize culture and susceptibility results to aid in the selection of antimicrobials when clinically relevant. Therapeutic antimicrobial use should be confined to appropriate clinical indications. Inappropriate uses such as for uncomplicated viral infections should be avoided. Therapeutic exposure to antimicrobials should be minimized by treating only for as long as needed for the desired clinical response. Limit therapeutic antimicrobial treatment to ill or at risk animals, treating the fewest animals indicated.

And finally, veterinarians promote human and environmental health through judicious therapeutic application (2): “Minimize environmental contamination with antimicrobials whenever possible. Accurate records of treatment and outcome should be used to evaluate therapeutic regimens.”

Veterinarians evaluate treatment success or failure and modify preventative disease plan to reduce future treatment.

REFERENCES

- 1) CVM-GFI209, “The Judicious Use of Medically Important Antimicrobial Drugs in Food-Producing Animals” 2013.
- 2) AVMA, Judicious Therapeutic Use of Antimicrobials 2013.

IMPACT OF PRE-ENRICHMENT MEDIA PH ON *SALMONELLA* DETECTION

IMPACTO DEL PH DE UN MEDIO PRE-ENRIQUECIDO EN LA DETECCIÓN DE *SALMONELLA*

K.. Richardson^A, N. Cox^B, J. Cason^C, D. Cosby^B, and L. DeRome^A

^AAnitox Corp., Lawrenceville, Georgia 30043

^BUSDA, ARS, Russell Research Center, Athens, Georgia 30605

^CUSDA Retired, Athens, Georgia 30605

RESUMEN

En un estudio reciente, el pH de los medios pre enriquecidos para *Salmonella* se transformaron a ácidos (pH 4.0 a 5.0) cuando el alimento/ ingrediente fue incubado por 24 horas. Se ha reportado que las condiciones ácidas dañan o matan la *Salmonella*. En el presente estudio, cultivos estresados y no estresados de *S. Typhimurium* (ST), *S. Enteritidis* (SE), *S. Infantis* (SI), *S. Senftenberg* (SS) y *S. Montevideo* (SM) se incubaron en rangos de pH que iban de 4.0 a 7.0. El daño celular se determinó en agar xilosa-lisina-tergitol 4 (XLT4) y la muerte celular se determinó en agar nutritivo (NA). En el caso de la *Salmonella* no estresada, se observó que ST y SE fueron la que más toleraron las condiciones ácidas, y que SS y SM fueron las más sensibles. En el caso de la *Salmonella* estresada, se observaron tanto la tolerancia como la sensibilidad opuestas. Estos hallazgos sugieren que el pH de los medios pre enriquecidos puede influenciar el serotipo de *Salmonella* recuperado del alimento.

SUMMARY

In a recent study, the pH of commonly used *Salmonella* pre-enrichment medias became acidic (pH 4.0 – 5.0) when feed/ingredient were incubated for 24 h. Acidic conditions have been reported to injure or kill *Salmonella*. In this study, non-stressed and stressed cultures of *S. Typhimurium* (ST), *S. Enteritidis* (SE), *S. Infantis* (SI), *S. Senftenberg* (SS) and *S. Montevideo* (SM), were subjected to incubation pH ranging from 4.0 – 7.0. Cell injury was determined on xylose lysine tergitol 4 (XLT4) and cell death determined on nutrient agar (NA). In the case of non-stressed *Salmonella*, ST and SE was observed to be the most tolerant to acidic conditions and SS, SM and SI observed to be the most sensitive. In the case of stressed *Salmonella*, the opposite tolerance/sensitivities among the isolates were observed. These finding suggest that the pH of the pre-enrichment media may influence the serotype of *Salmonella* recovered from feed.

INTRODUCTION

The current methodology used for isolating *Salmonella* from feed and feed ingredients has been derived from human food methods with minimum consideration to the challenges that occur with dry matrixes and the stressed status of microorganisms. Pre-enrichment media are designed to revive stressed or injured *Salmonella* for detection in later analytical steps, but recent research has indicated that these media can become acidic during incubation. Cox *et al* (1) reported the pH of various pre-enrichment media could decrease from an initial pH of 6.1-7.2 to a final pH of 3.9 - 4.1 depending on the type of pre-enrichment media and feed/ingredient type. These acidic conditions could impact the isolation and detection of *Salmonella*.

The influence of pH on *Salmonella* has primarily focused on *Salmonella* growth rather than *Salmonella* recovery. At a pH of 4 - 5, the growth of *Salmonella* is inhibited (2,3,4). However, there is limited information on the impact of pH on the isolation and detection of *Salmonella*. Blankenship (5) reported that exposure of viable (non-stressed) *S. Bareilly* to acidic conditions resulted in cell death, cell injury and changes biochemical enzyme activity. The impact of acid injury on the recovery and detection of other isolates of *Salmonella* is viable and stressed states were evaluated.

MATERIALS AND METHODS

Production of inoculum. Isolates of *ST*, *SS*, *SI*, *SE*, and *SM* were obtained from the American Type Culture Collection (ATCC). Isolates were rehydrated in nutrient broth and transferred to veal infusion agar. Cultures were streaked on XLT-4 agar and the serology of each culture confirmed by somatic antigen agglutination. A single colony from the XLT-4 agar plate was transferred to a milk dilution bottle (160 mL) containing 90 mL of tryptic soy broth (TSB, Difco) and incubated for 18 – 24 h at 37°C. Broth cultures were utilized for the non-stressed inoculum and for the preparation of stressed inoculum as described by Liu *et al.* (6).

Acid exposure. Sterile citrate buffer solutions of pH 4 – 7 were prepared utilizing sodium citrate and citric acid. Aliquots (nine mL) of the buffer solutions were transferred to 15 mL sterile test tubes and 10^6 cfu *Salmonella* added. For the stressed inoculum, one g of the dried inoculum was added to each test tube. Test tubes were vortex for 15 s for mixing purposes and then incubated for 24 h at 37°C.

Cell injury method. At 6 and 24 h of incubation, one mL samples from each buffer solution was aseptically removed and serial dilutions prepared. Aliquots (0.1 mL) of the dilutions were plated in duplicate on both NA (Difco) and XLT-4 agar. Plates were counted after 24 h of incubation at 35°C. Inability to grow on XLT-4 agar was taken to indicate cell injury. The extent of injury was determined as the ratio of total counts on XLT-4 to nutrient agar. The degree of cell death was determined as the ratio of NA counts after various treatment times to initial NA counts.

RESULTS

The effect of the different citrate pH buffer solutions on cell death/cell injury was observed to be dependent on the pH of the incubation buffer, the isolate of *Salmonella* and the stress status of the microorganism. Cell death and cell injury of *Salmonella* was observed to increase in a linear fashion as the pH of the buffer solution was decreased. This enabled the data to be fitted to a linear regression to compare the acid tolerance of each isolate. The pH required for a 50% cell death and 50% cell injury for the non-stressed isolates are presented in Table 1. This strain of *ST* was the most acid tolerant with respect to cell death. *SS*, *SE* and *SI* were the most acid sensitive. In the case of cell injury, *ST* was the most acid tolerant and *SS* the most acid-sensitive.

Salmonella that had been subjected to stress (dehydration and heat exposure) exhibited different sensitivities to acidic conditions than non-stressed *Salmonella*. Data is presented in Table 2. Of the isolates, *ST* was the most affected. Stressing reduced the pH required for a 50% reduction >1 pH unit. In the case of *SS* and *SI*, the opposite was observed. Stressing increased the acid tolerance of the isolate by a 0.5 to >1 pH unit.

Utilizing XLT4 as the selective media allowed for observing the ability of the different isolates to produce hydrogen sulfide. In the case of non-stressed isolates of *Salmonella*, the ability of *SM* and *SI* to produce hydrogen sulfide was affected. At a pH of 7, *SM*, appeared as yellow colonies on XLT4. However, at lower pHs, colonies were black (H_2S positive). It was hypothesized that the colonies may have been immature in the pH 7 treatment and plates were incubated an additional 24 h. No changes in H_2S production were observed. In the case of *SI*, 46% of the colonies were H_2S negative when incubated in citrate buffer at pH 7. Lowering the pH did not appear to increase the number of H_2S negative colonies. The ability of other isolates of *Salmonella* to produce H_2S did not appear to be affected by pH.

Dehydration and heat treatment (stress) of *Salmonella* influenced the ability of *SM*, *SI* and *SE* to produce H_2S . In the case of *SM*, approximately 50% of the colonies were H_2S negative at a neutral pH without incubation. After 24 h of exposure to acidic conditions, the pH of the buffer did not appear to affect the percentage of H_2S negative colonies until a pH of 5 was obtained. At this pH, 75% of the colonies had lost their ability to produce H_2S . For *SI*, stressing increased the percentage of H_2S negative colonies from 46% to 78%. Reducing pH did not appear to increase the percentage of H_2S negative colonies. In the case of *SE*, 100% of the colonies were H_2S positive at a neutral pH without incubation. However, incubation in non-acidic conditions (pH 6-7) appears to result in H_2S negative colonies, whereas incubation in acidic conditions appears to favor H_2S positive colonies (Figure 1).

DISCUSSION

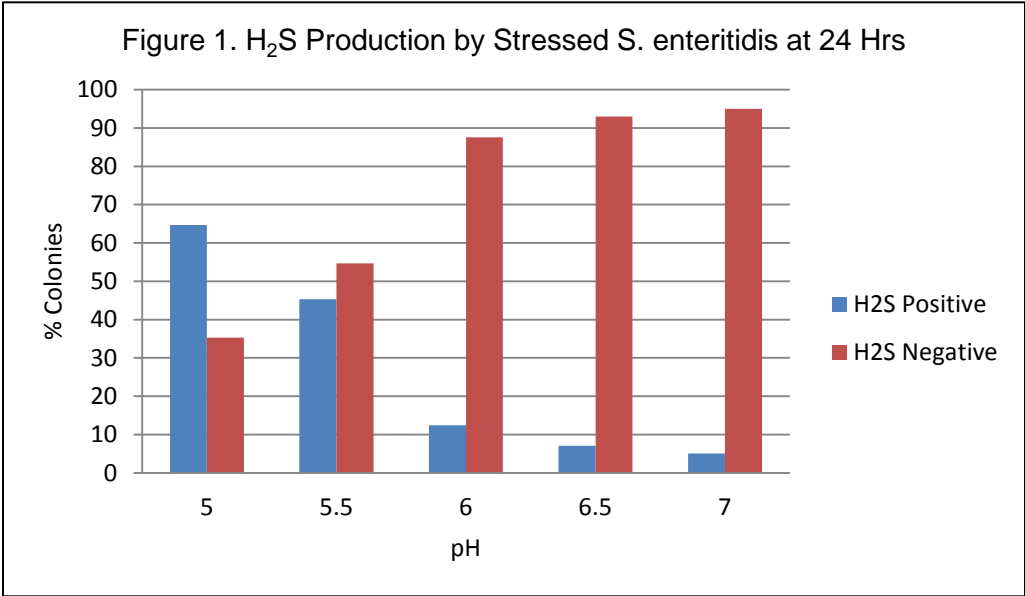
These results suggest that *Salmonella* may go undetected in feed samples due to an assortment of issues. *Salmonella* may die as a result of the acidity produced in the pre-enrichment media due to fermentation of substrates by background microflora. Also, acid injury of the *Salmonella* may change their biochemical profiles making them look different on plating and screening media. In addition, the viable or stressed condition of the *Salmonella* affects their sensitivity to acid injury. Even though certain issues have been raised by this research, making broad, sweeping conclusions should be avoided until numerous strains of many different serotypes of *Salmonella* have been thoroughly studied.

REFERENCES

1. Cox, N.A., J.A. Cason, R.J. Buhr, K.E. Richardson and L.J. Richardson. 2013. J. Appl. Poult. Res. 22:190-195.
2. Chung, K.C. and J.M. Goepfert. 1970. J. Food Sci. 35:326-328.
3. Ferreira, M.A.S.S. and B.M. Lund. 1987. Letters Appl. Microbiol 5:67-70.
4. McDermid, A.S., A.S. McKee, A.B. Dowsett and P.D. Marsh. 1996. J. Med Microbiol. 45:452-458.
5. Blankenship, L.C. 1981. J. Food Prot. 44(1):73-77.
6. Liu, T.S., G.H. Snoeyenbos, and V.L. Carson (1969). Avian Dis. 13:611-613.

Table 1. pH Required to Cause a 50% Reduction in the Recovery of Non-Stressed <i>Salmonella</i>		
Isolate	Cell Death	Cell Injury
<i>S. Typhimurium</i>	4.84	5.46
<i>S. Montevideo</i>	5.71	6.22
<i>S. Infantis</i>	5.88	6.69
<i>S. Enteritidis</i>	5.80	6.74
<i>S. Senftenberg</i>	5.80	6.88

Table 2. pH Required to Cause a 50% Reduction in the Recovery of Stressed <i>Salmonella</i>		
Isolate	Cell Death	Cell Injury
<i>S. Typhimurium</i>	6.07	6.09
<i>S. Montevideo</i>	5.49	6.07
<i>S. Infantis</i>	5.12	5.29
<i>S. Enteritidis</i>	5.74	6.32
<i>S. Senftenberg</i>	4.72	4.85



DETERMINACIÓN DE LA VIABILIDAD DE LA APLICACIÓN DE UNA VACUNA RHVT/ND Y UNA VACUNA EMULSIONADA INYECTADAS EN FORMA SIMULTÁNEA

VIABILITY TEST OF THE APPLICATION OF AN rHVT / ND VACCINE AND AN EMULSIFIED VACCINE INJECTED SIMULTANEOUSLY

J. Ríos Cambre^A, L. Montesinos^B, R. Alonso^C y N. Ledesma^B

^AMSD Salud Animal. Paseo de los frailes 22. Parque Industrial. Santiago Tianguistenco. México

^BUniversidad Nacional Autónoma de México. Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia. Departamento de Medicina y Zootecnia de Aves. México

^CUniversidad Nacional Autónoma de México. Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia. Departamento de Genética y Bioestadística. México

SUMMARY

To determine if the simultaneous application of a rHVT/ND vaccine with an inactivated emulsion vaccine in an oil adjuvant, under different way and temperature of application has an effect on the detection of the recombinant vaccine by means of molecular detection methods. Results show that even though the HVT was detected in all groups tested, there are differences in the amount of positive birds.

RESUMEN

Determinar si la aplicación simultánea de una vacuna rHVT/ND con una vacuna inactivada emulsionada en adyuvante oleoso bajo diversas condiciones de aplicación y temperatura afecta la detección de la vacuna recombinante por medio de la medición de partículas virales vacunales utilizando métodos moleculares de detección. Los resultados arrojan que aunque existe detección del virus HVT en todos los casos, pueden existir diferencias en cuanto a la incidencia de individuos positivos.

Una vacuna recombinante rHVT/ND + SB-1 es aquella en la cual el vector Herpesvirus del pavo (HVT) expresa la proteína F de fusión del virus de la enfermedad de Newcastle (ENC). Esta vacuna está diseñada para que al ser aplicada al día de edad en la planta de incubación, permita la reducción de vacunaciones en el campo, incluyendo las vacunas inactivadas que requieren aplicación individual (1,2). Sin embargo, en zonas avícolas donde se hace necesario vacunar contra otras enfermedades, como la Influenza aviar (IA), no es posible evitar el uso de vacunas emulsionadas. Con el fin de explotar el beneficio del uso de la vacuna rHVT/ND al máximo, se sugiere la aplicación de estas vacunas emulsionadas en presentación concentrada, con el fin de inmunizar a los pollitos en la planta de incubación utilizando volúmenes más reducidos para reducir el estrés causado por la inyección, para lo cual se han diseñado diversos equipos de vacunación automática que aplican ambas vacunas, una vacuna rHVT/ND + SB-1 (acuosa) y una vacuna inactivada de IA concentrada (emulsión oleosa) en forma simultánea.

Las vacunas rHVT/ND son asociadas a células; la viabilidad de las células es fundamental para garantizar la función biológica de la vacuna misma. Estas células son sumamente sensibles a cualquier variación adversa del ambiente en el que se encuentran, por esta razón, siempre que se desarrolla algún producto para ser administrado en forma simultánea, e incluso reconstituido en el mismo diluyente de reconstitución de la vacuna asociada a células, se deben correr pruebas de compatibilidad.

Actualmente existen en el mercado varios tipos de equipos de vacunación automáticos con inyección neumática con una sola aguja, diseñados para este fin. El más común es de tipo asincrónico, ya que utiliza dos disparadores de manera que los dos fluidos son inyectados uno después del otro, y uno de los cuales es diseñado en coordinación con MSD Salud Animal, denominado tentativamente "Deux-vaccines".

Recientemente se introdujo en México la prueba de la reacción en cadena de la polimerasa en tiempo real (RT-PCR) para el virus HVT, la cual es capaz de emitir resultados cualitativos y cuantitativos. Este recurso puede permitir en primera instancia determinar en forma directa si la administración de rHVT/ND en forma simultánea con vacunas oleosas bajo dicha forma de inyección y condiciones de temperatura variable resulta en una reducción de las aves positivas al vector HVT en un lapso considerado estándar para una vacuna de estas características, lo cual podrá ayudar a comprobar si existe compatibilidad entre ambos productos.

MATERIAL Y MÉTODOS

40 pollitos de engorda de un día de edad, procedentes del mismo lote de reproductoras y de la misma máquina nacedora. Vacuna rHVT/ND + SB-1 (Fusion ND-SB, MSD Salud Animal, Santiago Tianguistenco, México) con diluyente. Vacuna emulsionada inactivada contra la IA concentrada (Nobilis Protector Inac, MSD Salud Animal, Santiago Tianguistenco, México). Vacunador “Deux-vaccines” de tipo asincrónico. Baño María tipo Pro Heat con termostato graduable (MSD Salud Animal, Santiago Tianguistenco, México). Equipo RT-PCR Corbett Rotor-Gene 6000 (Departamento de Genética y Bioestadística, UNAM). Las aves se dividieron en cuatro grupos de 10 aves cada uno, y se identificaron y trataron de la siguiente manera:

Grupo 1. Fusion ND-SB

Grupo 2. Fusion ND-SB + vacuna emulsionada a temperatura de cuarto. Vacunados con equipo “Deux-vaccines”.

Grupo 3. Fusion ND-SB + vacuna emulsionada a 40°C. Vacunados con equipo “Deux-vaccines”

Grupo 4. Fusion ND-SB + vacuna emulsionada a 45°C. Vacunados con equipo “Deux-vaccines”

Todas las aves fueron vacunadas al día de edad y mantenidas en cautiverio. Al término de la vacunación se envió al laboratorio una muestra de vacuna del mismo lote utilizado sin descongelar para su uso en la estandarización de la prueba.

Posteriormente, a los 14, 21 y 28 días de edad se tomaron cuatro plumas remeras de cada ave. Las plumas fueron colocadas en bolsas de plástico limpio (una bolsa por ave). Se tuvo precaución de no presionar los cañones de las plumas para evitar la expulsión de la pulpa. Todas las bolsas fueron mantenidas en congelación. Cada grupo de plumas fue identificado de acuerdo al grupo de procedencia y se enviaron al Departamento de Medicina y Zootecnia de Aves de la Universidad Nacional Autónoma de México para el procesamiento de las muestras, las cuales se analizaron por la técnica de RT-PCR para la determinación del genoma del Herpesvirus del Pavo (HVT) vacunal.

Proceso de las muestras. Para determinar la cantidad de ADN viral se empleó la sonda que detecta el gen SORF1 del Herpesvirus de Pavo. Para la detección del ADN celular se empleó la sonda del gen $\alpha 2$ (IV) de la colágena de pollo, del cual hay una sola copia por célula. Ambas sondas fueron empleadas con anterioridad por Islam *et al.* (3).

La técnica de extracción del ADN de células de pollo se llevó a cabo mediante la modificación de la técnica descrita por Higuchi *et al.* (4)

El volumen final por reacción para el PCR-TR fue de 20 μ L, conteniendo 10 μ L de la muestra a analizar y 10 μ L del master mix. Los componentes del master mix por reacción fueron los siguientes: buffer Taq Polimerasa 1X, dNTP's 0.2mM, MgCl₂ 3mM, iniciadores F+R del virus 0.5 μ M, sonda del virus 0.1 μ M, iniciadores F+R del gen de referencia (colágena pollo $\alpha 2$) 0.5 μ M, sonda del gen de referencia 0.1 μ M, Taq polimerasa 1u, agua cpb 10 μ L.

La amplificación-detección del ADN se llevó a cabo en termociclador de PCR-TR con la siguiente programación: 95°C por 10 minutos, 40 ciclos de 95°C por 15 segundos y 60°C por 45 segundos.

RESULTADOS

A partir de los resultados obtenidos se consideraron diferentes tipos de muestras: muestras nulas (aquellas en las que no amplificó el ADN celular), muestras negativas (en las cuales no hubo amplificación viral, pero sí amplificación celular) y muestras positivas (aquellas que amplificó tanto el ADN viral como el ADN celular). En la Tabla 1 se muestra el porcentaje de muestras positivas de cada grupo.

DISCUSIÓN

Los resultados muestran que la detección del virus vacunal a los 14 días es un tanto errática, pues independientemente del tratamiento, hay diferencias importantes en la detección de las copias de los genes entre un grupo y otro. Esto puede coincidir con reportes que indican que en aves vacunadas empleando el vector HVT el establecimiento de la inmunidad tarda entre 21 y 28 días (5,6), y esto puede deberse a diferencias individuales en el tiempo de la replicación de las suficientes copias del virus vacunal. A partir del día 21 por lo menos el 80% de las aves analizadas de cada grupo resultaron positivas al virus HVT, lo cual también parece coincidir con la afirmación anterior. En estudios posteriores se reportará el efecto de estos tratamientos en la cantidad de copias por ave y por grupo, medidas por una metodología de cuantificación relativa.

REFERENCIAS

1. Morgan, RW; Gelb, Jr., J; Schreurs, CS; Lüticken, D; Rosenberger, JK; Sondermeijer, PJA. (1992). Protection of chickens from Newcastle and Marek's diseases with a recombinant herpesvirus of turkeys vaccine expressing the Newcastle disease virus fusion protein. *Avian Diseases* 36, 858-870.
2. Sondermeijer, PJA; Claessens, JAJ; Jenniskens, PE; Mockett, APA; Thijssen, RAJ; Willemse, MJ; and Morgan, RW. (1993). Avian herpesvirus as a live viral vector for the expression of heterologous antigens. *Vaccine* 11, 349-358.
3. Islam A, Harrison B, Cheetham BF, Mahony TJ, Young PL, Walkden-Brown SW. Differential amplification and quantification of Marek's disease viruses using real-time polymerase chain reaction. *Journal of virological methods*. 2004; 119: 103-113.
4. Higuchi R., von Beroldingen C., Sensabaugh G.F., Erlich H.A. (1988). DNA typing from single hairs. *Nature* 332, 543-546.
5. Morgan, RW; Gelb Jr., J; Pope, CR; Sondermeijer, PJA. (1993). Efficacy in chickens of a herpesvirus of turkeys recombinant vaccine containing the fusion gene of Newcastle disease virus: onset of protection and effect of maternal antibodies. *Avian diseases* 37, 1032-1040.
6. Hein, RG; Slacum, G; Rios, F; Lynch, P. (2008). Onset of immunity in birds with Newcastle disease maternal antibodies vaccinated with a recombinant HVT/F (NDV) vaccine. Proceedings of the XXIII World's Poultry Congress. Brisbane, Australia.

Tabla 1. El porcentaje de muestras positivas de cada grupo.

Grupo	Muestreo a los 14 días post-vacunación		Muestreo a los 21 días post-vacunación		Muestreo a los 28 días post-vacunación	
	Positivos/Total muestras	Positivos (%)	Positivos/Total muestras	Positivos (%)	Positivos/Total muestras	Positivos (%)
1	4/10	40.0%	10/10	100%	8/10	80.0%
2	6/10	60.0%	10/10	100%	9/9	100.0%
3	9/9	100%	10/10	100%	8/9	88.8%
4	7/10	70.0%	8/10	80.0%	10/10	100%

RENDIMIENTO PRODUCTIVO Y PIGMENTACIÓN DE LA YEMA DE HUEVO EN GALLINAS ALIMENTADAS CON DIETAS SORGO-PASTA DE SOYA SUPLEMENTADAS CON GRANOS SECOS DE DESTILERÍA CON SOLUBLES BAJOS EN ACEITE

YIELD AND PIGMENTATION OF EGG YOLK IN HENS FED SORGHUM - SOYBEAN – DDGS DIETS

A. Cortés^A, JF. Rivera^A, S. Ramírez^A, C. López^B, J. Arce^C y E. Ávila^A

^ACentro de Enseñanza, Investigación y Extensión en Producción Avícola, Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia, Universidad Nacional Autónoma de México

^BDepartamento de Producción Animal, Aves, Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia, Universidad Nacional Autónoma de México

^CUniversidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo FMVZ
Correo electrónico: cortescuevasarturo@yahoo.com

SUMMARY

In order to evaluate the use of two samples of distillers dried grains with solubles (DDGS A and B), low in oil (5.36 and 6.53 %) to determine the yield and pigmentation of egg yolk in Bovans White hens fed diets based on sorghum –soybean, a completely randomized design with five treatments and six replicates of 12 chickens each were used. The diets were supplemented with 6% and 12% of low oil DDGS (A and B) and supplemented with 1 and 2 ppm canthaxanthin per ton of feed. The results showed that the addition of 6% and 12% of low oil DDGS in sorghum-soybean diets for layer hens did not affect ($P > 0.05$) feed intake, laying rate, average egg weight, egg mass, and feed conversion; but their use improved the color of the egg yolk.

RESUMEN

Los DDGS (granos secos de destilería con solubles), son coproductos del etanol obtenidos a partir de ingredientes ricos en almidón, tienen un alto valor nutritivo. Actualmente existen nuevas variedades, bajas en aceite (2.5-7.5%), que las convencionales (10-12%). El aceite extraído de los DDGS, es principalmente utilizado para la producción de biodiesel. Diversos autores, han realizado investigaciones acerca de la evaluación de pigmentación incluyendo en diferentes porcentajes DDGS e indican que al incluir 5% de DDGS convencionales, con 11.78% de aceite, en la dieta de gallinas ligeras se tiene impacto significativo en el color de la yema. En el caso de DDGS bajos en aceite, existe información escasa sobre la evaluación de DDGS en la pigmentación de la yema. El presente estudio, tuvo como finalidad evaluar la inclusión de dos muestras de DDGS bajos en aceite (6.54% y 5.39% de aceite), en dietas sorgo-soya para gallinas ligeras y su efecto en el rendimiento productivo y pigmentación en yema. Con la finalidad de evaluar la inclusión de dos muestras (A y B) de granos secos de destilería con solubles (DDGS) bajos en aceite en dietas sorgo-soya para gallinas de postura y su efecto en la respuesta productiva y pigmentación de la yema del huevo, se realizó el presente estudio. Se utilizaron 360 gallinas de la estirpe Bovans White de 69 semanas de edad. Se utilizó un diseño completamente al azar, de 5 tratamientos con 6 repeticiones de 12 gallinas cada una. Los tratamientos fueron los siguientes: T1.-Dieta testigo sorgo-soya, T2.-6% de DDGS A, T3.-12% de DDGS A, T4.-6% de DDGS B y T5.-12% de DDGS B. También se evaluó la pigmentación de la yema por tres semanas con la adición de 1 ppm de cantaxantina y tres semanas con 2 ppm en todos los tratamientos. Los resultados en 70 días de experimentación para rendimiento productivo no indicaron diferencia ($P > 0.05$) entre tratamientos. Los resultados de luminosidad por colorimetría de reflectancia y mediante el abanico colorimétrico de DSM[®] no fueron diferentes ($P > 0.05$) entre tratamientos. Sin embargo para el enrojecimiento y amarillamiento de la yema, los datos indicaron diferencia estadística ($P < 0.05$) entre tratamientos, con menor amarillamiento y enrojecimiento en el tratamiento 1 respecto a los tratamientos 2 y 4, seguidos por los tratamientos 3 y 5. De los resultados obtenidos en el presente estudio, se puede concluir que la adición de 6% y 12% de DDGS bajos en aceite en dietas sorgo-soya para gallinas de postura, no afectó el comportamiento productivo y mejora la pigmentación de la yema de huevo. La inclusión de cantaxantina en 1 y 2 ppm incrementó la tonalidad amarillo naranja de la yema de huevo.

INNATE IMMUNE RESPONSE OF CHICKEN MACROPHAGES TO ESCHERICHIA COLI DERIVED-LPS AND *PROPIONIBACTERIUM ACNES* AND *GRANULOSUM* CHALLENGE

LA RESPUESTA INMUNE INNATA DE MACRÓFAGOS AVIARES AL RETO DE LPS-DERIVADO DE *E. COLI* Y DE *PROPIONIBACTERIUM ACNES* Y *GRANULOSUM*

J. Rodriguez-Lecompte^{A,*}, H. Echeverry^B, A. Yitbarek^C, and M. Parada-Gomez^D

^AAtlantic Veterinary College, University of Prince Edward Island, Canada. 550 University Avenue Charlottetown, PE, Canada. C1A 4P

^BMaple Leaf Foods. 15 Aries Court, Hamilton, ON – Canada. L8W 3C8

^CUniversity of Manitoba. 12 Dafoe Road. Winnipeg, MB – Canada. R3T 2N2

^DLaboratorios Calier de los Andes, Bogotá, Colombia

* Corresponding Author: jrodriguez@upei.ca 550 University Avenue Charlottetown, PE, Canada. C1A 4P3

RESUMEN

La primaria función del sistema inmune innato es el reconocimiento y diferenciación de lo propio y lo no propio; esto se logra por medio de un número significativo de componentes celulares y sub celulares. En este contexto la esencial importancia de los receptores tipo Toll (TLRs) es bien reconocida. Estructuras microbianas ricas en carbohidratos o patrones moleculares asociados a patógenos (PAMP) tales como el LPS, PG, que interactúan con receptores celulares como los TLRs en el huésped, activan una cascada de citoquinas pro-inflamatorias. Durante este proceso el primer paso las células inmunes que recirculan son reclutadas en los sitios de inflamación por medio de un mecanismo que involucra el reconocimiento y unión a carbohidratos propios conocido como selectinas. En este estudio hemos usado una línea celular de macrófagos de aves (HD-11) para caracterizar la respuesta inmune innata asociada a la presencia de LPS derivado de *E. coli* y la bacteria *Propionibacterium*. La expresión de TLR2b, TLR4, interleuquinas (IL)-4, IL-6, IL-8, IL-10, IL-12p35, IL-13, IL-18 y interferón (IFN)- γ fueron evaluadas. En general nuestros resultados muestran que no hubo diferencias en la expresión de los genes entre los grupos estudiados; sin embargo cuando los grupos fueron retados a un modelo de LPS la expresión fue estable y en algunos casos fueron decrecidos controlándose el gasto de energía y posibles reacciones inflamatorias *in vitro*.

SUMMARY

The primary functional theme of innate immunity is the distinction between self and non-self, which is maintained by a vast number of cellular and subcellular components. In this context, the immense importance of the toll-like receptors (TLRs) is well established. Microbial carbohydrate structure or Pathogen associate molecular pattern (PAMP) such as LPS, PG, and yeast interact directly with pattern recognition receptors (PRR) such as TLRs in the host triggering a pro-inflammatory cytokine cascade. Recirculating immune cells are recruited to inflammatory sites by a reaction pathway involving the self-carbohydrate-binding selectins as initial recognition step. We have used a chicken macrophage cell line (HD-11) to characterize innate immune responses associated with the presence of *E. coli*-derived LPS and *Propionibacterium*. Gene expression of TLR2b, TLR4, interleukins (IL)-4, IL-6, IL-8, IL-10, IL-12p35, IL-13, IL-18 and interferon (IFN)- γ were assessed. In general, our results show that treatments by themselves did not change the gene expression. Furthermore, in an LPS challenge model, no change was observed in most genes and in some cases even cause down-regulation controlling energy spend and possible inflammatory reaction *in vivo*.

INTRODUCTION

In order to control microbial agents and promote birds performance the poultry industry has been using antibiotics (1); however, costumer concerns about antibiotic resistance by pathogenic microorganisms is leading them to demand antibiotic-free animal products (2). Antigen presenting cells (APC) such as macrophages, dendritic

cells and B lymphocytes participate in the initial capture and processing of microbial antigens and later, present them to specific T and B cells for activation of their effector mechanisms (3,4). APCs are able to recognize conserved structures common to groups of pathogens called pathogen-associated molecular patterns (PAMP) (5). The germline-encoded receptors responsible for recognition of PAMPs in both non-pathogenic and pathogenic microbes are called pattern recognition receptors (PRRs) (6); Toll-like receptors (TLR) being the most extensively studied type of these receptors (3). After recognition of the specific PAMP, PRRs initiate a downstream signalling pathway that will lead to the production of cytokines and chemokines that will direct the immune response to a pro-inflammatory process (7). Beneficial microorganisms such as *Propionibacterium acnes* and *P. granulosum* (gram positive bacteria that have thick cell walls that are rich in peptidoglycans and lipopolysaccharides) have been used in animal models and production animals to stimulate their immune system (8,9,10) Moreover, purified PAMPs such as LPS have also been used for this goal (11).

The aim of the present study was to determine the immune response of chicken macrophages against *P. acnes*, *P. granulosum* (Gram +), and *E. coli* derived LPS (Gram -ve) by measuring gene expression of different TLRs and cytokines.

MATERIALS AND METHODS

Cell culture. HD-11 cell line was grown in RPMI medium supplemented with 10% fetal bovine serum heat inactivated, 5% chicken serum heat inactivated in a 5% CO₂ incubator at 37°C. Cells were cultured, harvested and diluted to get a final concentration of 2x10⁶ cells/mL in a final volume of 48mL.

Treatments. I17.5= Immunair 17,5 (oral suspension x500ml), INM= Immunair (oral suspension x 1000mL), INC= Immunocel (injectable suspension x50ml). C= Control (cell culture media).

In vitro test. Cell culture 8-well-plates were used for the experiment. Four 6-well-plates were used for cells + treatments (Experiment 1) and other four plates for cells + treatments + LPS challenge (Experiment 2). Each experiment contained a control group consisting of cells without any additive. However, in Experiment 2 cells also contained LPS. 1mL of media containing 2x10⁶ cells/ml was added to all wells. Immediately, 1mL of treatment and control solutions was added to the corresponding wells to obtain 10µL/mL of each treatment as final concentration. All plates were placed in an incubator at 37°C and 5% CO₂. In Experiment 1, plates 1 and 2 were incubated undisturbed for two h after which RNA extraction was performed from cells; at four h of incubation the cells from plates 3 and 4 were isolated for RNA extraction.

In Experiment 2, after 30 m of incubation an LPS challenge was added to get a final concentration of 10µg/mL of LPS in each well. Plates 5 and 6 were incubated undisturbed for additional 1.5 h, then RNA extraction was extracted from cells; and plates 7 and 8 were incubated for additional 3.5 h and then cells were isolated for RNA extraction. cDNA conversion was performed followed by qRT-PCR gene expression of TLR2b, TLR4, IL-4, IL-6, IL-8, IL-10, IL-12p35, IL-13, IL-18 and IFN-γ.

Gene expression. RNA was isolated using Invitrogen Trizol[®] Reagent (Life Technologies Inc. Burlington, ON, Canada) according to manufacturer's protocol. cDNA was produced using High Capacity cDNA Reverse Transcription Kit (Applied Biosystems, Mississauga, ON, Canada) according to manufacturer's protocol. Gene expression was measured using CFX Connect Real-Time System Bio-Rad (Bio-Rad Laboratories, Mississauga, ON, Canada) in a 96-well plate using a 10µL total reaction volume. Primer concentrations for the target and housekeeping genes were adjusted according to the results obtained in a standard curve for each specific case. SsoAdvanced[™] SYBR[®] Green Supermix was used according to Bio-Rad instruction manual (Mississauga, ON, Canada).

Statistical analysis. Statistical analysis of the relative gene expression in present study was done using REST-2009 Software (Technical University Munich. Qiagen, Germantown, MD, USA) which compares each treatment individually with the control group and expresses the relative gene expression as fold change of the target gene taking into consideration a reference gene (housekeeping gene, βactin in the present work) and the efficiency of reference and target genes. Results from this analysis are given as fold change with a respective p value. For the present work statistical difference is considered when p value is lower than 0.05. Values of fold change higher or lower than 1 with p<0.05 are considered statistically significant in both up-regulated and down-regulated respectively

RESULTS

In Experiment 1, relative gene expression analysis of HD-11 cells treated with immuno-modulatory products was in general not significantly affected at two h and four h of incubation; just cells treated with Immunocel at 2 hours of incubation showed a significant down-regulation of IL-12p35.

In Experiment 2, HD-11 cells treated with INM and challenged with LPS showed significant up-regulation of IL-4 and IL-6 at two h of incubation; also at two h of incubation HD-11 cells showed significant up-regulation of IL-13. At four h of incubation HD-11 cells challenged with LPS had significant down-regulation of IL-18 when treated with I17.5; significant down-regulation of IL-13 when treated with INM and significant down-regulation of TLR4, IL-8 and IL-18 when treated with INC.

REFERENCES

1. Dibner, J., and J. Richards Antibiotic growth promoters in agriculture: history and mode of action. *Poultry Science* 84:634-643. 2005.
2. Smith, M.A. Antibiotic Resistance. *Nursing Clinics of North America* 40:63-75. 2005.
3. Siamon, G. Pattern recognition receptors: doubling up for the innate immune response. *Cell* 111:927-930. 2002.
4. Rodríguez-Pinto, D. B cells as antigen presenting cells. *Cellular Immunology* 238:67-75. 2005.
5. Uematsu, S., and S. Akira PRRs in pathogen recognition. *Central European Journal of Biology* 1:299-313. 2006.
6. Kumar, H., T. Kawai, and S. Akira Pathogen recognition by the innate immune system. *International Reviews of Immunology* 30:16-34. 2011.
7. Aderem, A. Phagocytosis and the Inflammatory Response. *Journal of Infectious Diseases* 187:S340-345. 2003.
8. Awaad, M.H.H., A.M. Atta, M.A. Elmenawey, H. B.Gharib, W.A.A. El-Ghany, and A.A. Nada The effect of a combination of β (1-3) D-Glucan and *Propionibacterium granulosum* on productive performance and immune modulation of immunocompromised and non-immunocompromised broiler chickens. *Vet World* 6:31-38. 2013.
9. Dinsmore, R.P., M.B. Cattell, R.D. Stevens, C.S. Gabel, M.D. Salman, and J.K. Collins Efficacy of a *Propionibacterium acnes* Immunostimulant for Treatment of Chronic *Staphylococcus aureus* Mastitis. *J. Dairy Sci.* 78:1932-1936. 1995.
10. Ferrer, L.M., A. Fernández, A. Loste, A. Ortín, D. Lacasta, J.J. Ramos, M.T. Verde, and T. Conde Effect of oral administration of *Propionibacterium acnes* on growth performance, DTH response and anti-OVA titers in goat kids. *Pesquisa Veterinária Brasileira* 33:5-10. 2013.
11. Michalek, S.M., H. Kiyono, M.J. Wannemuehler, L.M. Mosteller, and J.R. McGhee Lipopolysaccharide (LPS) regulation of the immune response: LPS influence on oral tolerance induction. *The Journal of Immunology* 128:1992-1998. 1982.

THE EFFECTIVENESS OF A *BACILLUS LICHENIFORMIS* PROBIOTIC ON THE REDUCTION IN *SALMONELLA* HEIDELBERG SHEDDING AND COLONIZATION IN BROILER CHICKENS

EFICACIA DE UN PROBIÓTICO *BACILLUS LICHENIFORMIS*, OPTI -BAC L, EN LA REDUCCIÓN DE LA EXCRECIÓN Y LA COLONIZACIÓN DE *SALMONELLA* HEIDELBERG EN POLLOS DE ENGORDA

C. Roney^A, C. Hofacre^B, R. Owen^A, R. Berghaus^C, and G. Mathis^C

^AHuvepharma, Inc., Peachtree City, GA

^BPoultry Diagnostic and Research Center, Athens, GA

^CSouthern Poultry Research, Inc., Athens, GA

RESUMEN

Salmonella Heidelberg es la tercera causa principal de enfermedades producidas por alimentos contaminados con *Salmonella* en los Estados Unidos. Se ha comprobado que la moderación de la flora intestinal reduce la colonización por *Salmonella*, desde que el Dr. Nurmi en 1972 demostró que dando contenido cecal de una gallina adulta a un pollito mejoraría su capacidad para resistir la colonización por *Salmonella*. Este informe describe dos estudios controlados utilizando un producto comercial con *B. licheniformis*, Opti - Bac L, en la alimentación de pollos de engorda para reducir la colonización cecal, así como la transferencia de ave a ave, de una cepa de *Salmonella* Heidelberg resistente al ácido nalidíxico. Los resultados demuestran una reducción significativa en la conversión de alimento en pollos de engorda alimentados con el probiótico a lo largo de su período de crecimiento, así como una reducción de 60-77 % en la probabilidad de detección de *Salmonella* en las aves tratadas.

Este nivel de reducción se compara favorablemente con las tasas de reducción de colonización por *Salmonella* en pollos de engorda vacunados con vacunas vivas modificadas de *Salmonella* o en la progenie de reproductores vacunados con *Salmonella*.

SUMMARY

Three groups of one-day-old broilers were vaccinated for coccidiosis. Half the birds in each group were orally gavaged with an identifiable strain of *Salmonella* Heidelberg. Groups were fed rations containing no probiotic, probiotic (Opti-Bac L[®]) at 1 lb/ton, or a combination of salinomycin (Sacox[®]) 50 g/ton plus BMD[®] 50g/ton plus Opti-Bac L at 1 lb/ton.

Opti-Bac L alone, or in combination with salinomycin and BMD, resulted in a significant ($P < 0.05$) improvement in feed conversion and weight gain and a significant ($P < 0.05$) reduction in the numbers of infected ceca in both the seeder and horizontally challenged group.

Compared to birds receiving no probiotic, the incidence of *Salmonella* detection was 60% lower in birds receiving Opti-Bac L and 77% lower in birds receiving salinomycin plus BMD plus Opti-Bac L.

MATERIALS AND METHODS

One-day-old male broiler chicks were obtained from a local hatchery. Routine vaccinations were administered in the hatchery and birds were sprayed with a coccidiosis vaccine upon arrival at the research facility. Birds were randomly divided into 24 pens consisting of 50 birds per pen. Twenty-five chicks per pen were tagged for identification and then orally dosed with nalidixic acid resistant *Salmonella* Heidelberg. The treatments were replicated in eight blocks. Pens were randomly assigned to treatment groups.

All treatments were fed for the entire duration of the study. Birds received feed appropriate to the treatment from days 0 to 42. Birds were fed starter feed containing the appropriate treatment from days 0 to 21, grower feed

from d 21 to 35, and finisher feed from d 35 to 42. Birds were weighed by pen on days 0, 35, and 42. All feeds contained no additional antibiotics other than specified in treatment description.

Drag swab samples were collected for *Salmonella* environmental determination from all pens on d 14 and 42. On d 42, ten birds per pen (five seeder and five horizontal challenge) were randomly selected, humanely euthanized, weighed, and the ceca aseptically removed and placed in sterile plastic sampling bags for *Salmonella* isolation. *Salmonella* analysis was performed using standard procedures for selective enrichment and enumeration of *Salmonella*.

RESULTS

There was a significant improvement ($P < 0.05$) in feed conversion and weight gain at 42 days of age for the birds fed OBL and the OBL/Sal/BMD combination (Table 1).

There was a reduction in prevalence of *Salmonella* positive birds in both directly challenged and contact birds fed Opti-Bac L alone (Table 2). The addition of Opti-Bac L plus salinomycin and BMD to the feed further reduced colonization in the contact birds. All drag swab samples were positive for *Salmonella* indicating that a strong *Salmonella* Heidelberg challenge had been achieved.

DISCUSSION

The likely pathogenesis for the spread of *Salmonella* within a population of broilers is, as simulated in this study, with only a portion of the birds being infected at placement and lateral transmission being responsible for the spread of the organism to other birds in the flock. The results of this study indicate that the addition of Opti-Bac L by itself or in combination with salinomycin and BMD results in a statistically significant reduction in the prevalence of positive animals whether by preventing colonization from direct challenge or inhibiting the horizontal spread of the bacteria to pen mates.

In this study, the addition of Opti-Bac L and the addition of salinomycin and BMD to the Opti-Bac L resulted in a decrease in the number of *Salmonella* positive birds detected. There was also a decrease in the levels of *Salmonella* counts in the ceca of the positive birds from both treatment groups as compared to the controls. While the reduction numbers were not found to be statistically significant at the $p < 0.05$ level, cecal bacteria counts were lower for both treatment groups as compared to the controls. If total elimination of *Salmonella* is not possible, it is important to reduce the levels of *Salmonella* in affected animals. Reduction in *Salmonella* levels results in less chance of horizontal transmission to negative birds within a house and better efficacy of interventions being used in the processing plant. This study demonstrated that a pelleting temperature tolerant *Bacillus licheniformis* probiotic can reduce the prevalence of *Salmonella* Heidelberg colonization in broilers to 42 days of age.

Table 1. Effect of dietary treatments on performance of broiler chickens at 42 days of age.

	Feed Consumption	Adjusted FC	Ave. Weight Gain
Control	4.054 ^{AB}	1.978 ^A	2.050 ^C
Opti-Bac L(OBL)	4.035 ^B	1.906 ^B	2.117 ^B
OBL+Sal+BMD	4.179 ^A	1.886 ^B	2.216 ^A

^{A,B,C} Means within columns with different superscripts are significantly different (p<0.05)

Table 2. Effects of dietary treatments on *Salmonella* Heidelberg detection in broiler chickens at 42 days of age.

Treatment	Direct Challenge (% pos)	Contact (% pos)	Total (%)
Control	62.0 ^A	56.0 ^A	59.0 ^A
Opti-Bac L	36.0 ^B (42)*	38.0 ^B (32)	36.0 ^B (40)
OBL+Sal+BMD	30.0 ^B (52)	16.0 ^C (71)	24.0 ^B (59)

^{A,B,C} Means within columns with different superscripts are significantly different (p<0.05)

*Numbers in parenthesis represent percent reduction in prevalence compared to control group

EFFECTO DE LA CARGA ALOSTÁTICA POR MANEJO ANTEMORTEM SOBRE APARIENCIA Y CALIDAD MICROBIOLÓGICA DE LA CANAL DE POLLO CON ADICIÓN DE UN MODULADOR ALOSTÁTICO

EFFECTS OF THE ALLOSTATIC LOAD BY ANTEMORTEM HANDLING ON APPEARANCE AND MICROBIOLOGICAL QUALITY OF CHICKEN CARCASS WITH THE ADDITION OF AN ALLOSTATIC MODULATOR

M. E. Rubio-García^{A*}, M.S. Rubio-Lozano^B, E. Ponce-Alquicira^C, C. Rosario-Cortes^D y M. P. Castañeda-Serrano^A

^A Centro de Enseñanza, Investigación y Extensión en Producción Avícola (CEIEPAv) – Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia- Universidad Nacional Autónoma de México (FMVZ-UNAM), Manuel M. López S/N, Col Zapotitlan, México, D.F., C.P. 13209

^B Laboratorio de Ciencia de la Carne Animal, Secretaria de Producción Animal FMVZ-UNAM,

^C Departamento de Medicina y Zootecnia de Aves, FMVZ-UNAM,

^D Departamento de Biotecnología, Universidad Autónoma Metropolitana, Unidad Iztapalapa, Av. San Rafael Atlixco 186, Col Vicentina, México, D.F. C.P. 09340

*Corresponding autor: marielrubiodf@hotmail.com

SUMMARY

The objective of the study was to determine the effect of an allostatic modulator (MA) in reducing allostatic load caused by antemortem handling by evaluating the appearance and microbiological quality of the carcass. A combination of 50 g of ascorbic acid, 62.5 g of acetylsalicylic acid and 251 mEq of Na⁺, K⁺ and Cl⁻ by L, was administered two d before shipping to the slaughterhouse. Six hundred chicks were housed in eight treatments with three replicates of 25 chickens each, under a factorial 2 x 2 x 2 (lines X and Y, 10 h and 16 h fasting programs with and without the addition of MA). The appearance of the carcass was determined by the presence of injuries caused by antemortem handling and the microbiological quality of these by cfu count for coliform and total mesophilic. The results showed association between the frequency of injuries and the use of MA (P = 0,015) with a decrease in injuries from the use of MA. Together, 16 h of fasting and MA reduced coliform counts (0,5 log₁₀ cfu / mL, P = 0,003) and total mesophilic (0,25 log₁₀ cfu / mL, P = 0.0004) in unwashed carcasses. The antemortem handling in broilers increase the possibility of damage, reducing their welfare and carcass quality, but in this study it was demonstrated that the use of MA improves these aspects and offers consumers a better product in appearance and quality.

RESUMEN

El objetivo del estudio fue determinar el efecto de un modulador alostático (MA) en la reducción de la carga alostática causada por manejo antemortem mediante la evaluación de la apariencia y calidad microbiológica de la canal. Se administró una combinación de 50 g de ácido ascórbico, 62,5 g de ácido acetil salicílico y 251 mEq de Na⁺, K⁺ y Cl⁻ por L, 2 días antes del envío a rastro. Seiscientos pollitos fueron alojados en 8 tratamientos con 3 réplicas de 25 pollos cada uno, bajo un arreglo factorial 2 x 2 x 2 (estirpes X y Y, programas de ayuno 10 h y 16 h, con y sin la adición del MA). La apariencia de la canal se determinó por la presencia de lesiones causadas por manejo antemortem y la calidad microbiológica de estas mediante conteo de ufc para coliformes y mesófilos totales. Los resultados mostraron asociación entre la frecuencia de lesiones y el uso del MA (P = 0,015) con una disminución de lesiones por el uso del MA. Juntos, 16 h de ayuno y MA redujeron conteo de coliformes (0,5 log₁₀ ufc / ml, P = 0,003) y mesófilos totales (0,25 log₁₀ ufc / mL, P = 0,0004) en canales sin lavar. Los manejos antemortem en pollos de engorda aumentan la posibilidad de dañarlos, reduciendo su bienestar y calidad de las canales; sin embargo, en el presente trabajo se demostró que el uso de MA mejora estos aspectos y ofrece al consumidor un producto mejor en apariencia y calidad.

(El artículo será publicado en su integridad en *Poultry Science*.)

LA IMPORTANCIA DEL USO DE VACUNAS VIVAS EN LOS PROGRAMAS DE CONTROL DE *SALMONELLA* ENTERITIDIS

WHY CONTROL PROGRAMS OF *SALMONELLA* ENTERITIDIS MUST INCLUDE LIVE VACCINES (BACTERINS)

M. Salem

Lohmann Animal Health International

SUMMARY

One of the risk factors for infection with *Salmonella* Enteritidis is the lack of bird immunity to this infection. The immunization of long-lived birds with inactivated vaccines (bacterins) since the early 90s showed to be a very effective tool in the reduction of the transmission of this bacterium. However, studies by many researchers and field experiences in many countries showed that live vaccines (bacterins) are more effective in achieving the purpose of reducing infection in birds, the transmission to eggs, chicken and therefore humans. Live vaccines administered orally mimic the natural route of infection, prevent colonization of internal organs, the transmission to the egg, and prevent infection in the growth phase. They also can be used in combination with bacterins.

RESUMEN

Uno de los factores de riesgo para la infección con *Salmonella* Enteritidis es la falta de inmunidad de las aves a esta infección. La inmunización de las aves de larga vida con vacunas (bacterinas) inactivadas desde los inicios de los 90s mostró ser una herramienta muy efectiva en la reducción de la transmisión de esta bacteria. Sin embargo, estudios hechos por muchos investigadores y experiencias de campo en muchos países, muestran que las vacunas (bacterinas) vivas son más efectivas en el logro del propósito de reducir la infección en las aves, la transmisión al huevo, al pollo y por consiguiente a los seres humanos. Las vacunas vivas administradas por vía oral: imitan la vía natural de infección, evitan la colonización de órganos internos, la transmisión al huevo y evitan la infección en fase de crecimiento. Además se pueden usar en combinación con las bacterinas.

INTRODUCCIÓN

Los factores de riesgo relacionados con la zoonosis causada por *Salmonella* Enteritidis (SE) por el consumo y mal manejo de huevos y carne contaminadas, fueron dados a conocer desde los años 90s en los EU (9). Desde entonces, una gran cantidad de conocimientos sobre la prevención de la infección en las aves, y por consecuencia a los humanos, está a la disposición de profesionales de la avicultura para cualquiera que se interese en adquirir estos conocimientos. Dentro de estos conceptos es ampliamente aceptado que para poder reducir la infección en las aves y por consiguiente en los seres humanos, es necesario un programa integral que incluye:

1. Criar aves limpias de SE de origen;
2. Un buen programa de bioseguridad en la granja;
3. Control de roedores, insectos y animales silvestres;
- 4 Tratamiento de alimento y agua con productos que eliminen las salmonellas;
5. Muestreo programado de heces; y
6. Vacunación con vacunas vivas, inactivadas o mejor con una combinación de ambas.

También es sabido por los que se han educado al respecto, que es necesario que todos los puntos arriba mencionados se cumplan de una manera constante, precisa y auditable para que se obtengan los mejores resultados posibles. Por otro lado, a pesar de la disponibilidad de los conocimientos y recursos técnicos y materiales, aún hay países que no han decidido implementar por parte oficial o particular, programas funcionales y obligatorios que aseguren al público consumidor que los alimentos de origen de avicultura comercial, estén libres de SE. El público en esos países, está expuesto a ésta zoonosis. Existe además evidencia que los problemas por SE en aves y en humanos se reduce considerablemente cuando se permite legalmente el uso de vacunas vivas y /o bacterinas contra SE en las aves como parte del programa integral (13).

Cepas de salmonella enteritidis reportadas para vacunas

- Mutantes auxotróficas de doble marcador (mutagénesis química)
- De mutantes de deriva metabólica
- Mutantes *aro A*
- De proteína de membrana externa (*ompR*)
- Restringidas de hierro.
- Mutantes espontáneas sensibles a temperatura
- Mutantes *cya crp (11)*

Ventajas de las vacunas vivas. La eficacia de vacunas vivas de *Salmonella* ha sido bien documentada. Babu *et al* reportó que vacunas vivas de *Salmonellas* reducen considerablemente la excreción de SE cuando se comparan con grupos vacunados con vacunas inactivadas o con grupos no vacunados (1). Estos resultados están en acuerdo con los resultados obtenidos por Hassan & Curtis (5); Mastroeni *et al.* (12); Gast *et al.* (3) y Harrison *et al.* (4). En sus estudios confirmaron la mejor eficacia de las vacunas vivas cuando se comparan con vacunas inactivadas, además de la importancia de la inmunidad mediada por células (CMI) en la eliminación de *Salmonellas* por las aves. Además, Mastroeni *et al.* y, Beal *et al.* confirmaron que la eliminación de *Salmonella* Typhimurium es independiente de la función de las células B (10,2). Sin embargo, Horzinek *et al.* (7) reportó que las vacunas de *Salmonellas* vivas puede también elicitar ambas inmunidad mediada por células e inmunidad humoral en el sitio deseado (Ej. mucosas) en el animal. Hay también evidencia científica de que demuestra que el uso de sólo un serovar en vacunas vivas atenuadas puede proteger a las aves contra salmonelosis producida por los grupos B y D. Esto es debido a los niveles altos de protección cruzada entre ellos. (2). Además, Holt, Gast, and Kelly-Aehle (6). Encontraron que una vacuna viva de ST protegió a aves de 81 semanas contra el desafío con SE durante la muda (pelecha artificial) cuando se vacunaron 17 días antes del desafío y 13 días antes de iniciar la dieta forzada. Las características óptimas de las vacunas vivas de *Salmonella* Enteritidis son las siguientes:

- Que estimulen el sistema de inmunidad celular (CD8), mecanismo fundamental para controlar las salmonellas intracelulares.
- Estimular el sistema inmune de mucosas con producción de inmunoglobulina A secretora (SIgA) que auxilie en la prevención de la colonización del intestino por las salmonellas de campo.
- Que las bacterias vacunales se multipliquen por corto tiempo en el tejido intestinal de las aves vacunadas.
- Que se excreten y desaparezcan rápidamente tanto del hospedador como del medio ambiente.
- Que se puedan aplicar por medios masivos de vacunación. (baratos y no afectan el bienestar animal).
- Se apliquen por la misma ruta de infección natural que las salmonellas de campo.
- Que las bacterias vacunales puedan diferenciarse fácilmente de las salmonellas de campo en pruebas de laboratorio.
- Que no produzcan enfermedad en otras especies domésticas ni en el ser humano.
- Que no reviertan a patogenicidad.
- Que sean seguras para las aves vacunadas aun a 10x o más la dosis recomendada.

Otras ventajas de las vacunas vivas de *Salmonella* Enteritidis:

- Se pueden aplicar desde el primer día de edad y bloquear la colonización de *Salmonellas* de campo.
- Son compatible con algunos programas de probióticos.
- Evitan la infección temprana y durante la crianza (levante) evitando así la formación de aves portadoras durante esta etapa .La infección temprana puede difundir la infección más tarde durante la producción de huevo.
- Se pueden aplicar solas o en combinación con vacunas inactivadas.

Las vacunas disponibles. Las vacunas que más se usan comercialmente en la avicultura contra SE, son: Bacterinas monovalentes o polivalentes; comerciales o autógenas y vacunas vivas: dentro las vivas existen las que tienen algunos genes removidos o suprimida su función y algunas otras que son mutantes por deriva metabólica. También se usan vacunas vivas bivalentes (Se y ST). Dentro de las diferentes vacunas vivas contra *Salmonella* Enteritidis se encuentran las llamadas vacunas mutantes de deriva metabólicas; éstas son las más usadas actualmente. (8,12) Estas han sido usadas desde 1990 y actualmente están registradas y se usan en alrededor de 60 países, incluyendo muchos de la Comunidad Europea. Sin embargo, algunos países como México, algunos de Centro y Sur América (pocos ya) aún no autorizan el uso de vacunas vivas. En algunos de estos países (Centro América) oficialmente no se reconoce la presencia de salmonella enteritis como causante de infección en aves o en seres humanos.

REFERENCIAS

1. Babu, U.; Dalloul, R.A.; Okamura, M.; Lillehoj, H.S.; Xie, H.; Raybourne, R.B.; Gaimes, D.; Heckert, R.A. 2004. Salmonella enteritidis clearance and immune responses in chickens following Salmonella vaccination and challenge. *Veterinary Immunology and Immunopathology* 101:251-257.
2. Beal, R.K.; Powers, C.; Davison, T.F.; Barrow, P.A.; Smith, A.L. 2006. Clearance of enteric Salmonella enterica serovar Typhimurium in chickens is independent of B-cell function. *Infection and Immunity* 74:1442-1444.
3. Gast, R.K.; Stone, H.D.; Holt, P.S. 1993. Evaluation of the efficacy of oil-emulsion bacterins for reducing fecal shedding of Salmonella Enteritidis by laying hens. *Avian Diseases* 37:1085-1091.
4. Harrison, J.A.; Villareal-Ramos, B.; Mastroeni, P.; DeMarco de Hormaeche, R.; Hormaeche, C.E. 1997. Correlates of protection induced by live Aro-Salmonella typhimurium vaccines in the murine typhoid model. *Immunology* 90:618-625.
5. Hassan, J.O.; Curtiss III, R. 1990. Control of colonization by virulent Salmonella typhimurium by oral immunization of chickens with avirulent delta cya delta crop S. typhimurium. *Res. Microbiol* 141:839-850.
6. Holt, Gast, and Kelly-Aehle. 2003 Salmonella typhimurium vaccine to protect hens against Salmonella enteritidis infection while undergoing molt. *Avian Dis.* 47:656-661
7. Horzinek, MC, Schijns, VECJ, Denis, M, Desmettre, P, Babiuk, LA (1997): *Biology of Vaccination*. In: Pastoret, PP, Blancou, J, Vannier, P, Verschuere, C (eds): *Veterinary Vaccinology*. Elsevier Science B.V., Amsterdam, 131-135.
8. Linde, K, Fthenakis, GC, Fichtner, A (1998): Bacterial live vaccines with graded level of attenuation achieved by antibiotic resistance mutations: transduction experiments on the functional unit of resistance, attenuation and further accompanying markers. *Vet Microbiol* 62, 121-134.
9. Mason J. History and Significance of salmonella control in the US *Int. J. Food Microbiol.* 1994 Jan; 21(1-2):155.
10. Mastroeni, P.; Chabalgoity, J.A.; Dunstan, S.J.; Maskell, D.J.; Dougan, G. 2001. Salmonella: immune responses and vaccines. *Veterinary Journal* 161:132-164.
11. Revollo L, Ferreira A.J.P , Current perspectives in avian salmonellosis: vaccines and immune mechanisms of protection. 2012. *J. Appl. Poultry. Res.* 21:418-431.
12. Springer S, et al, 2000 A new live Salmonella enteritidis vaccine for chickens--experimental evidence of its safety and efficacy] *Berl Munch Tierarztl Wochenschr.* 2000 Jun; 113(6):246-52
13. Williams Mark. The UK Lion Quality Programme for Eggs. *Proceedings American College of Poultry Veterinarians*, Sacramento, USA Sunday 22, March 2009.

EVALUACIÓN DE UN PROGRAMA DE VACUNACIÓN CONTRA INFLUENZA AVIAR (H5N2) Y ENFERMEDAD DE NEWCASTLE CONCENTRADA OLEOSA EN POLLO DE ENGORDA

EVALUATION OF A VACCINATION PROGRAM AGAINST AVIAN INFLUENZA (H5N2) AND NEWCASTLE DISEASE (CONCENTRATED OIL ADJUVANT) IN BROILERS

J. Sánchez^A, N. Christy^A y J. Coss^B

^ADepartamento técnico avícola Boehringer Ingelheim Vetmedica SA de CV

^BRepresentante técnico de ventas Boehringer Ingelheim Vetmedica SA de CV
josue.sanchez@boehringer-ingelheim.com
CP 44940

ABSTRACT

This study evaluated the use of a vaccine against AI + ND Conc KV applied in broilers under field conditions. Two groups were formed, group A (new seed strain and LaSota Newcastle) compared to other vaccination schedule called vaccinated control, group B. Ten repetitions for each group adding serials total more than 2.5 million birds were performed on the vaccinated group, both serological monitoring for both fractions was performed and productive behavior. The statistical evaluation used to define the difference between groups was Kruskal-Wallis and Student T's. Group A performed better than the control group vaccinated with the highest and homogeneous serological response, mortality was 3.8% less than 130g and a difference greater body weight compared with the control group was statistically significant.

RESUMEN

El presente estudio evaluó el uso de una vacuna contra AI + ND Conc. KV aplicada en pollo de engorda bajo condiciones de campo. Donde se conformaron dos grupos, el grupo A (nueva semilla más Newcastle cepa LaSota) comparado contra otro calendario de vacunación denominado grupo control vacunado (B), se realizaron 10 repeticiones seriadas para cada grupo sumando en total más de 2,5 millones de aves vacunadas por grupo, en ambos se realizó seguimiento serológico para ambas fracciones y comportamiento productivo. La evaluación estadística que se utilizó para definir la diferencia entre grupos fue Kruskal-Wallis y T de Student's. El grupo A obtuvo mejores resultados que el grupo control vacunado, con la más alta y homogénea respuesta serológica, mortalidad de 3.8% menos y una diferencia de 130g en peso corporal mayor comparado con el grupo control siendo estadísticamente significativos.

INTRODUCCIÓN

La influenza aviar (AI) y la enfermedad de Newcastle (ND), son dos de las principales enfermedades respiratorias que afectan a las aves y que tienen una repercusión económica. El control de la influenza aviar en el mundo se ha tratado básicamente de dos formas diferentes. Algunos países han adoptado la posición de erradicar todos los virus que contengan la hemoaglutinina H5 o H7. Para lograr la erradicación, se opta por el sacrificio de un gran número de aves y de esta forma mantenerse libres del virus de influenza en la región o regiones. Ejemplo de estos países son Estados Unidos, Chile, Australia, Holanda, Italia, etc... En otros países como México y países asiáticos se practica la vacunación con biológico inactivados preparados con el tipo de virus causante del problema. La vacunación disminuye la capacidad de diseminación del virus a otras aves, reduciendo así la cantidad de virus presente en el medio ambiente avícola. A pesar de los esfuerzos realizados por muchos países con planes de vacunación bien establecidos, aún se presentan brotes de la enfermedad.

En el caso de la enfermedad de Newcastle a pesar de los programas de vacunación que se aplican en muchos países, las cepas patógenas del virus de Newcastle continúan apareciendo esporádicamente causando tanto mortalidades considerables en las parvadas afectadas, como problemas en la exportación de aves y sus subproductos.

Algunos países eliminan las aves portadoras del virus con el objeto de mantenerse libre de las cepas patógenas o velogénicas del virus, mientras que otros deciden “vivir con los virus patógenos”, practicando planes de vacunación para proporcionar diferentes grados de inmunidad y de esta forma controlar los efectos devastadores de este tipo de cepas.

Las vacunas a virus vivo utilizadas en el control del Newcastle incluyen cepas catalogadas como lentogénicas o de baja patogenicidad, siendo las cepas B1 y LaSota las más conocidas. Estas cepas, proporcionan niveles adecuados de inmunidad.

Las vacunas inactivadas, emulsionadas en aceite y concentradas para su uso en pollos de engorda, también se han desarrollado y son de amplio uso en algunos países donde las cepas de virus patógenos son consideradas endémicas (1,2,3,4,5,6,7,8).

MATERIALES Y MÉTODOS

En el presente estudio se utilizaron pollos de engorda comerciales Ross Ross de un día de edad hasta la séptima semana de vida, el estudio se condujo bajo condiciones de campo en casetas tecnificadas, con alimento y abastecimiento de agua acorde con los lineamientos establecidos por la empresa. Se utilizaron dos programas de vacunación con dos vacunas diferentes que confieren protección contra la enfermedad de Influenza aviar y Newcastle de laboratorios comerciales conocidos. Las vacunas fueron aplicadas de acuerdo a las recomendaciones propias de cada laboratorio a una dosis de 0.2mL vía sub cutánea en el tercio medio del cuello al día cero de edad en incubadora con máquinas automáticas; así mismo, se revacuno con una vacuna AI + ND KV entre los 8-12 días con una dosis de 0.5mL vía sub cutánea en el tercio medio del cuello manualmente, adicionando vacunación de virus vivo cepa La Sota a los ocho vía ocular, 17 y 30 días de edad vía aspersión.

GRUPOS

Grupo A: Vacuna emulsionada AI + ND Conc. KV (semilla Influenza Aviar tipo A, subtipo H5N2, cepa 2393-06 y Newcastle cepa LaSota).

Grupo B: Calendario de vacunación con vacuna AI + ND Conc. KV (semilla H5N2 y La Sota) usada en la granja.

Se incluyeron dos grupos experimentales con 2, 700,000 aves; el grupo (A) fue vacunado con el producto de investigación veterinaria designado y el grupo (B) se consideró como el grupo control vacunado; todos los grupos tuvieron un muestreo serológico consecutivo desde la semana 1 hasta la semana 7. Así mismo se tomaron los parámetros productivos de peso y mortalidad semanalmente.

Después de la vacunación en la incubadora, cada grupo fue ingresado en casetas tecnificadas de una misma zona geográfica.

La respuesta inmune fue monitoreada por la prueba de inhibición de la hemaglutinación (HI) para AI y ND, la prueba usada ha demostrado su efectividad de medición en estudios previos cuando una vacuna con virus muertos es utilizada.

La prueba fue analizada por medio de análisis estadísticos e hipótesis.

El seguimiento serológico fue analizado bajo la prueba de Kruskal-Wallis y T de Student´s para definir si existía diferencia estadística entre los grupos enfocado a mortalidad y peso corporal.

DISCUSIÓN

El grupo A obtuvo una adecuada respuesta serológica presentes en ambas fracciones, viéndose en éstas, un desempeño ascendente homogéneo desde una edad temprana, no siendo así, para el grupo B el cual presentó resultados aparentemente similares hasta las 35 semanas de vida.

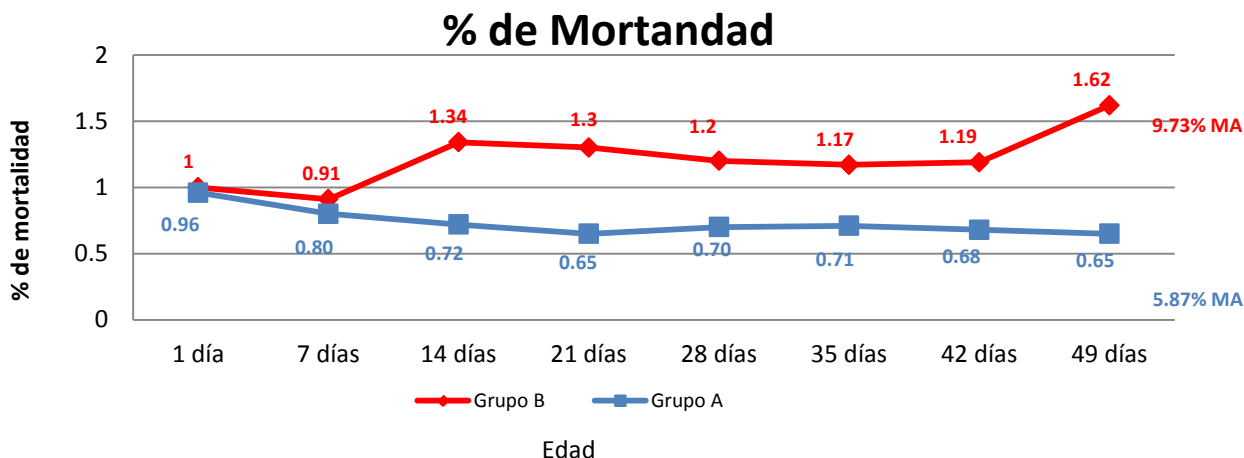
El grupo A presento menor mortalidad que el grupo B, de hasta 3.8% menor comparativamente, siendo estadísticamente significativo, lo que quiere decir que el programa de vacunación aplicado en el grupo A demostró ser más protector bajo mismas condiciones.

En cuanto a peso, si bien no se presentó una diferencia estadística significativa entre los grupos, se obtuvo 130g más de peso corporal comparado con el grupo B, lo cual dimensionando los gramos a la cantidad de aves sometidas al estudio representa 351,000 kg de peso más que el obtenido en el grupo B.

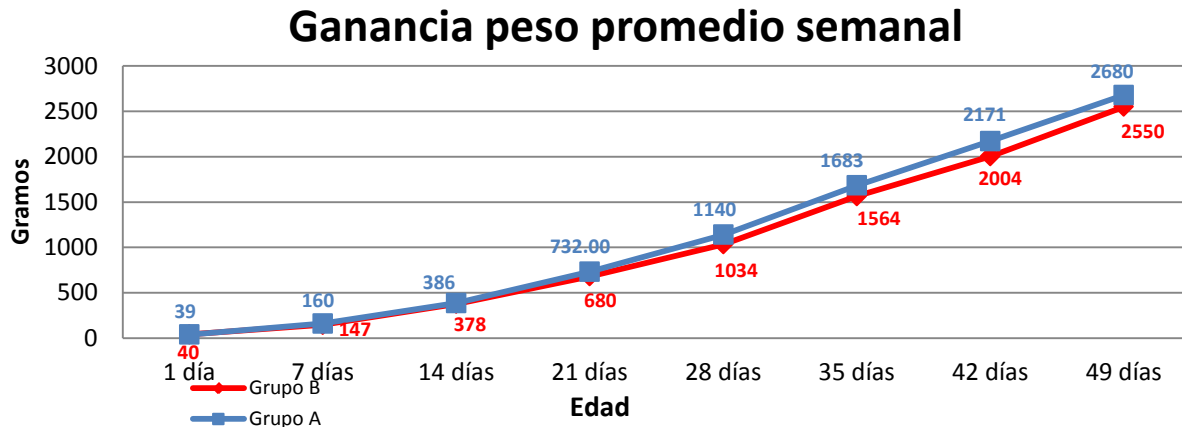
REFERENCIAS

1. Pero F. Actualidades sobre la enfermedad de Newcastle. XXXVII Convención Nacional Aneca. 2012.
2. Alexander D.J. Newcastle Disease, Other Avian Paramyxoviruses, and Pneumovirus Infections Diseases of Poultry, 12th ed. Editor-in-chief, Y. M. Saif; associate editors. Iowa State University press, Ames, Iowa. 2008.
3. Alexander, D.J. Gordon Memorial Lecture. Newcastle disease. British Poultry Science. 42, 5-22. 2001.
4. Ganapathy, K., Cargill, P., Montiel, E. & Jones, R.C. Interaction between live avian pneumovirus and Newcastle disease virus vaccines in specific pathogen free chickens. Avian Pathology. 34, 297-302.2005.
5. Perozo, F., Nava, J. & Rivera, S. Evaluation of two vaccination programs against Newcastle disease in Ross line broiler chickens reared under field conditions in Zulia state, Venezuela. 2. Immune response and protection against an experimental challenge. Revista científica FCV/LUZ. 14, 387-394. 2004.
6. Senne, D.A., King, D.J. & Kapczynski, D.R. Control of Newcastle disease by vaccination. Developments in Biological Standardization (Basel). 119, 165-70.2004.
7. David E. Swayne and David A. Halvorson. Influenza. Diseases of Poultry, 12th ed. Editor-in-chief, Y. M. Saif; associate editors. Iowa State University press, Ames, Iowa. 2008.
8. European Food Safety Authority. Vaccination against avian influenza of H5 and H7 subtypes in domestic poultry and captive birds. The EFESA Journal P.p.1-64.2007.

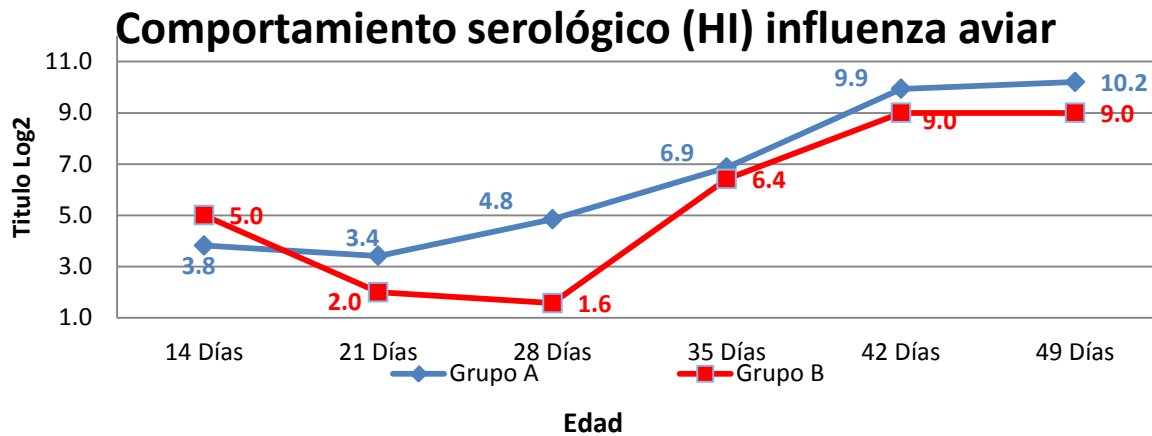
Gráfica 1. La mortalidad acumulada (MA) comparativa obtenida para el grupo A, durante el ciclo, es de 3.86% menor que la del grupo B y una de T Student´s =-5.69 (el número de aves muertas son diferentes en todos los grupos).



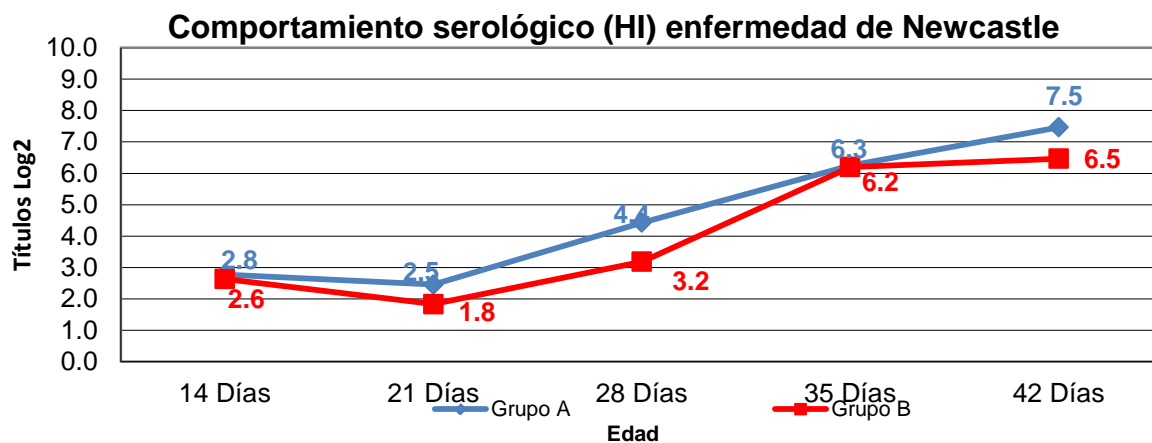
Gráfica 2. La ganancia de peso para el grupo A fue 130g mayor que el grupo B y una de T Student's=0.161 (no existe diferencia estadística entre el peso de los grupos).



Gráfica 3. El desempeño serológico del grupo A, demostró una respuesta más alta en todas las edades de manera ascendente y sostenida, no siendo así, para el grupo B el cual obtuvo resultados similares hasta los 35 días de edad.



Gráfica 4. El desempeño serológico del grupo A, mostró a las edades de 21 y 28 días una respuesta serológica más alta, de aproximadamente 1 log² en comparación del grupo B.



ANALISIS DE LA EFICACIA Y EFICIENCIA DE DIFERENTES CUADRILLAS PARA VACUNAR GALLINAS LIGERAS

ANALYSIS OF THE EFFECTIVENESS AND EFFICIENCY OF DIFFERENT CREWS IN VACCINATING LIGHT HENS

J. Sánchez and N. Christy

Departamento técnico negocio avícola Boehringer Ingelheim Vetmedica SA de CV
josue.sanchez@boehringer-ingelheim.com
C.P.44940

ABSTRACT

This analysis aimed to assess the number of hens vaccinated per hour in different vaccination crews to measure the effectiveness and efficiency of the same. For the study, measurements were performed in twenty different companies. Sometimes effectiveness is often confused with efficiency, and given the same meaning, and the reality is that there is a big difference. In this case, we can say that a crew is effective if it achieves vaccinate as many birds as quickly, however, is not necessarily efficient because if the wrong number of vaccinated birds is high it isn't effective. You should always strike a balance between effective and efficient. This paper shows results from different vaccination crews that can serve as reference for consolidated vaccination crews and training.

RESUMEN

El presente análisis tuvo como objetivo evaluar el número de gallinas vacunadas por hora en diferentes cuadrillas de vacunación para medir la eficacia y la eficiencia de las mismas. Para el estudio se realizaron veinte mediciones en diferentes empresas. A veces se suele confundir la eficiencia con eficacia, y se les da el mismo significado; y la realidad es que existe una gran diferencia. En este caso podemos decir que una cuadrilla es eficaz si logra vacunar el mayor número de aves en el menor tiempo, sin embargo, no necesariamente es eficiente ya que si el número de aves mal vacunadas es alto de nada sirve ser eficaz. Siempre se debe lograr un equilibrio entre eficaz y eficiente. El presente trabajo nos muestra resultados de diferentes cuadrillas de vacunación que pueden servir como referencia para cuadrillas de vacunación consolidadas y en entrenamiento.

INTRODUCCIÓN

En México el negocio avícola se caracteriza por estar altamente tecnificado y en constante mejora, lo que demanda tener los conocimientos que permitan dar un valor agregado a los productos que se consumen. El comportamiento de las aves, así como los parámetros productivos alcanzados en cada caso particular, son el reflejo de las prácticas realizadas por el personal responsable en conjunto con la calidad de las aves, alimento y otros factores. En lo que compete a una buena protección de las aves contra las enfermedades, es un factor muy importante que los biológicos empleados sean de excelente calidad, contar con un sistema de mejora continua basado en buenas prácticas de vacunación que nos permita inmunizar correctamente a las aves y que las aves se encuentren sanas con un sistema inmune preparado para montar una respuesta inmune protectora. Debido al gran número de aves que deben vacunar las cuadrillas se logra ser eficaz y vacunar el mayor número de aves en el menor tiempo, sin embargo esa misma rapidez puede llevar a cometer errores, llegando a no ser eficiente y lo cual repercute en la salud de las parvadas, es recomendable lograr un equilibrio de ambos. Por tal razón el análisis realizado en este trabajo, pretende aportar rangos de vacunación basados en la eficacia y eficiencia obtenidos de diversas cuadrillas de vacunación en diferentes empresas avícolas que les permita tener referencias de comparación con las cuadrillas que actualmente están laborando.

MATERIALES Y MÉTODOS

Se visitaron diez empresas avícolas, en las cuales se realizó un análisis de cada una de sus cuadrillas de vacunación. Se tomó en cuenta el número de aves que vacunó cada cuadrilla por hora en promedio y el porcentaje de

error al vacunar. La evaluación fue únicamente para la vía de aplicación subcutánea de forma manual en aves ligeras. Para medir el tiempo se utilizó un cronómetro Casio HS-3V-1 y los datos resultantes fueron anotados en un formato diseñado por BIV.

Análisis estadísticos. Para evaluar los datos entre grupos se realizó una prueba de análisis de varianza (ANOVA) con un 95% de intervalo de confianza.

RESULTADOS

En la Tabla 1 se muestra el promedio del número de aves vacunadas por hora en cada una de las empresas y el promedio de errores por cada cien aves vacunadas en cada una de las empresas.

En la Tabla 2 se muestra el tiempo y los errores por empresa por cada 100 aves.

En la Gráfica 1 se puede observar la relación entre el tiempo (eficacia) y los errores en la vacunación (eficiencia).

Se tomaron los tres mejores promedios grupo A, los tres promedios intermedios B y los tres promedios bajos C para determinar cuál es su grado de varianza en forma positiva y negativa en el que se ubican los vacunadores a diferentes niveles de eficacia y eficiencia (Gráfica2).

DISCUSIÓN

De acuerdo con la publicación del Dr. Salleras es importante evaluar la eficacia y la eficiencia de las vacunas, sin embargo no únicamente de la calidad del producto sino de la aplicación de las mismas. En este estudio se muestra que hay que observar un equilibrio para obtener los resultados esperados.

El Dr. Alonso menciona que es importante evaluar a los vacunadores y entrenarlos, para disminuir el riesgo de que se presente un problema sanitario por una mala aplicación de la vacuna, por lo cual, con los resultados obtenidos se puede evaluar a las cuadrillas para evitar los errores en la aplicación y pueden servir de referencia también en la capacitación del personal (1,2).

CONCLUSIÓN

Los resultados muestran que no necesariamente el ser eficaz quiere decir que se es eficiente en el proceso de vacunación y viceversa.

Las empresas que toman más tiempo en vacunar son las más altas en errores de aplicación de la vacuna. (No son ni eficaces ni eficientes).

Las empresas que vacunan más rápido (son eficaces) podrían ser más eficientes al disminuir sus errores aunque aumenten ligeramente el tiempo destinado a la vacunación.

De acuerdo con los resultados obtenidos en el análisis de varianza los vacunadores más rápidos vacunarán entre 3535 a 4500 aves por hora con un promedio de 3915, de tal manera los vacunadores promedio vacunarán entre 1943 a 2654 aves por h con un promedio de 2315 y los vacunadores que se toman más tiempo en el proceso, vacunarán entre 1643 a 1841 con un promedio de 1752 aves por hora.

Tomando en cuenta el análisis de varianza al medir la presencia de errores en la vacunación, tenemos que los vacunadores que cometen menos errores por cada 100 aves vacunadas, presentarán de 1 a 3 aves mal vacunadas, con un promedio de 2.33, así mismo, los vacunadores promedio presentarán de 4 a 5 aves mal vacunadas, con un promedio de 4.33 y por último los vacunadores que cometen más errores al vacunar presentarán de 6 a 9, con un promedio de 8 aves.

Cabe mencionar que en casos al que denominamos vacunadores de excelencia encontramos tiempos de 3.03 minutos por cada 100 aves vacunadas con una eficacia del 100%.

REFERENCIAS

1. Salleras L., Domínguez A., Navas E., Pratts G. Eficacia y efectividad de la vacunación antineumocócica en las personas de 65 años o mayores. Vacunas Elsevier. Volumen 1, Issue2., Pp. 75-79. 2000.
2. Alonso E., Métodos de vacunación. Revista avicultores en Colombia. www. Encolombia.com.

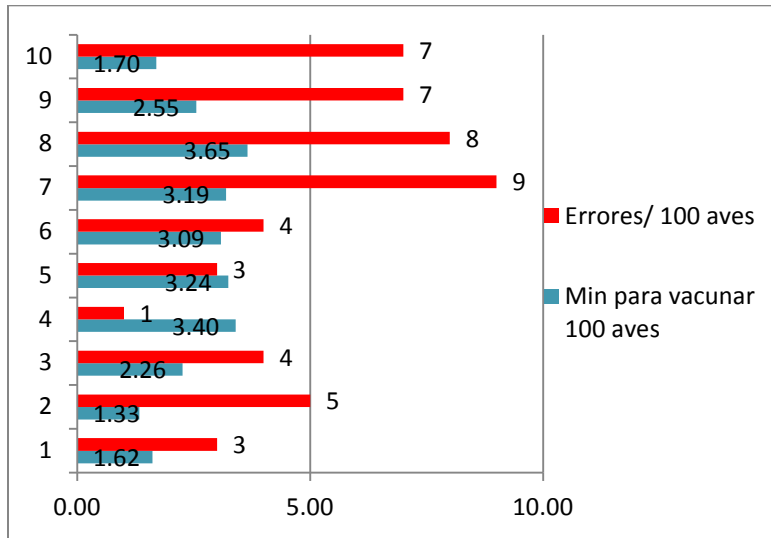
Tabla 1. El promedio del número de aves vacunadas por hora en cada una de las empresas y el promedio de errores por cada cien aves vacunadas en cada una de las empresas.

Empresa	Aves vac/hr	Mojado	Sangrado	Total errores/100 aves
1	3710	3	0	3
2	4500	5	0	5
3	2654	2	2	4
4	1764	0	1	1
5	1851	3	0	3
6	1943	4	0	4
7	1880	7	2	9
8	1643	4	4	8
9	2350	7	0	7
10	3535	4	3	7

Tabla 2. El tiempo y los errores por empresa por cada 100 aves.

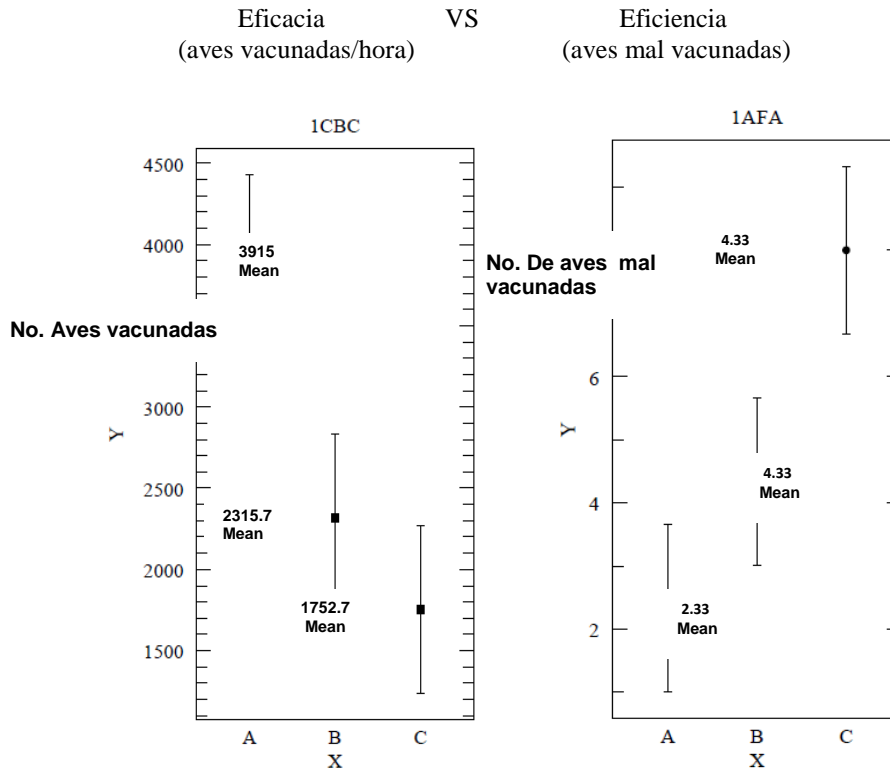
Empresa	Aves vac/hr	Min para vacunar 100 aves	Errores/ 100 aves
1	3710	1.62	3
2	4500	1.33	5
3	2654	2.26	4
4	1764	3.40	1
5	1851	3.24	3
6	1943	3.09	4
7	1880	3.19	9
8	1643	3.65	8
9	2350	2.55	7
10	3535	1.70	7

Gráfica 1. La relación entre el tiempo (eficacia) y los errores en la vacunación (eficiencia).



Gráfica 2. Gráfico (CBC) en el eje de la Y muestra el número de aves vacunadas, eje de la X los grupos de acuerdo a la eficacia (aves vacunadas/hora). En la gráfica (AFA) en el eje de la Y tenemos el número de aves mal vacunadas y para el eje de la X los grupos de acuerdo a su eficacia.

Gráfica de la media entre los grupos



AVIBACTERIUM ENDOCARDITIDIS REPORTE DE AISLAMIENTO DE GALLINAS LEGHORN COMERCIALES EN MÉXICO

REPORT OF AVIBACTERIUM ENDOCARDITIS ISOLATION FROM COMMERCIAL LEGHORN LAYERS IN MEXICO

J. Sánchez^A, N. Christy^A, E. Soriano^B y J. Coss^C

^ADepartamento técnico avícola Boehringer Ingelheim Vetmedica SA de CV

^BCentro de Investigación y Estudios Avanzados en Salud Animal Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia de la Universidad Autónoma del Estado de México.

^CRepresentante técnico de ventas Boehringer Ingelheim Vetmedica SA de CV
josue.sanchez@boehringer-ingelheim.com
CP 44940

ABSTRACT

This field diagnosis was made in commercial layers between 20 and 35 weeks of age, which was obtained from seven isolates from trachea, liver and oviduct. Typing was performed by means of molecular biology and quantification of 16S rRNA amino acids resulting in the identification of a bacterial infectious agent with 99% similarity classified as *Avibacterium endocarditidis*, which was previously isolated and typified by Dr. Bissgard and Dr. Christensen in 2007 where they obtained 27 isolates showed breeding bird endocarditis and in 2010 from hens that presented the same picture 43% of the isolates. It is noteworthy that birds sampled had a drop production between 8 and 10 points, in these no evidence of endocarditis was found, however birds showed areas of necrosis in cheeks, chins, dehydration, blood clots in periorbital cavity. Also found severe redness in the mucous membrane of the oviduct. While the present work throws the present of *Avibacterium endocarditidis* in organs not previously reported, finding no references published in Mexico, it is likely that this is the first published work in this country, just as, it is necessary to continue field research (1,3).

RESUMEN

El presente diagnóstico de campo fue realizado en gallinas de postura comerciales entre las 20 – 35 semanas de edad, obtenido a partir de 7 aislamientos provenientes de tráquea, hígado y oviducto. Se realizó la tipificación por medio de biología molecular y cuantificación de aminoácidos del 16S rRNA dando como resultado la identificación de un agente infeccioso de origen bacteriano con el 99% de similitud clasificado como *Avibacterium endocarditidis*, mismo que fue aislado y tipificado anteriormente por el Dr. Bissgard y el Dr. Christensen en el 2007, ellos obtuvieron 27 aislamientos procedentes de aves reproductoras que presentaron endocarditis posteriormente en el 2010 de gallinas que presentaron el mismo cuadro en un 43% de los aislamientos. Cabe mencionar que las aves muestreadas presentaban una baja de postura entre 8 y 10 puntos, en estas no se encontraron indicios de endocarditis, sin embargo las aves mostraron zonas de necrosis en mejillas, barbillas, deshidratación, presencia de coágulos sanguíneos en cavidad periorbitaria. Así mismo se encontró enrojecimiento severo en la mucosa del oviducto. Si bien el presente trabajo nos arroja la presencia del *Avibacterium endocarditidis* en órganos no reportados anteriormente, al no encontrar referencias publicadas en México, es probable que este sea el primer trabajo publicado en este país, de igual manera, es preciso continuar con la investigación de campo (1,3).

INTRODUCCIÓN

La familia *Pasteurellaceae* incluye una gran diversidad de Gram-negativos anaerobios facultativos y fermentativos. Los principales géneros de la familia son la *Pasteurella*, *Bibersteinia*, *Mannheimia*, *Actinobacillus*, y *Haemophilus*. La familia también incluye varios otros grupos de agentes patógenos de animales que comparten una relación genética fenotípica. Los organismos dentro de esta familia, están involucrados en una amplia gama de enfermedades clínicas respiratorias, que afectan a mamíferos, aves (ver cuadro 1), reptiles e insectos (6). En los últimos años, la ARNr: hibridación de ADN y la secuenciación del 16S rRNA, se han utilizado para estudiar las relaciones genéticas de estos organismos y sus relaciones con otras bacterias gram negativas. El doctor Bisgaard,

tipificó un nuevo grupo denominado non-V-factor perteneciente a la familia *Pasteurellaceae*, el cual muestra caracteres fenotípicos similares a los de *Avibacterium*, tentativamente llamado taxón 50 fue aislado recientemente de endocarditis valvular y en forma septicémica de las aves reproductoras. Basado en resultados fenotípicos, datos genotípicos y secuenciación del 16S rRNA, proponen dar cabida al taxón 50 dentro del género *Avibacterium* como una especie separada. Así mismo en un estudio de desafío con *Avibacterium* endocarditidis, realizado con 40 aves reproductoras, observaron que el agente se aislaba con mayor facilidad del endocardio, sin embargo también fue aislado de hígado y bazo con escaso crecimiento. Las principales lesiones encontradas fueron las valvulares en forma aguda, que van desde leve engrosamiento de las válvulas a la inflamación severa. Las lesiones observadas en el bazo incluyen diferentes grados de lesiones y necrosis hepática que van desde pequeños infartos hasta grandes áreas de necrosis coagulativa. La artritis se produjo en 19 aves, 15 de las cuales dieron positivo para *Avibacterium* endocarditidis. La mayoría de las aves desarrollaron bacteriemia, pero el escaso crecimiento en hígado y el bazo, así como la falta de bacterias demostrado por FISH (fluorescencia de hibridación in situ) y la histopatología, sugirieron una septicemia que causara la muerte de las aves. No se observó una correlación significativa entre el tamaño de la dosis inoculada y el desarrollo de endocarditis valvular, sin embargo, los cambios regresivos en el ovario, necrosis del hígado, hepato-esplenomegalia y nefromegalia fueron significativamente dependientes de la dosis. Donde se concluye que el *Avibacterium* endocarditidis representa un patógeno potencial para las aves (4,5).

MATERIALES Y MÉTODOS

En el presente estudio se evaluaron 50 gallinas ligeras de postura Leghorn White entre 20 a 35 semanas de edad en producción, las cuales fueron alojadas en casetas tecnificadas elevadas, con acceso a agua limpia y alimento balanceado.

Se realizaron muestreos bacteriológicos, histopatológicos y PCR de hígado, riñón, bazo, tráquea, cavidad periorbitaria, pulmón y oviducto.

Las muestras fueron remitidas al Centro de Investigación y Estudios Avanzados en Salud Animal Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia de la Universidad Autónoma del Estado de México.

Signos clínicos. Las aves muestreadas presentaban una baja de postura entre 8 y 10 puntos con presencia de huevo deforme (imagen 1), en estas no se encontraron indicios de endocarditis, sin embargo las aves presentaron zonas de necrosis en mejillas, barbillas, deshidratación, presencia de coágulos sanguíneos en cavidad peri orbitaria (imagen 2, 3). Así mismo se encontró enrojecimiento severo en la mucosa del oviducto.

RESULTADOS

Se obtuvieron siete aislamientos pertenecientes a la familia *Pasteurellaceae* proveniente de tráquea, hígado y oviducto, las cuales, fueron tipificadas por medio de PCR 16S rRNA, estas bacterias aisladas correspondían a un *Avibacterium* endocarditidis con un 99% de similitud.

Los hallazgos histopatológicos reportaron un problema en riñón con uratosis por deshidratación, glomerulopatía inespecífica y zonas de necrosis focales en hígado.

Los otros órganos no presentaron cambios patológicos aparentes.

DISCUSIÓN

De acuerdo con las referencias citadas en este trabajo realizadas por el Dr. Bissgard, los hallazgos obtenidos muestran gran similitud con las lesiones encontradas en el hígado descritas como áreas de necrosis.

Cabe la posibilidad que los sitios donde se aisló el *Avibacterium* endocarditidis, tráquea, hígado y oviducto, fuera por un estado septicémico presente en las aves, evidenciando que la bacteria puede replicarse en otros órganos además de los descritos en la literatura.

Por otro lado, la identificación y metodología que se utilizó para la tipificación molecular del agente coincide con los trabajos referidos, lo cual asegura la correcta identificación del *Avibacterium* endocarditidis siendo este de un 99% de similitud (2).

Cabe la posibilidad de que otros agentes infecciosos de etiología viral puedan estar interactuando en el cuadro clínico, es necesario seguir la investigación de campo para descartar la presencia de dichos agentes, así mismo, reproducir la enfermedad bajo condiciones controladas con el fin de realizar el agente del endocardio y replicar el cuadro clínico referido por la literatura, esto ayudaría a integrar el cuadro para determinar si en alguna forma se ve involucrada la caída de producción por el *Avibacterium* endocarditidis.

Haciendo referencia a los estudios reportados, por el Dr. Bissgard y Christensen realizados en su mayoría en el Department of Veterinary Disease Biology, Faculty of Health and Medical Sciences, de la University of Copenhagen, en Frederiksberg C, Denmark y al no encontrar referencia bibliográfica de la bacteria aislada en México, es probable que sea el primer caso reportado en este país.

REFERENCIAS

1. Horne. M. B., y M Bisgaard. Pathology and Localization of Avibacterium endocarditidis in Experimentally Infected Broiler Breeders. *Journal of Comparative Pathology*. Department of Veterinary Disease Biology, Faculty of Health and Medical Sciences, University of Copenhagen, Frederiksberg C, Denmark. 2013.
2. Bisgaard M., y H. Christensen. Multilocus sequence phylogenetic analysis of Avibacterium. . Department of Veterinary Disease Biology, Faculty of Health and Medical Sciences, University of Copenhagen, Frederiksberg C, Denmark. 2012.
3. Bisgaard M.,y H. Christensen. Avibacterium endocarditidis sp. nov., isolated from valvular endocarditis in chickens. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*. Department of Veterinary Disease Biology, Faculty of Health and Medical Sciences, University of Copenhagen, Frederiksberg C, Denmark. 2007.
4. Bisgaard M., y H. Christensen Observations on the incidence and aetiology of valvular endocarditis in broiler breeders and detection of a newly described taxon of Pasteurellaceae, Avibacterium endocarditidis. Department of Veterinary Disease Biology, Faculty of Life Sciences, University of Copenhagen, Frederiksberg C, Denmark. *Avian Patology*. 2010.
5. John R. Glisson., B. W. Calnek. *Diseases of Poultry*. Pasteurella. 12 nd. Blackwell Publishing, 2008: 657-690.
6. A.R. Woolums. Pasteurellaceae: Avibacterium, Bibersteinia, Mannheimia, and Pasteurella. *Veterinary Microbiology*, 3rd edition, Edit. Wiley-Blackwell. P.p. 101-107. 2013.

Cuadro 1. Algunos miembros de la Familia Pasteurellaceae de importancia en enfermedades aviarias.

Genus and Species	Associated Disorder or Site
<i>Avibacterium avium</i> (formerly <i>Pasteurella avium</i>)	Normal respiratory flora of chickens
<i>Avibacterium endocarditidis</i>	Endocarditis in chickens
<i>Avibacterium gallinarum</i> ^a (formerly <i>Pasteurella gallinarum</i>)	Respiratory disease in poultry
<i>Avibacterium paragallinarum</i> ^a (formerly <i>Haemophilus paragallinarum</i>)	Infectious coryza in chickens
<i>Avibacterium volantium</i> (formerly <i>Pasteurella volantium</i>)	Normal respiratory flora of chickens
<i>Basfia succiniciproducens</i>	Normal rumen flora
<i>Bibersteinia trehalos</i> ^a	Respiratory disease in ruminants, bacteremia in lambs
<i>Chelonobacter oris</i>	Various infections in tortoises
<i>Lonepinella koalarum</i>	Tannin-degrading bacterium in normal koala feces
<i>Mannheimia glucosida</i>	Mastitis in sheep, respiratory disease in ruminants
<i>Mannheimia granulomatis</i>	Respiratory and other infections in deer, ruminants, and hares; skin disease (lechiguana) in cattle; mastitis in sheep
<i>Mannheimia haemolytica</i> ^a	Respiratory disease in ruminants, mastitis in sheep
<i>Mannheimia ruminalis</i>	Normal rumen flora, mastitis in sheep
<i>Mannheimia varigena</i>	Respiratory infections and bacteremia in ruminants and swine, mastitis in cattle
<i>Necropsobacter rosorum</i>	Isolated from birds, significance uncertain
<i>Nicoletella semolina</i>	Respiratory disease in horses
<i>Pasteurella aerogenes</i>	Gastroenteritis in swine, abortion in swine
<i>Pasteurella caballi</i>	Respiratory disease in horses
<i>Pasteurella canis</i> ^a	Respiratory and oral infections in dogs, canine bite wound infections
<i>Pasteurella dagmatis</i>	Normal respiratory flora of birds, respiratory and oral cavity infections in dogs and cats, canine or feline bite wounds
<i>Pasteurella langaaensis</i> (formerly <i>Pasteurella langaa</i>)	Normal respiratory flora of birds
<i>Pasteurella lymphangitidis</i>	Bovine lymphangitis
<i>Pasteurella mairii</i>	Abortion in swine, bacteremia in piglets
<i>Pasteurella multocida</i> ssp. <i>gallicida</i> ^a	Fowl cholera-like disease in birds
<i>Pasteurella multocida</i> ssp. <i>multocida</i> ^a	Fowl cholera, respiratory disease in ruminants and swine, bacteremia/septicemia in ruminants, mastitis in ruminants, respiratory disease and other infections in rabbits, respiratory and oral cavity infections in dogs and cats, canine and feline bite wound infections
<i>Pasteurella multocida</i> ssp. <i>septica</i> ^a	Fowl cholera-like disease in birds, respiratory and oral cavity infections in dogs and cats, canine and feline bite wound infections, respiratory and other infections in bats
<i>Pasteurella pneumotropica</i> ^a	Respiratory disease in rodents
<i>Pasteurella skyensis</i>	Bacteremia/septicemia in farmed Atlantic salmon
<i>Pasteurella stomatis</i> ^a	Respiratory and oral cavity infections in dogs and cats, canine and feline bite wound infections
<i>Pasteurella testudinis</i>	Infections in tortoises and turtles
<i>Phocaeobacter uteri</i>	Isolated from uterus of harbor porpoise, significance uncertain

^aOrganisms that cause disease of particular importance, as defined by relatively frequent identification of infection and relative severity of disease associated with infection.

EFFICACY AND FIELD SAFETY OF A COMBINED AVIAN ENCEPHALOMYELITIS – FOWL POX – PIGEON POX LIVE VIRUS VACCINE IN CHICKENS

EFICACIA Y SEGURIDAD DE CAMPO DE UNA VACUNA COMBINADA DE VIRUS VIVO LIOFILIZADO COMBINADO DE ENCEFALOMIELITIS AVIAR, VIRUELA AVIAR Y VIRUELA DE LA PALOMA EN POLLOS

G. Sarma, B. Kersting, and G. Spina

Hygieia Biological Laboratories, 1785 East Main Street #4, P. O. Box 8300, Woodland, CA 95776

RESUMEN

La encefalomiélitis aviar (AE) causa una reducción marcada en la producción de huevo, disminución de la incubabilidad de los huevos y una mortalidad alta en pollitos. El virus de la viruela aviar (FP) provoca lesiones cutáneas (viruela seca) o lesiones diftéricas (viruela húmeda) en pollos infectados. La viruela húmeda causa una mortalidad más alta lo que resulta en graves pérdidas económicas. La vacuna contra la viruela de la paloma (PP) parece proporcionar una mejor protección cruzada contra algunas cepas de campo de la viruela húmeda. Aunque han habido informes de aumento de la eficacia asociado con diversas mezclas de campo de vacunas de FP y PP, el proceso de vacunación es laborioso y requiere mucho tiempo. En este estudio se evaluó una combinación de la vacuna contra PP + FP y AE para su seguridad y eficacia en pollos de ocho semanas o más. Se vacunó un total de 124 pollos con la vacuna de AE + FP + PP a través de la membrana del ala y se desafiaron con cepas virulentas de virus de AE y FP. La protección en contra del desafío con FP y AE fue de 100 % y 97 % respectivamente. La vacuna ha demostrado ser segura cuando se prueba bajo condiciones tanto de laboratorio como de campo.

ABSTRACT

Avian encephalomyelitis (AE) causes a marked drop in egg production, decrease in egg hatchability and high mortality in young chicks. Fowl pox (FP) virus causes cutaneous lesions (dry pox) or diphtheritic lesions (wet pox) in infected chickens. Wet pox causes higher mortality resulting in severe economic loss. Pigeon pox (PP) vaccine appears to provide better cross protection against some wet pox field strains. Although there have been reports of increased efficacy associated with various field mixtures of FP and PP vaccines, the process of vaccination is labor intensive and time consuming. In the present study, we evaluated a combination of AE + FP + PP vaccine for its safety and efficacy in chickens aged eight wk or older. A total of 124 chickens were vaccinated with AE + FP + PP vaccine through wing web and challenged against virulent strains of AE and FP viruses. Protections against FP and AE challenge were 100% and 97% respectively. The vaccine was demonstrated to be safe when tested under both laboratory and field conditions.

INTRODUCTION

Fowl pox virus causes cutaneous lesions (dry pox) or diphtheritic lesions (wet pox) in infected chickens. Dry pox produces scabs and lesions around the comb, wattle, ear lobes, and eyes. Wet pox lesions are mostly seen in the oral cavity and the upper respiratory tract, especially the larynx and trachea. Wet pox causes higher mortality in infected flocks resulting in significant economic loss. Avian encephalomyelitis virus infection in laying and breeding flocks causes a marked drop in egg production, decrease in egg hatchability and high mortality in young infected chicks.

Vaccination of poultry with either FP or PP vaccines appears to generate cross-protective immune response against the other (1,3,4). However, the immunity induced by either vaccine alone may not be sufficient enough to protect against variant strains. Outbreaks of FP have emerged in some previously vaccinated flocks leading to virulent field strains (variant strains) that were not controlled by use of commercial FP vaccine alone (2). The virulent strains often cause increased mortality due to respiratory obstruction (wet pox or diphtheritic form of the disease). Vaccinating chickens with both FP and PP vaccines appears to provide better protection against the

virulent field strains of the virus. Therefore, poultry producers in pox endemic areas routinely vaccinate their flocks with both FP and PP vaccines so as to obtain a greater spectrum of protection against the disease. For vaccinating chickens, poultry producers mix various FP containing products with PP vaccine and administer the mixed product via wing web route. However, mixing of separate products has some disadvantages including preparation error, longer time requirement for vaccine rehydration and mixing and eventual loss of virus titer, inconsistency in vaccine potency and product contamination during preparation and processing. In the present study, we evaluated the efficacy and safety of a freeze dried live virus vaccine containing AE, FP and PP viruses in a single preparation in chickens aged eight weeks or older.

MATERIALS AND METHODS

Specific pathogen free (SPF) chickens aged eight wk or older were used for vaccination. For Hygieia AE-FP-PP vaccine, a total of 124 chickens were vaccinated via wing web using a double needle wing web stab. For comparison, another group of 30 chickens were vaccinated with a field mixture of commercial AE-FP and PP vaccine through wing web. The freeze dried vaccines were rehydrated with sterile diluent following the directions for use circular accompanying the product. The experiment consisted of three trials. In each trial, a group of chickens originating from the same source and flock was kept as unvaccinated challenged controls. At 4 – 6 d post vaccination, all vaccinated and control chickens were checked for vaccine induced “Take” at the site of vaccination. All vaccinated chickens were observed daily for 21 d post vaccination (DPV) for development of any vaccine associated adverse reactions, mortality, and appearance of pox lesions on the comb, wattle, eyelids and other non-feathered areas of the body. Chickens were also observed for development of clinical signs of avian encephalomyelitis including ataxia, circling, depression, paralysis, sudden death, tremors, or torticollis.

Vaccinated and positive control chickens were challenged against AE and FP at 21 DPV. The AE challenge was done intracerebrally and Fowl pox challenge virus was administered through wing web route using a double needle stab. The AE challenged chickens were observed for 21 DPC for AE clinical signs such as ataxia, circling, depression, paralysis, sudden death, tremors, or torticollis. Any chicken showing clinical signs of AE and/or mortality was considered positive or unprotected. The FP challenged chickens were observed for 10 DPC for clinical signs of FP such as appearance of nodular lesions at the site of challenge virus inoculation, as well as lesions or scabs at the non-inoculated, non-feathered areas of the body including the comb, wattles, eyelids and oral mucosa. Any chicken showing lesion at the challenge virus inoculation site or elsewhere was considered positive or unprotected.

The safety of the vaccine was evaluated by vaccinating a total of 186,768 eight to eleven wk old chickens (LSL, Cobb and HY-W36) in three different geographical areas of the country. Daily mortality was recorded up to three wk post-vaccination and compared with the control birds which were vaccinated with other commercially available vaccines. One hundred randomly selected birds each from the vaccinated and control groups in all three trial sites were also examined for pox “take” at 7 – 8 d post vaccination.

RESULTS AND DISCUSSION

Hygieia AE-FP-PP vaccine was found to be safe for wing web administration in chickens aged eight wk or older both under laboratory and field conditions. This was evidenced by the absence of any vaccine associated adverse reactions, absence of secondary pox lesions at the non-inoculated sites, and absence of AE clinical signs or mortality during the three wk post vaccination observation period. Under field situations, the post vaccination mortality was comparable to the control groups.

When examined for pox “take”, 100% of the vaccinated chickens (both under laboratory and field conditions) revealed good vaccine “take” at the site of vaccination. With other commercially available vaccines, the pox takes in vaccinated chickens under field conditions averaged 86%. The percentages of protection against AE and FP challenge under laboratory conditions are shown in Table 1. The Hygieia AE-FP-PP vaccine induced 100% protection against FP challenge in the vaccinated chickens. Protection in the unvaccinated challenged controls was 0%. The average percentage protection against AEV challenge with Hygieia AE-FP-PP vaccine was 97% in the vaccinated chickens and 0% in the unvaccinated challenged controls.

CONCLUSION

Hygieia’s avian encephalomyelitis – fowl pox – pigeon pox vaccine, when tested in chickens aged eight weeks or older, was found to be safe and efficacious against both fowl pox and avian encephalomyelitis virus challenge.

The vaccine was also proved to be safe when tested in commercial chickens under field situations. Hygieia AE-FP-PP vaccine was distinctly advantageous over the commercial vaccines due to the fact that it contained both FP and PP viruses in a single preparation.

REFERENCES

1. Beaudette, F.R. Twenty Years of Progress in Immunization Against Virus Diseases of Birds, Journal of the American Veterinary Medical Association, 115:232-244, and 116:367-377. 1949.
2. Fatunmbi, O.O. and Reed, W.M. Evaluation of a commercial modified live virus fowl pox vaccine for the control of “variant” fowl poxvirus infections, Avian Diseases, 40:582-587. 1996.
3. Tripathy, D.N. and Hanson, L.E. Pathogenesis of Fowlpox in Laying Hens, Avian Diseases, 22:259-265. 1978.
4. Winterfield, R.W. The response of chickens to vaccination with different concentrations of pigeon pox and fowl pox viruses, Avian Diseases, 9:237-241. 1965.

Table 1. Efficacy of Hygieia AE-FP-PP vaccine against challenge with AE and fowl pox viruses.

Treatment groups	No. of birds vaccinated	No. of birds challenged		% Protection (average)		Post vaccination “Take” at the site of vaccination (%)
		AE	FP	AE	FP	
Hygieia AE-FP-PP vaccine	124	60	62	97	100	100
Commercial AE-FP vaccine mixed with PP vaccine	30	15	15	93	100	100
Unvaccinated challenged controls	0	76	77	0	0	0

The numbers in the table represent data from three trials

CHICKEN ANEMIA VIRUS AND IMMUNOSUPPRESSION: IMPACT ON MAREK'S DISEASE VACCINE PROTECTION

K. A. Schat

Department of Microbiology and Immunology, College of Veterinary Medicine, Cornell University,
Ithaca, NY 14853
Email: kas24@cornell.edu

ABSTRACT

Subclinical immunosuppression caused by chicken infectious anemia virus (CIAV) is an important contributing factor to Marek's disease (MD) vaccine breaks. Infection with CIAV results in reduced T helper and cytotoxic T lymphocyte activity affecting antibody and cell-mediated immune responses. CIAV infection is controlled by the development of virus-neutralizing antibodies, which can be compromised by poorly controlled infectious bursal disease virus (IBDV) infection. MD virus (MDV), especially the very virulent (vv+) strains, is also highly immunosuppressive. When field strains of MDV infect properly vaccinated birds or reactivate from latency, memory CTL will be activated to control virus replication. These CTL are also dividing thus providing target cells for CIAV replication. In conclusion, when CIAV is actively replicating during infection with or reactivation of MDV, CTL responses are suboptimal and MDV infection is poorly controlled leading to vaccine breaks.

INTRODUCTION

Although MD is in general well controlled by vaccination in ovo or at one d of age, MD remains a concern for several reasons. First of all, vaccination practices are often suboptimal resulting in some vaccine breaks. Proper use of standard operating procedures at the hatchery remains essential for optimal protection and has been the topic of many presentations. The short-term financial gain by using vaccines diluted beyond the recommendations by the manufacturer results in suboptimal protection when very virulent (vv) or vv+ strains of MDV are present (4). The second reason is the continuous evolution of MDV. Over the last 100 years MDV has increased significantly in virulence (10). The first increase in virulence occurred in the mid 1950's when the poultry industry changed from a rather extensive to a more intensive production system. Subsequent increases in virulence are, at least in part, caused by the fact that none of the vaccines prevent infection with field strains thus allowing for the development of escape mutants (1). In addition, Atkins et al. (1) suggested that the reduction in age of broilers to processing also favors an increase in virulence. Unfortunately, there are no good options to change these developments. Without vaccination, losses would be staggering in breeder and layer flocks and in many countries in broilers as well. Thorough cleaning of broiler houses after each cycle may alleviate the need to vaccinate as is the case in some countries, but this will be impractical in the USA and Mexico. A third important factor is immunosuppression especially by chicken infectious anemia virus (CIAV), which is difficult to control in commercial production systems.

In this review I will briefly discuss the pathogenesis of CIAV and its impact on immune responses, MD vaccine-induced immune responses, and how CIAV can influence MD vaccine-induced immune responses. With few exceptions only references for book chapters and review papers are used for these three sections.

PATHOGENESIS OF CHICKEN INFECTIOUS ANEMIA VIRUS

CIAV, currently the only member of the *Gyrovirinae* of the *Circoviridae*, is characterized by its small size (± 25 nm), single-stranded, circular, covalently closed, negative sense DNA genome of 2,298 nt, and very important from a practical point of view the extreme resistance of CIAV to many commercial disinfectants (7, 9). The genome codes for only three proteins: VP1 (the capsid protein), VP2 (essential for the proper folding of VP1) and VP3, which is also known as apoptin. VP3 is essential for virus replication and mutation of the start codon will prevent virus replication. VP3 is also important because it causes apoptosis of infected cells. The replication of the viral genome requires the formation of double-stranded (ds)DNA, which resembles in some respects a mini-chromosome or a bacterial plasmid. Because CIAV does not code for the necessary enzymes to generate new DNA, and thus infectious virus particles, it needs to infect dividing cells using the cellular enzymes to generate viral DNA. The dividing cells which are susceptible to infection with CIAV are the hemocytoblasts, the precursor cells for

erythrocytes, heterophils and thrombocytes, in the bone marrow, thymocytes and T cells. Destruction of the hemocytoblasts by CIAV results in lower hematocrit values, decreased phagocytosis of bacteria by a lack of heterophils and thrombocytes, and increased hemorrhages. Infection of the thymocyte series results in a loss of thymocytes (thymus atrophy), T helper (Th) and cytotoxic T lymphocytes (CTL). The loss of Th lymphocytes and CTL impacts negatively the antibody and cell-mediated immune responses. Virus-neutralizing (VN) antibodies develop within six wk post infection (pi) eliminating virus replication. However, CIAV can remain present in gonads and lymphocytes probably as dsDNA fulfilling the characteristics of latency (7). Latent CIAV can be transmitted vertically and be reactivated. Infection with CIAV only causes clinical disease if infection occurs during the first one to ten d of age in maternal antibody-negative chickens. However older chickens can develop clinical disease when humoral antibody responses are severely compromised for example after infection with vv infectious bursal disease virus (IBDV). Control of vvIBDV using appropriate vaccines without causing damage to the bursa of Fabricius is therefore an important component for the control of CIAV infections.

MAREK'S DISEASE VACCINE-INDUCED IMMUNITY

Infection of naïve chickens with MDV causes first a lytic infection of B lymphocytes followed by a lytic infection of mostly CD4+ T cells. The lytic phase of infection can cause severe atrophy of the thymus and bursa of Fabricius resulting in immunosuppression. Latent infections are established in CD4+ T cells starting around seven d pi but infection with vv+ strains may cause permanent damage to the primary lymphoid organs and early mortality. Latency can be permanent or temporarily depending on the genetic resistance and immunocompetence of the birds and the virulence of the MDV strain. Ultimately, MDV-positive CD4+ cells may transform in which case tumors develop.

To protect against MD, chickens are vaccinated in the USA at 18 d of embryonation (broilers) or directly after hatching (layers and breeders). The latter two groups of birds receive sometimes a second vaccination between 1 – 14 d of age. If a second vaccination is given, it has to be done within the first one to two d of age before chickens are exposed to field virus. Vaccination induces both innate and acquired immune responses. The former include the production of nitric oxide and interferons as well as the activation of natural killer cells which are important to reduce early MDV infections. Innate responses are short-lived, lack memory, and are therefore only important during the first 7 – 10 d pi. However, innate responses are of crucial importance for the development of acquired immunity. Antibodies play only a minor role in protective immunity because MDV infection is strictly cell-associated. In contrast to antibodies, CTL responses are a key component of vaccine-induced acquired immunity.

Protective immunity is primarily antiviral reducing but not preventing replication of field virus. The importance of antitumor immunity is controversial and immune responses to tumor cells may be directed to viral antigens rather than true tumor antigens. (8).

IMPACT OF CIAV INFECTION ON MAREK'S DISEASE

CIAV infection in maternal antibody-positive chickens typically occurs once maternal antibodies have waned and flocks typically seroconvert between 4 – 10 wk of age. During this time birds may also become infected with MDV field strains. CTL responses are the key component to control virus replication and memory CTL against MDV antigens will be rapidly activated and start dividing thus presenting target cells for CIAV replication. MD vaccine breaks have been linked directly or indirectly to the presence of CIAV infection in several instances (2, 3). Similarly, CIAV infection has also been implicated in infectious bronchitis breaks (5). The effect of CIAV on CTL was clearly shown by Markowski-Grimsrud and Schat (6) using reticuloendotheliosis virus (REV) as a model. Chickens hatched from antibody-positive and -negative hens were infected at four wk of age with CIAV with or without exposure to REV at the same time. At seven d pi CIAV replication was measured by quantitative (q)PCR and qRT-PCR and CTL responses to REV-transformed lymphocytes was measured by chromium release assays (CRA). In the case of maternal antibody-positive chickens, qPCR and qRT-PCR showed lack of CIAV replication and a strong CTL response to REV. Residual maternal antibodies were apparently still present at four wk of age, even while the Iddex ELISA was negative. In contrast, maternal antibody-negative chicks showed high levels of CIAV DNA and RNA, the latter indicating active virus replication. The CTL response to REV was significantly reduced in these birds.

CONCLUSIONS

CIAV is an important pathogen causing subclinical immunosuppression and can be an important co-factor in vaccine breaks against MD and may other diseases. Development of vaccines to protect chickens to CIAV infection early in life will be an important addition to disease control programs.

REFERENCES

1. Atkins, K. E., A. F. Read, N. J. Savill, K. G. Renz, A. F. Islam, S. W. Walkden-Brown, and M. E. Woolhouse. Vaccination and reduced cohort duration can drive virulence evolution: Marek's disease virus and industrialized agriculture. *Evolution* 67:851-860. 2013.
2. Davidson, I., M. Kedem, H. Borochoviz, N. Kass, G. Ayali, E. Hamzani, B. Perelman, B. Smith, and S. Perk. Chicken infectious anemia virus infection in Israeli commercial flocks: virus amplification, clinical signs, performance, and antibody status. *Avian Dis.* 48:108–118. 2004.
3. Fehler, F., and C. Winter. CAV infection in older chickens, an apathogenic infection? In: II. International Symposium on infectious bursal disease and chicken infectious anaemia. Institut fur Geflugelkrankheiten, Justus Liebig University, Giessen, Germany, Rauschholzhausen. pp 391-394. 2001.
4. Gimeno, I. M., A. L. Cortes, E. R. Montiel, S. Lemiere, and A. K. R. Pandiri. Effect of diluting Marek's disease vaccines on the outcomes of Marek's disease virus infection when challenged with highly virulent Marek's disease viruses. *Avian Dis.* 55:263-272. 2011.
5. Hoerr, F. J. Clinical aspects of immunosuppression in poultry. *Avian Dis.* 54:2-15. 2010.
6. Markowski-Grimsrud, C. J., and K. A. Schat. Infection with chicken anaemia virus impairs the generation of pathogen-specific cytotoxic T lymphocytes. *Immunology* 109:283-294. 2003.
7. Schat, K. A. Chicken anemia virus. *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* 331:151-184. 2009.
8. Schat, K. A., and V. Nair. Marek's disease. In: *Diseases of Poultry*, 13 ed. D. E. Swayne, J. R. Glisson, L. R. McDougald, J. V. Nolan, D. L. Suarez and V. Nair, eds. Wiley-Blackwell, Ames, IA. pp 515-552. 2013.
9. Schat, K. A., and V. L. van Santen. Chicken infectious anemia. In: *Diseases of Poultry*, 13 ed. D. E. Swayne, J. R. Glisson, L. R. McDougald, J. V. Nolan, D. L. Suarez and V. Nair, eds. Wiley-Blackwell, Ames, IA. pp 248-264 and 276-284. 2013.
10. Witter, R. L. Increased virulence of Marek's disease virus field isolates. *Avian Dis.* 41:149-163. 1997.

CLOSTRIDIAL ENTEROPATHIES: MITIGATING THEIR EFFECTS IN AN ANTIBIOTIC FREE PRODUCTION SYSTEM

ENTEROPATÍAS CLOSTRIDIALES: MITIGACIÓN DE SUS EFECTOS EN UN SISTEMA DE PRODUCCIÓN LIBRE DE ANTIBIÓTICOS

J. Schleifer, T. Lohrmann, and S. Johnson

Quality Technology International (QTI) Inc. 1707 N. Randall Rd. Suite 300, Elgin, IL. 60123

RESUMEN

Las enteropatías clostridiales siguen afectando a la producción avícola comercial en los Estados Unidos. Informes recientes indican un aumento de enfermedades como la enteritis necrótica en pollos de engorda. Los resultados de estas enfermedades son disminución en el rendimiento de producción, mayor costo de producción y aumento de la mortalidad. En correspondencia con el aumento de las enfermedades clostridiales se reduce el uso de antibióticos. Esta dinámica de producción está siendo impulsada por la demanda del mercado y las iniciativas regulatorias. Por lo tanto, se están investigando alternativas a los agentes terapéuticos comúnmente utilizados. Estudios recientes han informado que el uso de microbios alimentados directamente (DFMs) puede mejorar los efectos de las enfermedades clostridiales.

Los objetivos de esta presentación son delimitar la incidencia actual de enteropatías clostridiales. Se discutirá el examen de la literatura publicada que describe la eficacia y el modo de acciones que tienen los DFMs en la mejora de las enteropatías clostridiales. Por último, se discutirá un estudio de la investigación actual sobre el efecto atenuante que tienen los DFMs en las enteropatías clostridiales.

SUMMARY

Clostridial enteropathies continue to plague commercial poultry production in the United States. Recent reports indicate an increase in diseases such as necrotic enteritis in broilers. The results of these diseases are decreased production performance, heightened cost of production, and increased mortality. Corresponding to the rise of clostridial diseases is reduced antibiotic usage. This production dynamic is being driven by market demands and regulatory initiatives. Thus, alternatives to commonly used therapeutic agents are being investigated. Recent studies have reported that the use of direct fed microbials (DFMs) can ameliorate the effects of clostridial diseases.

The objectives of this presentation are to delineate the current incidence of clostridial enteropathies. An examination of published literature describing the efficacy and mode of actions that DFMs express toward the amelioration of clostridial enteropathies will be discussed. Finally, a survey of current research regarding the mitigating effect DFMs have on clostridial enteropathies will be addressed.

INTRODUCTION

Clostridial enteropathies continue to plague commercial poultry production in the United States. Recent reports indicate an increase in diseases such as necrotic enteritis in broilers and focal duodenal necrosis in commercial laying hens. The results of these diseases are decreased production performance, heightened cost of production and increased mortality.

NECROTIC ENTERITIS

Necrotic enteritis (NE) in broilers is caused by *Clostridium perfringens* and is characterized by acute morbidity and mortality. The clinical signs are identified as sudden depression, loss of appetite and reluctance to move. Mortality often accompanies clinical symptoms. Gross lesions are observed in the jejunum and ileum. Initial lesions include petechial hemorrhaging of the mucosal layer of the intestine with muco-fibrinous inflammation. As the disease progresses, necrosis proliferates and a pseudo-fibrinous membrane may be found on the mucosal layer (5).

The economic impact of necrotic enteritis is pronounced. Current estimates are that there is an 80% incidence of subclinical NE in broilers produced in an antibiotic free production system. Skinner *et al.* (10) showed a 12%

reduction in body weight and a 10.9% increase in feed conversion rates in birds with subclinical NE. An economic analysis by the same authors showed that NE resulted in a loss to producers ranging from \$878 to over \$1,400 per flock. When feed loss compensation costs were analyzed, an additional loss of approximately \$400 to \$740 per flock was additive (10).

NE is often complicated or predisposed by jejunal or ileal coccidiosis, caused by *Eimeria maxima*. Because of the pathogenic nature of *Eimeria maxima*, the two diseases are often linked. However, the two diseases may occur separately and may not be intrinsically concurrent. Yet, the producer should examine for coccidiosis if the incidence of NE is increasing within the respective production system.

FOCAL DUODENAL NECROSIS

Focal duodenal necrosis (FDN) is an emerging disease in commercial layer hens. It was first reported in 1997. It is a unique disease in that the affected animal most often presents with no clinical symptoms. The only common symptom reported is “pale combs”. The disease has been reported in hens as early as 15 wk old and cases have been identified throughout the lay cycle. The hallmark sign is a drop in case weights. Case weight reductions of up to two lbs. per case have been reported. Also, in approximately 50% of the outbreaks, a drop in egg production has been reported. The production drop may be as much as 10%. Yet in most cases, production has been reported to not be affected.

The disease seems to be restricted to the duodenum of the hen. The lesions are characterized by gray-green foci in the mucosa. Microscopic ulcerations have been observed corresponding to the gross lesions. Gram positive bacteria have been identified in association with the lesions. Diagnostic laboratory analyses generally result in the isolation of *Clostridium colinum*. However a report from the Netherlands indicates that *Clostridium perfringens* may also be a pathogen (1).

The incidence of FDN also appears to be on the increase. There is no substantive indication as to the incidence of the disease in the early 2000's; however veterinarians now believe that the incidence could be in excess of 80% (2).

As with NE, there currently are no preventative measures that can be taken for FDN. The only approved antibiotic for use in commercial layer hens is bacitracin at 25 g/ton. Reports indicate that recurrences of the disease are common after treatment with the antibiotic.

ANTIBIOTIC FREE PRODUCTION

The use of antibiotics in broilers to treat NE is more commonplace and reports indicate that commonly used therapeutic antibiotics are generally still effective. However, increased resistance to these antibiotics continues to be observed and refractory cases appear to be on the rise. Corresponding to the increased incidence of both NE and FDN is consumer and regulatory pressure to reduce their usage.

The exact incremental increase in antibiotic free meat production in the United States is difficult to assess. However, in 2009 Organic Trade Association reported a 20% per year growth in organic meat sales since 1997(3). Indications are that organic and antibiotic free meat sales will continue to increase based on projections by major US food retailers in this market segment (4).

DFM EFFECTIVENESS

With increased pressure to reduce antibiotic usage in some poultry production segments, producers are seeking alternative products that will reduce the effects of clostridial diseases. One of the initial papers showing that DFMs can have an effect against clostridial enteropathies was reported by Fukata *et al.* (6). These researchers orally dosed young chickens with *Lactobacillus acidophilus* or *Streptococcus faecalis* one d prior to challenging the birds with *C. perfringens* and observed a reduction in the recovery of *C. perfringens* in the duodenum. Maruta *et al.* (8) showed a reduction in *C. perfringens* in the feces of broilers that were fed *Bacillus subtilis* C-3102 from one d of age. Hofacre *et al.* (1998) found that the undefined bacterial culture, marketed as Avigard, resulted in a significant reduction in the incidence of NE and lesion expression in subsequently challenged broilers. Additional research indicated that there may be a direct relationship with a reduction in fecal shedding of *C. perfringens* in broilers and an increase in the percent of *Lactobacillus* as a component of the total anaerobic microbiota of the chicken's intestine (7).

Current research has centered on the effectiveness of *Bacillus subtilis* C-3102 either by itself or in combination with another product to reduce NE pathologies. Data indicates that there is a dose response to decreasing the effects of NE by *C. perfringens* with increasing levels of *B. subtilis* C-3102. Additionally, an additive effect of *C.*

perfringens reductions has been reported when *B. subtilis* C-3102 is combined with an oral one-time dosage of proprietary *Lactobacillus reuteri* (9). Finally, an additive effect in the reduction of NE was observed with the combination of *B. subtilis* C-3102 and the yeast cell wall preparation, IMW50™.

CONCLUSIONS

DFMs have been shown to reduce the effects of *Clostridium perfringens* infections in young chickens for over 20 years. During this time the incidence of clostridial enteropathies in populations not treated with DFMs have steadily increased. Current indications suggest that clostridial enteropathies are becoming more refractive to conventional antibiotic therapies. Additionally, consumer demands have placed more pressure on producers to use less antibiotic intervention during the production phase. Thus the uses of specific direct fed microbials appear to be an effective option for producers toward reducing the effects of clostridial enteropathies.

REFERENCES

1. Allaart, J.G., N.D. deBruijn, A.J.A.M. vanAsten, T.H.F. Fabri and A. Grone. NetB-producing and beta2-producing *Clostridium perfringens* associated with subclinical necrotic enteritis in laying hens in the Netherlands. *Avian Pathol.* 41:541-546. 2012.
2. Anonmys. An Overview of Focal Duodenal Necrosis (FDN). Technical Update. Hy-Line International, Dallas Center, IA. 2013.
3. Anonmys. The Organic Trade Association 2009 Organic Industry Survey. Organic Trade Association, Greenfield, MA. 2009.
4. Anonmys. Whole Foods Market 2013 Annual Report. Whole Foods Market, Inc. Austin, TX. 2013.
5. Ficken, M.D., D.P. Wages. Necrotic Enteritis. *Diseases of Poultry* 10th Ed., Calnek et al. eds. 1997.
6. Fukata, T., Y. Hadate, E. Baba and A. Arakawa. Influence of bacteria on *Clostridium perfringens* infections in young chickens. *Avian Dis.* 35:224-227. 1991.
7. Kato, M., N. Otomo, K. Nishimura, Y. Tadano, T. Marubashi, H. Miyazaki, K. Maruta and D.M. Hooge. Dietary *Bacillus subtilis* C-3102 spores influence intestinal (excreta) populations of Lactobacilli, *Clostridium perfringens*, Enterobacteriaceae (coliforms), and Salmonella, and live performance of broiler chickens. *Poult. Sci.* 86:216-217. 2007.
8. Maruta, K., H. Miyazaki, S. Masuda, M. Takahashi, Y. Tadano and H. Takahashi. Exclusion of intestinal pathogens by continuous feeding with *Bacillus subtilis* C-3102 and its influence on the intestinal microflora in broilers. *Anim. Sci. Technol.* 67:271-280. 1996.
9. Schleifer, J., T. Lohrmann, N. Otomo, T. Hamaoka, G. Mathis, B. Lumpkins and D.M. Hooge. Dose responses to dietary *Bacillus subtilis* C-3102 plus *Lactobacillus reuteri*. 2013 AAAP Convention, Chicago, IL. 2013.
10. Skinner JT, S. Bauer, V. Young, G. Pauling and J. Wilson. An economic analysis of the impact of subclinical (mild) necrotic enteritis in broiler chickens. *Avian Dis.* 54:1237-1240. 2010.

(IMW50 is a trademark of ICC, Brazil.)

REDUCING EXPERIMENTALLY INDUCED NECROTIC ENTERITIS LESIONS IN BROILERS USING DIETARY *BACILLUS SUBTILIS* C-3102 (CALSPORIN)

REDUCCIÓN DE LAS LESIONES DE ENTERITIS NECRÓTICA INDUCIDA EXPERIMENTALMENTE EN POLLOS DE ENGORDA MEDIANTE EL USO DE *BACILLUS SUBTILIS* C-3102 (CALSPORIN) EN LA DIETA

J. Schleifer, T. Lohrmann, N. Otomo, T. Hamaoka, G. Mathis^A, B. Lumpkins^A, and D. M. Hooge^B

Quality Technology International (QTI) Inc. 1707 N. Randall Rd. Suite 300, Elgin, IL. 60123

^ASouthern Poultry Research Inc., Athens, GA. 30607

^BHooge Consulting Service Inc. Eagle Mountain, UT. 87529

RESUMEN

La enteritis necrótica (NE) en pollos de engorda comerciales ocurre con mayor frecuencia entre las edades de 14 a 30 d y es causada por *Clostridium perfringens*. Los productores avícolas están limitando o eliminando cada vez más el uso de antibióticos en el control de NE. Se están investigando productos alternativos para controlar las infecciones de NE. El objetivo de este estudio es examinar la efectividad de Calsporin[®] (*Bacillus subtilis* C-3102) contra un desafío con NE. En este estudio, NE se reprodujo por medio del desafío de pollos de engorda a los 14 d de edad con *Eimeria maxima*, seguido de una sonda oral con *C. perfringens* a partir de los 19 d de edad. Las puntuaciones de las lesiones de NE se evaluaron a los 21 d de la edad. Los parámetros de mortalidad y de producción se evaluaron a los 28 d de la edad. Dosificaciones variables de Calsporin se analizaron para determinar las capacidades correspondientes de mejora de NE. La eficacia de Calsporin en este modelo de desafío de NE se comparó con un grupo control no tratado y uno que recibió niveles terapéuticos de Stafac[®]. Se obtuvieron reducciones significativas en mortalidad y en las puntuaciones de lesiones con Calsporin frente a un desafío con NE comparado con el grupo sin tratar/infectado. Todos los resultados de calificación de las lesiones para los grupos de tratamiento que recibieron Calsporin fueron estadísticamente equivalentes a los grupos alimentados con las dietas Stafac. Los resultados indican que hay evidencia de respuesta a la dosis con tratamientos con Calsporin en lo que respecta a la reducción de lesiones de enteritis necrótica, la mortalidad y las influencias de producción

SUMMARY

Necrotic enteritis (NE) in commercial broilers most often occurs between the ages of 14 to 30 d of age and is caused by *Clostridium perfringens*. Poultry producers are increasingly limiting or eliminating the use of antibiotics in the control of NE. Alternative products to control NE infections are being investigated. The objective of this study is to examine the effectiveness of Calsporin[®] (*Bacillus subtilis* C-3102) against an NE challenge. In this trial, NE was reproduced by challenging broilers at 14 d of age with *Eimeria maxima*, followed by an oral gavage of *C. perfringens* starting at 19 d of age. NE lesion scores were assessed at 21 d of age. Mortality and production parameters were assessed at 28 d of age. Varying dosages of Calsporin were analyzed to determine corresponding capabilities of NE amelioration. The effectiveness of Calsporin in this NE challenge model was compared to a non-treated control group and one that received therapeutic levels of Stafac[®]. Significant reductions in mortality and lesion scores were attained with Calsporin against an NE challenge compared to the non-treated/infected group. All lesion score results for the treatment groups receiving Calsporin were statistically equivalent to the groups fed the Stafac diets. The results indicate that there is evidence of dose response with the Calsporin treatments in regard to the reduction of NE lesions, mortality and production influences.

INTRODUCTION

NE is a pervasive disease in 14 to 28 d old chickens which can often result in high levels of morbidity and mortality. The etiologic agent is typically *Clostridium perfringens*. However, *Eimeria maxima* infections are considered a significant predisposing factor for NE (1). There is a need for alternatives to therapeutic antibiotics in the control of NE as producers decrease antibiotic usage. DFMs (direct fed microbials), particularly Calsporin, as a feed additive has shown an effect on reducing *C. perfringens* in fecal samples (2,4). Recent studies indicate that swine fed Calsporin resulted in significantly less *C. perfringens* in fecal samples (3). The purpose of this study was to examine the effect of various levels of Calsporin in reducing NE. The various dosages were also compared to non-treated controls and to conventional therapeutic antibiotic effectiveness.

MATERIALS AND METHODS

A battery trial was conducted from 0 to 28 d of age, using Cobb male broiler chicks. Except for Treatment 1, all birds were challenged with ~5,000 oocysts of *Eimeria maxima* on d 14 and with 1×10^8 cfu of *Clostridium perfringens* per bird on d 19, 20, and 21. No coccidiostat was used in the feed and no coccidia vaccine was administered to birds. Each treatment consisted of eight cages (rep) of eight birds each per treatment with each bird having 0.62 ft²/bird. Birds were randomly assigned to cages and given *ad libitum* access to feeders and water via nipple drinkers. Treatments were randomized by pen prior to the start of the study.

Birds were weighed by cage on d 0, 14, 21, and 28. Feed was weighed in on d 0 and remaining feed was weighed on d 14, 21, and 28. The trial was terminated on d 28.

The six treatments used in this study were:

1. Non-infected chicks, non-medicated diets
2. Infected chicks, non-medicated diets
3. Infected chicks, 20 gm/ton Stafac[®]
4. Infected chicks, CALSPORIN 300,000 cfu/g diet
5. Infected chicks, CALSPORIN 600,000 cfu/g diet
6. Infected chicks, CALSPORIN 900,000 cfu/g diet

Necrotic enteritis intestinal lesion scoring (0 to 3) was performed on three birds per cage on d 21. Three birds from each cage were selected, sacrificed, weighed, and examined for the degree of presence of necrotic enteritis lesions. If less than three birds were present at time of scoring, all remaining birds within the cage were scored. The scoring was based on a 0 to 3 score, with 0 identified as the absence of gross NE lesions and 3 identified as the presence of severe gross NE lesions.

RESULTS

An NE mortality of 12.5% and an average NE score of 1.04 were attained in the infected/non-treated (positive control) group. When comparing the two control groups, to the four feed additive treatments, BWG (body weight gain) was not significantly different. However, as expected, those birds that were infected and receiving no feed additive had the lowest BWG at d 28. Similarly, the infected non-treated control group had significantly poorer mortality adjusted F/G (feed-to-gain, 0-28 d) compared to other treatments.

When comparing the four feed additive treatments, birds fed Calsporin had similar BWG, F/G, NE mortality % and NE score to birds fed diets supplemented with Stafac at 20 g/t. Compared to the infected and non-treated control group, birds fed diets containing Calsporin at 600,000 to 900,000 cfu/g of feed had significantly better livability. Correspondingly, the birds treated with the highest level of Calsporin had the lowest NE scores.

DISCUSSION

The NE challenge in this trial can be considered mild-moderate based on mortality levels and lowered body weights. All feed additive treatments provided significant reductions in mortality levels compared to the untreated control. The greatest reduction in NE-related mortality was achieved with Stafac with no mortality. The greatest reduction in NE lesion scores was achieved with Calsporin at 900,000 cfu/g treated feed. The treatment reductions in lesion scores were not statistically significant. The 28 d body weight gain and feed/gain ratios generally

corresponded numerically, however no feed additive treatment provided a significant improvement in each of these parameters.

The weight gain, feed/gain ratios and reduction in lesion scores with increasing inclusion rates of Calsporin correspond with additional studies.

REFERENCES

1. Ficken, M.D. and D. Wages. Necrotic enteritis. Diseases of Poultry 10th Edition. 1997.
2. Kato, M., N. Otomo, K. Nishimura, Y. Tadano, T. Marubashi, H. Miyazaki, K. Maruta, and D. M. Hooge. Dietary *Bacillus subtilis* C-3102 spores influence intestinal (excreta) populations of Lactobacilli, *Clostridium perfringens*, Enterobacteriaceae (coliforms), and Salmonella, and live performance of broiler chickens. Poult. Sci. 86:216-217 (Abstr.). 2007.
3. Knudson B.K., N. Otomo, T. Hamaoka, B. Lee, and S.C. Johnson. Effects of commercial diets with or without CALSPORIN® (*Bacillus subtilis* C-3102 spores) on fresh fecal microbial profiles of sows from breeding through lactation. J An Sci, Vol 91 (e-suppl 2):46. 2013.
4. Maruta, K., H. Miyazaki, S. Masuda, M. Takahashi, T. Masrubashi, Y. Tadano, and H. Takahashi. Exclusion of intestinal pathogens by continuous feeding with *Bacillus subtilis* C-3102 and its influence on the intestinal microflora in broilers. Anim. Sci. Technol. 67:273-280. 1996.

(Calsporin is a registered trademark of Calpis Co., Ltd., Tokyo, Japan)

(Stafac is a registered trademark of Phibro Animal Health Corporation)

Table 1.

<i>Treatment</i>	<i>NE Mortality%</i> <i>28 Days</i>	<i>NE Lesion Score</i> <i>21 Days</i>	<i>Body wt. 0-28</i> <i>Days lbs</i>	<i>Body wt. 21-28</i> <i>Days lbs</i>	<i>Adj.Feed/gain</i> <i>0-28 Days</i>
NonInfected/Non-treated	0 b	0 c	1.77	0.75	1.93 b
Infected/Non-treated	12.50 a	1.04 a	1.59	0.69	2.13 a
Stafac 20 g/ton	0 b	0.29 b	1.76	0.77	1.97 ab
Calsporin 300,00/g	4.69 ab	0.67 ab	1.71	0.72	2.06 ab
Calsporin 600,00/g	3.13 b	0.67 ab	1.68	0.77	2.08 a
Calsporin 900,000/g	3.13 b	0.17 bc	1.71	0.80	2.09 a
<i>P value</i>	0.001	<0.001	0.371	0.14	<0.001

^{a, b, c} Within data set, values with different superscript letters, differ significantly

MOLECULAR AND ANTIGENIC CHARACTERIZATION OF VARIANT REOVIRUSES FROM CLINICAL CASES OF TENOSYNOVITIS

CARACTERIZACIÓN MOLECULAR Y ANTIGÉNICA DE VARIANTES DE REOVIRUS DE CASOS CLÍNICOS DE TENOSINOVITIS

H. Sellers, E. Linnemann, and V. Gauthiersloan

Poultry Diagnostic and Research Center, Department of Population Health
College of Veterinary Medicine, University of Georgia
953 College Station Road
Athens, GA 30602 USA

RESUMEN

Un aumento dramático en el número de casos clínicos de tenosinovitis inducida por reovirus ha sido reportado en los últimos dos años. Variantes de reovirus se han aislado de 70% de las muestras presentadas a la PDRC. El análisis genotípico del reovirus sigma C ha identificado dos grupos de variantes de los reovirus que tienen desde 50 hasta 80% de similitud con las cepas vacunales comerciales. Actualmente se desconoce el origen de las variantes. Análisis moleculares y antigénicos adicionales de las variantes de reovirus están en marcha para proporcionar una mejor comprensión del posible origen de estos virus.

SUMMARY

A dramatic increase in the number of clinical cases of reovirus induced tenosynovitis has been reported over the past two years. Variant reoviruses have been isolated from 70% of the samples submitted to the PDRC. Genotypic analysis of the reovirus sigma C has identified two variant groups of reoviruses that range from 50 to 80% similarity to commercial vaccine strains. The origin of the variants is currently unknown. Additional molecular and antigenic analysis of the variant reoviruses is underway to provide a better understanding to the possible origin of these viruses.

ABSTRACT

Avian reoviruses are ubiquitous in poultry and usually not a major concern for poultry producers. While reoviruses can be isolated from healthy birds, they have been associated with several diseases including malabsorption syndrome and runting and stunting syndrome (RSS), although their role as primary pathogens in the clinical syndromes is not clear. In contrast, the association of some reoviruses with clinical cases of viral arthritis (VA)/tenosynovitis is quite clear especially when reoviruses are isolated from the tendons of affected birds. Control of reovirus-induced VA can be achieved by vaccination of broiler breeders with a combination of live and/or inactivated vaccines with maternal immunity passed on to progeny for early protection against field challenge. In broilers, live attenuated vaccines are available for use at day-of-hatch and some even used *in ovo*. Current commercial vaccine strains (S1133, 1733, 2408 and 2177 to name a few) have been used for decades to control diseases associated with reovirus. In addition, autogenous vaccines have been produced, on a company by company basis, with field isolates for use in breeders. A dramatic increase in the number of clinical cases of reovirus induced tenosynovitis and/or lameness in broilers, ranging in age from two and a half to eight weeks, were submitted to the Poultry Diagnostic and Research Center. Here, we report the molecular and antigenic characterization of field isolates associated with VA.

Reoviruses were isolated, from the tendons submitted, in primary chicken embryo liver cells. Cytopathic effect characteristic of reoviruses was observed in most cases by 72 h post inoculation. Cells were frozen and thawed three times and RNA was extracted from the supernatant. RNA was used for RT-PCR to amplify a region of the S1 segment encoding the entire sigma C protein (Kant, *et al.*, 2003). RT-PCR products were sequenced directly for most of the cases; however, in some cases, the products were cloned and sequenced. Multiple alignments were

generated using ClustalW (Lasergene 11.0, DNASTar) followed by phylogenetic analysis using Neighbor Joining algorithm with 1,000 bootstrap replicates.

Genotypic analysis of the reovirus sigma C identified two variant groups of reoviruses isolated from clinical VA cases submitted from 2011 to present. The amino acid similarity of the group 1 VA variants was <50% similar to reovirus vaccine strains S1133, 1733, 2408 and 2177. Serological evaluation of several representative isolates from this group was performed using one way virus neutralizations in primary chicken embryo liver cells. Hyperimmune serum against a group 1 variant was generated in SPF chickens and used as a positive control along with antiserum against S1133 and 2408. VN titers of 2-4 (\log_2) were observed with S1133 and 2408 antiserum, suggesting that antibodies generated against the vaccine strains would not provide sufficient protection against challenge. Several challenge experiments were performed in progeny from vaccinated breeders that support this finding (data not shown). Similarity of the group 2 VA variants was 80% similar to reovirus vaccine strains and 50% similar to the group 1 variants. In one-way VNs, using hyperimmune serum against group 1 variants and vaccine strains S1133 and 2408, VN titers of <16 were observed suggesting that antibodies generated against vaccine strains and group 1 variants poorly neutralize group 2 variants.

The origin of the variants is currently unknown. Additional molecular and antigenic analysis of the variant reoviruses is underway to provide a better understanding to the possible origin of these viruses.

2009-2013 RETROSPECTIVE STUDY ON NECROTIC ENTERITIS IN CHICKENS AND TURKEYS IN THE CENTRAL VALLEY OF CALIFORNIA

ESTUDIO RETROSPECTIVO DEL 2009 AL 2013 SOBRE ENTERITIS NECRÓTICA EN POLLOS Y PAVOS DEL VALLE CENTRAL DE CALIFORNIA

C. Gabriel Sentíes-Cué^A, B. R. Charlton^A, H. L. Shivaprasad^B, R. P. Chin^B, and F. A. Uzal^C

California Animal Health & Food Safety Laboratory System (CAHFS),
School of Veterinary Medicine,
University of California, Davis

^ATurlock Branch, 1550 N. Soderquist Road, Turlock, CA 95381

^BTulare Branch, 18830 Road 112, Tulare, CA 93274

^CSan Bernardino Branch, 105 West Central Avenue, San Bernardino, CA 92408

RESUMEN

Entre enero del 2009 y octubre del 2013, 199 casos de enteritis necrótica (NE) en pollos y pavos fueron diagnosticados en el CAHFS. Todas las aves fueron alojadas en el Valle Central de California. 134, 50 y 15 casos de NE fueron diagnosticados en pollos de engorda, pavos y gallina ponedoras respectivamente. El rango de edades fue de 12 días a 29 semanas, y 16 días a 12 semanas en pollos y pavos respectivamente. Los factores asociados más frecuentemente con la NE fueron coccidiosis, reducción del tejido linfoide en la bolsa de Fabricio, infecciones por *Salmonella* spp., e infecciones por enteritis hemorrágica viral. Entre enero y octubre del 2013 se registró un aumento en el número de casos de NE observados en comparación con los años previos. El diagnóstico se basó en examinación macroscópica e histológica, así como descartar otros agentes de enteritis necrotizantes. En algunas ocasiones también se utilizó el cultivo de anaeróbicos como una ayuda en el diagnóstico.

SUMMARY

Between January of 2009 and October of 2013, 199 cases of necrotic enteritis (NE) in chickens and turkeys were diagnosed at CAHFS. All the birds were housed in the Central Valley of California. One hundred and thirty four, 50, and 15 NE cases were diagnosed in meat type chickens, turkeys and layers, respectively. Age ranges for NE presentation were 12 d to 29 wk, and 16 d to 12 wk in chickens and turkeys, respectively. The most frequent factors associated with NE were coccidiosis, lymphoid depletion in the bursa of Fabricius, *Salmonella* spp. infection, and hemorrhagic enteritis virus infection. Between January and October of 2013 there has been an increase in the numbers of NE cases observed in comparison with previous years. Diagnosis was based on gross and histological examination coupled with ruling out other agents of necrotizing enteritis. Anaerobic culture was also occasionally used as a diagnostic aid.

FIELD SAFETY AND EFFICACY OF VECTOR MAREK'S/INFECTIOUS BURSAL DISEASE VACCINES (RHVT – IBD) AS ASSESSED BY CLINICAL AND PRODUCTIVE PERFORMANCE IN COMMERCIAL LAYERS IN ARGENTINA

SEGURIDAD DE CAMPO Y EFICACIA DE LAS VACUNAS VECTORIZADAS CONTRA LA ENFERMEDAD DE MAREK/ENFERMEDAD INFECCIOSA DE LA BOLSA (RHVT/IBD) SEGÚN LA EVALUACIÓN DEL DESEMPEÑO CLÍNICO Y PRODUCTIVO EN GALLINAS COMERCIALES DE POSTURA EN ARGENTINA

L. Sesti^A, L. Sara^B, R. van Oort^C, F. Lozano^D, M. Paniago^D, and C. Cazaban^D

Ceva Animal Health

^ABrazil, ^BArgentina, ^CUnited States, ^DFrance

RESUMEN

La seguridad de campo y la eficacia de dos vacunas vectorizadas HVT -IBD (Cepa de la vacuna recombinante contra Marek HVT [rHVT] que expresa el gen VP2 del virus de la enfermedad infecciosa de la bolsa [IBD]) se evaluaron en una prueba de campo que involucró varias parvadas de gallinas de postura comerciales en Argentina. Tres lotes de gallinas de postura comerciales fueron vacunados (día 1, SQ) con un rHVT – IBD expresando el VP2 de la cepa variante E IBDV (Grupo 1) y otras tres parvadas recibieron otra vacuna rHVT - IBD expresando el VP2 de IBDV de la cepa Lukert clásica (Grupo 2). Se compararon los parámetros de salud y crecimiento, serología de IBD, histología de la bolsa de Fabricio y datos de rHVT - IBD PCR durante la fase de crianza entre los dos grupos. Todas las parvadas de gallinas de postura en los grupos 1 y 2 fueron contemporáneas y tuvieron el mismo manejo, nutrición, tipo de alojamiento y desafío de la enfermedad ambiental.

Los datos clínicos, de laboratorio y de crecimiento de todas las parvadas de ambos grupos no mostraron diferencias estadísticas entre los dos vacunas rHVT - IBD utilizadas en esta prueba de campo, para todos los parámetros evaluados.

SUMMARY

Field safety and efficacy of two vector HVT-IBD vaccines (recombinant Marek's HVT [rHVT] vaccine strain expressing the VP2 gene of the infectious bursal disease [IBD] virus) were assessed in a field trial involving several flocks of commercial layers in Argentina. Three commercial layer flocks were vaccinated (day 1 SQ) with an rHVT-IBD expressing the VP2 of the variant E IBDV strain (Group 1) and three other flocks received another rHVT-IBD vaccine expressing the VP2 of Lukert classical IBDV strain (Group 2). Health and growth parameters, IBD serology, Bursa of Fabricius histology and rHVT-IBD PCR data during the rearing phase were compared between the two groups. All layer flocks in groups one and two were contemporaneous and had the same management, nutrition, type of houses and environmental disease challenge.

The clinical, laboratory and growth data from all flocks in both groups showed no statistical differences between the two rHVT-IBD vaccines used in this field trial for all parameters evaluated.

INTRODUCTION

Infectious bursal disease (IBD) was first described in 1962 and since then has been described throughout the world. The socio-economic significance of this poultry disease is considerable worldwide. Various clinical forms of the disease can occur but the true incidence of those different forms is quite difficult to determine. IBD is present worldwide in all countries with modern poultry production systems. Depending on the age of the infected chicken

and the virulence of the infecting IBD virus, immunosuppression (very difficult to diagnose and measure) and/or high rates of morbidity and mortality will ensue in the infected flock (3). Therefore, it is indispensable to vaccinate broilers, commercial layers and light and heavy breeders against IBD wherever field challenge exists. Currently, many types of vaccines against IBD are available worldwide, ranging from conventional live vaccine strains of different invasiveness rates to molecular biology derived vaccines (recombinant/vector vaccines) (2).

The objective of this field trial was to investigate the safety and efficacy of vector rHVT-IBD vaccines in one commercial layer farm in Argentina located in an area of medium to low classic IBDV challenge and/or local variants challenge.

MATERIAL AND METHODS

Testing vaccines. The new IBD commercial vaccine tested was a turkey herpesvirus-based recombinant vaccine (rHVT) expressing a key protective antigen (VP2 viral protein of the variant E strain) of the IBD virus (rHVT-IBD-1; Vectormune[®] IBD, from Ceva Animal Health - Lenexa, Kansas, USA).

A second HVT recombinant vaccine (rHVT-IBD-2) from a different manufacturer was also used.

Experimental groups. The trial was carried out in one commercial layer company located in the eastern part of Argentina, a region of medium to low field challenge from classic IBDV and local variants. Gumboro vaccination program was used.

Vaccination program. rHVT-IB-1 at d 1 SQ (69,000 layers) vs. rHVT-IBD-2 at d 1 SQ (63,900 layers). Both groups were also vaccinated with a Marek's Rispens strain mixed with rHVT-IBD vaccines.

Sampling for laboratory analysis. Blood samples for Gumboro ELISA serology (Idexx – IBD classic kit) from all flocks were taken at 1, 21, 42 and 105 d of age. In order to confirm rHVT vaccination “take”, at 21 d of age, five chickens were euthanized and clinical samples taken from spleen and wing feathers for PCR (Polymerase Chain Reaction) analysis for detection of rHVT. Five BF from each flock were also taken at 21 and 42 d of age for histopathology (lymphoid depletion analysis).

Growth and clinical data. Key flock parameters (average weekly bird weight, weekly flock uniformity and weekly mortality) were collected from each flock and statistically analyzed for differences between the vaccines tested programs throughout the rearing period.

Statistical analysis. All productivity, clinical and laboratory results were statistically analyzed by completely random analysis of variance and means compared by Tukey HSD All-Pairwise test at p<0.05 level. (Statistix[®] 9.0 software – www.statistix.com)

RESULTS AND DISCUSSION

Serology. Gumboro seroconversion measured by ELISA serology (Idexx IBD classic kit) indicated a slow and uniform Ab production (Table 1) from rHVT-IBD vaccinated chickens, although the commercial kit utilized is not recommended for appropriate detection of VP2 specific Ab production.

rHVT PCR / Histopathology score. All rHVT vaccinated flocks were positive at PCR indicating that the rHVT vaccines were properly applied at the hatchery (Table 2). No BF histopathology lesion was found in chickens vaccinated with both rHVT-IBD-1 and rHVT-IBD-2 vaccines indicating no early IBD challenge in the farm.

Growth and clinical data. The measured growth (average weight and body weight uniformity) and clinical (mortality) data are depicted in Table 3. In group two, mortality rate during rearing in chickens vaccinated with rHVT-IBD-1 was significantly lower from that observed in rHVT-IBD-2 vaccinated chickens. The final etiology for that mortality was not assessed.

CONCLUSIONS

The results from this field trial indicate that both rHVT-IBD vaccines equally protected the chickens against IBD and Marek's disease in this farm.

REFERENCES

1. Etteradossi, N & Saif, YM (2013) Infectious Bursal Disease. In: D. E. Swayne, J. R. Glisson, L. R. McDougald, L. K. Nolan, D. L. Suarez and V. Nair (editors) - Diseases of Poultry, 13th edition – 2013. Published by Wiley-Blackwell – John Wiley and Sons Inc., Ames, Iowa, USA.
2. Müller, H; Mundt, E; Etteradossi, N and Islam, MR (2012) Current status of vaccines against infectious bursal disease. Avian Pathology 41(2):133-139.
3. van den Berg, TP (2000) Acute infectious bursal disease in poultry: a review. Avian Pathology 29:175-194.

Table 1. Gumboro ELISA serology (Idexx classic kit; GMT [%CV]) during the rearing phase in layer flocks vaccinated with different Gumboro vaccination programs (means of each vaccination program in each company followed by different letter in the same age are statistically different, $p < 0.05$).

Age	Gumboro Serology	
	<i>r</i> HVT-IBD-1	<i>r</i> HVT-IBD-2
1 d	8741 ^a [29]	7209 ^a [27]
21 d	410 ^a [48]	462 ^a [87]
42 d	157 ^a [92]	331 ^a [70]
105 d	2968 ^a [34]	3994 ^a [28]

Table 2. Bursa of Fabricius' histopathology lesion scores (lymphoid depletion) at 21, 28, 35, and 42 d of age from detected in layer vaccinated with different Gumboro vaccination programs (means of each vaccination program in each company followed by different letter in the same age are statistically different, $p < 0.05$). Data from IBDV and *r*HVT PCR are also depicted.

Age	Histopathology & <i>r</i> HVT PCR	
	<i>r</i> HVT-IBD-1	<i>r</i> HVT-IBD-2
Histopathology score		
21 d	0	0
42 d	0	0
<i>r</i>HVT PCR (spleen and/or wing feather pulp)		
21 d	Positive	Positive

Table 3. Clinical and growth performance during the rearing phase in layer flocks vaccinated with different Gumboro vaccination programs (means of each vaccination program in each company followed by different letter are statistically different, $p < 0.05$).

	Clinical and Growth Performance	
	<i>r</i> HVT-IBD-1	<i>r</i> HVT-IBD-2
Total mortality in rearing	4.03 % ^a	4.01 % ^a
Clinical signs	No clinical signs and lesions of IBD and Marek's was observed in all chickens.	
Weight gain in rearing	There was no statistical difference ($p > 0.05$) in weekly body weight gain and uniformity between the groups of chickens vaccinated with both <i>r</i> HVT-IBD vaccines.	
Body weight uniformity in rearing		

FIELD PERFORMANCE OF DIFFERENT VACCINATION PROGRAMS AGAINST INFECTIOUS BURSAL DISEASE (IBD) USING CONVENTIONAL LIVE AND DIFFERENT RHVT-IBD VECTOR VACCINES IN COMMERCIAL LAYERS IN BRAZIL

RENDIMIENTO DE CAMPO DE DIFERENTES PROGRAMAS DE VACUNACIÓN CONTRA LA ENFERMEDAD INFECCIOSA DE LA BOLSA (IBD) QUE UTILIZAN VACUNAS VIVAS CONVENCIONALES Y DIFERENTES VACUNAS VECTORIZADAS RHVT - IBD EN GALLINAS DE POSTURA COMERCIALES EN BRASIL

L. Sesti^A, F. Resende^A, M. Oizumi^A, C. Kneipp^A, R. van Oort^B, F. Lozano^C, M. Paniago^C, and C. Cazaban^C

Ceva Animal Health
^ABrazil, ^BUnited States, ^CFrance

RESUMEN

Varias parvadas de gallinas de postura comerciales en dos empresas diferentes en Brasil fueron vacunadas contra la enfermedad infecciosa de la Bolsa (IBD) con diferentes programas de vacunación. Las vacunas utilizadas fueron: a) vacuna vectorizada rHVT - IBD que expresa el gen VP2 de la cepa variante E IBDV combinada con la cepa de la vacuna convencional Rispens de Marek (rHVT - IBD + Rispens; 234.162 gallinas de postura), b) vacuna vectorizada rHVT - IBD expresando el gen VP2 de la cepa clásica Lukert IBDV (rHVT - IBD; 24.698 gallinas de postura), y c) vacunas vivas convencionales de IBD (LIVECONV; cepa intermedia; 74.037 gallinas de postura). Los datos de parámetros de salud y crecimiento, serología de IBD, histología de la bolsa de Fabricio y los datos rHVT - IBD PCR se compararon entre los tres programas diferentes de vacunación durante la fase de crianza. Todas las parvadas de gallinas de postura en cada compañía eran contemporáneas y tuvieron el mismo manejo, nutrición, tipo de alojamiento y desafío de la enfermedad ambiental.

Gallinas de postura vacunadas con rHVT - IBD + Rispens mostraron una mortalidad total menor ($p < 0.05$) durante la fase de crianza y una calificación menor de lesiones de histopatología de la bolsa de Fabricio ($p < 0,05$) a las 3 semanas de edad, en comparación con las gallinas de postura vacunadas con la vacuna rHVT - IBD. El resto de los datos clínicos, de laboratorio y de crecimiento de todas las parvadas en ambas empresas, no mostraron diferencias estadísticas entre los tres programas de vacunación utilizados en esta prueba de campo.

SUMMARY

Several commercial layer flocks in two different companies in Brazil were vaccinated against infectious bursal disease (IBD) with different vaccination programs. Vaccines used were: a) vector rHVT-IBD vaccine expressing the VP2 gene of the variant E IBDV strain combined with conventional Marek's Rispens vaccine strain (rHVT-IBD+Rispens; 234.162 layers); b) vector rHVT-IBD vaccine expressing the VP2 gene of the classical Lukert IBDV strain (rHVT-IBD; 24.698 layers); and c) conventional live IBD vaccines (LIVECONV; intermediate strain; 74.037 layers). Health and growth parameters, IBD serology, bursa of Fabricius histology and rHVT-IBD PCR data during the rearing phase were compared between the three different vaccination programs. All layer flocks in each company were contemporaneous and had the same management, nutrition, type of houses and environmental disease challenge.

Layers vaccinated with the rHVT-IBD+Rispens showed lower ($p < 0.05$) total mortality during the rearing phase and lower ($p < 0.05$) bursa of Frabricius histopathology lesion score at three wk of age when compared with layers vaccinated with the rHVT-IBD vaccine. All other clinical, laboratory and growth data from all flocks in both companies showed no statistical differences between the three vaccination programs used in this field trial.

INTRODUCTION

Infectious bursal disease (IBD) is an acute, highly contagious viral infection of young chickens that has lymphoid tissue, especially the cloacal bursa (bursa of Fabricius - BF) as its primary target. IBD is present worldwide in all countries with modern poultry production systems. Depending on the age of the infected chicken and the virulence of the infecting IBD virus, immunosuppression and/or high rates of morbidity and mortality will ensue in the infected flock (3).

Therefore, it is indispensable to vaccinate broilers, commercial layers and light and heavy breeders against IBD wherever field challenge exists. Currently, many types of vaccines against IBD are available worldwide, ranging from conventional live vaccine strains of different invasiveness rates to molecular biology derived vaccines (recombinant/vector vaccines) (2).

The objective of this field trial was to investigate the safety and efficacy of a vector *r*HVT-IBD + Rispens vaccine in comparison with different IBD vaccination programs with conventional live vaccines and another *r*HVT-IBD vaccine in two different commercial layer farms in Brazil located in areas of medium to low very virulent IBDV challenge and/or local variants challenge.

MATERIALS AND METHODS

Testing vaccines. The new IBD commercial vaccine tested was a turkey herpesvirus-based recombinant vaccine (*r*HVT) expressing a key protective antigen (VP2 viral protein of the variant E strain) of the IBD virus combined (same ampoule) with a conventional Marek's Rispens vaccine strain (***r*HVT-IBD-1**; Vectormune[®] IBD/Rispens, from Ceva Animal Health - Lenexa, Kansas, USA). A second HVT recombinant vaccine (***r*HVT-IBD-2**) from a different manufacturer was also used as well as a conventional live intermediate strain Gumboro vaccine.

Experimental groups. The trial was carried out in two commercial layer companies located in southeast Brazil, a region of medium to low field challenge from very virulent IBDV and local variants. Vaccination programs used by the two companies were as follows:

Company 1 – *r*HVT-IBD-1 at d 1 SQ (192,000 layers) vs conventional live IBDV intermediate vaccine strain applied via drinking water at, 12, 17, 22 and 27 d of age (46,000 layers – these chickens also received a conventional HVT+Rispens Marek's vaccine at d 1 SQ at the hatchery).

Company 2 – *r*HVT-IB-1 at d 1 SQ (52,000 layers) vs *r*HVT-IBD-2 at d 1 SQ (25,000 layers) mixed with a monovalent Marek's Rispens strain vaccine.

Sampling for laboratory analysis. Blood samples for Gumboro ELISA serology (Idexx – IBD classic kit) from all flocks were taken at 1, 21, 35, 42, 49, and 105 d of age. In order to confirm *r*HVT vaccination “take,” five chickens were euthanized and clinical samples taken from spleen and wing feathers for PCR (polymerase chain reaction) analysis for detection of *r*HVT. Five BF from each flock were taken at 21, 28, 35, and 42 d of age for histopathology and IBDV PCR analysis.

Growth and clinical data. Key flock parameters (average weekly bird weight, weekly flock uniformity and weekly mortality) were collected from each flock and statistically analyzed for differences between the vaccination programs throughout the rearing period.

Statistical analysis. All productivity, clinical and laboratory results were statistically analyzed by completely random analysis of variance and means compared by Tukey HSD All-Pairwise test at $p < 0.05$ level. (Statistix[®] 9.0 software – www.statistix.com)

RESULTS AND DISCUSSION

Serology. Gumboro seroconversion measured by ELISA serology (Idexx IBD classic kit) indicated a slow and uniform Ab production (Table 1) from *r*HVT-IBD vaccinated chickens, although the commercial kit utilized is not recommended for appropriate detection of VP2 specific Ab production. On the other hand, chickens vaccinated with conventional live vaccines had not seroconverted even at 49 d of age clearly indicating failure in vaccine “take.” The strong seroconversion observed at 105 d of age in live conventional vaccines vaccinated chickens was most certainly due to field IBDV challenge.

***r*HVT PCR / IBDV PCR / Histopathology score.** All *r*HVT vaccinated flocks were positive at PCR indicating that the *r*HVT vaccines were properly applied at the hatchery (Table 2). BF histopathology lesion scores indicated that *r*HVT-IBD-2 vaccinated chickens were challenged very early when the vaccine had not yet established full protection. Conventional live vaccine vaccinated chickens were never PCR positive for the vaccine virus nor showed any histological lesion in the BFs indicating no vaccination “take” whatsoever.

Growth and clinical data. The measured growth (average weight and body weight uniformity) and clinical (mortality) data are depicted in Table 3. In Company 2, mortality rate during rearing in chickens vaccinated with *r*HVT-IBD-1 was significantly lower from that observed in *r*HVT-IBD-2 vaccinated chickens. The final etiology for that mortality was not assessed.

CONCLUSIONS

The results from the this field trial indicate that both *r*HVT-IBD vaccines performed quite similarly, except for the higher mortality during rearing and earlier BF histopathological lesions presented by the flocks vaccinated with *r*HVT-IBD-2 vaccine. On the other hand, it seems clear that field Gumboro vaccination is not a reliable strategy to protect commercial layers against IB.

REFERENCES

1. Etteradossi, N & Saif, YM (2013) Infectious Bursal Disease. In: D. E. Swayne, J. R. Glisson, L. R. McDougald, L. K. Nolan, D. L. Suarez and V. Nair (editors) - Diseases of Poultry, 13th edition – 2013. Published by Wiley-Blackwell – John Wiley and Sons Inc., Ames, Iowa, USA.
2. Müller, H; Mundt, E; Etteradossi, N and Islam, MR (2012) Current status of vaccines against infectious bursal disease. Avian Pathology 41(2):133-139.
3. van den Berg, TP (2000) Acute infectious bursal disease in poultry: a review. Avian Pathology 29:175-194.

Table 1. Gumboro ELISA serology (Idexx classic kit; GMT [%CV]) during the rearing phase in layer flocks vaccinated with different Gumboro vaccination programs (means of each vaccination program in each company followed by different letter in the same age are statistically different, $p < 0.05$).

Age	Company 1		Company 2	
	<i>r</i> HVT-IBD-1	Field vaccination	<i>r</i> HVT-IBD-1	<i>r</i> HVT-IBD-2
1 d	8663 ^a [19]	7159 ^a [26]	6913 ^a [26.9]	5608 ^a [32]
21 d	1738 ^a [62.5]	1189 ^a [64]	1118 ^a [64]	953 ^a [50.7]
35 d	444 ^a [67.8]	69 ^b [70]	405 ^a [80.4]	386 ^a [75.1]
42 d	586 ^a [69.7]	36 ^b [106.2]	2513 ^a [46.9]	1555 ^a [63.7]
49 d	1112 ^a [58.5]	58.5 ^b [81.9]	2553 ^a [32.1]	2268 ^a [47.9]
105 d	4278 ^a [50.4]	8819 ^b [21.1]	5026 ^a [28]	6648 ^a [31.1]

Table 2. Bursa of Fabricius' histopathology lesion scores (lymphoid depletion) at 21, 28, 35, and 42 d of age from detected in layer vaccinated with different Gumboro vaccination programs (means of each vaccination program in each company followed by different letter in the same age are statistically different, $p < 0.05$). Data from IBDV and rHVT PCR are also depicted.

Age	Company 1		Company 2	
	rHVT-IBD-1	Field vaccination	rHVT-IBD-1	rHVT-IBD-2
Histopathology score				
21 d	0	0	0 ^a	2.2 ^b
28 d	0	0	0	0
35 d	0	0	0	0
42 d	0	0	3 ^a	3 ^a
IBDV PCR				
21 d	VP2 gene insert	Negative	VP2 gene insert	VP2 gene insert
28 d	Negative	Negative	VP2 gene insert	VP2 gene insert
35 d	Negative	Negative	VP2 gene insert Mixed infection	VP2 gene insert Mixed infection
42 d	VP2 gene insert	Negative	VP2 gene insert Mixed infection	VP2 gene insert Mixed infection
rHVT PCR (spleen and/or wing feather pulp)				
21 d	Positive	not done	Positive	Positive
28 d	Positive	not done	Positive	Positive

Table 3. Clinical and growth performance during the rearing phase in layer flocks vaccinated with different Gumboro vaccination programs (means of each vaccination program in each company followed by different letter are statistically different, $p < 0.05$).

	Company 1		Company 2	
	rHVT-IBD-1	Field vaccination	rHVT-IBD-1	rHVT-IBD-2
Total mortality in rearing	2.6 % ^a	2.8 % ^a	1 % ^a	1.9 % ^b
Weight gain in rearing	There was no statistical difference ($p > 0.05$) in weekly body weight gain and uniformity between the vaccination programs when compared to the target standard curve of the birds' genetic brand in both companies.			
Body weight uniformity in rearing				

PATHOGENESIS OF TURKEY ARTHRITIS REOVIRUS (TARV)

PATOGÉNESIS DE LA ARTRITIS CAUSADA POR REOVIRUS EN PAVOS

T. Sharafeldin, S. Mor, S. Goyal, and R. Porter

Minnesota Veterinary Diagnostic Laboratory, 1333 Gortner Ave., Saint Paul, MN 55108

RESUMEN

El reovirus aviar ha sido aislado y caracterizado a partir de pavos de 16 semanas de edad con tenosinovitis/artritis y tendones con rupturas desde el 2011 en Minnesota. Estos virus han demostrado ser genéticamente diferentes a los reovirus del pollo. Dos de los virus aislados produjeron tenosinovitis cuando se inocularon de manera experimental en pavitos de una semana de edad via oral, intratraqueal y/o vía cojinete plantar 1 a 2 semanas post inoculación. De las 7 a las 16 semanas post inoculación, los pavitos presentaron un andar severamente afectado, fibrosis y adhesión y ruptura del tendón gastrocnemio. En el presente trabajo se estudió la patogénesis y la diseminación en el tejido del reovirus causante de la artritis a través de la inoculación del virus en pavitos de una semana de edad. El virus será detectado por medio de la localización de la determinación de la copia del gen utilizando qRT-PCR e inmunohistoquímica.

ABSTRACT

Avian reovirus has been isolated and characterized from 16 wk old tom turkeys with tenosynovitis/ arthritis and ruptured tendons since 2011 in Minnesota. These viruses showed to be genetically different from chicken reoviruses. Two isolated reoviruses showed tenosynovitis when it was experimentally inoculated in one wk old turkey poults via oral, intratracheal and/or footpad route from one to two wk post inoculation. At seven wk post inoculation until 15 wk post inoculation, poults showed severely disturbed gait, fibrosis, adhesion and rapture in gastrocnemius tendon. In this work, we study the pathogenesis and tissue spread of turkey arthritis reoviruses through inoculation of the TARV-O'Neil via oral route to one wk old turkey poults. Virus was detected in intestine, gastrocnemius tendon, bursa of Fabricius, spleen liver and kidney at 12, 24, 48, 72, 96, 168, and 331 h post inoculation PI. Virus gene copy determination using quantitative RT-PCR used to quantify the virus multiplication. TARV-O'Neil showed the highest multiplication (more than 1000 copies) in intestines at 96 h in jejunum, and bursa of Fabricius. In cloacal swab, 100 virus copy numbers were detected. Internal organs and tendons did not have this high copy number as shown in intestines and bursa of Fabricius. These results tells that TARV-O'Neil multiply mostly in intestines and bursa of Fabricius. Furthermore, a turkey may shed the virus at 96 h PI.

INTRODUCTION

Avian reovirus was first identified in tendons of 15-wk-old tenosynovitis/arthritis turkeys in 1980 (3). Page et al., (6) described cases of lameness in five and eight wk old turkeys.

In 2011, Minnesota Veterinary Diagnostic Laboratory isolated and characterized novel turkey arthritis reovirus (TARV) strains from tendons of turkeys with tenosynovitis/arthritis (4). When some of these strains inoculated experimentally via oral, intratracheal and footpad routes in one wk old turkey poults, they induced tenosynovitis in gastrocnemius tendon while chicken reovirus and reovirus isolated from turkey intestines did not (7).

In this work, we study the pathogenesis of TARV-O'Neil; virus multiplication, tissue spread and shedding. This should tell how virus behaves in turkeys and this will lead to understand how the virus uniquely produces the disease.

MATERIAL AND METHODS

Birds. Eighty commercial one d old male turkey poults were divided into two groups; 40 birds that were inoculated with TARV-O'Neil orally and 40 birds inoculated with virus free MEM orally. Birds were supplied with food and water *ad libitum*.

Virus. TARV-O'Neil that was grown and titrated in QT-35 cell culture. The virus had the following titer $10^{5.5}$ TCID₅₀/mL.

Experimental design. Poults were kept in air filtered isolators in RAR facility in University of Minnesota, Twin cities campus. Birds were supplied with food and water ad libitum. Birds were then inoculated with either 0.2 mL of virus or 0.2 mL of virus free MEM at one wk of age. At 12, 24, 48, 72, 96, 168, and 331 h post inoculation PI, five birds from each group were euthanized and samples from duodenum, jejunum, cecum, bursa of Fabricius, cloacal swab, kidney, liver, heart, spleen and gastrocnemius tendon were collected.

Samples processing. Samples were homogenized in Hank's balanced salt solution (HBSS) with 2% donor horse serum (DHS), antibiotics and antifungal drugs. The homogenates were centrifuged for 2500 rpm for 25 minutes then supernatant were kept frozen (-20) until RNA extraction.

Virus gene copy determination. Samples that were kept frozen were subjected to RNA extraction using QIAamp Viral RNA Mini Kit (Qiagen, Valencia, CA). The extracted RNA was subjected to quantitative RRT-PCR to determine the S4 gene copy number. Previously developed turkey reovirus specific rRT-PCR was used (Unpublished data). Forward primer 5'- ATCATGGCT GGGTTTGTGCC-3' and reverse primer 5'- AGAACGAATTTGTARGCGACCA-3' were designed to amplify 99 bp fragments from S4 gene. A TaqMan probe, 5'- FAM-TGAG MGTGATGACTTTACYCC -TAMRA-3' was similarly selected. The Real time PCR reactions were set up in 96-well format and carried out in Mastercycler[®] ep realplex2 (Eppendorf, Hamburg, Germany) using One-step RT -PCR Kit (Qiagen, Valencia, CA). Each 25 μ L of reaction mixture contained 5 μ L, 5X reaction buffer, 1.0 μ L enzyme mix, 0.2 μ L RNase inhibitor (Promega, Madison, USA), 300nM of each primer and 200 nM of TaqMan probe and 2 μ L of RNA. Two no template control (NTC) wells were included in each run. Wells were sealed with optical lids. The PCR cycling conditions were 30 min at 50°C, 15 min at 95°C and then 45 cycles each of denaturation at 95°C for 15 s and annealing and extension at 56°C for 45 s. Amplification data were analyzed by software version (Eppendorf). The software generated standard quantitation curves by plotting the threshold cycle (Ct) values against the logarithm of the input copy number.

RESULTS

Virus gene copy determination. In intestines and bursa of Fabricius (Fig. 1), the virus multiplication was low until 48 h PI. The virus gene copy number in cecum exceeded 100 copies at 48 h PI. At 72 h the virus gene copy number in bursa of Fabricius was more than 100 copies. At 96 h PI, the virus gene copy numbers exceeded 1000 copies in jejunum, cecum and bursa of Fabricius. The virus multiplication in duodenum was lower and in virus gene copy number was around 100 copies at 96 h PI.

In internal organs and gastrocnemius tendon (Fig. 2), the virus gene copy number was lower than 100 copies during all times PI.

DISCUSSION

Previous experiments showed that TARV-O'Neil causes significant histologic tenosynovitis at four wk post inoculation (7). No lameness we seen on these birds until four wk PI. Only histologic inflammation was observed on the tendons of birds that were inoculated at one wk of age via oral, intratracheal or footpad route. Normally in the field we always find reovirus induced lameness at 10 wk and older birds. For that hypothesized for another experiment that the bird got infected at young age and the virus causes tendon sheath inflammation and fibrosis and when bird gets older and heavier problems starts. In the other experiment, birds were inoculated by TARV-O'Neil through oral route at one wk of age then followed until 16 wk of age. We start to see disturbed gait in infected group compared with control one from eight wk of age (seven wk PI). This gait disturbance increased until 16 wk of age (Unpublished data). This raised curiosity to study the pathogenesis of TARV-O'Neil and how this virus uniquely causes histologic inflammation scores that lead to lameness while other avian reovirus (Turkey enteric reovirus and chicken reovirus) does not.

The virus showed high S4 gene copy number in cecum, jejunum and bursa of Fabricius compared with liver, spleen, kidney, heart and tendons at 96 h PI. These results (Fig.1 and Fig.2) show that the virus multiplies mostly in the first two wk in intestines and bursa of Fabricius. The virus start to sheds at 96 h PI as cloacal swabs showed 100 virus copies at 96 h PI. This tells some facts about the virus but we still need to understand more about how the virus causes inflammation in gastrocnemius tendon sheath though it is not a main site of virus replication. Further work in continuing with blood samples, tendon samples and intestines. This work is investigating cytokine expression.

REFERENCES

1. Afaleq, A.A. and Jones, R.C. (1989). Pathogenicity of three turkey and three chicken reoviruses for poults and chicks with particular reference to arthritis/tenosynovitis. *Avian Pathology*, 18, 433-340.
2. Jones, R.C. (2000). Avian reovirus infection. *Rev. sci. tech. Off. int. Epiz.*, 19, 614-625.
3. Levisohn, S., Gur-Lavie, A. and Weisman, J. (1980). Infectious synovitis in turkeys: Isolation of tenosynovitis virus-like agent. *Avian Pathology*, 9, 1-4.
4. Mor, S.K., Sharafeldin, T.A., Porter, R.E., Ziegler, A., Patnayak, D.P. and Goyal, S.M. (2013) Isolation and characterization of a turkey arthritis reovirus. *Avian Diseases*, 57, 97-103.
5. Olson, N.O. and Solomon, D.P. (1968). A natural outbreak of synovitis caused by the viral arthritis agent. *Avian Diseases*, 12, 311-316.
6. Page, R.K., Fletcher, O.J., Villegas, P. (1982). Infectious tenosynovitis in young turkeys. *Avian Diseases*, 26, 924-927.
7. Sharafeldin T.A., Mor S.K., Bekele A.Z., Verma H., Goyal S.M. and Porter R.E. (2014). The role of avian reoviruses in turkey tenosynovitis/arthritis. Submitted to *Avian Pathology*

Figure 1. Virus gene copy number in intestines and bursa of Fabricius.

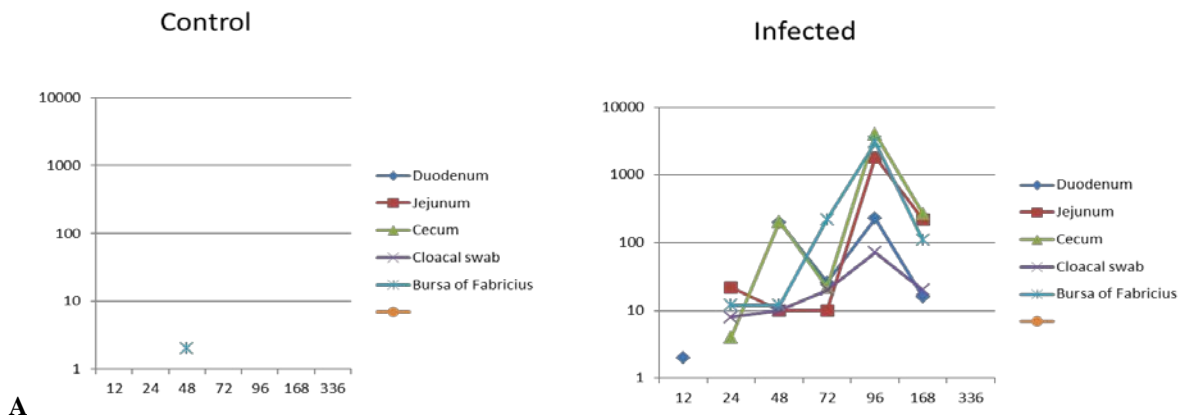
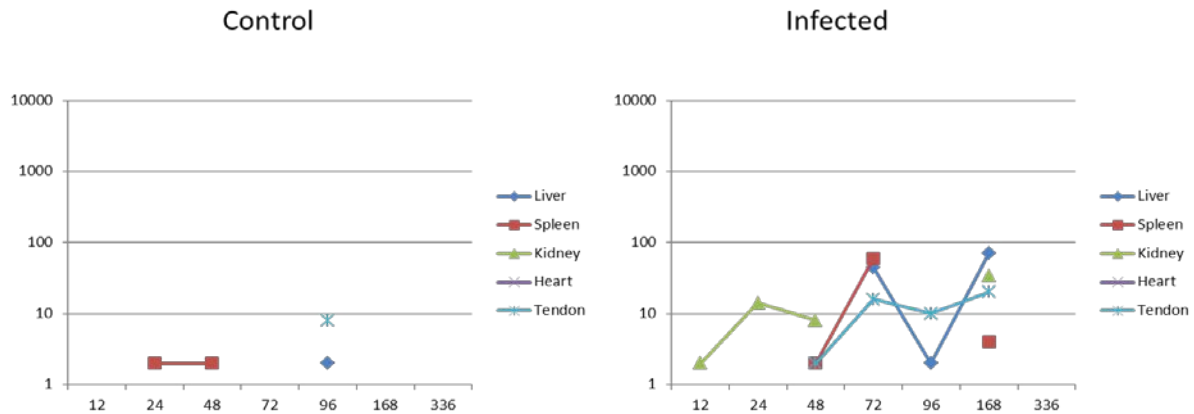


Figure 2. Virus gene copy number in internal organs and gastrocnemius tendon.



INCREASED INCIDENCE OF GIZZARD EROSIONS IN TURKEY POULTS AND BROILER CHICKENS

AUMENTO EN LA INCIDENCIA DE EROSIONES EN LA MOLLEJA DE PAVOS Y POLLOS DE ENGORDA

H. Shivaprasad and R. Chin

California Animal Health and Food Safety Laboratory System, Tulare branch, University of California, Davis

RESUMEN

Las erosiones en la capa de la koilina de la molleja que en ocasiones resultan en úlceras están teniendo una mayor ocurrencia en pavos jóvenes y en pollos de engorda. Existen muchas causas que provocan las erosiones de la molleja. Aminas como la mollerrosina, un subproducto del pescado o de la harina de carne se sabe que causa irritación gástrica, lo cual resulta en erosiones en la molleja. Los adenovirus Grupo I también se han asociado con erosiones en la molleja de pollos. El estrés, cuerpos externos, metales pesados y en ocasiones nemátodos también han sido asociados con erosiones en la molleja.

Recientemente existe un aumento en la incidencia de estas erosiones en pavitos y en pollos libres de antibióticos. Para mantener la flora bacteriana en cantidades bajas en el agua, se utilizan ácidos orgánicos y cloro. El sulfato de cobre también se utiliza para controlar la presencia de hongos en el alimento. Es probable que si estos productos son utilizados en exceso, pudieran causar irritación gástrica la cual resultaría en erosiones de la molleja.

SUMMARY

Erosion of the koilin layer of the gizzard, sometimes resulting in ulcers, is becoming a common occurrence in young turkeys and broiler chickens. There are many causes for gizzard erosions. Amines such as gizzerosine a byproduct of fish or meat meal, has been known to cause gastric irritation resulting in gizzard erosions. Group I adenovirus has also been associated with gizzard erosions in chickens. Stress, foreign bodies, heavy metals and occasionally nematode parasites have also been associated with gizzard erosions.

Recently there is increased incidence of gizzard erosions more commonly in turkey poults and chickens raised as antibiotic free. To keep the bacterial flora down in the water, organic acids and chlorine are being used. Copper sulfate is also being used to control mold in the feed. It is probable that if these products are used in excess they can cause gastric irritation resulting in gizzard erosions.

ABSTRACT

Gizzard, also called the ventriculus, is the muscular stomach of most species of birds that functions in grinding of feed and helps in digestion. It is made up of smooth muscles rich in myoglobin and is arranged in four semi-autonomous regions, two thick and two thin muscles. Lining the inner surface of the gizzard is hardened membrane called koilin or cuticle. The cuticle or most commonly called koilin layer is rich in carbohydrate complexes and is secreted by the glands underneath. The koilin layer protects the gizzard from acid and proteolytic enzymes secreted by the proventriculus and from injury during grinding of hard feed or ingredients. The pH of gizzard is low, 2.5 to 4.74. The mean retention time of solid phase markers in the proventriculus and gizzard is about 35 min. In general, feed containing grains spend more time than those made up of crumbles and mash. Even though gizzard does not contribute any enzymes or gastric juice, it is the organ where the main proteolysis takes place. Therefore, any damage to the gizzard lining or the underlying mucosa and muscular layers can cause maldigestion resulting in poor absorption of nutrients in the intestine. This in turn can result in decreased weight gain and other health consequences in broilers and turkeys.

It has been observed that in the past several years that there is an increased incidence of gizzard erosions in poults and broilers grown as "antibiotic free" or "organic." However, there are many causes which can cause gizzard erosions. Biogenic amines such as gizzerosine a byproduct of fish or meat meal has been known to cause gastric irritation resulting in gizzard erosions. Group I adenovirus has also been associated with gizzard erosions in chickens. Stress, foreign bodies, heavy metals and occasionally nematode parasites have also been associated with

gizzard erosions. Others, such as organic acids to decrease pH in the water, chlorine dioxide, hydrogen peroxide used to control bacteria in the drinking water, and Copper sulfate to control mold in feed if used in excess, have the potential to cause gizzard erosions.

In order to study the incidence and pathology of gizzard erosions in turkey poults and broiler chickens routine diagnostic submissions to the laboratory were used. Various parameters such as age of the birds (1 d to 56 d), history, clinical signs, use of any substances to control bacteria such as organic acids, chlorine, hydrogen peroxide, number of birds submitted and number of birds with gizzard erosions and the nature and consistency of the feed in the gizzard were recorded. In addition, gross and microscopic examination of gizzards in all cases, pharynx, esophagus and proventriculus in most cases and tongue and crop in some cases were performed. Feed and gizzard contents were also analyzed for biogenic amines such as histamine, putrescine, cadaverine, spermidine, spermine, tyramine, tryptamine and phenylethylamine.

The earliest incidence of gizzard erosions observed in turkey poults and chicks were at three d of age but were most common around 10 to 19 d of age. The incidence of gizzard erosions ranged from a few birds to as many as six to eight in a standard submission of eight to eleven birds per submission. The feed in the gizzard of birds with gizzard erosions were often coarse and also contained litter.

Gross lesions of the koilin layer ranged from focal pale yellow streaks to diffuse pale rough appearing koilin throughout. Often the koilin layer had peeled off from the underlying mucosa and occasionally there were hemorrhages and ulcers. Microscopically the lesions consisted of mild to severe, focal to multifocal or diffuse degeneration, necrosis and ulceration of the koilin. This was accompanied by a thin to thick layer of fibrinosuppurative exudate mixed with bacteria either replacing or overlying the koilin and the mucosa. There was infiltration of heterophils and lymphocytes in the mucosa and the crypts were often dilated. Occasionally there was extension of inflammation in to the submucosa and muscular layers. In the upper digestive tract there were lesions suggestive of caustic changes of the mucosa characterized by hypertrophy and pale epithelial cells several layers thick most commonly in the pharynx but also in the tongue, esophagus and crop. Occasionally there was candidiasis of the mucosa in these organs.

No viral inclusions suggestive of adenovirus were found in the mucosa of the gizzard or the upper digestive tract. Feed and gizzard contents analyzed for biogenic amines either were negative or were in non-toxic concentrations. The cause of gizzard erosions in turkey poults and broiler chickens could not be determined. But there was history of using organic acids, chlorine dioxide, and hydrogen peroxide in the water to control bacteria in most of these cases. Therefore, it is probable that these products if used in excess and in combination of a low pH in the gizzard might have caused gastric irritation resulting in gizzard erosions and ulcerations as well as lesions in the upper digestive tract.

COMMON NUTRITIONAL DISEASES SEEN IN COMMERCIAL CHICKENS AND TURKEYS IN CENTRAL CALIFORNIA

ENFERMEDADES NUTRICIONALES COMUNES OBSERVADAS EN POLLOS Y PAVOS EN CALIFORNIA CENTRAL

H. Shivaprasad^A, R. Chin^A, S. Carnaccini^B, B. Charlton^B, and G. Senties^B

California Animal Health and Food Safety Laboratory System, Tulare^A and Turlock^B branches,
University of California, Davis

RESUMEN

A pesar de los grandes avances hechos en la nutrición aviar, se siguen observando casos de desnutrición de forma común en pollos y pavos. Varios factores como errores humanos, interacciones nutricionales, mala digestión y mala absorción debido a enfermedades, etc. pueden tener influencia sobre la presencia de las enfermedades o la desnutrición. Estas enfermedades incluyen dedos torcidos y parálisis debido a deficiencias de vitamina B2, encefalomalacia debida a deficiencias de vitamina E, ricketsia/osteomalacia debida a deficiencias de calcio, fósforo y vitamina D3 o una ambibalencia en la relación calcio:fósforo, así como lesiones oculares, en el sistema digestivo anterior, sistema respiratorio y lesiones bursales debidas a deficiencias de vitamina A. La perosis puede deberse en gran parte a la deficiencia de magnesio y la discondroplasia tibial puede deberse a factores genéticos y a desbalances de electrolitos. El raquitismo en pavos puede deberse a una mala absorción como resultado de enfermedades intestinales causadas por virus entéricos. Las enfermedades ocasionadas por desnutrición pueden ser diagnosticadas tentativamente en base a los signos clínicos y la patología en aves, y confirmarse por medio de análisis del alimento, serológicos y evaluaciones hepáticas.

SUMMARY

In spite of vast advances made in poultry, nutrition diseases of malnutrition are still observed rather commonly in chickens and turkeys. Various factors such as human errors, nutritional interactions, maldigestion and malabsorption due to diseases etc. can influence diseases of malnutrition. These diseases include curly-toe paralysis due to vitamin B2 deficiency, encephalomalacia due to vitamin E deficiency, rickets/osteomalacia due to calcium, phosphorus and vitamin D3 deficiency or an imbalance in the ratio of calcium to phosphorus and ocular, upper digestive, respiratory and bursal lesions due to vitamin A deficiency. Slipped tendon most likely due to deficiency of manganese and tibial dyschondroplasia probably due to genetics and electrolyte imbalance are also observed. Field rickets in turkey poults due to malabsorption as a result of intestinal diseases due to enteric viruses also occurs. Diseases of malnutrition can be tentatively diagnosed based on clinical signs and pathology in birds and confirmed by feed, serum and liver evaluations.

ABSTRACT

Nutrition is the process of furnishing the cells inside the animal with that portion of the external chemical environment needed for optimum functioning of the many metabolic and chemical reactions (Scott 1971). It involves procurement, digestion, and absorption of nutrients. Nutrients including amino acids, carbohydrates, fats, vitamins, inorganic chemical elements, energy, water and oxygen are essential for normal growth and development, livability, work and reproduction. These nutrients should be in proper concentration and balance to be effective.

In spite of vast advances made in poultry nutrition, diseases of malnutrition are still observed rather commonly in chickens and turkeys. Various factors can influence nutritional diseases in birds in general. It is important to understand these factors as they are necessary for taking corrective steps. These include human errors such as omission of an ingredient or two of groups of vitamins (water soluble and fat soluble), improper mixing, improper storage, miscomputations in feed formulations and misfeeding to wrong species or sex or age of the birds. Other important factors that can influence nutritional diseases include poor nutritive value of an ingredient, nutrient and mineral interactions, poor shelf life and insufficient feed availability. Poor health of the birds due to bacteria,

viruses, parasites and other causes can result in anorexia, dysphagia, maldigestion, malabsorption, decreased storage or utilization, increased excretion or secretion and increased requirements that can also cause malnutrition.

Malnutrition in poultry can result in a generalized or a specific disease. Specific disease conditions such as encephalomalacia or rickets are easy to diagnose and treat. But generalized or subclinical disease or signs such as loss of weight or failure to thrive due to marginal deficiencies of nutrients are very difficult to diagnose and treat. The latter are probably more common in the field than realized. Malnutrition can also suppress immune system, decreased reproductive performance, decrease weight gain, can cause feather problems and cause decreased response to therapeutic agents.

Diagnosis of malnutrition in poultry can generally be based on history such as recent feed change, clinical signs, gross and microscopic lesions, analysis of feed if available, liver and serum, serum chemistry, radiography of the birds and estimating peroxide levels in the feed which indicates rancidity. Feeding trials with suspected feed can also be performed but it can be time consuming, expensive and sometimes disappointing. Treatment is another option of diagnosing diseases; for example, curled toe paralysis due to riboflavin (vitamin B2) deficiency where the birds will respond to supplementation of riboflavin or multiple B vitamins if the condition is diagnosed and treated promptly.

Some of the common diseases of malnutrition seen in chickens and turkeys were rickets, osteomalacia/osteoporosis, encephalomalacia, curled toe paralysis, vitamin A deficiency, and occasionally slipped tendon.

One of the most common diseases of malnutrition seen in poultry was rickets, most likely due to calcium, phosphorus, and vitamin D3 deficiency or an imbalance in the ratio of calcium to phosphorus. Another manifestation of rickets, a condition called "field rickets" was also observed in turkey poults most likely due to malabsorption caused by damage to the tips of the intestinal villi by enteric viruses. Similar condition can also take place in broiler chicks such as in runting stunting syndrome but it has not been well documented. In cases of rickets, chickens and poults were often presented with clinical signs of being down on legs and increased mortality in the flock. Gross lesions include crooked keels, soft, pliable and bowing of long bones, beading of ribs and enlarged parathyroid glands. Similar lesions were also seen in adult laying chickens due to osteoporosis. Microscopic lesions due to rickets were quite characteristic in the physis of long bones in young birds and hyperplasia of chief cells in the parathyroid glands. Feed analysis confirmed rickets in some cases.

Encephalomalacia due to vitamin E deficiency has been observed in young chicks and turkey poults characterized by neurological signs of ataxia, head tilt and sudden death. Gross lesions of soft and enlarged cerebellum with petechiae and hemorrhage and microscopic lesions of malacia, hyalin thrombi, and hemorrhages were characteristic lesions of encephalomalacia.

Curled toe paralysis due to vitamin B2 (riboflavin) deficiency was primarily seen in young 9 to 27 d old broiler and pullet chicks characterized by ataxia, curled or non-curved toes, and increased mortality as high as 50 % in one instance. Gross and microscopic lesions in the nerves consisted of enlarged sciatic nerves, loss of cross striations, demyelination, and infiltration of lymphocytes. Prompt diagnosis followed by supplementation with multivitamins had a dramatic and positive effect on this condition.

Many cases of vitamin A deficiency were diagnosed primarily in turkeys at different ages: 3 to 6 and 11 to 19 wk old. Droopy birds with ruffled feathers, ocular discharge, failure to gain weight, and increased mortality were the primary clinical signs. Gross and microscopic lesions included caseous exudate in the ocular, upper digestive, respiratory systems, and in the bursa of Fabricius accompanied by squamous metaplasia of the cuboidal and columnar epithelial cells. Analysis of feed samples revealed either very low or no vitamin A.

Slipped tendon most likely due to deficiency of manganese was occasionally seen in a few turkeys and pullets characterized by swelling of the hock joint and slippage of the gastrocnemius tendon.

DETECTION OF CYTOLETHAL DISTENDING TOXIN (CDT) GENES IN *CAMPYLOBACTER JEJUNI* ISOLATED FROM CHICKEN CARCASSES

DETECCIÓN DE GENES DE LA TOXINA DISTENSORA CITOLETAL (CDT) EN CEPAS DE *CAMPYLOBACTER JEJUNI* AISLADAS DE POLLO EN CANAL

Y. Sierra-Arguello^{A*}, M. Trinidad^A, G. Perdoncini^A, and V. Pinheiro do Nascimento^A

^A Center for Diagnostics and Research in Avian Pathology (CDPA), Av. Bento Gonçalves, 9090. CEP 91540-000. Federal University of Rio Grande do Sul (UFRGS). Faculty of Veterinary Medicine (FAVET). Porto Alegre, Rio Grande do Sul, Brazil

*Corresponding author E-mail: yuli_melisasierra@yahoo.com - Fax: +55 (51) 3308-6130.

RESUMEN

Uno de los principales factores de virulencia relacionados a la patogenicidad de *Campylobacter jejuni* en infecciones humanas y animales es la toxina distensora citoletal (CDT), conduciendo a arresto del ciclo celular en G2/M y posterior muerte celular. Su actividad está codificada por el complejo de genes *cdt*, que consiste en tres genes adyacentes (*cdtA*, *cdtB*, *cdtC*). El objetivo del presente trabajo fue aislar e identificar cepas de *C. jejuni* a partir de carcasas refrigeradas de tres plantas de sacrificio del estado de Rio Grande del Sur, Brasil; detectar mediante la técnica de PCR la presencia del complejo de genes *cdt*. Treinta cepas de *Campylobacter jejuni* fueron aisladas e identificadas por métodos fenotípicos y genotípicos. La presencia del complejo *cdt* fue detectada en el 63,33% de las cepas aisladas, demostrando la alta posibilidad de la presentación de la toxina que está relacionada con la patogénesis de la diarrea inflamatoria en humanos.

SUMMARY

One of the major virulence factors related to the pathogenicity of *Campylobacter jejuni* in human and animal infections is the cytolethal distending toxin (CDT), leading to cell cycle arrest in G2/M and subsequent cell death. Its activity is encoded by the *cdt* gene operon, which consists of three adjacent genes (*cdtA*, *cdtB*, *cdtC*). In this work we isolated and identified strains of *Campylobacter jejuni* from refrigerated carcasses of three slaughter plants in the state of Rio Grande do Sul, Brazil and detected using PCR the presence of *cdt* genes operon. Thirty strains of *Campylobacter jejuni* were isolated and identified by phenotypic and genotypic methods. The *cdt* complex was detected in 63.33 % of the isolates, showing a high possibility of the introduction of this toxin which is linked to the pathogenesis of inflammatory diarrhea in humans.

INTRODUCTION

Campylobacteriosis is a zoonosis of worldwide distribution, with significant impact on public health. In recent years *Campylobacter* has been recognized as an emerging foodborne organism, which is widely distributed in the environment, well as acting as a pathogen or commensal bacteria of the gastrointestinal tract of domestic and wild animals. *Campylobacter* is widespread in nature and the principal reservoirs of these microorganisms are the alimentary tract of wild and domesticated birds (19). This microorganism is the principal cause of human gastroenteritis worldwide, but the disease can present as a spectrum from asymptomatic to severe bloody diarrhea. In rare instances this infection may be followed by sequelae including septicemia (5) and neuropathies such as Guillain-Barré syndrome (GBS) (3).

The pathogenesis of *Campylobacter jejuni* (*C. jejuni*) is poorly understood as compared to other enteric pathogens. Various pathogenic mechanisms like production of cholera like enterotoxin and cytotoxin and ability to adhere and invade epithelial cells have been proposed to play a role in the cases of enteritis (7, 15). CDT is encoded by three adjacent genes, *cdtA*, *cdtB*, and *cdtC*, and expression of all three *cdt* genes is required in order to produce active CDT (14). Thus, CDT toxin can act as a virulence factor in pathogens that produce this toxin, since genes are

active. Abuoun *et al.* (1) suggested that *cdtB* encodes the active/toxic component of the toxin, while *cdtA* and *cdtC* are involved with binding to and internalization into the host cell.

At that time, Peres *et al.* (13) first reported that the mechanism of mammalian cell intoxication by *E. coli* CDT involved arrest of the cell cycle at the G2/M phase. Soon after, these observations were extended to CDT produced by *Aggregatibacter* (formerly *Actinobacillus*) *actinomycetemcomitans* (17). Finally, Gelfanova *et al.* (10) demonstrated that the underlying mechanism of CDT-induced cell death involving apoptosis. It has been observed that CDT causes cell cycle blockage in several cell types (18) indicating that the action of CDT differs from other bacterial toxins. Thus, as *Campylobacter* may be transferred from animals to human, it is important to know whether all *Campylobacter* isolates obtained from different sources are equally virulent. To address this matter, thirty *C. jejuni* isolates from three slaughter plants in the state of Rio Grande do Sul, Brazil were selected and tested in the present study.

MATERIALS AND METHODS

Processing of carcasses. The refrigerated carcasses are rinsed in sterile polyethylene bags containing 400 mL of buffered peptone water (BPW 1%). 1 mL aliquot of each sample was removed and homogenized in 9 mL of Bolton broth supplemented with antibiotics and incubated in microaerophilic conditions (10% CO₂, 2% H₂, 5% O₂, and 80% N₂) for 48 h at a temperature of 41.5°C. 100µL of the suspension was filtered on a membrane with a 0.65 mM pore acetate, this membrane was spread on the surface of a charcoal cefoperazone deoxycholate agar (CCDA) plate (CM739, Oxoid®, with cefoperazone selective supplement SR 155E) for 30 min. The plate was incubated in microaerophilic conditions at 41.5°C for 48 h. Colonies suspected as being *Campylobacter* spp. were examined for cell morphology by phase-contrast microscopy (Olympus B201). The isolates were purified further on blood agar plates (BA; Blood Agar Base N.2, Oxoid, supplemented with sterile defibrinated ovine blood 5%). Single colonies were picked and streaked onto wet BA plates, and further characterized to species level by their catalase reaction ability to hydrolyze hippurate and indoxyl acetate. For the final identification of the suspect samples Multiplex-PCR technique (9) was used. The colonies were collected and resuspended in 1 mL of ultrapure water, transferred to microtubes, and later frozen at -20°C until DNA extraction. Isolates were stored with glycerol 15% at -80°C until required for further investigations.

Detection of *cdt* genes from *Campylobacter* isolates by PCR. Thirty *Campylobacter jejuni* isolated and identified by polymerase chain reaction (PCR) were used. As a positive control tests, was used the standard strain ATCC 29428 *Campylobacter jejuni*.

Standardization of protocols: Three pairs of primers for detection of CDT complex in *Campylobacter jejuni*, was selected based on Datta *et al.* (8) and Wiczorek *et al.* (19). The primers were: *cdtA* F: 5'CCTTGTGATGCAAGCAATC3' and *cdtA* R: 5'ACACTCCATTTGCTTTCTG3', *cdtB* F: 5'CAGAAAGCAAATGGAGTGTT3' and *cdtB* R: 5'AGCTAAAAGCGGTGGAGTAT3'; *cdtC* F: 5'CGATGAGTAAAACAAAAGATA3' and *cdtC* R: 5'TTGGCATTATAGAAAATACAGTT3'. The PCR conditions were adapted from Datta *et al.*(8). All PCR amplifications were performed in a mixture (30µL) consisting of 3 µL of the PCR buffer (10 – fold concentrated), 0.2 (5 U) of the Taq thermostable DNA polymerase (Invitrogen®), 1.25 µl of MgCl₂ (25 mM), 2.4 µL dNTPs (dATP, dCTP, dGTP and dTTP, each at 2.5 mM), 0.5 µL extracted template DNA and 1 µL of a 20 pM solution of each primer. Sterile Milli-Q water was added q.s.p 30 µL. All amplification reactions are performed in thermal cycler (Peltier Thermal Cycler Biocycler-MJ96 + / MJ96G). The 30 cycles was performed as follows: denaturation at 94°C for 1 min, annealing at a temperature specific to the primer pair (*cdtA* 47°C, *cdtB* 51°C and *cdtC* 49°C) for 1 min and extension at 72°C for 1 min. Part of this amplified sample was analyzed by electrophoresis in 2% agarose gels (Invitrogen®). DNA bands were stained with ethidium bromide and visualized with a UV transilluminator (ATTO®).

RESULTS

The primary goal of this work was to determine the frequency of *cdt* genes in *C. jejuni* isolates from chicken carcasses. The *cdt* gene cluster was detected in 63.33% isolates. Of the samples tested, 83.33% (25/30) were positive for *cdtA*, 63.33% (19/30) positive for *cdtB* and 86.66% (26/30) positive for *cdtC*. The high prevalence of toxin genes demonstrated that these putative pathogenic determinants are widespread among *Campylobacter* isolates from poultry. These results varied in agreement with the literature, which reports frequencies usually near 100% for all three genes. Datta *et al.* (8) reported a frequency of 100% for the genes in the studied samples, which included chicken, chicken feces, cattle feces and human clinical samples. Rozyneketal *et al.* (16) found 100% of prevalence in isolates from broiler carcasses. Wiczorek *et al.* (19) reported in samples of bird feces, 87.5% positive for *cdtA*,

75% and 90% for *cdtB cdtC*, respectively. In Brazil, there are few studies about CDT in *Campylobacter jejuni*. Carvalho *et al.* (6) searching *Campylobacter jejuni* in poultry carcasses reported CDT complex in only 36.4% of the samples. According to Martinez *et al.* (11), essentially all strains of *C. jejuni* have the *cdt* genes, and most have toxin activity. But there are exceptions of isolates that mutate and do not express the toxin activity. Asakura *et al.* (2) also observed that some *cdt* genes are not identified due to mutations as deletion, insertion or substitution of nucleotides, and suggest that these mutations may affect the activity of the toxin. Bang *et al.* (4) reported that toxin production is low or absent when mutations in regions of the *cdt* gene occur, however, according to Park (12), and even some strains are CDT negative, mutants retain some toxigenic activity. Our understanding of the ecology of CDT-producing bacterial species has greatly expanded and the molecular biology of CDT-induced cellular genotoxicity has improved significantly. However, the natural history and contribution of CDT produced by individual bacterial pathogens in the context of mucocutaneous colonization, initiation and persistence of infection and disease in their respective host niches remain incompletely understood.

REFERENCES

1. Abuoun, M., G. Manning, S. A. Cawthraw, A. Ridley, I. H. Ahmed, T. M. Wassenaar, D. G. Newell. Cytolethal distending toxin (CDT)-negative *Campylobacter jejuni* strains and anti-CDT neutralizing antibodies are induced during human infection but not during colonization in chickens. *Infect Immun.* 73, 3053–3062.10.1128/IAI.73.5.3053-3062. 2005.
2. Asakura, M., W. Samorsornuk, M. Taguchi, K. Kobayashi, N. Misawa, M. Kusumoto, K. Nishimura, A. Matsuhisa, S. Yamasaki. Comparative analysis of cytolethal distending toxin (*cdt*) genes among *Campylobacter jejuni*, *C. coli* and *C. fetus* strains. *Microb. Pathog.* v.42, p.174-183. 2007
3. Ang, C. W., M. A. De Klerk, H. P. Endtz, B. C. Jacobs, J. D. Laman, F. G. A. Van Der Meche, P. A. Van Doorn. Guillain-Barré syndrome- and Miller Fisher syndrome- associated *Campylobacter jejuni* Lipopolysaccharides induce anti-GM₁ and anti-GQ_{1b} antibodies in rabbits. *Infect. Immun.* 69, 2462-2472. 2001.
5. Bang, D. D., E. M. Nielsen, F. Scheutz, M. Madsen. PCR detection of seven virulence and toxin genes of *Campylobacter jejuni* and *Campylobacter coli* isolates from Danish pigs and cattle and cytolethal distending toxin production of the isolates. *J. Appl. Microbiol.* v.94, p.1003-1014. 2003.
6. Blaser, M. J., I. D. Berkowitz, M. LaForce, J. Cravens, B. Reller, W.-L. L. Wang. *Campylobacter* enteritis clinical and epidemiologic features. *Ann. Int. Med.* 91, 179-185. 1979.
7. Carvalho, A. F. *et al.* Detecção dos genes da toxina citoletal distensiva em estirpes de *Campylobacter jejuni* isoladas de carcaças de frangos. *Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.* v.62, n.5, pp.1054-1061. 2010.
8. Crushell, E., H. Sinead, F. Sharif, B. Bourke. Enteric *Campylobacter*: Purging its secrets? Review. *Pediatr. Res.* 55, No.1. 2004.
9. Datta, S. H. Niwa, K. Itoh. Prevalence of 11 pathogenic genes of *Campylobacter jejuni* by PCR in strains isolated from humans, poultry meat and broiler and bovine faeces. *J. Med. Microbiol.* v.52, p.345-348. 2003.
10. Denis, M., C. Soumet, K. Rivoal, G. Ermel, D. Blivet, G. Salvat, P. Colin. Development of m-PCR assay for simultaneous identification of *Campylobacter jejuni* and *C. coli*. *Letters in Appl. Microbiol.* 29, 406–410. 1999.
11. Gelfanova, V., E. J. Hansen, S. M. Spinola. Cytolethal distending toxin of *Haemophilus ducreyi* induces apoptotic death of Jurkat T cells. *Infect. Immun.* 67, 6394-6402. 1999.
12. Martinez, I., E. Mateo, E. Churruca, R. Alonso, A. Fernández-Astorga. Detection of *cdtA*, *cdtB*, and *cdtC* genes in *Campylobacter jejuni* by multiplex PCR. *Int. J. Med. Microbiol.* v.296, p.45-48. 2006.
13. Park, S.F. The physiology of *Campylobacter* species and its relevance to their role as foodborne pathogens. *Int. J. Food Microbiol.* v.74, p.177-188. 2002.
14. Peres, S. Y., O. Marches, F. Daigle, J. P. Nougayrede, F. Herault, C. Tasca, J. De Rycke, E. Oswald. A cytolethal distending toxin (CDT) from *Escherichia coli* producing CNF2 blocks HeLa cell division in G2/M phase. *Mol. Microbiol.* 24, 1095-1107. 1997.
15. Pickett, C.L., C.A. Whitehouse. The cytolethal distending toxin family. *Trends in Microbiol.* 7: 292-297. 1999.
16. Rizal, A., A. Kumar, A. S. Vidyarthi. Prevalence of pathogenic genes in *Campylobacter jejuni* isolated from poultry and human. *Int. J. Food Saf.* 12: 29-34. 2010.
17. Rozynek, E. *et al.* Prevalence of potential virulence markers in Polish *Campylobacter jejuni* and *Campylobacter coli* isolates obtained from hospitalized children and from chicken carcasses. *J. Med. Microbiol.* v.54, p.615-619. 2005.

18. Sugai, M., T. Kawamoto, S. Y. Peres, Y. Ueno, H. Komatsuzawa, T. Fujiwara, H. Kurihara, H. Suginaka, E. Oswald. The cell cycle-specific growth-inhibitory factor produced by *Actinobacillus actinomycetemcomitans* is a cytolethal distending toxin. *Infect. Immun.* 66, 5008-5019. 1998.
19. Whitehouse, C. A., P. B. Balbo, E. C. Pesci, D. L. Cottle, P. M. Mirabito, C. L. Pickett. *Campylobacter jejuni* cytolethal distending toxin causes a G2-phase cell cycle block. *Infect. Immun.* 66, 1934-1940. 1998.
20. Wiczorek, K., J. Osek. Comparison of two molecular methods for genotyping of *Campylobacter* sp. isolated from poultry. *Bull. Vet. Inst. Pulawy.* 52, 523-528. 2008.

ACKNOWLEDGMENTS

We would like to acknowledge CAPES Coordination of Qualification of Higher Education Faculty for their financial support.

THE INTERFACE OF SCIENCE AND POLICY IN DETERMINING SALMONELLA OUTBREAKS ATTRIBUTABLE TO POULTRY

EL PUNTO DE CONTACTO ENTRE LA CIENCIA Y LA POLÍTICA EN LA DETERMINACIÓN DE BROTES DE SALMONELLA ATRIBUIBLES A LA AVICULTURA

R. Singer

Department of Veterinary and Biomedical Sciences, College of Veterinary Medicine, University of Minnesota,
1971 Commonwealth Ave., St. Paul, MN 55108

RESUMEN

Salmonella sigue siendo un problema importante de salud humana, y si bien las enfermedades causadas por algunas bacterias transmitidas por los alimentos han disminuido, los casos de salmonelosis se han mantenido estables. Muchos de los casos de salmonelosis humana son atribuibles al consumo de aves. Muchas políticas recientes implementadas para reducir los riesgos para la salud humana asociados con aves contaminadas con *Salmonella* se basan en la detección de brotes causados por subtipos de los serotipos de *Salmonella*. Una determinación del brote objetiva y basada en la ciencia es esencial para que estas políticas proporcionen un beneficio real para la salud humana. Esta presentación explorará un evento reciente de salmonelosis que fue definido por el CDC como un brote causado por siete patrones diferentes de electroforesis en gel en un campo de pulsos (PFGE) de *Salmonella* Heidelberg. El objetivo de la presentación será entender la ciencia detrás de la determinación del brote y cómo la industria de la avicultura podría verse afectada en el futuro si esta definición se sigue utilizando.

SUMMARY

Salmonella continues to be a significant human health problem, and while illnesses due to some foodborne bacteria have decreased, salmonellosis cases have remained steady. Many human salmonellosis cases are attributable to the consumption of poultry. Many recent policies being implemented to reduce the human health risks associated with *Salmonella*-contaminated poultry are based on the detection of outbreaks caused by subtypes of *Salmonella* serotypes. A science-based and objective outbreak determination is essential if these policies are to provide a real benefit to human health. This presentation will explore a recent salmonellosis event that was defined by the CDC as an outbreak caused by seven different pulsed-field gel electrophoresis (PFGE) patterns of *Salmonella* Heidelberg. The objective of the presentation will be to understand the science behind the outbreak determination and how the poultry industry might be impacted in the future if this definition continues to be used.

ABSTRACT

Salmonella continues to be a significant human health problem, and while illnesses due to some foodborne bacteria have decreased, salmonellosis cases in the U.S. have remained steady (1). Many human salmonellosis cases are attributable to the consumption of poultry, with certain mathematical models of attribution in the U.S. estimating that as many as 48% of sporadic salmonellosis cases are attributable to poultry consumption (2). One possible explanation for the disconnect between *Salmonella* reductions in poultry over the past decade and the stable incidence rate of salmonellosis in humans is the continued reliance on prevalence-based performance standards (3).

Current policies being implemented to reduce human health risks associated with *Salmonella*-contaminated poultry are based on the detection of outbreaks caused by subtypes of *Salmonella* serotypes. For example, pulsed-field gel electrophoresis (PFGE) is commonly used to link illnesses due to *Salmonella*, to identify possible sources of these illnesses, and to determine if a possible outbreak of specific *Salmonella* subtypes is occurring. A science-based and objective outbreak determination is essential if these policies are to provide a real benefit to human health. This presentation will explore a recent salmonellosis event that was defined by the CDC as an outbreak caused by multiple different pulsed-field gel electrophoresis (PFGE) patterns of *Salmonella* Heidelberg. The objective of the presentation will be to understand the science behind the outbreak determination. Of critical importance, data that might be used to estimate the number of expected illnesses will be explored. Without a solid understanding of the

biases in the U.S. surveillance systems and of the number of illnesses that might be expected under normal conditions, outbreaks will be declared that might actually represent nothing more than the expected number of illnesses. If there is a desire to have performance standards predict public health risks, changes must be made in inspection practices so that they have a real relationship to public health outcomes.

REFERENCES

1. Centers for Disease Control and Prevention (CDC). Foodborne Diseases Active Surveillance Network (FoodNet): FoodNet Surveillance Report for 2011 (Final Report). Atlanta, GA: U.S. Department of Health and Human Services, CDC. 2012.
2. Guo, C., R.M. Hoekstra, C.M. Schroeder, S.M. Pires, K.L. Ong, E. Hartnett, A. Naugle, J. Harman, P. Bennett, P. Cieslak, E. Scallan, B. Rose, K.G. Holt, B. Kissler, E. Mbandi, R. Roodsari, F.J. Angulo, and D. Cole Application of Bayesian techniques to model the burden of human salmonellosis attributable to U.S. food commodities at the point of processing: adaptation of a Danish model. *Foodborne Pathog. Dis.* 8:509-516. 2011.
3. Williams, M.S., and E.D. Ebel Estimating changes in public health following implementation of hazard analysis and critical control point in the United States broiler slaughter industry. *Foodborne Pathog. Dis.* 9:59-67. 2012.

(A full-length article will be published.)

FIELD UTILIZATION OF AN INFECTIOUS LARYNGOTRACHEITIS ELISA

USO EN CAMPO DE UNA PRUEBA DE ELISA CONTRA LA LARINGOTRAQUEÍTIS INFECCIOSA

G. Slacum^A, R. Monleon^B, and B. van Leerdam^B

^ABioChek USA Corp., 3 Southgate Road, Scarborough, ME 04074, USA

^BBioChek B.V., Fokkerstraat 14, 2811 ER Reeuwijk, Netherlands

RESUMEN

La laringotraqueítis infecciosa (LTI), causada por el Herpesvirus aviar, es una infección respiratoria aguda y altamente contagiosa que afecta principalmente a los pollos. Los signos clínicos pueden variar desde tos, expectoraciones sanguinolentas, disnea rara a severa, y mortalidad por asfixia. Puede causar pérdidas económicas significativas debido a aumentos en la tasa de conversión alimenticia, mortalidad elevada y disminución en la producción de huevo. Los signos clínicos y las lesiones, de las cuales la traqueítis es la principal, pueden ser utilizados para realizar un diagnóstico presuntivo. Pruebas como histología, PCR y serología (ELISA y neutralización viral) son utilizadas comúnmente para confirmar el diagnóstico de LTI. Existe un debate sobre la efectividad de ELISA para el diagnóstico de LTI, ya que se presume que muy pocos anticuerpos humorales contra el virus de LTI se pueden detectar después de un desafío, debido a que la protección contra la LTI está regulada principalmente por la inmunidad mediada por células. Además, se ha presumido que el nivel de inmunidad humoral medido por los anticuerpos detectados en ELISA no se puede correlacionar con el nivel de protección en una parvada. Más aún, existe la percepción de que los títulos medidos por ELISA no son capaces de diferenciar entre una parvada vacunada y una no vacunada. Esta presentación resume lo que sabemos sobre la prueba BioChek ELISA en campo. En particular, se discutirá la utilidad de la prueba de ELISA para el diagnóstico de LTI, y cómo puede utilizarse para diferenciar entre parvadas vacunadas y no vacunadas y entre parvadas vacunadas y desafiadas.

SUMMARY

Infectious laryngotracheitis (ILT), caused by avian Herpesvirus, is an acute, highly contagious viral respiratory infection, principally affecting chickens. Clinically the signs can vary from coughing, bloody expectorations, and rales to severe dyspnea and mortality due to asphyxiation. It can cause significant economic losses due to increased feed conversion rates, elevated mortality, and decreased egg production. Clinical signs and lesions, of which tracheitis is the primary lesion, can be used for presumptive diagnosis. Histology, PCR and serology (ELISA and VN) are often used to confirm ILT diagnosis. There has been debate over the effectiveness of ELISA for ILT diagnosis as it has been presumed that very little humoral antibody against ILTV can be detected after challenge because protection for ILT is predominantly regulated through cell-mediated immunity. In addition, it has been presumed that the level of humoral immunity as measured by the antibodies detected in the ELISA cannot correlate with the level of protection in a flock. Furthermore, there is the perception that titers as measured by the ELISA are not capable of differentiating between a vaccinated and a non-vaccination flock. Interpretation of ILT ELISA (Biochek B.V., Reeuwijk, Netherlands) results has been shown to be most effective when all parameters, such as mean titer, percent positives, and vaccination index (VI) are evaluated simultaneously. With live TCO vaccines and recombinant vector vaccines, experimental data has shown that vaccine responses can be clearly distinguished from challenged flocks on the basis of mean titer response, percent positives and VI index. However, this is not true for live CEO vaccines. The main reason for this could be that CEO vaccines mimic field strains in immunogenicity and spreading capacity. Field data taken from non ILT vaccinated and non clinical broiler flocks at the age of 39 to 50 d have shown the ILT ELISA test to be highly specific (> 99%). Comparison data with other diagnostic methods show that the ELISA can be useful as a screening test. Because of the specificity of the test, detection of one or more positives in an unvaccinated broiler flock can be interpreted as suspect infection, but further confirmation with clinical symptoms and other laboratory tests such as histology and/or PCR is needed to confirm an ILT diagnosis.

AISLAMIENTO E IDENTIFICACIÓN DEL VIRUS H7N3 EN *HIRUNDO RUSTICA* (GOLONDRINA COMÚN) EN EL ESTADO DE JALISCO

ISOLATION AND IDENTIFICATION OF THE AVIAN INFLUENZA VIRUS SUBTYPE H7N3 IN THE COMMON SWALLOW (*HIRUNDO RUSTICA*) IN THE STATE OF JALISCO

E. Soto^A, J. María Wence^A, R. Viguera^B, J. Luis Borrego^A, D. Sarfati^A y B. Lozano^A

^ALaboratorio Avimex, S.A. de C.V. J.I. Bartolache 1862. Colonia del Valle, Delegación Benito Juárez. 03100.

México, D.F., México

^BDiagnósticos Clínicos Veterinarios, S.A. de C.V. Campesinos 224, Colonia Granjas Esmeralda, Delegación Iztapalapa. 09810, México, D.F., México

SUMMARY

It has been demonstrated that the avian influenza virus (AIV) in wild birds is a constant threat for poultry production due to the close relation that some wild birds like swallows (*Hirundo rustica*) and grackles (*Quiscalus mexicanus*) have with poultry farms. The recent outbreaks of the avian influenza (AI) virus H7N3 in different states of Mexico have caused large economic losses and it has been very important in some municipalities of the state of Jalisco.

This work has the objective of bringing information about the virus isolation and the AIV subtype H7N3 identification in swallows in the state of Jalisco, with the aim of documenting it, so in other affected zones by the disease the epidemiology surveillance in wild birds will be reinforced.

RESUMEN

Los virus de influenza aviar (VIA) en aves silvestres han mostrado ser una amenaza constante para la producción avícola debido a la cercanía que algunas aves silvestres como las golondrinas (*Hirundo rustica*) y zanates (*Quiscalus mexicanus*) tienen con granjas avícolas. Los recientes eventos del brote del virus H7N3 de Influenza Aviar (IA) en diferentes estados de la república mexicana han causado grandes pérdidas económicas y esto se ha visto de manera muy importante en algunos municipios del estado de Jalisco.

El presente trabajo pretende informar del aislamiento viral e identificación de VIA subtipo H7N3 en golondrinas en el estado de Jalisco, con la finalidad de documentarlo y que en zonas afectadas por este virus se fortalezca la vigilancia epidemiológica de la enfermedad en aves silvestres.

INTRODUCCIÓN

Los virus de influenza aviar (VIA) infectan principalmente a las aves acuáticas de vuelo libre como virus de baja patogenicidad, pero cuando infectan especies avícolas terrestres comúnmente cambian en su patogenicidad y causan la muerte de las aves domésticas criadas de manera intensiva, afectando también a otras especies avícolas e incluso a mamíferos. Durante el brote de VIA de alta patogenicidad (VIAAP) subtipo H5N1 que inició en Asia en el año 2004 se detectó la infección y muerte de cuervos silvestres, así como de gatos domésticos, tigres y leopardos en cautiverio.

El virus de influenza aviar de alta patogenicidad (VIAAP) subtipo H7N3 fue detectado en granjas avícolas de México y reportado el día 21 de junio de 2012. La afectación de parvadas por este virus fue observada primeramente en los municipios de Acatic y Tepatlán en el estado de Jalisco, en donde predomina la producción de gallinas comerciales productoras de huevo para plato, causando la muerte de gallinas y codornices comerciales con importantes daños económicos en la avicultura nacional.

OBJETIVO

Presentar el hallazgo de golondrinas comunes (*Hirundo rustica*) que enfermaron y murieron durante el brote de VIAAP subtipo H7N3 en el estado de Jalisco, de las cuales se obtuvo el aislamiento de este virus.

DESCRIPCIÓN

Durante el mes de septiembre de 2012 se observó la muerte repentina de golondrinas que se encontraban en los estacionamientos de las casas, iglesias y edificios de la ciudad de Tepatitlán, estado de Jalisco. En una sola mañana amanecieron alrededor de 40 a 50 golondrinas en el piso de una sola calle, repitiéndose esto en toda la ciudad. Algunas aves estaban muertas, mientras que otras presentaban incoordinación, incapacidad para caminar y epistótonos. Las aves que estaban en la calle e intentaban volar, únicamente subían alrededor de tres metros de altura y luego de cinco metros de distancias caían nuevamente al piso.

Dado que es en esta época en que las aves anidan, en el piso se encontraron muertas aves adultas pero también los polluelos que caían de los nidos. Esta mortalidad solamente fue observada en esa semana de septiembre.

Se tomaron golondrinas que acababan de morir y se congelaron completas para su envío, en cajas térmicas herméticas y desinfectadas al laboratorio de Diagnósticos Clínicos Veterinarios, S.A. de C.V. ubicado en la ciudad de México y debido a que el brote de VIAAP subtipo H7N3 en gallinas de postura se encontraba activo en la región, se solicitó el aislamiento de VIA en esos animales. El número de caso de recepción en el laboratorio fue el 12-3868, donde los resultados de las pruebas de virología de las golondrinas fueron positivos al aislamiento de VIAAP subtipo H7N3, identificado con anticuerpos monoclonales.

Inmediatamente se realizó el reporte correspondiente a la SAGARPA (25 de septiembre de 2012), quienes verificaron los hallazgos en el laboratorio de alta seguridad nivel 3 de CPA y finalmente lo reportaron a la Organización Mundial de Sanidad Animal (OIE).

CONCLUSIÓN Y COMENTARIOS

El VIAAP subtipo H7N3 fue aislado en este caso de golondrinas comunes (*Hirundo rustica*), causando su muerte, lo que demuestra que este virus tiene el potencial de infectar a las aves de vuelo libre que habitan en los alrededores de las granjas avícolas, por lo que es conveniente reforzar las medidas de bio-seguridad y de aislamiento sanitario de las mismas para evitar el contacto de las aves domésticas con la fauna silvestre.

REFERENCIAS

1. http://www.oie.int/wahis_2/public/wahid.php/Countryinformation/Countryreports
2. <http://www.birdlife.org/datazone/speciesfactsheet.php?id=7116&m=1> «Barn Swallow (*Hirundo rustica*) – BirdLife species factsheet» (en inglés). BirdLife International.
3. <http://www.repository.naturalis.nl/document/46434> Dickinson, Edward C.; Dekker, René W. R. J. (2001). «Systematic notes on Asian birds. 13. A preliminary review of the Hirundinidae». *Zoologische Verhandelingen (Leiden: Rijksmuseum van Natuurlijke Historie)* 335: pp. 127–144. ISSN 0024-1652.
4. Turner, Angela K.; Rose, Chris. *Swallows & martins: an identification guide and handbook*. Boston: Houghton Mifflin. pp. 164–169. ISBN 0-395-51174-7.1989.
5. L.D. Sims and I.H. Brown. Multicontinental epidemic of H5N1 HPAI virus (1996-2007). In: *Avian influenza*. Edited by. D.E. Swayne. Blackwell Publishing. 251-286. 2008.
6. D.E. Swayne. *Influenza*. In: *Diseases of Poultry*. 12th edition. Edited by Y.M. Saif, A.M. Fadly, J.R. Glisson, L.R. McDougald, L.K. Nolan and D.E. Swayne. Iowa State University Press. pp 153-184. 2008.

CALIFORNIA SHELL EGG FOOD SAFETY (SEFS) REGULATION CCR §1350

REGULACIÓN CCR §1350 DE LA SEGURIDAD ALIMENTARIA DEL CASCARÓN DEL HUEVO (SEFS) EN CALIFORNIA

K. Takeshita

CDFA, ESQM program

RESUMEN

California (CA) instituyó una nueva regulación SEFS en su código de regulación § 1350 para todas las parvadas mayores de 3000 gallinas de postura, incubadas el 1° de julio del 2013 o después y que vendan huevo en California. Las parvadas que cumplan con la SEFS deberán conocer los requerimientos la regla del huevo FDA del código federal de regulación § 118 para el control de *Salmonella* Enteritidis (SE) incluyendo registros, pollos provenientes de granjas reproductoras limpias de SE en E.U., pollitas que estén monitoreadas contra SE, premisas positivas para limpiar SE, bioseguridad, control de roedores, control de mosca, pruebas ambientales de SE y pruebas de SE en huevo. Además de los requerimientos de la regla FDA del huevo, CA SEFS CCR § 1350, se requiere de un documento que certifique que a los pollos se les realizan pruebas contra SE, pruebas contra SE antes de despoblar y dos vacunaciones con vacuna viva y una con vacuna muerta de SE.

Comenzando el 1° de enero del 2015, SEFS CRC §1350, se requerirá que las gallinas ponedoras sean alojadas en un espacio por ave utilizando la fórmula $(322 + [(n-1) \times 87.3])/n$, en donde “n” es el número de gallinas. Por ejemplo, se requerirá un mínimo de 116 pulgadas² por ave para 9 gallinas en un corral. Las parvadas que cumplan todos los requerimientos mencionado podrán vender huevo en California (CA), y los empaques deberán tener la leyenda “CA SEFS compliant”.

SUMMARY

California (CA) instituted a *new* SEFS regulation CCR (California Code of Regulation) § 1350 for all flocks with greater than 3000 laying hens, hatched July 1 2013 or later and selling eggs into CA. Flocks that are SEFS compliant must meet the FDA egg rule CFR (Code of Federal Regulation) § 118 requirement for *Salmonella* Enteritidis (SE) control including records, chicks from US SE clean breeders, pullets that are SE monitored, cleaning SE positive premise, biosecurity, rodent control, fly control, environmental SE testing and SE egg testing. In addition to the FDA egg rule requirements, CA SEFS CCR § 1350 requires chick paper SE testing, pre-depopulation SE testing and 2 live plus 1 killed SE vaccination.

Beginning in January 1, 2015, SEFS CRC § 1350 requires that layers be housed at a space per bird using formula $(322 + [(n-1) \times 87.3])/n$, where “n” equals the number of birds. For example a minimum 116 square inches per bird are required with a 9 birds in an enclosure. Flocks which meet all of the above requirements can sell eggs in CA and containers must be labeled “CA SEFS compliant.”

To support the consumption of high quality, safe eggs, the California Department of Food and Agriculture (CDFA) adopted a new Section 1350 (Shell Egg Food Safety) and amended Section 1354 (Product Labeling) of Title 3 of the California Code of Regulations. These regulations require any in-state or out-of-state egg producer or egg handler selling chicken eggs in California to implement *Salmonella enterica* serotype Enteritidis reduction measures and label products accordingly. These requirements will be implemented in phases beginning on July 1, 2013.

Phase 1, Effective July 1, 2013

Enhanced Salmonella Enteritidis (SE) Testing and Vaccination

- Applies to all flocks with 3,000 or more laying hens and a hatch date of 7/1/2013 or later, whose eggs are sold in California.
- Laying hens whose shell eggs are pasteurized or otherwise processed to reduce the risk of SE consistent with Food and Drug administration (FDA) regulations (5 log reduction) are exempt.

New California Shell Egg Food Safety Regulations
In Addition to the FDA Standards

1. Environmental SE Tests (Title 3, Section 1350)

a) While there may be various effective methods for environmental testing related to chicks being placed, the California Egg Safety rule requires that ten (one paper for every ten boxes of chicks) of chick papers be tested for *Salmonella* Enteritidis. Check with the laboratory you use for SE testing to determine the best way to submit samples. Currently the California Animal Health and Food Safety Laboratory is accepting three types of specimens:

1. Chick papers that are swabbed with pre-moistened (double strength skim milk or commercially available evaporated milk) 3x3 gauze pads *at the farm* after the chicks have been removed. One gauze pad is rubbed across the surface of the five papers and placed into a sterile plastic bag. After collection of up to ten papers (two gauze pads pooled), add approximately 15-30 ml double strength skim milk and deliver to laboratory within 48 hours after collection. Samples may be frozen if unable to deliver to laboratory within 48 hours.

2. Portions of chick papers totaling 25 grams should be cut out using disinfected scissors or torn out with sterile gloves, pooled in a sterile container and delivered to the laboratory *from the farm*.

3. Chick papers (one paper for every ten boxes of chicks) are removed at the farm and placed into a clean plastic trash bag and submitted to the laboratory within 48 hours of collection. Samples submitted by this method will be charged an additional processing fee and only samples from one producer will be set up per day

b) End of Production Testing: should take place at 2-4 weeks prior to the end of production and should include a minimum of sixteen swabs per flock that can be pooled in four swabs per bag.

2. SE Vaccination Program (Title 3, Section 1350)

a) Protocol includes a minimum of two attenuated live vaccinations and one killed or inactivated vaccination or a demonstrated equivalent SE vaccination program approved by CDFA. Vaccines are available through livestock supply companies or directly through the manufacturer.

Phase 2, Effective January 1, 2015

Reduced Stocking Density and Product Labeling

1. Reduced Stocking Density (Title 3 Section 1350)

a) Stocking density requirements apply to all chickens whose eggs are sold in California, regardless of flock size.

b) Requires a minimum floor space per hen dependent on the number of hens in the enclosure:

# Hens	1	2	3	4	5	6	7	8	>9
In ² /Hen	322	205	166	146	135	127	121	117	116

2. California Product Labeling (Title 3 Section 1354)

a) Grade and Size Designation: Where eggs are not produced by the person whose name appears on the label, the name shall be qualified by a phrase that reveals the connection such person has with such eggs; such as, “Produced for _____,” “Distributed by _____” or any other wording the expresses the facts.

b) The principal display panel for containers for all eggs sold in California must have the following statement: “California Shell Egg Food Safety Compliant” or equivalent approved by CDFA. The Statement shall be legible and plainly marked on each container in letters not less than ¼ inch in height.

**FDA Production, Storage and Transportation
of Shelled Eggs Regulation Guidance**
Title 21 CFR Section 118

FDA Egg Safety Standards require you create and implement a written SE prevention plan that is specific to each farm where eggs are produced and includes at minimum the SE prevention measures outlined in this guidance document.

One or more supervisory personnel must be appointed responsible for ensuring compliance with each farm's SE prevention plan. This person must have successfully completed training on SE prevention measures for egg production under a standardized curriculum recognized by the FDA or must be qualified through job experience.

This person is responsible for:

- Development and implementation of an SE prevention plan that is appropriate for your specific farm, reassessing and modifying the SE prevention plan as necessary to ensure that the requirements are met and reviewing records (does not need to have performed the monitoring or created the records).

The following records documenting your SE prevention plan must be maintained:

- Written SE prevention plan, with records of review, modification & corrective actions taken
- Documentation that pullets were “SE Monitored” or raised under “SE Monitored” conditions
- Records documenting compliance with SE prevention measures:
 - Biosecurity measures
 - Rodent and other pest control measures
 - Cleaning & disinfection procedures performed
 - Refrigeration requirements
 - Environmental and egg sampling procedures
 - Results of SE testing
 - Diversion of eggs
 - Egg treatment records

All records must include:

- Your name and location of farm
- Date and time of activity that the records reflects
- Signature/initials of person performing operation or creating records
- Data and information reflecting compliance activities

1. SE Prevention Measures (Title 21 CFR Section 118.4):

a) Pullets: obtain pullets that are from SE-monitored breeder flocks or raised under SE-monitored conditions. SE-monitored means pullets are raised under SE Control conditions, which include:

- Chicks obtained from SE-monitored breeder flocks that meet the National
- Poultry Improvement Plan’s standards for “US SE Clean” status.
- Pullet environment is tested for SE when pullets are 14 to 16 weeks old
- If test positive for SE take proper cleaning and disinfection steps, which
- include removal of all visible manure, dry cleaning to remove dust, feathers
- and old feed and disinfection with appropriate disinfection method

b) Biosecurity: limit visitors’ contact with poultry, protect against cross contamination between poultry houses through people and equipment, prevent stray poultry, wild birds, cats and any other animals from entering poultry houses and restrict employees from housing poultry at their personal homes. These biosecurity measures can be achieved by:

- Maintaining fencing and locked gates
- Providing a visitor log or a closed facility to visitors
- Dedicated cleaning and disinfection of poultry houses, clothing and hands

c) Rodents, Flies & Other Pest Control: perform rodent and fly counts on a regular basis and increase control as indicated by counts and remove vegetation in and around poultry houses to reduce harborage for pests

d) Cleaning & Disinfection: Performed before new laying hens are added to house and/or after positive environment or positive egg SE test. This can be accomplished by:

- removing all visible manure
 - dry cleaning poultry house to remove dust, feathers, old feed
 - following proper disinfection protocol of the poultry house following cleaning
- e) Refrigeration: eggs must be held or transported at 45 degrees F ambient temperature or below beginning 36 hours after time of lay
2. Environmental Testing for SE (Title 21 CFR Section 118.5):
- a) As one indicator of the effectiveness of your SE prevention plan, you must perform environmental testing within the poultry house for SE when the flock has reached 40 to 45 weeks of age and each time a flock is molted, beginning 4 to 6 weeks after the end of the molting process.
- b) The environmental test must utilize sampling techniques appropriate to the poultry house layout
3. Options for Positive SE Environmental Test:
- a) 14 to 16 Week Test
- you must begin egg testing within two weeks of the start of egg laying
- b) 40 to 45 Week and Post Molt Test
- review and make any necessary adjustments to your SE prevention plan to ensure that all measures are being properly implemented
 - begin egg testing or divert egg to treatment
4. Testing Eggs from SE Positive Flock (Title 21 CFR Section 118.6)
- a) You must conduct four tests (each test requires a collection of 1,000 intact eggs representative of a day's production), at two week intervals. If all four tests are *negative* no further egg tests are required.
- b) However, if any of the egg tests are *positive* you must divert* all eggs from that flock to treatment and repeat the testing protocol until all tests are negative.
- c) A *monthly egg test* (each test requires a collection of 1,000 intact eggs representative of a day's production) must be conducted if:
- you have a positive egg test;
 - divert eggs for treatment;
 - later meet the negative test result requirement; and
 - return to table egg production.
- c) If you have a positive monthly test you must divert all eggs from that flock for treatment for the life of the flock or until four egg tests conducted in two week intervals are all positive
- *NOTE: If you are diverting eggs, the pallet, case or other shipping container must be labeled and all documents accompanying the shipment must contain the following legible and conspicuous statement: **“Federal Law requires that these eggs must be treated to achieve at least a 5-log destruction of *Salmonella Enteritidis* or processed as egg products in accordance with the Egg Products Inspection Act, 21 CFR 118.6(f).”**
5. Treatment of Eggs from SE Positive Flock (Title 21 CFR Section 118.3)
- a) Requires utilizing a technology or process that achieves at least 5-log destruction of SE for shell eggs or the processing of egg products in accordance with the Egg Products Inspection Act (<http://www.fda.gov/RegulatoryInformation/Legislation/ucm148752.htm>).
6. Registration of Farms with FDA (Title 21 CFR Section 118.11)
- a) Shell egg producers are required to register their farms with FDA within 30 days of becoming an egg producer. Producers may register their farms by:
- Electronic Registration at <http://www.access.fda.gov>.
 - Mail or Fax using FDA Form no. 3733. The form can be requested by writing to the US Food and Drug Administration, 5600 Fishers Lane, (HFS-681), Rockville, MD 20857 or by calling 1-800-216-7331.

ANÁLISIS DE LOS RESULTADOS DE SENSIBILIDAD ANTIMICROBIANA REALIZADOS EN *ESCHERICHIA COLI* DE AVES DE MÉXICO DURANTE EL PERIODO 2005 A 2013

ANALYSIS OF THE RESULTS OF ANTIMICROBIAL SUSCEPTIBILITY IN *ESCHERICHIA COLI* IN BIRDS FROM MEXICO DURING THE PERIOD 2005-2013

E. Tapia^A, L. Santiago^A, R. Viguera^A, E. Soto^B, D. Sarfati^B y B. Lozano^B

^ADiagnósticos Clínicos Veterinarios SA de CV. México
Campeños 224, Colonia Granjas Esmeralda, 09810, México, D.F., México

^BLaboratorio AVI-MEX SA de CV. México
Bartolache 1862, Colonia Del Valle, 03100, México, D.F., México

SUMMARY

Antimicrobial susceptibility testing were performed on 371 *Escherichia coli* purified isolates obtained from bird's clinical cases from 2005 to 2013 using the disk diffusion method (sensidiscs) and following standardized guidelines approved by the National Committee for Clinical Laboratory Standards. The antimicrobials tested included amoxicillin, enrofloxacin, florfenicol, fosfomicin, furaltadone, gentamicin, neomycin, norfloxacin, and trimethoprim sulfaclopiridicina sodium. The results for the period indicate a high resistance of *Escherichia coli* to amoxicillin and trimethoprim sulfaclopiridicina sodium, and resistance to enrofloxacin, florfenicol, and fosfomicin, which begins to appear from 2010.

RESUMEN

Se realizaron pruebas de sensibilidad antimicrobiana en 371 aislamientos de *Escherichia coli* purificados obtenidos de casos clínicos de aves del año 2005 al 2013 utilizando el método de difusión con disco (sensidiscos) y siguiendo los lineamientos estandarizados y aprobados por el National Committee for Clinical Laboratory Standards. Los antimicrobianos probados incluyen amoxicilina, enrofloxacina, florfenicol, fosfomicina, furaltadona, gentamicina, gentamicina combinada con ácido nalidíxico, neomicina, norfloxacina y sulfaclopiridicina sódica con trimetoprim. Los resultados en el período indican que existe una gran resistencia de *Escherichia coli* hacia amoxicilina y sulfaclopiridicina sódica con trimetoprim y que a partir del 2010 comienza a presentarse resistencia a enrofloxacina, florfenicol y fosfomicina.

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 a *Escherichia coli* (*E. coli*) realizados en el laboratorio de Diagnósticos Clínicos Veterinarios durante nueve años en el periodo comprendido entre 2005 y 2013.

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 (NCCLS).

Las 371 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, purificadas e identificadas por pruebas bioquímicas, reacciones enzimáticas o pruebas de PCR.

Los antimicrobianos utilizados fueron amoxicilina (Amoxi), enrofloxacina (Enro), florfenicol (Flor), fosfomicina (Fosf), furaltadona (Fural), gentamicina (Genta), gentamicina combinada con ácido nalidíxico (Genta+Naldix), neomicina (Neo), norfloxacina (Nor) y sulfaclopiridicina sódica 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 de 66%.

RESULTADOS

Tabla 1. Resultados de las pruebas de sensibilidad antimicrobiana.

Resultados: Porcentaje Anual de Sensibilidad Antimicrobiana de <i>Escherichia coli</i>												
Antimicrobiano	Concentración en µg	2005	2006	2007	2008	2009	2010	2011	2012	2013	Promedio	
Amoxicilina	20 µg	● 29%	● 42%	● 27%	● 0%	● 36%	● 4%	● 15%	● 22%	ND	● 22%	
Enrofloxacina	5 µg	● 71%	● 79%	● 77%	● 75%	● 79%	● 45%	● 61%	● 54%	● 53%	● 66%	
Florfenicol	5 µg	● 78%	● 68%	● 78%	● 27%	● 77%	● 48%	● 47%	ND	● 30%	● 57%	
Fosfomicina	200 µg	● 85%	● 88%	● 69%	● 100%	● 83%	● 55%	● 54%	● 55%	● 53%	● 71%	
Furaltadona	300 µg	● 90%	● 100%	ND	● 100%	● 84%	● 85%	● 95%	● 92%	ND	● 92%	
Gentamicina	10 mg	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	● 83%	● 77%	● 80%	
Gentamicina + Ac nalidíxico	10 µg + 30 µg	● 100%	● 87%	● 96%	● 86%	● 94%	● 73%	● 59%	● 61%	● 59%	● 79%	
Neomicina	30 µg	● 100%	● 97%	● 100%	● 100%	● 100%	● 94%	● 98%	● 97%	● 100%	● 98%	
Norfloxacina	10 µg	● 67%	● 65%	● 78%	● 87%	● 91%	● 67%	● 79%	● 74%	● 50%	● 73%	
Sulfaclopiridazina + Trimetoprim	27.75 µg + 1.25 µg	● 13%	● 40%	● 19%	● 21%	● 58%	● 27%	● 17%	● 19%	● 20%	● 26%	

* ND: No disponible

- Bajo: menos de 33% de cepas sensibles.
- Medio: entre 33 y 66% de cepas sensibles.
- Alto: más del 66% de cepas sensibles.

CONCLUSIONES

Los antibióticos en los cuales se presentó mayor resistencia a las cepas evaluadas durante el periodo de 9 años fueron amoxicilina y sulfaclopiridazina + trimetoprim. Los antibióticos que presentaron un mayor sensibilidad fueron fosfomicina, furaltadona (prohibida en México), gentamicina, gentamicina + ácido nalidíxico, neomicina y norfloxacina.

A partir del año 2010 se observó un decremento en la sensibilidad de *E. coli* hacia Enrofloxacina, ya que de un 79% obtenido en el periodo 2005 - 2009, bajo a un 53% en el periodo 2010 - 2013; a florfenicol de un 66% en el periodo de 2005 a 2009 disminuyó a un 42% en 2010 - 2013 y hacia fosfomicina que de un 85% obtenido en el periodo 2005 - 2009, bajó a un 54% en el periodo 2010 a 2013.

REFERENCIAS

1. Gail L. Woods & John A. Washington. Antimicrobial Susceptibility Tests: Dilution and Disk Diffusion Method. In "Manual of Clinical Microbiology". Edited by Patrick R. Murray. 6th Ed. 1995.
2. Jorgensen, J. H., Ferraro, M.J., Craig, W.A., Doren, G.V., Finegold, S.M., Fung-Tomc, J., Hansen, S.L., Hindler, J., Reller, L.B., Swenson, J.M., Tenover, F.C., Testa, R.T., & M.A. Wikler. Performance Standards for Antimicrobial Disk Susceptibility Tests. Approved Standard. M2-A6, Vol 17, No. 1. The National Committee for Clinical Laboratory Standards. Approved by the American National Standards Institute. 6th ed. 1997.

CHITOSIN-ARGININE (CA) AS A BIOFILM-REDUCING WATER LINE TREATMENT

POLI (ACETIL ARGINIL) GLUCOSAMINA COMO MEDIO PARA REDUCIR LA BIOPELÍCULA EN LAS LÍNEAS DE AGUA

S. Tilley^A, S. Baker^B, M. Berrang^C, and C. Hofacre^A

^AUniversity of Georgia, PDRC, 953 College Station Rd. Athens, GA 30602

^BSyndegen, Inc. 1420 N Claremont Blvd. Suite 105D. Claremont, CA 91711

^CUSDA, ARS, RRC, 950 College Station Rd. Athens, GA, 30605

RESUMEN

La biopelícula que se forma en las líneas de agua de granjas avícolas son el sitio ideal para que los organismos residan, se repliquen y eviten la desinfección. La *Salmonella* es una preocupación siempre creciente en la sanidad alimenticia, por lo que se realizan esfuerzos cada vez mayores para controlar la exposición inicial. La poli (acetil arginil) glucosamina (PAAG) es un polímero derivado del chitosán natural que tiene propiedades antimicrobianas innatas y se sabe que las bacterias no desarrollan resistencia contra él. En otros estudios, la PAAG ha removido de manera exitosa biopelículas ya establecidas y ha prevenido la formación de las mismas. También se ha demostrado que las aves lo pueden consumir de manera segura. Utilizando un modelo de laboratorio para líneas de agua, una solución de PAAG redujo de manera efectiva el número de organismos de *Salmonella* adheridos.

El objetivo del presente estudio es cuantificar la dosis ideal para que se produzca el máximo efecto anti-película. Se propone el uso de la PAAG como un tratamiento intermitente para las líneas de agua con el fin de disminuir la presencia de biopelículas, especialmente de *Salmonella*.

SUMMARY

Biofilms in poultry water lines are an ideal place for infectious organisms to reside, replicate, and avoid disinfection. *Salmonella* is an ever increasing food safety concern; increased efforts are being made to control initial exposure. Poly (acetyl, arginyl) glucosamine (PAAG) is a natural chitosin derivative polymer that has innate antimicrobial properties and bacteria are not known to develop chitosin resistance. In other trials, PAAG has successfully removed established biofilms and prevented the formation of biofilms. It has also been shown to be safe for consumption by poultry. Using a laboratory model for water lines a solution of PAAG has effectively reduced the number of attached *Salmonella* organisms.

The aim of this study is to quantify the ideal dose for maximum anti-biofilm effect. PAAG is proposed for use as an intermittent water line treatment to decrease the presence of biofilms, specifically *Salmonella*.

ABSTRACT

Bacteria attach to a surface forming a biofilm which can hinder removal by common disinfectants (1). Some bacteria are better than others at forming biofilms but once it is formed many pathogens can reside in the matrix. *Salmonella* spp. have been shown to have some biofilm forming capabilities but will also dwell, replicate, and potentially infect poultry via water lines (1, 2, 3, 4). The aim of this study was to investigate the effect of a natural chitosan derivative polymer, Chitosan-arginine (CA) on the prevention and breakdown of biofilms with *Salmonella* Enteritidis. Varying concentrations of CA were used with an experimental design of poultry water lines colonized with *S. Enteritidis* for two waterline experiments. The Poly Vinyl Chloride (PVC) fittings were allowed to incubate with *S. Enteritidis* before CA addition and then permitted to incubate for another period of time before sampling. In both experiments the control, brain heart infusion (BHI) only groups showed *S. Enteritidis* levels of over 10^8 CFU/mL whereas the CA treated groups all decreased with the greatest decrease in 500-1000ug/mL CA.

INTRODUCTION

Food safety is an ever-growing concern for consumers and therefore the poultry industry, especially with *Salmonella* spp. Commercial poultry species can be exposed to pathogens by many methods including aerosol, environment, and water line contamination (4). The sanitation of poultry water lines can be difficult due to the limited options of disinfectants that can be used while the birds are drinking and varying success against biofilms (1, 2, 3). Common bacteria such as *Pseudomonas* spp., *E. coli*, and others are biofilm forming organisms. Water lines can harbor many organisms such as *Salmonella* spp., *Campylobacter* spp., and various viruses (4, 5). Limited effectiveness of disinfectants that can be used while birds are in the house has been seen as biofilm build-up of minerals and debris in poultry water lines. Disinfectants used after birds have left the farm can be very effective but have to be administered correctly and have a narrow influence on the other six wk when birds are on the farm. Chitosan-arginine is a natural product that has been demonstrated to have antibiofilm activity against a range of organism including Gram positive and Gram negative bacteria including *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Salmonella typhi*, *Staphylococcus aureus*, and *Listeria myonocytogenes*. The purpose of this study was to determine the effectiveness of a natural chitosan derivative polymer, Chitosan-arginine (CA), as a water line disinfectant against biofilm formation and degradation of biofilms.

MATERIALS AND METHODS

Experimental design. Polyvinyl chloride pipe (PVC) fittings were used as models for in-house poultry water lines. One portion of the experiment dealt with preventing biofilm formation on the PVC fittings while the other was testing the effect of breaking down pre-formed biofilms. A monoculture of *Salmonella* Enteritidis was inoculated in PVC fittings and allowed to attach. The *S. Enteritidis* was provided growth medium with treatments added of varying concentrations of Chitosan-arginine (CA) and allowed to incubate for variable times before sampling.

***S. Enteritidis* culture.** A monoculture of *Salmonella enterica* serovar Enteritidis (Culti-Loop ATCC 13076) was cultivated on 5% sheep blood agar plates (Remel, Lenexa, Kans.) and grown to a confluent lawn of the bacteria. The bacteria were collected and added to sterile phosphate buffered saline (PBS) until a McFarland standard of approximately 0.5 was reached, indicating a concentration of approximately 10^8 CFU/mL, this served as the *S. Enteritidis* solution.

Treatment groups. Chitosan-arginine solution (5mg/mL) was diluted by adding to 1/10 strength sterile BHI to achieve the following concentrations: A) No CA, B) 50ug/mL CA, C) 100ug/mL CA, D) 250ug/mL CA, E) 500ug/mL CA, and F) 1000ug/mL CA.

Biofilm development. The first portion of the experiment 50mL of *S. Enteritidis* solution was added to sterilized PVC fittings and incubated for 2 h at 25°C (6). After incubation the solution was poured off and the fittings were rinsed three times with sterile water using a 10mL syringe with slight force to remove non-adhering cells. Each fitting was then refilled with 50mL of 1/10 strength sterile BHI broth mixed with CA solution at the previously described concentrations. The treatment solution was incubated for 24 h at 25°C. After incubation the treatment solutions were poured off and the fittings were again rinsed three times with sterile water as described above.

The second portion of the experiment involved PVC pipe water lines from an experimental poultry house. They had a visible biofilm present and *Pseudomonas* spp. was cultured. These pipes were cut into 10 cm pieces and inoculated in the same fashion as previously described but only treatments A (no CA), E (500ug/mL CA) and F (1000ug/mL CA) were tested in the same fashion as before. After the initial 24 h incubation with treatment mixture the solution was poured off and new treatment mixture was added, incubated for another 24 h period at 25°C, this was repeated a third time for one of the replicates.

Sampling. Assessment of preventing biofilm development involved sampling fittings 24 h after treatment mixture was added. Testing for biofilm breakdown involved two replicates being sampled 48 h post inoculation and one 72 h post inoculation.

Folding 4x4 pads into quarters, moistening with water, and wrapping in foil before autoclaving created sterilized gauze pads. After rinsing to remove non-adherent cells with sterile water, the pipes were sampled with sterilize gauze pads by using aseptic technique and wiping internal surface three consecutive times. The sample gauze was placed in sterile Whirl-Pak[®] bags with 5mL of sterile PBS. The samples were stomached for 60 seconds and 100uL of fluid was removed for diluting. Ten fold serial dilutions were made on each sample with sterile PBS and each dilution was plated (10uL in triplicate for each sample – 30uL total) on 5% blood agar plates. The plates were allowed to incubate at 37°C for 24 h before enumeration. The number of colonies for each was counted and averaged for each dilution. Only attached cells were recorded.

RESULTS/DISCUSSION

Preventing biofilm formation. In the control group (A), more than 10^8 CFU/mL were detected. Each treatment group lowered the log of colonies per mL but it varied based on the CA concentration. In treatment groups E (500ug/mL CA) and F (1000ug/mL CA) there was about a 10^3 CFU/mL reduction.

Breaking down biofilm. The control group (A) averaged the highest concentration of *S. Enteritidis* (10^9 CFU/mL) and groups E and F were lower concentrations, 10^3 CFU/mL and 0 CFU/mL respectively. It could be theorized that a water line treatment of CA on a weekly or biweekly basis from the time the birds are placed until processing may prevent the development of a biofilm and act to break down any newly developed biofilms.

REFERENCES

1. Costerton, J.W., et al., *Microbial Biofilms*. Annual Review of Microbiology, 1995. **49**(1): p. 711-745.
2. Schonewille, E., et al., *Biofilm building capacity of Salmonella enterica strains from the poultry farm environment*. FEMS Immunology & Medical Microbiology, 2012. **65**(2): p. 360-365.
3. Marin, C., A. Hernandez, and M. Lainez, *Biofilm development capacity of Salmonella strains isolated in poultry risk factors and their resistance against disinfectants*. Poultry Science, 2009. **88**(2): p. 424-431.
4. Amaral, L.d., *Drinking water as a risk factor to poultry health*. . Revista Brasileira de Ciencia Avicola, 2004. **6**(4): p. 191-199.
5. Zimmer, M., et al., *Detection of Campylobacter jejuni Strains in the Water Lines of a Commercial Broiler House and Their Relationship to the Strains That Colonized the Chickens*. Avian Diseases, 2003. **47**(1): p. 101-107.
6. Berrang, M.E., J.F. Frank, and R.J. Meinersmann, *Effect of Chemical Sanitizers with and without Ultrasonication on *Listeria monocytogenes* as a Biofilm within Polyvinyl Chloride Drain Pipes*. Journal of Food Protection, 2008. **71**(1): p. 66-69.

(The full-length article will be published in the *Journal of Applied Poultry Research*.)

USE OF ARTIFICIAL NEURAL NETWORKS TO CLASSIFY THE ANTIMICROBIAL RESISTANCE AND THE RELATIONSHIP OF 38 GENES ASSOCIATED WITH THE VIRULENCE OF *ESCHERICHIA COLI* ISOLATES FROM BROILERS

USO DE REDES NEURALES ARTIFICIALES PARA CLASIFICAR LA RESISTENCIA ANTIMICROBIANA Y LA RELACIÓN DE 38 GENES ASOCIADOS CON LA VIRULENCIA DE *ESCHERICHIA COLI* AISLADA DE POLLOS DE ENGORDA

D. Tonini da Rocha, F. de Oliveira Salle, S. Luis da Silveira Rocha, H. Luiz de Souza Moraes,
and C. Tadeu Pippi Salle

Center for Diagnosis and Research in Avian Pathology (CDPA) of the Veterinary School, Federal University of Rio Grande do Sul (UFRGS), Porto Alegre, Brazil

RESUMEN

Escherichia coli es responsable de varios procesos patológicos en los pollos de engorda. Este estudio demuestra que es posible predecir el uso de antimicrobianos evaluando 38 genes distintos responsables de factores de virulencia, a través de redes neurales artificiales (ANN). Además, se encontró la relación entre el índice de patogenicidad y la resistencia a 14 antimicrobianos que formaban parte de la base de datos utilizada para este estudio (muestras aisladas de parvadas de pollos de engorda, lesiones de celulitis y síntomas respiratorios). Los resultados muestran que la ANN es capaz de llevar a cabo una correcta clasificación del comportamiento de las muestras con una amplitud de 74.22% a 98.44%, haciendo posible predecir la resistencia al antibiótico. El análisis estadístico llevado a cabo para evaluar la relación entre el índice patogénico (PI) y la resistencia a 14 antibióticos demostró que estas variables son independientes. Esto es, su máximo puede ocurrir en PI sin que ocurra un cambio en la resistencia al antimicrobiano, o incluso lo opuesto, cambios en la resistencia al antimicrobiano sin cambios en el PI.

SUMMARY

Escherichia coli is responsible for various pathological processes in poultry (1). This study demonstrated that it is possible to predict the antimicrobials's use, testing thirty-eight distinct genes responsible for virulence factors, through artificial neural networks (ANN). Also, it was found the relationship between pathogenicity index and resistance to fourteen antimicrobial forming part of the database used for the development of this study (samples isolated from broiler litter, lesion of cellulitis and respiratory symptoms). The results show that the ANN is capable of performing correct classification of the samples' behavior with an amplitude of 74.22% to 98.44%, making it possible to predict the antibiotic resistance. The statistical analysis performed to assess the relationship between pathogenic index (PI) and resistance to 14 antibiotics showed that these variables are independent. That is, peaks can happen in PI without change in antimicrobial resistance, or even the opposite, changes in antimicrobial resistance without changes in PI.

INTRODUCTION

The avian pathogenic *Escherichia coli* (APEC), belonging to the family Enterobacteriaceae, is responsible for various pathological processes in poultry, acting as an agent in the primary or secondary lesion such as: aerosacculitis, pericarditis, perihepatitis, peritonitis, salpingitis, omphalitis, cellulitis, among others (1). This study addresses the antimicrobial resistance of *E. coli* (APEC) strains in an innovative way, using tools such as artificial neural networks, methodology embedded in the CDPA's research line (Center for Diagnostics and Research in Avian Pathology). The use of artificial intelligence, specifically ANNs, is being increasingly used as a tool for data analysis and nonlinear multivariate, common feature in biological phenomena (2). The objective of this study was to demonstrate that it is possible to predict the use of antimicrobials, using thirty-eight distinct genes responsible for virulence factors, derived from *Escherichia coli* isolates from broiler, through ANNs. Also, it was found the

relationship between pathogenicity index (PI) and resistance to fourteen antimicrobial forming part of the database used for the development of this study.

MATERIALS AND METHODS

The data used in this study was collected in a database generated at the CDPA Veterinary Faculty, Federal University of Rio Grande do Sul. Information on 246 isolates of *Escherichia coli* was used as follows:

- Characterization of 38 genes associated with pathogenicity (*crl*, *ireA*, *cnf1/2*, *tia*, *sat*, *fyuA*, *mat*, *sfa/focCD*, *malX*, *afa/drab*, *neuC*, *iha*, *hrlA*, *fimC*, *pic*, *hlyA*, *kpsMTII*, *sitDep*, *ompA*, *iroN1*, *gimB*, *sitD*, *trafT*, *ibeA*, *chuA*, *vat*, *tsh*, *iucD*, *cvi/cva*, *papC*, *irp2*, *iss*, *EAST1*, *felA*, *iutA*, *cvaC*, *papG*, *fimH*)
- Antimicrobial resistance to 14 antibiotics (amikacin, amoxicillin/clavulanic acid, ampicillin, cephalexin, ceftiofur, cefuroxime, ciprofloxacin, clindamycin, cotrimoxazole, enrofloxacin, gentamicin, norfloxacin, ofloxacin, and tetracycline)

The artificial neural networks were constructed using the Neuroshell Classifier 2.1 software (Ward Systems Group, Inc., Frederick, MD, USA, 1997- 2000).

The results available were transformed into a binary form. Thus, the negative results are represented by number 0 and the positive ones by 1. This criterion was used for sensitivity (0) or resistance (1) to the 14 antibiotics studied, to the absence (0) or presence (1) of genes associated with pathogenicity, to the absence (0) or presence (1) of the different lesions observed in the chicks. Non-motile isolates were represented by 0 and motile isolates by 1. As to the origin of isolates, it was necessary to add one more value and the data was noted as follows: litter (0), cellulitis (1) and respiratory cases (2).

In this study, based on the methodology used by Salle (3), the inputs chosen to construct the artificial neural networks were the 38 genes associated with pathogenicity. The outputs used were the behavior of *Escherichia coli* strains against 14 antibiotics.

The significant difference between the mean levels of pathogenicity and the sensitive and resistant to the 14 antibiotics used in this study was observed when samples was performed statistical analysis with the aid of JMP ® 9.0.1 software (SAS Institute Inc., 2010).

RESULTS AND DISCUSSION

Table 1 shows the characteristics of artificial neural networks constructed with the inputs 38 genes associated with virulence. The outputs were the resistance or susceptibility to 14 antibiotics studied by Salle (3).

According to the results of Table 1, it was observed that the correct ratings had a range of 74.22 % to 98.44 %. Now with regard to sensitivity and specificity of the classifications, the results showed that the range of sensitivities of ratings was from 0% to 100 % for the intermediate samples, 0 % to 87 % for resistant, and 62 % to 100% sensitive. Referring to the specificity, the results were 98 % to 100 % for the intermediate samples, 50 % to 99 % for resistant and 0 % to 87 % for the sensitivity.

This study agreed with the conclusions obtained by Salle *et al.* (4) has shown that it is possible, in a simplified way, using only the 38 genes associated with virulence obtain conclusive results regarding antimicrobial resistance. Also it is possible to conclude that: if there is suspicion of infection by *Escherichia coli*, and this sample was identified through traditional microbiological techniques, now using technologies like polymerase chain reaction (PCR), tool that elucidated the genes associated with virulence factors combined with the use of Artificial Neural Networks, is possible to define what is the best treatment to that sample.

The results obtained from statistical analysis of the pathogenicity index and the 14 antimicrobials that were analyzed in this study showed no significant differences between the averages: Pathogenicity index (PI) and the antimicrobial resistance of the samples. Also, it was noticed that these variables were independent, namely, it is possible to observe peaks of PI without any changes in antimicrobial resistance or the contrary.

REFERENCES

1. KABIR, S.M.L. Avian colibacillosis and salmonellosis: a closer look at epidemiology, pathogenesis, diagnosis, control and public health concerns. Int. Environ. Res. Health. 2010.
2. 2. FACELI, K. *et al.* Inteligência artificial uma abordagem de aprendizado de máquina. Rio de Janeiro: LTC, 2011.
3. 3. SALLE, F. O. Utilização de Inteligência Artificial (Redes Neurais Artificiais) para a classificação da resistência a antimicrobianos e do comportamento bioquímico de amostras de *Escherichia coli* isoladas de frangos

de corte. Tese (Doutorado em Ciências Veterinárias), Universidade Federal do Rio Grande do Sul. 2009.

4. 4. SALLE, F.O. *et al.* Use of artificial intelligence (artificial neural networks) to classify antimicrobial resistance from *Escherichia coli* samples isolated from broilers. In: 60th Western Poultry Disease Conference, 2011, Sacramento. Proceedings 60th Western Poultry Disease Conference.

Table 1. Classification of bacterial resistance (intermediate, resistant or sensitive) of 256 samples of *Escherichia coli* to 14 antibiotics using artificial neural networks, as input the 38 genes associated with virulence.

Outputs	Inputs	Correct classifications (%)	S (i)*	E (i)	S (r)	E (r)	S (s)	E (s)
Amikacin	Genes	97,27	0,0	1,0	0,0	1,0	1,0	0,0
Amoxicillin + Clavulanic acid	Genes	98,05	1,0	1,0	0,0	1,0	1,0	0,37
Ampicillin	Genes	82,42	0,72	1,0	0,36	0,98	0,98	0,41
Cephalexin	Genes	94,92	0,6	1,0	0,41	0,99	0,99	0,5
Ceftiofur	Genes	96,88	0,57	1,0	0,71	1,0	1,0	0,61
Cefuroxime	Genes	96,09	0,0	1,0	0,28	1,0	1,0	0,16
Ciprofloxacin	Genes	85,94	0,75	1,0	0,55	0,97	0,97	0,61
Clindamycin	Genes	98,44	0,5	1,0	1,0	0,5	0,5	1,0
Cotrimoxazole	Genes	74,22	1,0	1,0	0,72	0,75	0,74	0,73
Enrofloxacin	Genes	75,78	0,42	0,98	0,53	0,94	0,94	0,55
Gentamicin	Genes	88,67	-	-	0,35	0,99	0,99	0,35
Norfloxacin	Genes	88,28	0,55	1,0	0,34	1,0	1,0	0,42
Ofloxacin	Genes	89,45	1,0	1,0	0,24	0,99	0,99	0,5
Tetracycline	Genes	77,73	1,0	1,0	0,87	0,63	0,62	0,87

* S (i): sensitivity for isolates with intermediate resistance
 E (i): specificity for isolates with intermediate resistance
 S (r): sensitivity to resistant isolates
 E (r): specificity for resistant isolates
 S (s): sensitivity for sensitive isolates
 E (s): specificity for sensitive isolate

TENOSYNOVITIS IN BROILERS IN QUEBEC: THE COMPLEX RELATIONSHIP WITH REOVIRUS

TENOSINOVITIS EN POLLOS DE ENGORDA EN QUEBEC: LA COMPLEJA RELACIÓN CON REOVIRUS

J.P. Vaillancourt^A and D. Tremblay^B

^ADepartment of Clinical Sciences, Faculty of Veterinary Medicine, University of Montreal, CP 5000, St-Hyacinthe, Qc, Canada J2S 7C6

^BLaboratoires de diagnostic moléculaire et virologie, Faculty of Veterinary Medicine, University of Montreal, CDEVQ, 3220 Sicotte, St-Hyacinthe, Qc, Canada J2S 2M2

RESUMEN

En 2012 y 2013, un gran número de parvadas se han visto afectadas con tenosinovitis la cual se ha observado durante el sacrificio de pollos de engorda en Quebec. Se realizó un estudio comparando 13 parvadas afectadas (del 5 al 20 % de las aves con lesiones) con 27 parvadas control (no se observaron aves con lesiones) de la misma región y sacrificados en el mismo día como casos. Se recogieron muestras de tejido de 5 aves de cada parvada, así como muestras de sangre (ELISA). El trabajo de diagnóstico incluyó PCR, aislamiento viral y secuenciación; también se recopiló información sobre rendimiento de la parvada. Los títulos serológicos fueron significativamente mayores en las aves de las parvadas con casos en comparación con las parvadas control. Pero lo más probable es que se diagnosticara la infección por reovirus tanto en los casos como en los controles, basándose en PCR y / o cultivo. Se identificaron siete cepas diferentes de reovirus, y algunas de estas cepas se aislaron a partir de parvadas casos y controles. También se discutirán otros factores de riesgo (incluyendo nutricional).

SUMMARY

In 2012 and 2013, a large number of flocks were affected with tenosynovitis observed at slaughter in broilers in Quebec. A study was conducted comparing 13 affected flocks (5 to 20% of birds with lesions) to 27 control flocks (no birds with lesions observed) from the same region and slaughtered on the same day as cases. Tissue sampling was collected on five birds per flock as well as blood samples (ELISA). Diagnostic work included PCR and virus isolation and sequencing. Information was also collected about flock performances. Serological titers were significantly higher in birds from case flocks compared to control flocks, but reovirus infection was just as likely to be diagnosed in cases and controls based on PCR and/or culture. Seven different strains of reovirus were identified, and some of these strains were isolated from case and control flocks. Other risk factors (including nutritional) will also be discussed.

ABSTRACT

Tenosynovitis is one of the clinical manifestations of avian reovirus infection in chickens, particularly in meat-type chickens. In 2012 and 2013, a large number of chicken broiler flocks were affected with tenosynovitis and observed at slaughter in broilers in Quebec. Observed lesions included swollen shanks and hocks, excessive synovial fluid, enlargement of gastrocnemius/digital flexor tendon area, rupture of tendons resulting in subcutaneous hemorrhages leading to a greenish discoloration over the site of the rupture.

A series of variants, much different from vaccine strains and associated with leg problems in broilers, has also been identified in different regions of North America since 2012 (1). The emergence and reemergence of reovirus-related diseases over the years in poultry make this virus a pathogen of interest as primary or secondary agent.

At the request of two slaughter plants from different companies, a study was designed based on discussions with field veterinarians and a poultry pathologist (Drs Ghislain Hébert, Louise Mercier, Mona Morin, and Daniel Venne). A case-control study was conducted comparing 13 affected flocks (5 to 20% of birds observed with lesions at slaughter) to 27 control flocks (no birds observed with similar lesions) from the same region and slaughtered on the same day at the same slaughter plant. The case and control flocks came from the two slaughter plants that had requested the work.

Shanks and blood samples (for reovirus ELISA testing) were collected from 11 birds from each flock. Six of the 11 shanks were stored at -76°C , and tendons from the other five shanks were sampled for PCR and virus isolation. Information was also collected about flock performances.

Viruses were isolated and/or detected at the Faculté de médecine vétérinaire of the University of Montreal (FMV-UdeM) virology and molecular diagnostic laboratories. Briefly, 200 mg of fresh tissues was grinded with the Biospec Mini Bead-beater (BioSpec Products Inc., Bartlesville, OK). Viruses were propagated by serial passage into bursal reticuloepithelial (REP) cells with Hanks medium supplemented with 10% fetal bovine serum (FBS) and 1% penicillin/streptomycin. Extraction of nucleic acid was performed with 200 μL of viral suspension, using the fully automated sample preparation Qiacube and the QIAamp cadior Pathogen Mini Kit (QIAGEN Inc., Valencia, CA) according to the manufacturer's instructions. Amplification of partial S1 gene was then executed. Viral dsRNA was first denatured 10 min at 95°C in presence of primers Forward-Reo-SEQ-S1: 5' TGATACTGTCAATTGACTTCGAACGTG-3' and Reverse-REO-SEQ-S1: 5' ATCCCCGTACGGCGCGCCACAC-3'. Reverse transcription of the RNA and amplification of the cDNA were performed with Qiagen One-Step RT-PCR kit. PCR products were purified with the Omega Bio-Tek E.Z.N.A. Cycle-Pure Kit (Omega Bio-Tek Inc., Norcross, GA). Sequencing was performed using the same primer sets used in the reverse transcription-PCR, with standard automated sequencing methods (FMV Sequencing Laboratory, BigDye Terminator sequencer version 3.1 [ABI 310]; Applied Biosystems, Foster City, CA). The resulting sequences were compared with sequences of vaccine strains and strains available in the GenBank database. Software (BioEdit sequence alignment editor version 7.0.9; Ibis Therapeutics, Carlsbad, CA) using the CLUSTAL W alignment method was utilized and an unrooted phylogenetic tree of the S1 gene was constructed by using the distance-based neighbor-joining method. Bootstrap values were calculated for 1,000 repeats of the alignment.

Although mortality was slightly higher on average in case flocks (2.52%) compared to controls (1.81%), the difference was only marginally significant ($p = 0.08$). Total carcass condemnations (excluding parts condemned) did not differ statistically between the two groups (cases: 1.33% versus controls: 1.52%).

On average, serologic titers were higher in birds from case flocks (2264) compared to controls (1279). However, reovirus infection was as likely to be diagnosed in cases as in controls based on PCR and/or culture. Indeed, of 13 cases, eight were PCR positive and/or culture positive, while 17 of the 27 control flocks were PCR and/or culture positive. In fact, when comparing flocks with tissue samples showing typical microscopic lesions associated with reovirus infection to flocks with no such lesions, no significant difference could be found. Six different strains of reovirus were identified, and some of these strains were isolated from case and control flocks. They were all significantly different from vaccine strains. Some isolates were very similar to strains previously identified in the neighboring province of Ontario, some were similar to strains isolated in Georgia, and others were closely related to strains previously sequenced in Israel. Table 1 below summarizes the information for isolates that appeared very similar, yet were found in case as well as control flocks.

Results from this small study confirm that reoviruses can be isolated from normal and affected birds (2). Although reovirus may certainly play a role in the presence of gross lesions observed at slaughter, it was not possible to clearly identify a strain responsible for the problem. There was also no clear relationship between reovirus strain and the hatchery of origin. Although reovirus may persist in birds longer than processing age (3), it is possible that the virus may no longer be isolated by that time. Therefore, without sequencing, diagnostic efforts (serology, virus isolation, PCR) are of little value when investigating such problems. Further work is being carried out to sequence the whole genome of the virus strains equally found in case and control flocks in order to determine whether they are identical or not. If this proves to be the case, the question would be which risk factors are required to allow these viruses to cause disease. Some of these factors may be related to the environment of the affected flocks. Nutritional factors should also be considered. For example, Timms (4) demonstrated that a 12.5% rapeseed diet had an impact on the production of leg abnormalities caused by avian reovirus in male broiler chickens. The current emergence of reovirus strains that are much different from vaccinal strains shows that the problem is likely multifactorial with risk factors that have yet to be identified.

REFERENCES

1. Rosenberger J.K. et al. 2013. Novel reovirus in broilers associated with arthritis/tenosynovitis : viral characterization and research. Proceedings of the National Meeting on Poultry Health, Processing and Live Production. Ocean City, October 2013.
2. Jones, R.C., Reovirus Infections. In: Diseases of Poultry, 13th ed. D. Swayne, J.R. Glisson, L.K. Nolan, D.L. Suarez, V.L. Nair, eds. Wiley-Blackwell. pp. 351-370. 2013.
3. Islam, M.R. Reovirus infection in chickens. PhD Thesis. University of Liverpool. 1988.

4. Timms, L.M., Influence of a 12.5 per cent rapeseed diet and an avian reovirus on the production of leg abnormalities in male broiler chickens. Res. Vet. Sci. 38 (1): 69-76. 1985.

Table 1.

Similarity with	Flock status	Lesions ^A		Bacterial culture	Serologic titer ^B	Hatchery ID ^C	Slaughter plant ID
		Gross	Histo				
Ontario variant	Case	Yes	Yes	Staph ^D	2716	3	2
	Control	No	No	-	346	2	1
Israel variant	Case	No	Yes	-	2139	4	2
	Control	No	No	-	958	5	1
	Control	No	Yes	-	1243	3	1
	Control	No	Yes	-	980	4	1
	Control	No	No	-	756	3	1

^ALesions compatible with reovirus infection (yes versus no) for macroscopic (gross) and microscopic (histo) lesions

^BAverage ELISA titer for reovirus

^CID: identification number

^D*Staphylococcus* isolated from lesion

ANÁLISIS DEL SEGUIMIENTO EPIDEMIOLÓGICO DE FOCOS DE ENFERMEDAD DE NEWCASTLE EN EL ESTADO DE MÉXICO, 2013

EPIDEMIOLOGIC FOLLOW-UP OF FOCAL POINTS OF NEWCASTLE DISEASE IN THE STATE OF MEXICO, 2013

A. Valadez Sanabria

Médico Veterinario Zootecnista
Independencia 1327 Col. Reforma y Ferrocarriles Nacionales, C.P. 50070
Toluca, Estado de México
email: alicia_valadez@yahoo.com

SUMMARY

In 2013 Mexico was declared free of velogenic Newcastle disease (VND) with vaccination. The present work describes the epidemiologic follow-up that took place in three foci of VND occurring in fighting cocks in the State of Mexico in 2013 until it was resolved using the official format from SENASICA. It was concluded that fighting cocks and backyard poultry represent a higher risk for foci of VND because this type of production often lacks proper biosecurity measures and established annual vaccination programs. Also, the constant movement of fighting cocks to “palenques” and fairs represents an additional threat.

RESUMEN

México fue declarado libre de la enfermedad de Newcastle velogénica (ENCV) con vacunación, en el año 2013. En el presente trabajo, se describen los seguimientos epidemiológicos en tres focos que se presentaron en la avicultura de combate del Estado de México durante el año 2013, hasta su cierre, utilizando el formato oficial del Servicio Nacional de Sanidad, Inocuidad y Calidad Agroalimentaria (SENASICA). Se concluyó que la avicultura de combate y la de traspatio, representan mayor riesgo para la presentación de focos de la ENCV, por el tipo de producción, carencia de medidas de bioseguridad y de calendarios de vacunación establecidos anualmente, así como la constante movilización de gallos de pelea a palenques y ferias.

INTRODUCCIÓN

La ENC, es clasificada por la Organización Mundial de Sanidad Animal (OIE), como una enfermedad de declaración obligatoria debido a su elevada contagiosidad y por su importante impacto económico y social (1). La avicultura comercial es un sector importante en la producción pecuaria del Estado de México. Las explotaciones de gallos de pelea y traspatios, componen una parte importante del sector avícola, preocupante desde el punto de vista del movimiento de aves y el potencial de éstas como portadoras y transmisoras de enfermedades que pudieran llegar a afectar la industria avícola estatal. Dentro de las enfermedades aviares más importantes que pueden diseminarse, se encuentra la Enfermedad de Newcastle (ENC), considerada como una de las patologías de alta transmisión y que causa mayor impacto económico a la avicultura por las pérdidas que ocasiona, representadas por elevadas morbilidades y mortalidades, bajas en la producción, altos costos de los tratamientos de infecciones secundarias y cuantiosas inversiones en los programas para su control y erradicación (2). Para prevenir y controlar la diseminación de esta enfermedad se deben implementar medidas como planes de vacunación en aves de traspatio y de combate (3); desarrollar planes de vigilancia epidemiológica activa, hacer seguimiento de casos sospechosos (vigilancia pasiva); llevar a cabo capacitaciones constantes y educación a los propietarios, cuidadores y responsables de este tipo de aves, para en un futuro no muy lejano poder erradicar la enfermedad. Aunado a lo anterior, se identifica que las explotaciones con aves de combate que mantienen medidas de bioseguridad regulares o malas y los predios de traspatio con nulas medidas de bioseguridad, se encuentran expuestos a una mayor probabilidad de ocurrencia de la enfermedad. El objetivo del presente trabajo, fue analizar tres focos de la ENCV a través de la vigilancia epidemiológica pasiva realizada en el Estado de México, que constituyó una herramienta muy importante para la oportuna detección de la enfermedad e implementar estrategias de control en aves de combate y de traspatio.

MATERIAL Y MÉTODO

Con información proporcionada por el Comité de Fomento y Protección Pecuaria del Estado de México S.C. (CFPPEM), se analizaron las actividades epidemiológicas realizadas en tres focos diagnosticados por la Comisión México Estados Unidos para la Prevención de la Fiebre Aftosa y otras Enfermedades Exóticas de los Animales (CPA) como positivos a ENCV en predios de traspatio con aves de combate durante el año 2013, utilizando el formato oficial emitido por la DEAR. Los focos identificados como 1 y 2 corresponden a los que se presentaron en Toluca y el foco número 3, es el de Ixtlahuaca.

RESULTADOS

A través del formato: Lista de verificación de documentos para el cierre de focos de la Enfermedad de Newcastle en el Estado de México, emitido por la DEAR, se analizaron tres focos de la ENCV, dos registrados en el municipio de Toluca y uno en Ixtlahuaca. La población total registrada en los tres focos, fue de 345 aves (combate y traspatio), la mortalidad global por enfermedad fue del 40% con un rango de 40 a 94. En los tres focos se registró similar signología: diarrea amarillenta-verdosa, secreción nasal, crestas moradas y edema en párpados.

Se sacrificaron un total de 191 aves en los dos predios de Toluca, indemnizando a los productores. Se concluyó el seguimiento epidemiológico, integrando la información solicitada por la DEAR: Formatos SIVE 01 y 02, resultados de laboratorio, oficios de cuarentena, actas de despoblación o sacrificio, muestreos perifocales y resultados, oficio de levantamiento de cuarentena, entre otros. Actualmente, los tres predios se mantienen sin aves.

DISCUSIÓN

En la actualidad la OIE, sigue considerando a la ENC, una de las principales enfermedades virales de las aves; por ser altamente contagiosa y por las pérdidas económicas que ocasiona.

México se considera libre de la ENC a partir del año 2013, sin embargo, se siguen presentando eventos de la enfermedad en aves de traspatio y de combate.

La densidad de la población aviar y su distribución en el Estado de México, varía según la región geográfica y el tipo de UPP. El establecimiento de una granja o UPP en México no se regula con fines de la salud y la producción animal; solo se hace por el reglamento del Bando Municipal, en función del uso de suelo y la zona según sea urbana o rural; lo que representa un riesgo para transmisión de enfermedades a granjas tipo comercial. Estudios previos realizados en porcinos, encontraron que la ubicación de granjas a menos de 1-0 km de radio de la granja foco, es considerado como riesgo, sin especificar el nivel (3).

REFERENCIAS

1. Organización Mundial de Sanidad Animal (OIE). Technical Disease Card. Newcastle Disease. October 2009. www.oie.int.
2. Moreno, Ch. R. La Enfermedad de Newcastle y algunos avances recientes de diagnóstico. *Ciencia Veterinaria* 6:-50-51.1994.
3. Estrada, S. E., Diosdado, V. F., Arriaga, R. E., Ávila, S.E., Hernández CA, Morilla GA. Evaluación de algunos factores que pudieron influir en el incremento de la fiebre porcina clásica en el Estado de México, México, durante 1997. *Vet. Méx.*, 2001; 32 (1): 47-53.

EVALUATION OF THE REDUCTION OF *AVIBACTERIUM PARAGALLINARUM* COLONIZATION IN VACCINATED SPF CHICKENS USING QUANTITATIVE PCR

EVALUACIÓN DE LA REDUCCIÓN DE LA COLONIZACIÓN DE *AVIBACTERIUM PARAGALLINARUM* EN POLLOS LIBRES DE PATÓGENOS ESPECÍFICOS VACUNADOS UTILIZANDO PCR CUANTITATIVA

M. Pietraszewski, N. Downs, and M. Vazquez

Research and Development Department, Lohmann Animal Health International, Winslow, ME, USA

Corresponding author: mjpietraszewski@lahinternational.com

RESUMEN

La coriza infecciosa aviar es una enfermedad respiratoria altamente contagiosa causada por *Avibacterium paragallinarum*. La infección se caracteriza por conjuntivitis espumosa, sinusitis, descarga nasal, depresión y letargia. El objetivo de este estudio fue evaluar la reducción de la colonización de la coriza infecciosa en pollos libres de patógenos específicos (SPF) utilizando PCR cuantitativa. Los pollos SPF se vacunaron en las semanas 12 y 16 utilizando dos vías de vacunación. Los pollos fueron desafiados a las 20 semanas de edad contra los serotipos A, B y C. Después de tres días post desafío, se tomaron muestras del paladar hendido y la carga bacteriana fue evaluada mediante PCR cuantitativa. Los resultados mostraron una reducción significativa (prueba de chi cuadrada, $P=0.05$) en la carga bacteriana del paladar hendido de los pollos vacunados comparados con los pollos no vacunados. Estos resultados sugieren que la PCR cuantitativa puede ser un método confiable para evaluar la eficacia de la vacuna.

SUMMARY

Avian coryza is a highly contagious respiratory disease caused by *Avibacterium paragallinarum*. The infection is characterized by foamy conjunctivitis, sinusitis, nasal discharge, depression, and lethargy. The goal of this study was to evaluate the reduction of coryza colonization in SPF chickens using quantitative PCR. SPF chickens were vaccinated at 12 and 16 wk of age using two vaccination routes. Chickens were challenged at 20 wk of age against serotypes A, B and C. After three d post challenge, swabs samples were taken from the chickens palatine cleft and the bacterial loads were assessed by quantitative PCR. Results showed a significant reduction (ANOVA test, $P=0.05$) of bacterial loads in the palatine cleft of vaccinated chickens in comparison with unvaccinated chickens. These results suggest that quantitative PCR (qPCR) may be a feasible method to evaluate vaccine efficacy.

INTRODUCTION

The causal organism of infectious coryza is *Avibacterium paragallinarum*. Infection is highly contagious and rapidly spreads through flocks and chicken houses. The emergence of secondary infections during the course of the disease prolongs the clinical signs dramatically impacting flock performance. The disease is characterized by depression, facial swelling, conjunctivitis, mucus discharge, and in very acute cases there is low rate of mortality (1). The highest impact in the flock is the economic losses due to the decreased productivity. Vaccination practices have shown to help reduce risk of contamination. In zones with high incidence of coryza, vaccines do not always protect against all field isolates; in these cases proper biosecurity and improving vaccination programs is generally the best way to prevent outbreaks. The efficacy of coryza vaccines is usually evaluated by the analysis of the type and intensity of clinical signs developed after challenge with virulent coryza strains. The differences in clinical signs observed between vaccinated and non-vaccinated chickens after infection are scored and expected to result in significant differences between groups. The results obtained with this type of analysis are subjective and therefore the method lacks statistical power and leads to inconsistent results (2). The development of a more reliable and quantitative method to evaluate with a simpler approach the performance of coryza vaccines would be ideal. The aim of this study was to evaluate the feasibility of qPCR as a potential method to measure the reduction of coryza colonization in challenged birds after two administrations of three different commercial coryza vaccines.

MATERIALS AND METHODS

Experimental design. A total of 130 White Leghorn SPF chickens (12 wk of age) were included in this study. Chickens were randomly distributed into 13 treatment groups. Three commercial vaccines were administered to the birds and they were identified as Vaccine A, B, and C. (Table 1).

Vaccination. The groups were vaccinated with the vaccine randomly assigned to them using the IM route with a dose of 0.5 mL at 12 wk of age and then again at 16 wk of age. Control groups received injections of placebo in the same manner.

Preparation of the challenge inoculum. Challenge seeds of coryza 0083, Modesto and Spross were thawed and 0.5 mL of seed was inoculated into 200 mL of coryza media supplemented with 0.1% NADH (10%), 3% dextrose and 6% horse serum. The culture was incubated overnight (18 h) at 37°C. Culture media was transferred into 30 mL sterile vials, stoppered, crimped, and held at room temperature until use in the challenge (no more than 2 h). A plate count was conducted to determine the CFU/mL of the challenge culture. Plate counts resulted in titers of: 0083= $6.71_{\log_{10}}$ CFU/0.2mL, Modesto= $6.55_{\log_{10}}$ CFU/0.2mL, and Spross= $6.67_{\log_{10}}$ CFU/0.2mL.

Challenge. At 20 wk of age the birds were inoculated with a 0.20 mL intranasal challenge (0.10 mL in each nasal orifice) of one of the three challenge strains. The birds in the negative control group were kept in a separate isolation room and inoculated with sterile PBS and considered as the non-challenged controls.

Palatine cleft swabs. At the peak of clinical signs (three d post-challenge) the palatine cleft of each challenged bird was swabbed with a flocced micro swab. The swabs were placed in 1 mL sterile water in falcon tubes for processing. Each tube was vortexed then a sample of 100 μ L was taken from each tube and placed into a 96-well microplate. The samples were then boiled at 100°C for 20 min to lyse the cells. Boiled samples were processed using qPCR to quantify the amount of coryza present in each sample.

qPCR. Primers and probes were designed to amplify and detect a 143bp, 128bp, and 128bp region of 0083, Spross, and Modesto, respectively. Quantitative PCR was conducted using the Bio-Rad CFX96™ Real-Time PCR Detection System (Bio-Rad, Hercules, CA). Reactions were carried out in 20 μ L containing: 1x SsoFast™ Probes Supermix (Bio-Rad, Hercules, CA), 0.5 μ M each qPCR Fwd and Rev primer, 0.25 μ M probe, and 1 μ L of template. The cycling conditions were as follows: 1 cycle at 95°C for 2 min. and 40 cycles at 95°C for 5 sec. and 60°C for 10 sec. Standards were generated through PCR amplification of each region. The DNA was purified using the Wizard® SV Gel and PCR Clean-up System (Promega, Madison, WI) and quantified using the Qubit™ fluorometer (Invitrogen, Carlsbad, CA). The DNA was diluted to a stock concentration of 1×10^9 copies/ μ L.

Data analysis. All qPCR was analyzed using ANOVA with significance level set at $P \leq 0.05$.

RESULTS

Reduction of bacterial colonization was determined at the peak of clinical signs (3 d post-challenge). Swab samples were taken from the palatine cleft of each bird and the average copy number was assessed by qPCR. There was no detectable coryza present on the swabs for any of the vaccinated birds challenged with coryza serotype A (0083), while controls had an average bacterial loads of 1.3×10^5 copy#/mL (Figure 1). Birds challenged with coryza serotype B (Spross) had average bacterial loads of 1.1×10^6 , 9.7×10^4 , 9×10^4 , and 2.0×10^5 copy#/mL for controls, vaccine A, vaccine B, and vaccine C groups, respectively. Birds challenged with coryza serotype C (Modesto) had average bacterial loads of 5.4×10^5 , 1.5×10^4 , and 8.6×10^2 copy#/mL for controls, vaccine A, and vaccine B, respectively. Birds that received Vaccine C were free of any detectable levels of Modesto strain. There was a significant reduction of the colonization of coryza 0083, Spross, and Modesto between all vaccinated groups regardless the type of adjuvant utilized in the formulation.

DISCUSSION

Traditional methods for determining vaccine efficacy of coryza vaccines rely on the use of clinical signs as an analytical measure. Due to the nature of the readout, significant differences can be difficult to observe and may not reflect true vaccine performance. In addition, the method of observing for clinical signs is highly subjective and can vary depending on the technician conducting the test. This study was set forth to determine the feasibility to detect coryza colonization using a more practical quantitative method than bacterial re-isolation. It was demonstrated that qPCR was not only able to detect coryza colonization at three d post-challenge, but also able to detect statistically significant differences between vaccinated and non-vaccinated groups. The three commercial vaccines were able to completely eliminate colonization of coryza serotype A at three d post-challenge. For serotype B, chickens showed

0.90-1.2 times less colonization than the control group. Chickens challenged with serotype C had 5.7 (Vac-C), 1.9 (Vac-B), and 1.3 (Vac-A) less bacterial load than the control group. Based on these results, qPCR may provide an alternative/supplemental approach in determining the efficacy of coryza vaccines based on reduction of colonization after challenge.

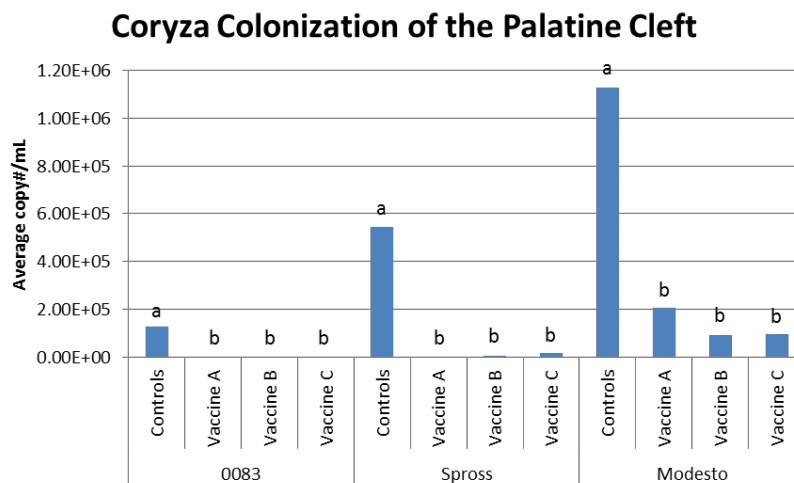
REFERENCES

1. Blackall P.J. Infectious Coryza: Overview of the Disease and New Diagnostic options. *Clinical Microbiology Reviews*. 12(4):627-632. 1999.
2. Sim, Julius and Wright, Chris C. The kappa statistic in reliability studies: use, interpretation, and sample size requirements. *J. Amer. Physical Therapy*. 85: 257-268. 2005.

Table 1. Treatment groups.

Group	Adjuvant	Treatment	Birds #	Challenge
1		Vaccine A	10	0083
2	WO	Vaccine A	10	Spross
3		Vaccine A	10	Modesto
4		Vaccine B	10	0083
5	Al(OH) ₃	Vaccine B	10	Spross
6	Gel	Vaccine B	10	Modesto
7		Vaccine C	10	0083
8	WOW	Vaccine C	10	Spross
9		Vaccine C	10	Modesto
10		Placebo	10	0083
11	WOW	Placebo	10	Spross
12		Placebo	10	Modesto
13		Placebo	10	No challenged
Total birds in test:			130	

Figure 1. Coryza colonization as determined by qPCR. Statistically significant ($P \leq 0.05$) differences are indicated by different letter designation.



DIFFERENCES IN SECONDARY REACTIONS INDUCED BY WATER-OIL-WATER (WOW) AND WATER-OIL (WO) *AVIBACTERIUM PARAGALLINARUM* VACCINES

DIFERENCIAS EN LAS REACCIONES SECUNDARIAS INDUCIDAS POR VACUNAS CONTRA *AVIBACTERIUM PARAGALLINARUM* EN ADYUVANTES AGUA/ACEITE/AGUA Y AGUA/ACEITE

M. Vazquez and N. Downs

Research and Development Department, Lohmann Animal Health International, Winslow, ME, USA
Corresponding author: mvazquez@lahinternational.com

RESUMEN

Con la nueva generación de aceites y surfactantes, la tecnología de emulsión para el sistema de suministro de antígenos tuvo una mejoría considerable. Dependiendo de la formulación de la vacuna y el tipo de antígeno, la severidad de la reacción puede variar y en algunos casos causar granulomas. La meta de este estudio fue evaluar el nivel de reacción en el sitio de vacunación inducido por vacunas contra coriza agua/aceite/agua y agua/aceite. Pollos libres de patógenos específicos (SPF) fueron vacunados a las 12 y 16 semanas de edad vía intramuscular y subcutánea. Los pollos fueron sacrificados y se evaluó el nivel de reacción en el sitio de la vacuna. Las lesiones observadas se calificaron de acuerdo a un sistema de puntuación establecido y las diferencias entre las dos vacunas en los distintos puntos de observación se evaluaron utilizando la prueba de chi cuadrada ($P=0.05$). Los resultados mostraron diferencias significativas entre las vacunas agua/aceite/agua y agua/aceite para ambas vías de administración.

SUMMARY

With the new generation of oils and surfactants the emulsion technology for antigen delivery systems has considerably improved. Depending on the vaccine formulation and the type of antigen, the severity of the reaction may vary and in some cases can induce granulomas. The goal of this study was to evaluate the level of reaction at the vaccination site induced by water –oil-water (WOW) and water-oil (WO) infectious coryza vaccines. SPF chickens were vaccinated at 12 and 16 wk using the intramuscular and subcutaneous routes. Chickens were euthanized and the level of reaction at the vaccination sites was evaluated. The observed lesions were scored according an established scoring system and differences between both vaccines were assessed by the Chi square test ($P=0.05$). Results showed that infectious coryza, WOW bacterin is two times less reactive than the WO bacterin when a 0.5 mL dose is applied twice by both IM and SQ route. The WOW vaccine administered by the SQ route induced milder reactions than when it was applied by the IM route.

INTRODUCTION

The efficacy of emulsion vaccines is related to the capacity of the vaccine to reduce to a certain degree and under specific criteria the level of disease in the host when they are compared with an unvaccinated group, while safety is mostly associated with the degree of reaction at the vaccination site. A properly developed emulsion vaccine must maintain an adequate balance between efficacy and safety. The oil quality, the immunogenic capacity of the antigen(s), formulation components, and the emulsification process are factors directly involved in the achievement of this balance. The kinetics of the antigen release varies according to the tolerance of the host to the oil, the type of antigen or a combination of both (1, 6). WOW emulsions are designed to have the same immunogenic characteristics as the WO formulations with the advantage of having minimal or no adverse reactions at the application site. *Avibacterium paragallinarum* is the causative agent of infectious coryza. The disease is mainly characterized by facial edema, nasal discharge and conjunctivitis. Infectious coryza has a considerable economic impact in poultry mostly in regions where the disease is endemic or with the prevalence of a high diversity of serotypes (A, B and C) or serovars (A1-A4, B1, C1-C4) (2). Available infectious coryza commercial vaccines are

commonly formulated as WO type or in other cases the antigen is usually adjuvanted with an aluminum hydroxide gel. There is little information evaluating the differences between the level of reactivity of WOW vs WO infectious coryza bacterins (3, 4, 5). The goal of this study was to assess if WOW bacterins are less reactive than the WO bacterins when they are administered by the subcutaneous or intramuscular routes.

MATERIAL AND METHODS

Experimental design. This study was conducted in two parts; each part was performed with three experimental groups with a total of 30 chickens each. The experimental groups were identified as WOW, WO, and placebo groups.

Birds. White Leghorn SPF chickens were included in this study. Chickens in both stages were randomly housed in floor pens where water and feed were supplied *ad libitum*.

Vaccines. WOW and WO commercial infectious coryza bacterins were included in the study, both products contained A, B and C serotypes of *Av. paragallinarum*. The placebo was experimentally formulated (WO and WOW) at Lohmann Animal Health International, Research and Development facilities.

Vaccination. Chickens in both parts of the study were vaccinated at 12 and 16 wk of age with 0.5 mL of their respective WOW, WO or placebo. For part one, the chickens were vaccinated by the intramuscular route while for part two a subcutaneous vaccination was performed.

Evaluation of the lesions in the vaccination site. Chickens were humanely sacrificed at five wk post-last vaccination and the injection site was analyzed in order to identify and classify the type of reaction present in the breast or neck of the chicken. The lesions were identified and scored according to the characteristics described in Table 1.

Data analysis. To assess the degree of reaction presented at the injection site, the scores obtained per each chicken were added in order to have a representative value per category and per experimental group. A Chi square ($P \leq 0.05$) analysis was conducted to determine significant differences between the type of vaccine applied and severity of the lesions produced by the vaccination.

RESULTS

As was previously indicated, five categories of lesions were identified (Table 1) to determine the “reactivity” of the WO and WOW commercial infectious coryza bacterins at the injection site.

Chickens vaccinated with WOW-SQ route induced 2.4 times less encapsulation and six times less changes in the internal tissue of the chicken neck than the WO-SQ bacterin. Granulomas were not observed with the WOW bacterin while four of the 30 chickens vaccinated with WO developed a small size granuloma. In general, both WO and WOW bacterins presented a normal level of absorption after five wk post second vaccination by the SQ route.

Chickens vaccinated with the WOW-IM route showed three times less changes in the breast tissue than the chickens vaccinated with the WO bacterin. Only one of the 30 chickens vaccinated with the WOW bacterin developed a certain type of granulomatous tissue in the breast. In comparison, the breasts of seven chickens vaccinated with the WO-IM presented different degrees of granulomatous tissue. No residual vaccine was observed (100% of absorption) in 30% of the chickens vaccinated with WOW-IM, while all the chickens vaccinated with WO-IM had different levels of remaining vaccine after 5 wk post-last vaccination.

None of the placebo groups showed any degree of reaction in the injection site with both (IM, SQ) vaccination routes.

DISCUSSION

Licensed emulsion vaccines in USA as in other parts of the world are required to ensure safety before they are released for its sale. In this study it was proven that infectious coryza, WOW bacterin is two times less reactive than the WO bacterin when a 0.5 mL dose is applied twice by both IM and SQ route (Fig. 1). Fukanoki *et al.* (4, 5), prepared several WOW vaccines including different components in the formulation and their reactivity was compared against a standard WO formula. Fukanoki showed that the variation of the components included in the formulation of these WOW vaccines had a direct impact on the intensity of the reaction and some of those formulations were more reactive than the WO vaccine. Blackall (3) studied the efficacy and the reactivity of WOW infectious coryza experimental vaccines. He found that WOW vaccines formulated for his study did not confer a satisfactory level of protection after challenge, but he remarked that the toxicity of these WOW vaccines was evidently reduced. In conclusion, the reactivity of vaccines is essential to trigger an adequate immune response but

at the same time this response must be mediated to avoid the presence of strong adverse reactions.

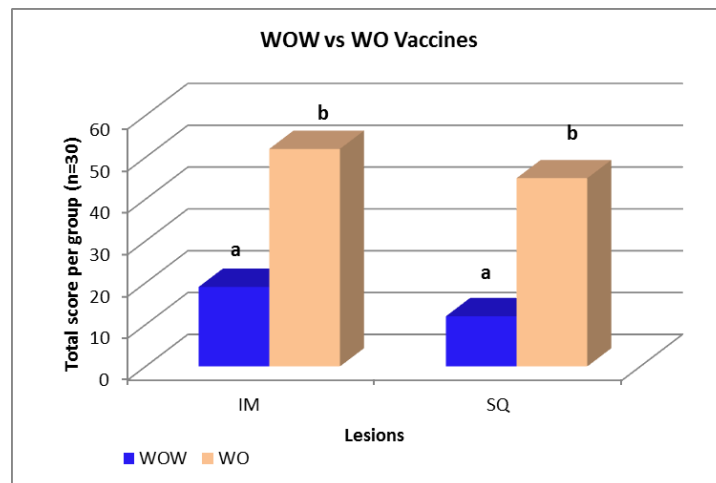
REFERENCES

1. Aucouturier J., Dupuis L. and Ganne V. Adjuvants designed for veterinary and human vaccines. *Vaccine* 19: 266-2672. 2001.
2. Blackall P.J. Infectious Coryza: Overview of the Disease and New Diagnostic options. *Clinical Microbiology Reviews*. 12(4):627-632. 1999.
3. Blackall P.J. Further Comparison of Adjuvants for an Inactivated Infectious Coryza Vaccine. *Avian Diseases*. 32:831-835.1998.
4. Fukanoki Shin-ichi, Matsumoto Kohei, Mori Hajime and Takeda Reiji. Relationship between antigen release and antibody response of Infectious Coryza Water-in-Oil-in Water Emulsion Vaccines. *Avian Diseases*. 44:869-873.2000.
5. Fukanoki Shin-ichi, Iwakura Tadashi, Iwaki Shuki, Matsumoto Kohei, Takeda Reiji, Ikeda Keiko, Shi Zhe and Mori Hajime. Safety and efficacy of water-in-oil-in-water emulsion vaccines containing Newcastle disease virus haemagglutinin-neuraminidase glycoprotein. *Avian Pathology*. 30:509-516. 2001.
6. Marciani D.J. Vaccine adjuvants, role and mechanisms of action in vaccine immunogenicity. *Drug discovery today*. 8(20):934-943. 2003.

Table 1. Scoring system to classify the reactions in the injection site.

Description of the lesion	Score			
	0	1	2	3
Changes on the internal skin tissue of the neck	Normal	Engrossed	Severely engrossed	
Changes in the breast tissue	Normal	Other		
Vaccine encapsulation	None	Partial	Severe	
Vaccine absorption	Absorbed	No absorbed		
Granuloma	None	Small (0.3-0.4 cm)	Medium (0.5-1.4 cm)	Large (≥ 1.5 cm)

Figure 1. Comparison of reactions induced by WOW and WO in the chicken injection site. Different letters indicates significant differences between groups by Chi square test ($P \leq 0.05$).



ASSESSMENT OF qPCR AS A METHOD TO EVALUATE *SALMONELLA* ENTERITIDIS SHEDDING

EVALUACIÓN DE LA PCR CUANTITATIVA COMO MÉTODO PARA EVALUAR LA ELIMINACIÓN DE *SALMONELLA* ENTERITIDIS

M. Pietraszewski and M. Vazquez

Research and Development Department, Lohmann Animal Health International, Winslow, ME, USA
Corresponding author: mjpietraszewski@lahinternational.com

RESUMEN

La PCR cuantitativa se ha vuelto muy popular y ha sido un método muy eficiente para detectar patógenos de manera cuantitativa. Los iniciadores específicos de la PCR cuantitativa fueron diseñados para ampliar una porción del gen transportador del antígeno O (Wzx) de la *Salmonella* Enteritidis (SE). El objetivo de este estudio fue evaluar la confiabilidad del uso de la PCR cuantitativa como un método para evaluar la eliminación de SE. Pollos libres de patógenos específicos fueron desafiados con una cepa virulenta de SE a las 20 semanas de edad. Los pollos se sacrificaron a diferentes tiempos y se tomaron muestras individuales del ciego y de heces, las cuales fueron analizadas con PCR cuantitativa y re-aislamiento bacteriano. Los resultados demostraron que la prueba de PCR cuantitativa puede utilizarse para discriminar la carga bacteriana en muestras de ciego y fecales, aunque el resultado más confiable fue observado en las muestras del ciego después de siete días post infección.

SUMMARY

Quantitative PCR (qPCR) has become a popular and efficient means for detecting and quantifying pathogens. Specific qPCR primers were designed to anneal to and amplify a portion of the O-antigen transporter (Wzx) gene of *Salmonella* Enteritidis (SE). The goal of this study was to assess the feasibility of the use of quantitative polymerase chain reaction (qPCR) as a method to evaluate SE shedding. SPF chickens were challenge with a SE virulent strain at 20 wk of age. Chickens were euthanized at different time points and individual samples of ceca and fecal swabs were taken and analyzed by qPCR and bacterial re-isolation. The results showed that qPCR assay can be used to discriminate bacterial loads in ceca and fecal samples, although the most reliable outcome was seen in the ceca samples after seven d post infection.

INTRODUCTION

One of the primary modes of *Salmonella* transmission is through the excretion of feces in chicken houses in which the bacteria are released into the environment. With fecal transmission still an inevitable mode of contamination, it is critical to evaluate the degree that shedding occurs naturally and if vaccination may result in a significant decrease following challenge. Reliable quantitative assays can be used to determine the true bacterial load released into the environment. This information can be used in determining more accurately the direct impact vaccination programs have on the reduction of *Salmonella* contamination via the oral-fecal route. Some of the current bacterial shedding methodologies utilize cloacal swabbing and drag swabs (1, 3). Depending on the sample type, time of collection, pre-enrichment procedures, and other experimental conditions, these methods may lead to inconsistent and/or inaccurate results. Cloacal swabbing relies on the assumption that each sample is equal; however, this is typically not the case. Drag swabs may provide a better idea of the overall shedding, but is limited to groups of chickens contained in any given area. We suggest an alternative method which may provide a more consistent approach which allows for accurate quantification of bacterial shedding on an individual chicken basis.

MATERIAL AND METHODS

Experimental design. A total of 36 SPF chickens were divided into groups of 6 and randomly assigned cages (six chickens per cage). All chickens were challenged at 20 wk of age. Bacterial enumeration of the cecal content and qPCR analysis of the cecal and fecal content was determined for a single group of chickens at 24, 48, 72, 96,

168, and 216 h post challenge (hpc).

Chicken housing. All chickens were maintained in colony houses at the Lohmann Animal Health facility (Winslow, ME). Chickens were individually assigned to cages by computer generated randomization (random.org). All chickens had access to feed and water *ad libitum* for the duration of the experiment. No biological or pharmaceuticals, other than the specific challenge strain (described below), was administered to the test animals.

Challenge culture preparation. A seed of ME 76 SE naladixic acid resistant strain was streaked onto TSA agar supplemented with naladixic acid (100 µg/mL) and incubated at 37°C overnight. Colonies were scraped and suspended in 12 mL of tryptose broth to an O.D._{600nm} of 0.902. The culture was diluted 1:10 with 1X PBS to a titer of 8.32×10^7 CFU/mL (as determined by traditional plating methodology) and immediately administered to all chickens in a 1.0 mL oral dose.

Fecal sample collection. The day prior to each sample date, paper under each cage was changed to ensure samples were no more than 17 h old. On the day of sampling, approximately 1.0g of fecal material was collected from each cage, homogenized, and 0.2g used for extraction using the QIAmp DNA stool Mini Kit (Qiagen, Maryland) following manufacture's recommendations.

Necropsy. On each sampling date (24, 48, 72, 96, 168, and 216 hpc) the appropriate group of chickens (six chickens per time point) were euthanized by cervical dislocation. Using proper aseptic technique, both ceca were removed from each chicken. One cecum was placed in a sterile Whirl-Pak bag and frozen. The contents of the remaining ceca were removed and 0.2g set aside for total DNA extraction using the QIAmp DNA stool Mini Kit (Qiagen, Maryland). The remaining contents were weighed and brought up to 10mL using sterile 1X phosphate buffered saline (PBS).

Cecal bacteriological enumeration. Following necropsy, cecal samples placed in PBS were titered following the traditional plating method. In short, samples were vortexed vigorously for 20 sec. then serially diluted through to 10^{-7} . From each dilution, 100µL was plated onto brilliant green (BG) plates supplemented with naladixic acid (100 µg/mL), in duplicate. Plates were incubated overnight (18 to 24 h) at 37°C then evaluated for typical *Salmonella* growth (red/pink colonies on a red/pink field) following incubation. *Salmonella* colonies were counted to determine the titer of SE contained in each gram of cecum.

Quantitative PCR for *Salmonella* fractions. The O-antigen transporter (*Wzx*) gene of *S. Enteritidis* was used to design qPCR primers specific for *S. Enteritidis* (2). These primers were designed to amplify a 172bp fragment of the O-antigen transporter gene of *S. Enteritidis*. Quantitative PCR was conducted using the Bio-Rad CFX96™ Real-Time PCR Detection System (Bio-Rad, Hercules, CA). Reactions were carried out in 20uL containing: 1x SsoFast™ Evagreen® Supermix (Bio-Rad, Hercules, CA), 0.5 uM each qPCR Fwd and Rev primer, and 1uL of template. The cycling conditions were as follows: 1 cycle at 98°C for 2 min. and 40 cycles at 98°C for 5 sec. and 65°C for 5 sec. Standards were generated through PCR amplification of the O-antigen gene. The DNA was purified using the E.Z.N.A Cycle Pure Kit (Omega Biotek, Norcross, GA) and quantified using the Qubit™ fluorometer (Invitrogen, Carlsbad, CA). The DNA was diluted to a stock concentration of 1×10^9 copies/uL.

Cecal and fecal quantitative analysis. Fecal and cecal samples were processed using the QIAmp DNA stool Mini Kit (Qiagen, Maryland) following the manufacture's recommendations. After extraction, samples were quantified and presented as copy#/mL of *Salmonella* Enteritidis DNA.

RESULTS

Bacterial enumeration. In order to determine the pattern of SE shedding, cecal content was sampled at 24, 48, 72, 96, 168, and 216 hpc. Results demonstrate that *Salmonella* Enteritidis can be re-isolated as early as 24 hpc and peaks by 72 hpc at 3.55×10^8 CFU/g of feces (Figure 1). Titters remained high throughout the remaining time points (7×10^6 - 1×10^9 CFU/mL).

Fecal and cecal qPCR titers. Both fecal and cecal samples, from the same chickens used to determine viable bacterial enumeration, were processed for qPCR analysis. Only two of six and one of six chickens showed detectable levels of bacterial DNA at 24 hpc in the cecal and fecal samples, respectively. Levels of detectable DNA peaked at 96 hpc and began to decrease at 168 hpc in both cecal and fecal samples (Figure 1). Quantitative PCR results of cecal and fecal contents reveal a high correlation demonstrating that cecal colonization and bacterial shedding through feces are similar.

DISCUSSION

The aim of this study was to evaluate the point at which shedding/colonization is maximal and may yield the best results in demonstrating a shedding reduction in chickens receiving a *Salmonella* vaccination program. The

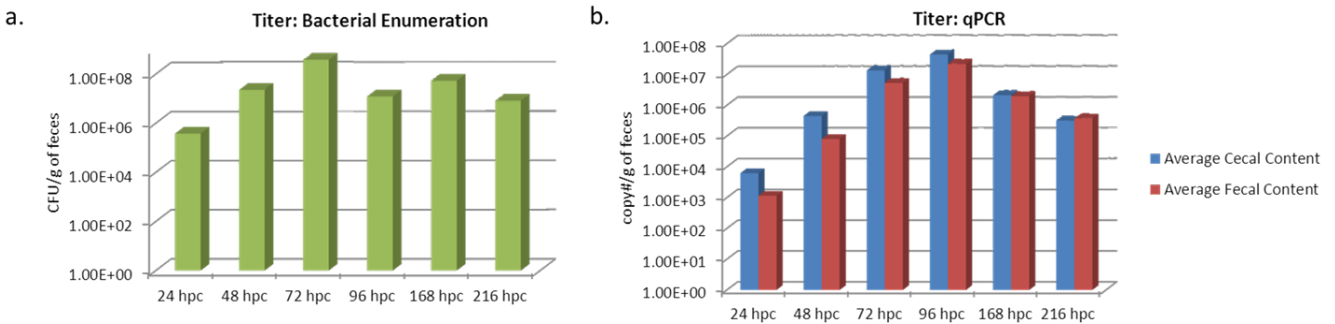
results of this study demonstrate that colonization and excretion of *Salmonella* Enteritidis can be detected by viable bacterial count and qPCR as early as 24 hpc. Peak of *Salmonella* colonization, based on viable bacterial counts of the cecum, appears to occur around 72 h and remains high out to 216 h, with titers fluctuating around 1×10^7 CFU/g of feces and never appearing to significantly decrease. The difficulty of processing the cecal samples for determining viable bacterial titers may be the cause of the fluctuating titers after 72 h.

Quantitative PCR analyses of cecal and fecal samples reveal a close correlation between the two. This demonstrates that colonization and shedding occur at a similar rate. Peak of bacterial colonization and shedding, based on qPCR results, occurs around 96-168 hours post challenge. Quantitative PCR analysis reveals a significant decrease in the amount of bacterial DNA present in fecal and cecal samples by 216 hpc, suggesting that bacterial colonization and shedding begins to decline shortly after peaking. This finding is important for the evaluation of SE vaccine performance where the samples must be taken before clearance in order to provide evidence of the true effects of vaccination. However, further studies must be conducted to verify this hypothesis. Quantification of cecal samples is suggested as they are easily obtained at necropsy and may be taken following the regular necropsy schedule (168 hpc).

REFERENCES

1. Barrow, P.A, Bumstead, N., Marton, K., Lovell, M.A., and Wigley, P. Faecal shedding and intestinal colonization of *Salmonella* enterica in in-bred chickens: the effect of host-genetic background. *Epidemiol. Infect.* 1132:117-126. 2003
2. Herrera-Leon, Silvia, et al. Blind comparison of traditional serotyping with three multiplex PCRs for the identification of *Salmonella* serotypes. *Research in Microbiol.* 158:122-127. 2007.
3. Riemann, H., et al. A survey for *Salmonella* by drag swabbing manure piles in California egg ranches. *Avian Disease.* 42:67-71. 1998.

Figure 1. Average qPCR and bacterial enumeration titers. Chickens were challenge with *Salmonella* Enteritidis and then cecal and fecal samples were obtained at 24, 48, 72, 96, 168, and 216 hpc. Viable bacteria enumeration was determined following the traditional plating method (a). Quantitative PCR was performed on fecal and cecal DNA extracts to determine copy#/g of feces (b).



UTILIZACIÓN DE ENZIMAS XILANASAS, B-GLUCANASAS Y FITASAS EN DIETAS MAÍZ-PASTA DE SOYA PARA GALLINAS EN POSTURA

USE OF XYLANASES, BETA-GLUCANASES, AND PHYTASES IN CORN-SOY IN LAYER DIETS

D. Vázquez, I. Miguel, C. Cortes y G. Ávila

^ACentro de Enseñanza, Investigación y Extensión en Producción Avícola-FMVZ –UNAM
mvzalmavazquez@gmail.com

SUMMARY

The present experiment evaluated the addition of a mixture of xylanases, beta- glucanases and phytases in corn-soy diets for laying hens with nutrients reduction, on productive performance. Three hundred thirty six Bovans White 53 wk old distributed in two treatments were used. Each treatment had 27 repetitions and 24 hens per repetition. Enzymes were added in a ratio of 100g/ton of feed. Results indicated there was no difference ($P>0.05$) between treatments. The yellow color of the yolk (50.8a and 52.6b) increased ($P<0.05$) with the enzyme addition. Based on the results, it can be concluded that inclusion of xylanases, beta-glucanases and phytases in corn-soy diets allow for nutrient reduction without affecting productive performance of hens, and improves yolk yellow pigmentation.

RESUMEN

El presente estudio se realizó con la finalidad de evaluar la adición de una mezcla de enzimas xilanasas, β -glucanasas y fitasas en dietas maíz-pasta de soya con reducción de nutrientes para gallinas de postura, sobre las variables productivas. Se emplearon 336 gallinas Bovans White de 53 semanas de edad en un diseño completamente al azar con 2 tratamientos. Cada tratamiento contó con 7 repeticiones de 24 gallinas cada una. Los tratamientos fueron: 1) dieta testigo con 17.5% de proteína cruda (PC), 2893 kilocalorías (kcal) de energía metabolizable (EM)/kg, 4.1% de calcio y 0.4% de fósforo disponible; 2) dieta con reducción de nutrientes, 16.80 % de PC 2823 kcal de EM/kg, 4.0% de calcio y 0.3% de fósforo + enzimas. Las enzimas se adicionaron a razón de 100 g por tonelada de alimento. La duración del experimento fue de 70 días. Los datos obtenidos de las variables en estudio, se sometieron a un análisis de T de Student. Los resultados obtenidos al final del estudio para porcentaje de postura, peso de huevo, masa de huevo/ave/día, consumo de alimento ave/día, conversión alimenticia, grosor de cascarón y porcentaje de huevo roto y en fáfara para los tratamientos 1 y 2 respectivamente, indicaron que no existió diferencia ($P>0.05$) entre ellos. El amarillamiento de la yema (50.8a y 52.6 b), se incrementó ($P<0.05$) con la adición de las enzimas. Con base en los resultados obtenidos, se puede concluir que la inclusión de enzimas xilanasas, β -glucanasas y fitasas en dietas maíz-soya permite reducir nutrientes, sin afectar el comportamiento productivo de las gallinas, además de que se mejora la pigmentación amarilla de la yema.

INTRODUCCIÓN

De acuerdo con Buchanan et al. (1) las enzimas hidrolizan los polisacáridos no amiláceos que pueden ser usados potencialmente por el animal e incrementa la utilización de la energía de la dieta. Además, la liberación del contenido celular permite que exista una digestión enzimática; y por lo tanto, una mayor digestibilidad de todos los nutrientes. De igual forma las fitasas hidrolizan el fitato encontrado en todos los ingredientes de origen animal. El fitato es una molécula con el potencial de ligarse a nutrientes de carga positiva (Na, Mg, K, Ca y Zn) lo que se considera una propiedad antinutricional ya que compromete la utilización de proteína, energía, calcio y minerales traza.

Con base en estos antecedentes, se planteó el presente estudio con la finalidad de evaluar el efecto de la inclusión de enzimas xilanasas, β -glucanasas y fitasas en dietas maíz-pasta de soya, sobre el comportamiento productivo de gallinas de postura.

MATERIAL Y MÉTODOS

Se utilizaron 336 gallinas de la línea Bovans White de 53 semanas de edad. Las aves se distribuyeron al azar en 14 grupos de 24 aves cada uno. Los tratamientos (dietas) experimentales fueron tipo práctico o comercial maíz-pasta de soya y se balanceó una dieta testigo según las especificaciones del manual de la estirpe Bovans White, con 17.5% de PC, 2893 Kcal/Kg de EM, 4.1% de calcio y 0.4% de fósforo disponible. Se formuló, también, una dieta similar reducida en nutrientes, empleando el aporte de nutrientes indicados en la matrix del complejo enzimático, a 2823 kcal/kg de EM, 16.80 % de PC, 4.0% de calcio y 0.3% de fósforo.

Las enzimas que se utilizaron contenían xilanasas, β -glucanasas y fitasas, producidas por el microorganismo *Penicillium funiculosum*, a una dosis de 100 g por tonelada de alimento. Las enzimas utilizadas contenían una actividad mínima de:

- A. endo-1,4-xilanasas: 1400 unidades AXG/g.
 - 1 unidad de AXG se define como la liberación de los oligómeros no precipitables en etanol a partir de un xilano asociado a un cromóforo, correspondiente a una absorbancia de 1.23 unidades a 590 nm.
- B. endo-1-3(4)- β -glucanasa: 200 AGL unidades/g.
 - 1 unidad de AGL se define como la liberación, de los oligómeros no precipitables en etanol, a partir de un glucano asociado a un cromóforo, correspondiente a una absorbancia de 0.82 unidades a 590 nm.
- C. Glucanasa y fitasa en cantidades no definidas.
- D. Los tratamientos fueron como se señala a continuación:
 - Tratamiento 1. Dieta testigo sin inclusión de complejo enzimático.
 - Tratamiento 2. Dieta baja en nutrientes más complejo enzimático.

Semanalmente, durante 10 semanas, se resumieron los datos de porcentaje de postura, peso promedio del huevo, porcentaje de huevos con cascarón roto y huevo en fáfara, consumo de alimento, masa de huevo por ave por día, porcentaje de mortalidad y conversión alimenticia. Los pesajes del huevo se realizaron por réplica. Al final del experimento se evaluó la pigmentación de la yema del huevo con un colorímetro de reflectancia Minolta CR-400; así como el grosor del cascarón con un micrómetro electrónico marca Mitutoyo, para lo cual se utilizaron 30 huevos de cada tratamiento.

RESULTADOS

Los resultados obtenidos en 10 semanas de experimentación, para porcentaje de postura, peso promedio del huevo, índice de conversión, consumo de alimento y masa de huevo, se encuentran resumidos en el Cuadro 1. Se puede apreciar que no hubo diferencia ($P>0.05$) entre tratamiento en las variables en estudio. Por otro lado, en el Cuadro 2, se muestran los resultados promedio de amarillamiento (b), grosor de cascarón, porcentaje de cascarón roto y porcentaje de huevo en fáfara. Se puede observar que en las variables grosor de cascarón, porcentaje de huevo roto y en fáfara, no hubo diferencia significativa ($P>0.05$) entre tratamientos. Los resultados de amarillamiento en la yema del huevo indicaron efecto benéfico ($P<0.05$) a la adición de enzimas, es decir, el color amarillo en la yema del huevo, se incrementó con la inclusión de enzimas.

REFERENCIAS

1. Buchanan NP, Kimbler LB, Parsons AS. The effects of nonstarch polysaccharide enzyme addition and dietary energy restriction on performance and carcass quality of organic broiler chickens. *J Appl Poult Res* 16:1-12. 2007.
2. Hughes AL, Dahiga JP, Wyatt CL, Classen HL. The efficacy of quantum phytase in a forty-week production trial using white leghorn laying hens fed corn-soybean meal-based diets. *Poult Sci* 87:1156-1161. 2008.
3. Liu N, Liu GH, Li FD, Sands JS, Zang S, Zheng AJ, Ru J. Efficacy of phytases on egg production and nutrient digestibility in layers fed reduced phosphorus diets. *Poult Sci* 86:2337-2342. 2007.

Cuadro 1. Resultados promedio de variables productivas en gallinas de postura durante 70 días de experimentación.

Tratamiento	Postura (%)	Peso del huevo (g)	Masa de huevo (g)	Consumo de alimento (g)	Conversión alimenticia
1	90.8a	63.9a	58.1a	111.3a	1.920a
2	90.7a	63.8a	57.9a	111.1a	1.910a

a,b valores con distinta literal son diferentes (P<0.05)

Cuadro 2. Resultados promedio de pigmentación amarilla en el huevo, grosor de cascarón y porcentaje de huevo roto y en fáfara.

Tratamiento	Amarillamiento (b)	Grosor de cascarón (mm)	Huevo roto y en fáfara (%)
1	50.8a	0.364	1.21
2	52.6b	0.369	1.67

a,b valores con distinta literal son diferentes (P<0.05)

GENOMA COMPLETO DE UNA CEPA DE ADENOVIRUS AVIAR SEROTIPO 4 CAUSANTE DE SÍNDROME DE HIDROPERICARDIO Y HEPATITIS EN MÉXICO

COMPLETE GENOME OF A STRAIN OF AVIAN ADENOVIRUS SEROTYPE 4 ISOLATED IN MEXICO

P. F. Vera-Hernández^A, L.J. García-Barrera^A, D. Cortés-Espinosa^A, A. Galiote-Flores^B, A. Morales-Garzón^B,
A. Toscano^B, E. Lucio-Decanini^B y A. Absalón^A

^AInstituto Politécnico Nacional. CIBA Tlaxcala. Carr. Est. Santa Ines-Tecuecomac Km 1.5, Tepetitla, Tlaxcala;
México. Tel. +52 (55) 5729 6000 Ext. 87813. aabsalon@ipn.mx

^BInvestigación Aplicada S.A. de C.V. Tehuacán, Puebla

SUMMARY:

Adenoviruses have been isolated from a variety of species of animals, including birds. Based on their genome organization, their serological properties, and growth in cell culture, these viruses have been grouped into four different genus under the Adenoviridae family. The major clades correspond to the four accepted genus. Two genus (Mastadenovirus and Aviadenovirus) come from mammals or birds, respectively, and the other two genera (Atadenovirus and Siadenovirus) have a wider range of host organisms. In this paper the complete genome of an avian adenovirus serotype 4 isolated in Mexico in 1994 that showed higher virulent characteristics is presented. Similarly, certain assumptions of the reasons for the virulence of adenovirus based on the nucleotide sequence of the complete genome are discussed.

RESUMEN

El síndrome de hidropericardio y hepatitis es un padecimiento severo de las aves. En este trabajo se presenta el genoma completo de un Adenovirus aviar del serotipo 4 aislado en México en el año 1992 que presentó características virulentas superiores. De igual forma, se discuten algunas hipótesis de las razones de la virulencia del adenovirus basados en la secuencia de nucleótidos del genoma completo.

INTRODUCCIÓN

El síndrome de hidropericardio y hepatitis (hepatitis–hydropericardium syndrome o HHS, por su nombre y siglas en inglés) también conocida como enfermedad de Angara, es una padecimiento severo de los pollos que alcanza tasas de mortalidad que han sido reportadas hasta de un 100 %. (1, 2)

Generalmente las aves infectadas no muestran signos clínicos aparentes asociados con la enfermedad, sin embargo, en la necropsia se observa la acumulación de líquido en el saco pericárdico de apariencia clara o de color ámbar, de consistencia acuosa o gelatinosa y un corazón deforme, otros cambios observados son hígado friable, descolorido e hinchado con necrosis focal, hemorragias petequiales en la musculatura del corazón y otros órganos, además de congestión y edema en los pulmones y por ultimo riñones pálidos con túbulos prominentes. El hígado es el órgano que muestra los cambios histopatológicos más notables tales como pequeñas áreas multifocales de necrosis, la infiltración de células mononucleares y la presencia de inclusiones intranucleares basófilas en los hepatocitos. (1, 3-5)

Algunos estudios realizados en diversos laboratorios, indican que la mayoría de los agentes causales del HHS pertenecen al serotipo 4 de adenovirus aviáres del grupo I (2, 3, 6-10). A pesar de que la Hepatitis con cuerpos de Inclusion (IBH) es causada por algunos serotipos de adenovirus aviáres del grupo I y que esta condición es también caracterizada por daño hepático, la IBH generalmente no es grave y sus tasas de mortalidad fluctúan entre el 0 al 10% pudiendo alcanzar hasta un 30%. (3)

El HHS fue reportado por primera vez a finales de 1987 en Angara, Pakistán(11). En México el HHS fue descrito por primera vez en 1990 (12) y en 1992 Lucio y cols. aislaron un virus de campo que reproduce el cuadro del HHS que denominan como cepa SHP92 que experimentalmente alcanza tasas de mortalidad de hasta 100%

cuando se administran macerados de hígados de pollos infectados en aves libres de patógenos específicos (SPF) de un día de edad por vía oral y subcutánea.

RESULTADOS

El genoma completo del adenovirus SHP92 tiene una longitud de 45,642 pares de bases, con un contenido de G+C de 54.72% y posee una organización similar a la de otros adenovirus aviares.

El análisis de los genomas por un alineamiento con Clustal W seguida de la generación de una matriz de identidad, indica que la cepa SHP92 tiene un porcentaje de similitud con la cepa KR5 de 98.84% y un 98.77% de identidad con la cepa ON1.

Como se muestra en la Figura 1, el alineamiento global de las secuencias completas de los genomas de adenovirus del serotipo 4, muestra que la región izquierda y central del genoma contienen pocas variaciones en comparación con el genoma de las cepas KR5 y ON1, y de manera general los marcos abiertos de lectura (ORF's) encontrados en estas regiones en la cepa SHP92 tienen una similitud importante con respecto a los adenovirus cuyo genoma esta reportado.

Por otra parte la región derecha del genoma resultó ser más variable encontrando regiones que alcanzan una diferencia de hasta un 50%.

CONCLUSIONES

Los genomas de los adenovirus aviares son más grandes (~45 kb) que los de adenovirus pertenecientes a los géneros Atadenovirus, Siadenovirus, o los de los aislados de mamíferos, serpientes o ranas. El contenido de G+C es generalmente un buen criterio de demarcación de especies para los adenovirus. Su valor para el genoma de la cepa SHP92 (54,72%) fue muy similar a las de las otras cepas de adenovirus aviares (53,8% a 57,9%).

La longitud del genoma de la cepa SHP92 es muy similar al de las cepas no patogénicas KR5 y ON1 (45,810 y 45,667 pb respectivamente) por lo que se descarta la idea que el tamaño del genoma pudiera estar relacionado con la virulencia.

REFERENCIAS

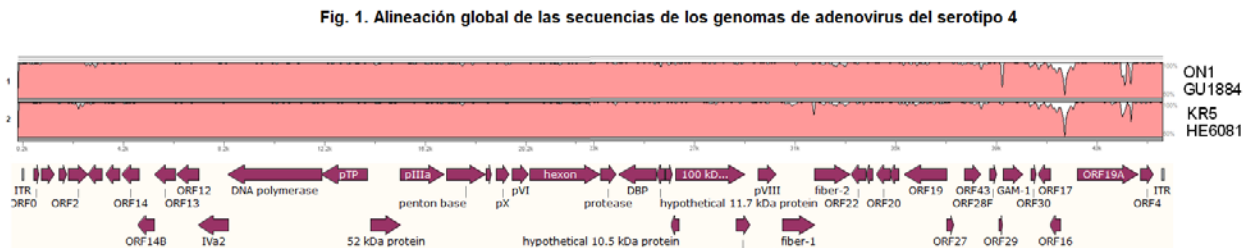
1. Ganesh, K., and R. Raghavan Hydropericardium hepatitis syndrome of broiler poultry: current status of research. *Research in veterinary science* 68:201-206. 2000.
2. Mase, M., K. Nakamura, and T. Imada Characterization of Fowl adenovirus serotype 4 isolated from chickens with hydropericardium syndrome based on analysis of the short fiber protein gene. *Journal of veterinary diagnostic investigation : official publication of the American Association of Veterinary Laboratory Diagnosticians, Inc* 22:218-223. 2010.
3. Mittal, D., N. Jindal, A.K. Tiwari, and R.S. Khokhar Characterization of fowl adenoviruses associated with hydropericardium syndrome and inclusion body hepatitis in broiler chickens. *Indian journal of virology : an official organ of Indian Virological Society* 25:114-119. 2014.
4. Chandra, R., S.K. Shukla, and M. Kumar The hydropericardium syndrome and inclusion body hepatitis in domestic fowl. *Tropical animal health and production* 32:99-111. 2000.
5. Mazaheri, A., C. Prusas, M. Voss, and M. Hess Some strains of serotype 4 fowl adenoviruses cause inclusion body hepatitis and hydropericardium syndrome in chickens. *Avian pathology : journal of the W.V.P.A* 27:269-276. 1998.
6. Asthana, M., R. Chandra, and R. Kumar Hydropericardium syndrome: current state and future developments. *Archives of virology* 158:921-931. 2013.
7. Schonewille, E., A. Singh, T.W. Gobel, W. Gerner, A. Saalmuller, and M. Hess Fowl adenovirus (FAdV) serotype 4 causes depletion of B and T cells in lymphoid organs in specific pathogen-free chickens following experimental infection. *Veterinary immunology and immunopathology* 121:130-139. 2008.
8. Shivachandra, S.B., R.L. Sah, S.D. Singh, J.M. Kataria, and K. Manimaran Immunosuppression in broiler chicks fed aflatoxin and inoculated with fowl adenovirus serotype-4 (FAV-4) associated with hydropericardium syndrome. *Veterinary research communications* 27:39-51. 2003.
9. Dahiya, S., R.N. Srivastava, M. Hess, and B.R. Gulati Fowl adenovirus serotype 4 associated with outbreaks of infectious hydropericardium in Haryana, India. *Avian diseases* 46:230-233. 2002.

10. Balamurugan, V., J.M. Kataria, R.S. Kataria, K.C. Verma, and T. Nanthakumar Characterization of fowl adenovirus serotype-4 associated with hydropericardium syndrome in chicken. *Comparative immunology, microbiology and infectious diseases* 25:139-147. 2002.

11. KHAWAJA, D.A., S. AHMED, A.M. RAUF, M. ZULFIGAR, and S.M. MAHMOOD Isolation of an adenovirus from hydropericardium syndrome in broiler chicks. *Pakistan Journal Veterinary Research* 1:2-17. 1988.

12. Altamirano, R.R., A. Retamo, and J. Zurita Hepatitis por Cuerpos de Inclusión y su relacion con alta mortalidad en pollo de engorda en México. *Memorias XV Convención Anual ANECA*:279-287. 1990.

Figura 1. Alineación global de las secuencias de los genomas de adenovirus del serotipo 4.



Se empleó el software mVISTA LAGAN. La altura del gráfico en el eje Y indica el porcentaje de identidad de nucleótidos de los genomas de los adenovirus comparados con la cepa SHP92. El eje X indica la posición de nucleótidos en el genoma del adenovirus. El genoma se muestra a escala por debajo de la alineación, los ORFs se representan como flechas.

ANÁLISIS DE LOS RESULTADOS DE MICOTOXINAS POR EL MÉTODO DE ELISA EN ALIMENTOS DE MÉXICO DURANTE EL PERIODO 2011 A 2013

ANALYSIS OF RESULTS OF MYCOTOXINS BY ELISA IN MEXICO'S FOOD DURING THE PERIOD 2011 TO 2013

R. Viguera^A, G. Aguilar^A, E. Tapia^A, E. Soto^B, D. Sarfati^B y B. Lozano^B

^ADiagnósticos Clínicos Veterinarios SA de CV. México. Campesinos 224, Colonia Granjas Esmeralda, 09810, México, D.F., México

^BLaboratorio AVI-MEX SA de CV. México. Bartolache 1862, Colonia Del Valle, 03100, México, D.F., México

SUMMARY

Competitive ELISA tests on samples of raw materials and different phases of finished feed were conducted during the period 2011 to 2013 from different regions of Mexico. Analyzed mycotoxins include aflatoxin, T-2, fumonisin, deoxynivalenol, ochratoxin and zearalenone. The effect of mycotoxins can vary depending on the age, gender, species, interaction with other mycotoxins or agents, etc.; therefore the minimum acceptable level for a food is variable. This analysis considered minimum levels reported in various bibliographies that have been associated with any effect on birds in production. The results indicate that in the period more than 20% of the analyzed samples have elevated levels of deoxynivalenol, ochratoxin and T-2. Regarding zearalenone, aflatoxin and fumonisin they were lower than 10% of the samples with high levels.

RESUMEN

Se realizaron pruebas de ELISA competitiva en muestras de materias primas y alimento terminado de diferentes fases durante el periodo 2011 al 2013 provenientes de diferentes regiones del país. Las micotoxinas analizadas incluyen aflatoxina, T-2, fumonisina, deoxynivalenol, ocratoxina y zearalenona. El efecto de las micotoxinas puede variar por la edad, sexo, especie, interacción con otras micotoxinas o agentes, etc., por lo que los niveles mínimos aceptables para un alimento son variables. En este análisis se consideraron niveles mínimos reportados en diferentes bibliografías que se han relacionado con algún efecto sobre las aves en producción. Los resultados en el período indican que más del 20% de las muestras analizadas presentan niveles elevados de deoxynivalenol, T-2 y ocratoxina. Con respecto a zearalenona, fumonisina y aflatoxina fueron menores al 10% de las muestras con niveles elevados.

INTRODUCCIÓN

La micotoxicosis es una enfermedad que afecta los parámetros productivos de las aves y es causada por la ingesta de micotoxinas contaminantes de granos y alimentos. Las micotoxinas son metabolitos tóxicos producidos por diferentes especies de hongos. Existen diferentes pruebas en el mercado para la identificación y cuantificación en donde destaca el ensayo por inmunoabsorción ligado a enzimas (ELISA) ya que no requiere de equipos especializados y su costo es menor comparado con otras técnicas como la cromatografía líquida de alta eficacia (HPLC). El monitoreo de alimentos a partir de la prueba de ELISA permite conocer el grado de contaminación por micotoxinas y de esta forma contribuir en la toma de decisiones para su control, por lo que el objetivo de este trabajo es presentar los resultados de determinación de la concentración de micotoxinas obtenidos en el Laboratorio de Diagnósticos Clínicos Veterinarios durante tres años en el periodo comprendido entre 2011 y 2013.

MATERIALES Y MÉTODOS

Las 423 muestras analizadas en este estudio corresponden a materias primas ($n=148$) conformadas por granos secos de destilería, maíz, sorgo, pasta de soya y semilla de algodón, así como de alimento balanceado de aves ($n=285$) de diferentes fases incluyendo inicio, desarrollo, finalización, crianza y postura; todas provenientes de distintas zonas avícolas de México.

La determinación de la concentración de micotoxinas se realizó por el método de ELISA competitiva para aflatoxina B₁ (AF), toxina T-2 (T-2), ocratoxina A (OTA), zearalenona (Z), deoxinivalenol o vomitoxina (DON) y fumonisina (F) siguiendo las indicaciones recomendadas por el fabricante de los reactivos (R-Biopharm®, Alemania), del equipo (Biotek®, EUA) y trabajando bajo los lineamientos y estándares de Buenas Prácticas de Laboratorio.

RESULTADOS

Los resultados se agruparon por año y de acuerdo al tipo de muestra (materia prima y alimento terminado), en donde se calculó el porcentaje de muestras que presentaron resultados mayores a los reportados en la bibliografía como causantes de daño en las aves de producción intensiva (límite), así como se determinaron los valores de concentración mínima y máxima de micotoxinas.

DISCUSIÓN

De acuerdo a los resultados obtenidos, las materias primas contienen mayores niveles de aflatoxina B₁, toxina T2, ocratoxina A y zearalenona, mientras que los alimentos terminados contienen niveles más elevados de deoxinivalenol y fumonisina. Durante los tres años evaluados, la micotoxina predominante en las muestras de materia prima y alimento terminado fue toxina T2, seguida por ocratoxina A, deoxinivalenol y zearalenona. En las muestras de alimento terminado del año 2013 no se encontraron resultados que fueran superiores al límite para aflatoxina B₁, zearalenona y fumonisina.

Las micotoxinas que presentaron mayores niveles de inclusión con respecto a su propio límite fueron la toxina T2 con un nivel de 4975.5 ppb en materia prima y de 350.7 en alimento terminado; la zearalenona con un nivel de 991.6 ppb en materia prima y de 602.2 ppb en alimento terminado; la aflatoxina B1 con un nivel de 400 ppb en materia prima y de 177.9 en alimento terminado; deoxinivalenol con un nivel de 35 ppm en alimento terminado y fumonisina con un nivel de 36 ppm en alimento terminado.

REFERENCIAS

1. Shivaprasad, H.L. Mycotoxicosis. In “Avian Disease Manual”. Edited by Bulianne, M. 7th Ed. 2013.
2. Hoerr, F.J. Micotoxicoses. In: Diseases of Poultry. 12th edition. Edited by Y.M. Saif, A.M. Fadly, J.R. Glisson, L.R. McDougald, L.K. Nolan and D.E. Swayne. Iowa State University Press. pp 1197-1229. 2008.
3. Cuevas, P.G. Niveles Máximos Permitidos en la Legislación Nacional e Internacional. III Encuentro Nacional de Laboratorios de Control de Calidad de la Industria Alimenticia Animal. México, 2012.

Tabla 1. Resultados de las pruebas de ELISA en materia prima.

Límite	2011 (n=45)		2012 (n=42)		2013 (n=61)	
	% muestras > límite	[Micotoxina] Mínimo - Máximo	% muestras > límite	[Micotoxina] Mínimo - Máximo	% muestras > límite	[Micotoxina] Mínimo - Máximo
AF > 20 ppb (µg/Kg)	4.9	21.6 - 231.4	9.5	20.1 - 123.1	6.6	20.21 - 400
T-2 > 50 ppb (µg/Kg)	41.0	59.9 - 4975.5	31.0	57.1 - 224.6	44.4	50.8 - 178.6
OTA > 10 ppb (µg/Kg)	51.4	11.6 - 97.6	10.0	10.4 - 33.4	24.1	10.5 - 94.7
Z > 250 ppb (µg/Kg)	18.4	288.1 - 991.6	0.0	-	15.4	310.6 - 354.7
DON > 0.3 ppm (mg/Kg)	33.3	0.3 - 3.5	14.8	0.3 - 0.8	15.9	0.3 - 1.9
F > 5 ppm (mg/Kg)	4.2	8.3	5.9	6.8	0.0	-

Tabla 2. Resultados de las pruebas de ELISA en alimento terminado.

Límite	2011 (n=106)		2012 (n=114)		2013 (n=55)	
	% muestras > límite	[Micotoxina] Mínimo - Máximo	% muestras > límite	[Micotoxina] Mínimo - Máximo	% muestras > límite	[Micotoxina] Mínimo - Máximo
AF > 20 ppb (µg/Kg)	3.9	25.0 - 35.9	23.3	23.4 - 177.9	0.0	-
T-2 > 50 ppb (µg/Kg)	34.0	51.7 - 257.6	14.8	51.7 - 350.7	21.4	50.5 - 105.7
OTA > 10 ppb (µg/Kg)	33.7	10.2 - 52.91	10.2	10.3 - 34.8	14.9	10.1 - 20.0
Z > 250 ppb (µg/Kg)	2.2	254.7	13.7	267.3 - 602.2	0.0	-
DON > 0.3 ppm (mg/Kg)	24.1	0.31 - 35.0	31.9	0.30 - 2.36	8.8	0.3
F > 5 ppm (mg/Kg)	9.8	6.0 - 36.0	3.6	5.1 - 5.9	0.0	-

MAREK'S DISEASE IN BACKYARD AND SPECIALTY FLOCKS, CURRENT STATUS

ESTADO ACTUAL DE LA ENFERMEDAD DE MAREK EN PARVADAS DE PATIO TRASERO Y PARVADAS ESPECIALIZADAS

P. Wakenell and Y. Sato

Purdue ADDL
West Lafayette, IN

RESUMEN

La enfermedad de Marek (MD) ha ido en aumento en parvadas pequeñas tanto de traspatio como comerciales, principalmente debido a la falta de vacunación. Las incubadoras pequeñas y el internet a menudo aconsejan a los propietarios de aves novatos que no existe la necesidad de vacunación contra MD. Se presentarán cuatro casos recientes y los escenarios que llevaron a los productores a buscar ayuda.

SUMMARY

Marek's disease (MD) has been increasing in small flocks both backyard and commercial, predominantly due to lack of vaccination. Novice poultry owners are often advised by small hatcheries and the web that there is no need for MD vaccination. We will be presenting four recent cases and the scenarios that led to the farmers seeking assistance.

ABSTRACT

Marek's disease (MD) is a ubiquitous herpesvirus that has been well controlled by vaccination in the commercial poultry industry. *In ovo* vaccination and increased improvement of vaccines have contributed to the success, but concern remains that new strains may not be easily controlled. Research on improving the genetics of commercial poultry and on improving vaccines are ongoing in hopes of staying ahead of the increasing virulence of MDV.

Backyard poultry rearing has been exploding in popularity in the last decade. The desire to have fresh eggs and the ability to choose attractive strains has driven this trend. Many communities are considering allowing a limited number of hens to be reared in urban and suburban settings. Unfortunately, many new poultry owners have limited knowledge of biosecurity and disease, and the information available on the internet is often incorrect. Poultry are usually purchased at auctions, swap meets, farm stores and at shows where multiple species are housed together and there is no information on flock history, vaccination or disease exposure. Most online poultry supplies offer MD vaccination, but purchasers usually do not know the necessity or are counseled not to have the chicks vaccinated.

At Purdue University's Animal Disease Diagnostic Laboratory, we are seeing an increase in the number of MD cases from backyard flocks in the last five years. Most of the birds are unvaccinated adults, and it is unknown whether the exposure was early in life or recent. Flock mortality ranges from 10-80% and is devastating to the owners. There is also concern that if the MDV is circulating unchecked in backyard poultry, new strains may emerge that will be difficult to control in commercial poultry industry. We are presenting MD cases that we have recently seen at Purdue ADDL.

A COLLECTION OF COMMON AND UNUSUAL NEUROLOGICAL DISORDERS IN COMMERCIAL CHICKENS

RECOPIACIÓN DE DESÓRDENES NEUROLÓGICOS COMUNES E INUSUALES EN POLLOS COMERCIALES

G. Zavala

Department of Population Health, College of Veterinary Medicine
University of Georgia, Athens, GA 30602
avianhealth@gmail.com
gzavala@uga.edu

RESUMEN

Los desórdenes neurológicos en los que se presentan signos clínicos significativos incluyen una variedad de condiciones de origen infeccioso, tóxico, metabólico y nutricional. En el presente estudio se reporta una recopilación de signos del sistema nervioso central comunes e inusuales, incluyendo varios casos de encefalitis fúngica, bacteriana y viral. Casos de signos neurológicos inusuales o casos en los que se sospecha de la presencia de signos neurológicos que indican una afectación importante en el sistema nervioso central incluyen reovirus y encefalitis por la enfermedad de Marek; una encefalopatía hepática putativa causada por el adenovirus aviar; intolerancia a las bacterinas de *Salmonella* y toxicosis por ionóforos.

SUMMARY

Neurological disorders with significant clinical signs include a variety of conditions of infectious, toxic, metabolic and nutritional origin. A collection of common and unusual central nervous system signs are herein reported, including various cases of fungal, bacterial and viral encephalitis. Cases of unusual neurological signs or suspect neurological signs indicating a significant insult to the central nervous system include reovirus and Marek's disease encephalitis, a putative hepatic encephalopathy caused by fowl adenovirus, intolerance to *Salmonella* bacterins, and ionophore toxicosis.

ABSTRACT

Various forms of relatively common neurological disorders of chickens have been well documented. The source of some neurological disorders may be (not exclusively) infectious, toxic, nutritional or idiopathic.

Viral infections may result in aseptic encephalitis as is the case in infections caused by West Nile virus (WNV) (3), Newcastle disease virus (NDV) (4), avian influenza virus (AIV) (8), avian encephalomyelitis virus (AEV) (7), and Marek's disease virus (MDV) (6). With the exception of MDV, all such viruses frequently induce clinical signs reflecting involvement the central nervous system (CNS), including tremors, torticollis, and a variety of disorders including alteration of the normal gait of birds, posture, eye sight, and incoordination or ataxia and other manifestations of brain involvement. MDV most commonly induces flaccid paralysis of the limbs and neck (6), but on occasion and in only a relatively small number of affected chickens it may induce blindness, or head tremors indistinguishable from those produced by AEV. Other viral infections may rarely involve infection of the brain. Such is the case of some reovirus strains that apparently can cause encephalitis with CNS related clinical signs, including incoordination and tremors (10). Reoviruses causing encephalitis are uncommon in commercial chickens but have been reported in mammals (9). Severe cases of adenovirus-induced inclusion body hepatitis (IBH) often result in massive hepatic necrosis associated with neurological signs. Although this is a relatively common clinical finding in individual chickens in the field, it has not been described in the scientific literature as a problem in chickens and may be reflect a syndrome similar to hepatic encephalopathy occurring in mammals (2).

Nutritional deficiencies causing neurological signs are most commonly represented by vitamin A/E deficiency resulting in avian encephalomalacia in young chicks (1). Complex B vitamin deficiencies have been described but are extremely rare and very difficult and expensive to document in commercial poultry.

Feed ingredient toxicities may also result in clinical signs resembling neurological involvement. *Severe* sodium

toxicosis may result in clinical signs resembling those associated with encephalitis, and is most likely observed in very young chickens intoxicated with sodium (5).

Ionophore toxicities have been reported in chickens and turkeys among other animal species and humans (11). Although monensin and salinomycin have been most commonly implicated, other ionophores have the potential of causing toxicities, particularly in adult chickens or turkeys that accidentally receive ionophores in their diet without having been exposed to the drug earlier in life.

Botulism is an infrequent but well documented source of overt neurological signs in chickens. Affected flocks may express sudden death and paralysis of the neck, limbs and the third eyelid. Cases of botulism may be associated with a history of increased litter moisture, sudden changes in weather resulting in overheating and an unusual bloom of insects.

Other intoxications are rare but may occur in regions or countries where potentially toxic pesticides or insecticides may be used around poultry or in agricultural fields; organophosphate poisoning, for example, results in the inhibition of acetylcholinesterase in nerve cells.

Certainly there may be many more sources of neurological signs in commercial poultry but the ones listed above are the most common and should be considered as possibilities in a differential diagnosis. This work describes recent common and uncommon cases of neurological disease of various etiologies.

REFERENCES

1. Bartholomew, A., D. Latshaw, and D.E. Swayne Changes in blood chemistry, hematology, and histology caused by a selenium/vitamin E deficiency and recovery in chicks. *Biol. Trace Elem. Res.* 62:7-16. 1998.
2. Gow, A.G., A.I. Marques, D.A. Yool, K. Crawford, S.M. Warman, P.D. Eckersall, R. Jalan, and R.J. Mellanby Dogs with congenital porto-systemic shunting (cPSS) and hepatic encephalopathy have higher serum concentrations of C-reactive protein than asymptomatic dogs with cPSS. *Metab. Brain Dis* 27:227-229. 2012.
3. Guy, J. West Nile Virus. In: *Diseases of Poultry*. J.R. Glisson, L.R. McDougald, L.K. Nolan, D.L. Suarez and V. Nair, eds. Wiley-Blackwell, Ames, IA. pp 479-482. 2013.
4. Miller, P.J., and G. Koch Newcastle Disease. In: *Diseases of Poultry*. J.R. Glisson, L.R. McDougald, L.K. Nolan, D.L. Suarez and V. Nair, eds. Wiley-Blackwell, Ames, IA. pp 89-133. 2013.
5. Sander, J.E., S.I. Savage, and G.N. Rowland Sodium sesquicarbonate toxicity in broiler chickens. *Avian Dis.* 42:215-218. 1998.
6. Schat, K.A., and V. Nair Marek's Disease. In: *Diseases of Poultry*. J.R. Glisson, L.R. McDougald, L.K. Nolan, D.L. Suarez and V. Nair, eds. Wiley-Blackwell, Ames, IA. pp 515-552. 2013.
7. Suarez, D.L. Avian Encephalomyelitis. In: *Diseases of Poultry*. J.R. Glisson, L.R. McDougald, L.K. Nolan, D.L. Suarez and V. Nair, eds. Wiley-Blackwell, Ames, IA. pp 486-493. 2013.
8. Swayne, D.E., D.L. Suarez, and L.D. Sims Influenza. In: *Diseases of Poultry*. J.R. Glisson, L.R. McDougald, L.K. Nolan, D.L. Suarez and V. Nair, eds. Wiley-Blackwell, Ames, IA. pp 181-218. 2013.
9. Tyler, K.L., J.S. Leser, T.L. PHang, and P. Clarke Gene expression in the brain during reovirus encephalitis. *J. Neurovirol.* 16:56-71. 2010.
10. VandeZande, S., and E.M. Kuhn Central nervous system signs in chickens caused by a new avian reovirus strain: a pathogenesis study. *Vet. Microbiol.* 25:42-49. 2006.
11. Zavala, G., D.A. Anderson, J.F. Davis, and L. Dufour-Zavala Acute monensin toxicosis in broiler breeder chickens. *Avian Dis.* 55:516-521. 2011.

THE IMPACT OF AVIAN RETROVIRUSES IN POULTRY PRODUCTION

G. Zavala

Department of Population Health, College of Veterinary Medicine
University of Georgia
avianhealth@gmail.com
gzavala@uga.edu

Avian retroviruses affecting chickens include the avian leukosis sarcoma group of retroviruses (ALSV), commonly known as avian leukosis viruses (ALV) (7, 8); the reticuloendotheliosis viruses (REV) (11, 15); and lymphoproliferative disease virus of turkeys (LPDV) (1). ALVs are generally classified into exogenous and endogenous viruses. The latter are transmitted genetically in the germ line cells, and the exogenous viruses are transmitted congenitally, horizontally or iatrogenically. The exogenous viruses are economically important whereas the endogenous viruses are considered normal genetic components of the chicken genome and usually do not cause clinical disease or performance problems (8). Exogenous ALVs are sub classified into five subgroups infecting chickens, namely subgroups A, B, C, D and J (9). Subgroups A and B were the first ALVs to be recognized as pathogenic and detrimental for poultry production (9). These two subgroups happened to be the most common in commercial poultry several decades ago. Both are capable of inducing a variety of tumors, with lymphoid leukosis being the most common form of neoplasia represented by B cell lymphomas (20). The commercial layer industry benefited from the eradication efforts of breeding companies specializing in the genetic selection of chickens for table egg production. Thus, subgroups A and B causing lymphoid leukosis were once a very significant economic and pathologic problem, and both were the first avian retroviruses to be effectively eradicated from breeding stock (21, 24). It is important to mention that ALVs, including subgroup A (ALV-A) have been contaminants of specific pathogen free chickens used to produce fertile eggs for vaccine production. Thus, vaccine contamination with ALVs has been at times a serious problem that has required eradication and the withdrawal of contaminated vaccines from the market (2, 29, 30). The meat type chicken industry was also affected by lymphoid leukosis years ago but to a lesser extent. Eradication of ALV-A and ALV-B in meat type chickens was possible in all major primary breeding companies thanks to the experience gained during the years of eradication efforts in egg type breeding stock. Subgroups C and D (ALV-C, ALV-D) have never been a problem in commercial chickens (9), perhaps due to the fact that the original breeding stock used to generate egg type and meat type breeding stock was free of both subgroups.

In or around 1988 there was a novel emerging subgroup identified in the United Kingdom (14, 16, 17, 23, 18, 19, 22). This new subgroup, classified as ALV-J (or subgroup J avian leukosis virus) found its way to virtually all meat type primary breeding companies of the world and by the mid 1990s there was hardly no ALV-J-free meat type breeding stock in the world (31). By 1998 ALV-J-associated mortality and loss of production reached unprecedented levels. The meat type chicken industry witnessed a serious shortage of eggs due to high mortality in hens and low fertility associated with male mortality. Eradication programs were put in place and by the early 2000s and most breeding companies had succeeded in eradicating ALV-J from their pure line breeding stock (14). While the Western world was in the process of eradicating ALV-J, some Asian countries suffered the infection of their indigenous breeds of chickens preferred for their meat texture and the color of their plumage. A prime example of infected breeding stock of indigenous chickens is represented by the Chinese “Yellow” chicken, which is overwhelmingly preferred in Southern and South East China, and in Taiwan (5, 6, 12). Today, China is in the process of eradicating ALV-J from its local indigenous breeds and also from some egg type breeding stock that was also contaminated.

Recently, our laboratory discovered a population of rustic colored slow-growing chickens bred to supply the ethnic markets of the United States and thus this virus, which had been considered completely eradicated from chickens in the Western World, still circulates and is now in the process of being eradicated (32).

The economic impact of ALV infection results primarily from increased mortality associated with tumors (9, 19), reduced egg production and egg weight (25), loss of uniformity in the progeny, inability to sell and export infected breeding stock and other forms of economic losses. It can easily be understood that ALV contamination of commercial vaccines must be avoided at all costs because contaminated vaccines injected into embryos or very young chickens can induce very severe losses. Thus, SPF breeding stock must be ALV-free and therefore the cost of testing for ALV infection in SPF stock is substantial as it is for primary breeding companies. Likewise, all vaccine

companies must demonstrate that their Marek's disease vaccines are free of ALV and thus they are forced to invest in testing vaccines for ALV detection among other potential contaminants (29, 30).

Other viruses related to ALSV include fowl glioma virus found in commercial chickens in Japan (13, 26, 27); and myeloblastosis-associated virus (MAV) types 1, 2 and 1/2, of which MAV-1 has been found in commercial egg layers as recently as 2006 (33).

Another avian retrovirus that has caused serious economic losses is reticuloendotheliosis virus (REV) (15). Like ALV-A and ALV-B, REV induces bursal lymphomas and increased mortality, and it has been found as a contaminant of fowl poxvirus vaccines (10). Besides being an oncogenic virus, REV is a powerful immunosuppressor as it induces cytokine dysregulation and it has been proven to significantly increase the consequences of viral, bacterial and parasitic infections, and it also induced delayed growth, stunting, poor feathering and decreased flock uniformity (2, 3, 4, 28).

Finally, lymphoproliferative disease virus of turkeys (LPDV), which had only been detected in turkeys of the Old World and the Middle East until recently, is now known to circulate in wild turkeys of the United States (1) and even more recently it has been detected in domestic turkeys of the North Eastern United States. LPDV has not been detected yet in commercial turkeys and it remains to be known whether it circulates in commercial turkeys. LPDV induces increased mortality and tumors in infected individuals, but little is known about its pathogenesis since so far isolation and propagation methods have not been developed and thus diagnostic reagents are scarce.

In summary, avian retroviruses have inflicted a very significant economic damage to the poultry industry at various intervals, but luckily it has been possible to control, reduce and eradicate such viruses in most cases.

REFERENCES

1. Allison, A.B., M.K. Keel, J.E. Phillips, A.N. Cartoceti, B.A. Munk, N.M. Nemeth, T.I. Welsh, J.M. Thomas, J.M. Crum, A.B. Lichtenwalner, E.M. Bunting, A.M. Fadly, G. Zavala, E.C. Holmes, and J.D. Brown Avian oncogenesis induced by lymphoproliferative disease virus: a neglected or emerging retroviral pathogen? *Virology In Press*. 2014.
2. Barbosa, T., G. Zavala, and S. Cheng Molecular characterization of three recombinant isolates of avian leukosis virus obtained from contaminated Marek's disease vaccines. *Avian Dis* 52:245-252. 2008.
3. Barbosa, T., G. Zavala, S. Cheng, and P. Villegas Full genome sequence and some biological properties of reticuloendotheliosis virus strain APC-566 isolated from endangered Attwater's prairie chickens. *Virus Res* 124:68-77. 2007.
4. Barbosa, T., G. Zavala, S. Cheng, and P. Villegas Pathogenicity and transmission of reticuloendotheliosis virus isolated from endangered prairie chickens. *Avian Dis* 51:33-39. 2007.
5. Cui, Z., S. Sun, Z. Zhang, and S. Meng Simultaneous endemic infections with subgroup J avian leukosis virus and reticuloendotheliosis virus in commercial and local breeds of chickens. *Avian Pathol* 38:443-448. 2009.
6. Cui Z., Y. Du, Z. Zhang, and R.F. Silva Comparison of Chinese field strains of avian leukosis subgroup J viruses with prototype strain HPRS-103 and United States strains. *Avian Dis* 47:1321-1330. 2003.
7. Fadly, A. Avian retroviruses. *Vet Clin North Am Food Anim Pract.* 13:71-85. 1997.
8. Fadly, A.M. Neoplastic Diseases. In: *Diseases of Poultry*, 12th ed. Y.M. Saif, A. M. Fadly, J. R. Glisson, L. R. McDougald, L. K. Nolan, and D. E. Swayne, ed. Blackwell Publishing, Ames, IA. pp 449-588. 2008.
9. Fadly, A.M., and V. Nair Leukosis/Sarcoma Group. In: *Diseases of Poultry*. J.R.G. Saif Y. M., L. R. McDougald, L. K. Nolan, D. E. Swayne., ed. Blackwell Publishing Professional, Ames, Iowa. pp 514-568. 2008.
10. Fadly AM, W.R., Smith EJ, Silva RF, Reed WM, Hoerr FJ, and Putnam MR An outbreak of lymphomas in commercial broiler breeder chickens vaccinated with a fowlpox vaccine contaminated with reticuloendotheliosis virus. *Avian Pathol.* 25:35-47. 1996.
11. Fadly, A.M., G. Zavala, and R.L. Witter Reticuloendotheliosis. In: *Diseases of Poultry*. F.A.M. Saif Y.M., Glisson J.R., McDougald L.R., Nolan L.K., Swayne D.E., ed. Blackwell Publishing Professional. pp 568-588. 2008.
12. Guo, G., S. Sun, and Z. Cui [Sequence analysis for the complete proviral genome of avian leukosis virus (subgroup J) strain SD07LK1 isolated from layers]. *Wei Sheng Wu Xue Bao* 49:400-404. 2009.
13. Hatai, H., K. Ochiai, K. Nagakura, S. Imanishi, A. Ochi, R. Kozakura, M. Ono, M. Goryo, K. Ohashi, and T. Umemura A recombinant avian leukosis virus associated with fowl glioma in layer chickens in Japan. *Avian Pathol* 37:127-137. 2008.
14. McKay, J.C.a.A.G.R. Control and eradication of ALV-J. In: *International Symposium on ALV-J and other avian retroviruses*. E.F. Kaleta, L. N. Payne, and U. Heffels-Redmann, ed. World Veterinary Poultry

- Association and Institut für Geflügelkrankheiten, Justus Liebig University, Rauschholzhausen, Germany. pp 248-255. 2000.
15. Nair, V., G. Zavala, and A.M. Fadly Reticuloendotheliosis. In: Diseases of Poultry. J.R. Glisson, L.R. McDougald, L.K. Nolan, D.L. Suarez and V. Nair, eds. Wiley-Blackwell, Ames, IA. pp 593-604. 2013.
 16. Payne L. N., A. M. Gillespie, and K. Howes Myeloid leukaemogenicity and transmission of the HPRS-103 strain of avian leukosis virus. *Leukemia* 6:1167-1176. 1992.
 17. Payne, L.N. History of ALV-J. In: International Symposium on ALV-J and other avian retroviruses. E.F. Kaleta, L. N. Payne, and U. Heffels-Redmann, ed. World Veterinary Poultry Association and Institut für Geflügelkrankheiten, Justus Liebig University, Rauschholzhausen, Germany. pp 3-12. 2000.
 18. Payne, L.N. HPRS 103: a retrovirus strikes back. The emergence of subgroup J avian leukosis virus. *Avian Pathology* 27:S36-S45. 1998.
 19. Payne, L.N. Myeloid leukaemogenicity and transmission of a new strain of avian leukosis virus. In: New and Evolving Virus Diseases of Poultry. M.S. McNulty, McFerran, J.B., ed. Community Research and Technological Development Programme in the Field of "Agriculture and Agro-Industry, Including Fisheries, 1990-1994," (AIR), Brussels, Belgium. pp 311-325. 1992.
 20. Payne, L.N. Viral lymphomagenesis in the domestic fowl: a review. *Proceedings of the Royal Society of Medicine* 70:559-563. 1977.
 21. Payne, L.N., and K. Howes Eradication of exogenous avian leukosis virus from commercial layer breeder lines. *Veterinary Record* 128:8-11. 1991.
 22. Payne, L.N., S.R. Brown, N. Bumstead, K. Howes, J.A. Frazier, and M.E. Thouless A novel subgroup of exogenous avian leukosis virus in chickens. *Journal of General Virology* 72:801-807. 1991.
 23. Payne, L.N., K. Howes, A. M. Gillespie, and L. M. Smith Host range of Rous sarcoma pseudotype RSV (HPRS-103) in 12 avian species: support for a new avian retrovirus envelope subgroup, designated J. *Journal of General Virology* 73:2995-2997. 1992.
 24. Spencer, J.L. Progress towards eradication of lymphoid leukosis viruses - a review. *Avian Pathology* 13:599-619. 1984.
 25. Spencer, J.L., J. S. Gavora, and R. S. Gowe Effect of selection for high egg production in chickens on shedding of lymphoid leukosis virus and gs antigen into eggs. *Poultry Science* 58:279-284. 1979.
 26. Tomioka, Y., K. Ochiai, K. Ohashi, T. Kimura and T. Umemura In ovo infection with an avian leukosis virus causing fowl glioma: viral distribution and pathogenesis. *Avian Pathol.* 32:617-624. 2003.
 27. Toyoda, T., K. Ochiai, H. Hatai, M. Murakami, E. Ono, T. Kimura, and T. Umemura Cerebellar hypoplasia associated with an avian leukosis virus inducing fowl glioma. *Vet Pathol* 43:294-301. 2006.
 28. Zavala, G. Virus-Induced Immunosuppression: Reticuloendotheliosis and Other Immunosuppressive Viruses. In: *Immunosuppressive Diseases of Poultry*. I.M. Gimeno, ed. Grupo Asis Biomedica, S.L., Zaragoza, Spain. pp 153-160. 2013.
 29. Zavala, G., and S. Cheng Detection and characterization of avian leukosis virus in Marek's disease vaccines. *Avian Dis* 50:209-215. 2006.
 30. Zavala, G., and S. Cheng Experimental infection with avian leukosis virus isolated from Marek's disease vaccines. *Avian Dis* 50:232-237. 2006.
 31. Zavala, G., S. Cheng, and M.W. Jackwood Molecular epidemiology of avian leukosis virus subgroup J and evolutionary history of its 3' untranslated region. *Avian Dis* 51:942-953. 2007.
 32. Zavala, G., S. Cheng, S.M. Williams, and P. Dunn A natural outbreak of ALV-J in U.S. slow growing specialty chickens. In: *American Veterinary Medical Association American Association of Avian Pathologists, Chicago, IL. p Electronic Proceedings*. 2013.
 33. Zavala, G., B. Lucio-Martinez, S. Cheng, and T. Barbosa Sarcomas and myelocytomas induced by a retrovirus related to myeloblastosis-associated virus type 1 in White Leghorn egg layer chickens. *Avian Dis* 50:201-208. 2006.