



MEMORIAS DE LA XXI CONVENCION ANUAL ASOCIACION NACIONAL DE ESPECIALISTAS EN CIENCIAS AVICOLAS

1o. al 5 de mayo de 1996 • Cancún, México

&

PROCEEDINGS OF THE FORTY-FIFTH WESTERN POULTRY DISEASE CONFERENCE

May 1-5, 1996 • Cancun, Mexico

EDITOR ANECA: DR. MIGUEL A. CENICEROS R.

EDITOR WPDC: DR. MARCUS M. JENSEN

KOGUT, M.H.	Increased resistance against both paratyphoid and typhoid salmonellosis in young chickens conferred by administration of *Salmonella enteritidis*-immune cytokines Aumento en la resistencia contra la tifoidea y la paratifoidea en pollos jovenes mediante la administración de citocinas de aves inmunizadas contra *Salmonella enteritidis*	
KOPPENHEFFER, T. L.	The alternative complement pathway (ACP) of the duck (*Anas platyrhynchos*) La ruta alternativa del complemento en el pato (*Anas platyrhynchos*)	348
KREAGER, K.	Biosecurity and Avian Influenza as it relates to the commercial table egg industry La bioseguridad y la Influenza Aviar y su relación con la industria productora de huevo para el plato	19
KUMAR, S.	Control of Marek's disease in the United States and some other countries by the use of Marek's disease vaccine, Rispens strain Control de la enfermedad de Marek en Estados Unidos y en algunos otros paises mediante el uso de la cepa vacunal Rispens	74
LAMICHHANE, C. M.	ELISA for the detection of antibody to Avian Influenza type A virus in chicken and turkey serum Prueba de ELISA para la detección de anticuerpos contra el virus de la Influenza Aviar tipo A en el suero de pollos y pavos	56
LE GROS, F.X.	Hydropericardium-Hepatitis Syndrome : Potency of an inactivated vaccine produced on cell cultures Síndrome de Hepatitis e Hidropericardio: potencia de una vacuna inactivada producida en cultivos celulares	140
LE GROS, F.X.	Avian Pneumovirus vaccine: Results of field trials on broilers in Europe Vacuna contra el Pneumovirus aviar: resultados de pruebas de campo con pollos de engorda en Europa	363
LEDESMA, M.N.	Caso clínico de anemia en pollos de engorda avian farm de 4 semanas Anemia in four-week old avian farm broilers: A case report	331
LEDESMA, M.N.	Resultados de la respuesta inmune humoral en parvadas comerciales de pollo de engorda ante la vacunación contra Influenza Aviar Results of humoral immune response in commercial broiler flocks after Avian Influenza vaccination	299
LEE, M.D.	Putative bacterial phenotypes contributing to the pathogenesis of fowl Cholera Fenotipos bacterianos putativos que contribuyen a la patogenia del Cólera aviar	324
LEY, D. H.	Transmissibility and safety of live *Mycoplasma gallisepticum* vaccines Transmisibilidad y seguridad de las vacunas elaboradas con *Mycoplasma gallisepticum* vivo	198
LIZARRAGA, R.E.	La hemoaglutinación pasiva en el diagnóstico de la Infección de la Bolsa de Fabricio A passive hemagglutination assay for the diagnosis of Infectious Bursal Disease	191

	ecto de un virus de I.A. de baja patogenicidad (VIABP) sobre rámetros productivos de aves reproductoras pesadas ne effects of a low pathogenicity Avian Influenza virus on productive parameters in broiler reeders	44
	Evaluación de cuatro diferentes líneas genéticas de pollos de engorda bajo distintas condiciones de alimentación y alojamiento Evaluation of 4 broiler genetic lines under different feeding and housing conditions	238
	Evaluación de la protección al desafío conferida por inmunoglobulinas específicas contra el virus de la Infección de la Bolsa de Fabricio (IBF) aplicadas al día de edad en aves libres de patógenos específicos Challenge protection with specific Infectious Bursal Disease virus strain	178
LUCIO, M.B.	Influenza Aviar en Swan Lake An AI outbrake in Swan Lake	43
LUCIO, M.B.	Mortalidad y producción de huevo en una parvada infectada por vía vertical con virus de la Anemia Infecciosa del pollo Infectious Anemia transovarian transmission: repercussion on growth & egg production	131
LUCHSINGER, D.	USDA national policy on Avian Influenza Política nacional del Departamento de Agricultura de Estados Unidos sobre la Influenza Aviar	16
MANCERA, M.A.	Situación actual de la *Salmonella enteritidis*, su distribución y posible origen Current situation of *Salmonella enteritidis*, distribution and possible origin	245
MARSH, T. E.	Fluoroquinolone MIC_{50} and susceptibility of *Escherichia coli* isolates from northeast Georgia processed poultry Concentración Mínima Inhibitoria $_{50}$ de las fluoroquinolonas y susceptibilidad de aislamientos de *Escherichia coli* procedentes de aves procesadas en la parte norte de Georgia	382
MARTINEZ, G.A.	Evaluación de la pigmentación en pollos de engorda sacrificados utilizando un colorímetro de reflectancia Evaluation of processed broiler pigmentation using a reflectance colorimeter	410
MARTINEZ, L. A.	Comparison of frontal plane vectors as predictors of pulmonary Hypertension Syndrome in broiler chickens Comparación de los vectores de planos frontales para predecir el Síndrome de Hipertensión pulmonar en pollos de engorda	231
MCCARTY, J.	Histopathological evaluation of Leghorn bursas as a measure of bursal health Evaluación histopatológica de bolsas de Fabricio de aves Leghorn como una medida de la salud de este órgano	394
MCGRUDER, E. D.	Evaluation of an experimental *Escherichia coli* airsacculitis model in broiler chicks Evaluación de un modelo experimental de aerosaculitis por *Escherichia coli* en pollos de engorda	128
MCNULTY, M. S.	A strategy for dealing with new virus diseases of poultry Una estrategia para hacer frente a las enfermedades virales nuevas en las aves	57

MEDINA, H. A.	Factors to consider in the design of a biosecurity program and related procedures for broiler and turkey operations Factores a considerar en el diseño de un programa de bioseguridad y procedimientos relacionados en granjas de pavos y pollos de engorda	17
MEEDE, S.L.	Influenza Aviar en México : estudio recapitulativo Avian Influenza in Mexico: a recapitulative study	301
MERINO, G.R.	Evaluación de los resultados zootécnicos de una parvada de reproductoras pesadas de segundo ciclo con una aplicación de vacuna subunitaria emulsionada de *E. coli* Evaluation of productive parameters of a second laying cycle broiler breeder flock vaccinated with an oil emulsion *Escherichia coli* subunit vaccine	125
MERINO, H.	Resultados de pigmentación con dos productos naturales de flor de Cempasuchil evaluados con el Colorímetro de Reflectancia Minolta CR-300 Pigmentation results with 2 natural marigold flower products evaluated by the Minolta CR-300 Reflectance Colorimeter	402
MEZA, A.M.	Calidad de la albumina del huevo obtenido de gallinas alimentadas con raciones que incluyen algas marinas Albumen quality in eggs from hens fed rations containing marine algae	404
MEZA, T. H.	Acción de un inhibidor de aromatasa sobre la diferenciación de la gónada femenina de embriones de pollo The action of an aromatase inhibitor on the differentiation of chicken embryo's female gonads	133
MICKLE, T. R.	Actualización sobre el desarrollo de una vacuna recombinante contra la Influenza Aviar en la que se utiliza como vector al virus de la viruela An update on the development of a recombinant Avian Influenza-fowlpox vectored vaccine	33
MIGLIACCIO, J.	Evaluation of a recombinant antigen Infectious Bursal Disease virus ELISA Evaluación de un antígeno recombinante de ELISA para la detección de anticuerpos contra el virus de la Infección de la Bolsa de Fabricio	360
MONTIEL, E.	Efficacy of Marek's vaccines in commercial broilers Eficacia de las vacunas de Marek en pollo de engorda	70
MOORE, K. M.	Avian Infectious Bronchitis virus: RNA recombination in vitro Recombinación *in vitro* del ARN del virus de la Bronquitis Infecciosa	63
MORALES, G.J.	Evaluación de la protección al desafío conferida por Inmunoglobulinas contra el Síndrome del Hidropericardio en pollo de engorda Protection against challenge conferred by Hydropericardium Syrdrome immunoglobulins in broilers	172
MUIR, S. K.	Acquisition of maternally derived systemic antibody in late stage embryos from commercial Leghorn and broiler flocks Adquisición de anticuerpos maternos sistémicos en embriones de pollo, durante las últimas fases de su desarrollo, procedentes de parvadas comerciales Leghorn y de engorda	146
MUTALIB, A.	Distribution of arthritis and osteomyelitis in turkeys with green liver discoloration Distribución de la artritis y la osteomielitis en pavos con hígados de color verdoso	204

NAGARAJA, K.V.	Plasmid diversity and genetic fingerprinting of *Salmonella enteritidis* isolates from poultry and human origin Diversidad de plásmidos y huella digital genética de aislamientos de *Salmonella enteritidis* de origen avícola y humano	250
NAVARRO, H.	Utilización de niveles máximos de inclusión de soya integral en dietas para pollo de engorde Utilize full fat soybeam meal in poultry rations	79
NEWMAN, L. J.	Live *Pasteurella multocida* vaccination: Vaccination technique and troubleshooting Vacunación con *Pasteurella multocida* viva: técnica y solución de problemas	142
NISBET, D. J.	Maintenance of a competitive exclusion culture by continuous-flow fermentation Mantenimiento de un cultivo de exclusión competitiva mediante fermentación de flujo contínuo	275
OCAMPO, C.L.	Eficacia antibacteriana *in-vitro* y en brotes de campo de ERC de la cefaquinolona Antibacterial efficacy of cephaquinolone *in vitro* and on Chronic Respiratory Disease field outbreaks	220
ODOM, T. W.	Role of L-Arginine on in vitro vasoactivity of pulmonary arteries in the broiler chicken El papel de la L-Arginina en la vasoactividad *in vitro* de las arterias pulmonares del pollo de engorda	234
ORTIZ, M. A.	Experiencias internacionales para la erradicación de Influenza Aviar International experiences in the eradication of Avian Influenza	305
OYARZABAL, O.A.	Further characterization of campylobacter-like bacteria isolated from avian species Caracterización adicional de bacterias tipo *Campylobacter* aisladas de especies aviares	387
PAEZ, L.A.	Método validado de la actividad antimicrobiana en desinfectantes A validated method to evaluate the antimicrobial activity of disinfectants	386
PALACIOS, M.R.	Evaluación de 7 vacunas comerciales de Influenza Aviar Evaluation of 7 commercial Avian Influenza vaccines	38
PECELUNAS, K.	Botulism: Case reports Reporte de casos de Botulismo	135
PERDUE, M. L.	Heterogeneidad en la proteína de la hemaglutinina entre aislamientos del virus de la Influenza Aviar H5N2 procedentes del centro de México Heterogeneity in the hemagglutinin protein among the H5N2 Avian Influenza isolates from central Mexico	8
PETRONE, V.M.	Aerosaculitis por *Aspergillus flavus* con formación de conidióforos en perdices indias (*Alectoris graeca chukar*) *Aspergillus flavus* airsacculitis with conidiophore formation in indian partridges (*Alectoris graeca chukar*)	334
PETRONE, V.M.	Análisis de la mortandad de aves migratorias y locales en la Presa De Silva, Guanajuato, México, en el invierno de 1994-1995 Mortality analysis of migratory and resident birds in dam Presa De Silva, Guanajuato, Mexico, during 1994-1995 winter	229

PONCE, P.G.	Efecto de la posición invertida del huevo fértil de gallina Leghorn durante el almacenamiento y los 12 primeros días de incubación sobre la pérdida de humedad Effect of air cell position of Leghorn hen fertile eggs during storage and the first 12 days of incubation on egg moisture loss	424
POSADAS, H.E.	Producción de huevos en semilibertad Egg production under partial free range conditions	423
PUEBLA, O.N.	Evaluación de dos vacunas emulsionadas experimentales, inactivadas con formalina y bromoetilenimina binaria (BEB), para la prevención de la Influenza Aviar (IA) Evaluation of one formalin-killed, and one binary bromoethylenimine-killed experimental, oil emulsion vaccines for the prevention of Avian Influenza	148
PURON, D.	Evaluación del comportamiento y costo de la dieta de pollos de engorda criados con dietas elaboradas por programación lineal y estocástica Performance/diet cost evaluation of broilers fed diets prepared by either linear or stocastic programming	413
QUEZADA, T.T.	Efecto de la aflatoxina B_1 sobre la farmacocinética de algunas sulfas en pollos de engorda Effect of aflatoxin B_1 on the pharmacokinetics of some sulfa drugs in broilers	86
QUINTANA, L.J.	Efecto de una cutícula artificial sobre la pérdida de peso de huevos fértiles de gallina Leghorn durante la incubación The effect of an artificial cuticle on weight loss of Leghorn fertile eggs during incubation	397
QUIROZ, P.M.	Comparación de los parámetros productivos del pollo de engorda con dos niveles de altura del comedero Comparison of broiler productive parameters with 2 different feeder height levels	426
RAMIREZ, J.H.	Consultor: sistema computarizado de apoyo al diagnóstico de las enfermedades de las aves de corral "Consultor": a computerized system for the support of poultry disease diagnosis	335
RATH, N.C.	Biochemical and cellular manifestations of growth plate cartilage in avian tibial Dyschondroplasia Manifestaciones bioquímicas y celulares de la placa del cartílago de crecimiento en la Discondroplasia de la tibia	132
REDDY, S. K.	Immunological characterization of *Mycoplasma gallisepticum* infections in specific pathogen free chickens Caracterización inmunológica de las infecciones por *Mycoplasma gallisepticum* en pollos libres de patógenos específicos	200
RICKE, S. C.	Ecology of *Salmonella* spp. Competitiveness under anaerobic and gastrointestinal growth conditions Ecología de la competitividad de *Salmonella* sp. Bajo condiciones anaeróbicas y de crecimiento gastrointestinal	280
RODRIGUEZ, V.H.	Estudio comparativo sobre la eficiencia de la vacunación contra Influenza Aviar en pollo de engorda al día y a los ocho días de edad Comparative study on the efficiency of Avian Influenza vaccination in broilers at 1 and 8 days of age	367

RODRIGUEZ, V.H.	Protección conferida por vacunas de Influenza Aviar inactivadas con formalina, B-propiolactona y etilenimina Binaria protection conferred by formalin-, B propiolactone-, or binary ethylenimine-inactivated Avian Influenza vaccines	307
ROJAS, O.A.	Análisis de resultados de gallinas reproductoras pesadas según su peso corporal Analysis of production results of broiler breeders, according to their body weights	97
RONEY, C S.	Resurgence of Zoalene anticoccidial in US broilers Resurgimiento del anticoccidiano Zoalene en pollos de engorda en Estados Unidos	118
ROSARIO, C.C.	Comparación de la irradiación con electrones y otros métodos de desinfección en huevos de gallinas semipesadas inoculados experimentalmente con *Salmonella enteritidis* Comparisson of electron irradiation and other disinfection methods on *Salmonella enteritidis*-experimentally inoculated semi-heavy hen eggs	260
RUBIO, G.M.	Evaluación del emplume en siete diferentes estirpes comerciales de pollo de engorda a los 28 y 42 días de edad, alojados bajo mismas condiciones de manejo y alimentación Evaluation of feathering of 7 different commercial broiler strains at 28 and 42 days of age, housed under the same management and feeding conditions	398
SALEM, M.	Coinfeccion viral del virus de Laringotraqueitis Infecciosa (VLTI) con el de Bronquitis Infecciosa (BI), virus de la Enfermedad de Newcastle (VEN) y con adenovirus en pollos de engorda Infectious Laryngotracheitis Virus, Infectious Bronchitis, Newcastle Disease Virus and adenovirus coinfection in broilers	77
SAMBERG, Y.	Evaluation of the efficacy of vaccines against highly virulent Infectious Bursal Disease virus Evaluación de la eficacia de las vacunas contra el virus altamente virulento de la Infección de la Bolsa de Fabricio	188
SAMS, A.R.	The effect of chronic heat on stress and the incidence of pale exudative turkey meat Efecto del estrés calórico crónico sobre la incidencia de carne de pavo pálida y exudativa	428
SANDER, J.E.	Evaluation of ELISA titers to infectious Laryngotracheitis Evaluacion de los titulos de ELISA contra la Laringotraqueitis Infecciosa	76
SANDOVAL, G.L.	Frecuencia de *Columbicola columbae* en palomas mensajeras del Distrito Federal, México Frequency of *Columbicola columbae* in carrier pigeons of Mexico City	436
SARMA, G.	Field trial and efficacy of polyvalent Marek's disease vaccines combined with a live attenuated strain of Infectious Bursal Disease virus Prueba de campo y eficacia de las vacunas polivalentes contra la enfermedad de Marek combinadas con una cepa atenuada del virus de la infección de la Bolsa de Fabricio	71
SCHLEIFER, J.	Serologic and performance results of commercial hens vaccinated with a vectored Newcastle Disease vaccine Resultados serológicos y de rendimiento de gallinas comerciales inmunizadas con una vacuna contra la Enfermedad de Newcastle elaborada con un vector	368

SEGURA, C.	Efecto del tiempo de entrega del pollito sobre su comportamiento productivo The effect of chick delivery time on broiler performance	395
SENNE, D. A.	Characterization of Avian Influenza H5N2 isolates recovered from chickens in Mexico Caracterización de los aislamientos virales H5N2 procedentes de pollos en México	5
SHARMA, J.M.	Effect of recombinant interferon on viral immunosuppression in chickens Efecto del interferón recombinante sobre la inmunosupresión viral en pollos	147
SILIM, A.	Mono and polyclonal antibodies against avian reovirus strain S1133 show evidence for the implication of ∫B protein in the virus neutralization Los anticuerpos monoclónicos y policlónicos contra el reovirus aviar cepa S1133, muestran evidencia de la implicación de la proteína ∫B en la neutralización del virus	349
SIVANANDAN, V.	Avian Influenza virus antibody detection by competitive ELISA Detección de anticuerpos contra el virus de la Influenza Aviar mediante ELISA competitiva	52
SOSA, J.J.	Efecto de toltrazuril sobre la protección contra coccidiosis en gallinas reproductoras pesadas: prueba de campo Effect of toltrazuril on coccidiosis protection in broiler breeders: A field trial	438
SOTO, P.E.	Valoración de la prueba de HI utilizada en el monitoreo serológico de la Influenza Aviar Evaluation of the hemagglutination inhibition test for serologically monitoring of Avian Influenza	53
SPACKMAN, D.	Vertical transmission of another group D *Salmonella* causing high neonatal mortality Transmisión vertical de otra *Salmonella* del grupo D que causa alta mortalidad neonatal	267
STEDMAN, N.L.	Observations on a naturally occurring outbreak of Marek's Disease in chickens and Coturnix quail Observaciones de un brote de ocurrencia natural de la enfermedad de Marek en pollos y en codornices	138
STEWART-BROWN, B.	The production and use of an inactivated Infectious Bursal Disease (IBD) vaccine using an avian cell line as a substrate Producción y uso de una vacuna inactivada contra la Infección de la Bolsa de Fabricio, utilizando como substrato una línea de origen aviar	187
SUAZO, O.A.	Efecto de tres programas de restricción alimenticia en el control de el Síndrome Ascítico y su repercusión en los parámetros productivos de el pollo de engorda The effect of 3 feed restriction programs in the control of Ascites Syndrome and their repercussion on production parameters in broilers	240
SUMANO, L.H.	Farmacocinética de CQ-S-EPCA-297, una cefaquinolona, en pollo de engorda Pharmacokinetics of CQ-S-EPCA-297, a new cephaquinolone, in broilers	218

SWAYNE, D. E.	Evaluación del virus inactivado de la Influenza Aviar H5, de las vacunas recombinantes con el virus de la viruela y de los reactivos utilizados en las pruebas diagnosticas: implicaciones en las estrategias de control y prevención de la Influenza Aviar Evaluation of inactivated H5 Avian Influenza virus and fowlpox virus recombinant vaccines and diagnostic test reagents: Implications in Avian Influenza control and prevention strategies	35
TEJEDA, P.A.	Evaluación económica de un sistema de producción de huevos semiintensivo Economic evaluation of a semi-freedom egg production system	430
TEJEDA, P.A.	Elección de nido y sus repercusiones en la postura de huevos en el piso Nest selection and it's affect on floor eggs	432
TEJEDA, P.A.	La relación entre problemas de salud y producción con el comportamiento de las aves de corral Relationship between healty problems and production with the behavior of poultry	433
TERHUNE, T.N.	Pharmacokinetics of Enrofloxacin oral solution in chickens Farmacoquinesis de la Enrofloxacina solución oral en pollos	217
TOSCANO, C.A.	Evaluación de daño, regeneración y protección de la Bolsa de Fabricio causado por la aplicación de vacunas a virus vivo contra la infección de la Bolsa de Fabricio Evaluation of bursal damage, regeneration, and protection by the administration of Infectious Bursal Disease live virus vaccines	183
TYRRELL, P.I.	DNA fingerprinting of *Mycoplasma gallisepticum, Mycoplasma synoviae, Mycoplasma iowae* and *Mycoplasma meleagridis* Huella digital del ADN de *Mycoplasma gallisepticum, M. synoviae, M. iowae* y *M. meleagridis*	351
URQUIZA, B.O.	Purificación y caracterización parcial de proteínas con actividad enterotóxica tipo CT de *Salmonella gallinarum* Purification and partial characterization of proteins *Salmonella gallinarum* with enterotoxic activity CT like	270
VALLADARES, J.C.	Detección serológica del Virus de Rinotraqueitis del pavo y su probable relación con enfermedad respiratoria en el noreste de México Serological detection of turkey Rhinotracheitis Virus and its possible relation with respiratory disease in north east Mexico	338
VALLADARES, J.C.	Epidemiología de la infección por *Salmonella enteritidis* en el noreste de México Epidemiology of *Salmonella enteritidis* infection in north east Mexico	253
VICTORIA, G.	Efecto del Toltrazuril como tratamiento post vacunal de Coccidiosis Aviar en pollo de engorda en comparación con Amprolio y su consecuencia sobre la inmunidad A comparison of Toltrazuril vs. Amprolium as coccidial post-vaccination treatments and their effects on immunity in broilers	112
VIELITZ, E.	Vaccines for *Salmonella* control Vacunas para el control de Salmonella	288

VILLEGAS, P.	Adenovirus and Inclusion Body Hepatitis in chickens Adenovirus y Hepatitis por Cuerpos de Inclusión en aves domésticas	62
VIRTANEN, E.	Betaine applications in poultry Aplicaciones de la betaina en aves	108
WHITFILL, C.E.	Protection against very virulent Infectious Bursal Disease (IBD) challenge in England by in ovo vaccination with a virus-antibody complex IBD vaccine Protección contra el desafío muy virulento con la Infección de la Bolsa de Fabricio en Inglaterra mediante la vacunación *in ovo* con una vacuna elaborada con un complejo virus-anticuerpo	189
WILSON, M.K.	Infectious Bursal Disease virus induced proventriculitis in maternally immune broiler chickens El virus de la Infección de la Bolsa de Fabricio indujo proventriculitis en pollos de engorda con inmunidad materna	193
WITTER, R.L.	Reproducibility of efficacy tests for Marek's disease vaccines Reproducibilidad de las pruebas de eficacia de las vacunas contra la enfermedad de Marek	72
WONG, R.A.	Administración *in ovo* de linfocinas como inmunoprofilaxis contra la infección por *Salmonella gallinarum* en pollos de engorda *in ovo* Administration of lymphokines as immunoprophylaxis in the prevention of *Salmonella gallinarum* in broilers	376
WOOLCOCK, P.R.	Characterization of Infectious Bronchitis virus isolates from California, 1994-1995 Caracterización de aislamientos de virus de la Bronquitis Infecciosa de California, de 1994 a 1995	68
WOOLEY, R.E.	Analysis of plasmids cloned from a virulent avian *Escherichia coli* and transformed into *Escherichia coli* DH5I Análisis de los plásmidos de una cepa virulenta de *Escherichia coli* de origen aviar transformada a *Escherichia coli* DH5I	383
YAMAMOTO, R.	Current situation on control of Avian Mycoplasmosis Situación actual del control de la Micoplasmosis Aviar	197
YAZWINSKI, T.A.	Considerations and tactics for helminth control in turkeys and chickens Consideraciones y tácticas para el control de los helmintos en pollos y pavos	122
ZIEGLER, A.F.	Confirmation of *Listeria monocytogenes* 4B in experimentally infected chickens by immunohistochemistry Confirmación mediante inmunohistoquímica de *Lysteria monocytogenes* 4B en pollos infectados experimentalmente	161

MEMORIAS DE LA XXI CONVENCION ANUAL DE LA ASOCIACION NACIONAL DE ESPECIALISTAS EN CIENCIAS AVICOLAS

PROCEEDINGS OF THE FORTY-FIFTH WESTERN POULTRY DISEASE CONFERENCE

RECENT WORK ON THE PATHOGENICITY OF AVIAN INFLUENZA VIRUSES AND THE PATHOGENICITY AND ANTIGENICITY OF NEWCASTLE DISEASE VIRUS

TRABAJOS RECIENTES SOBRE LA PATOGENICIDAD DE LOS VIRUS DE LA INFLUENZA AVIAR Y LA PATOGENICIDAD Y ANTIGENICIDAD DEL VIRUS DE LA ENFERMEDAD DE NEWCASTLE

Dennis J. Alexander, Geoff W. Wood, Michael S. Collins,
Jill Banks, and Ruth J. Manvell

Avian Virology, Central Veterinary Laboratory, New Haw, Addlestone
Surrey KT15 3NB,
United Kingdom

RESUMEN

Además de los virus de la influenza aviar (IA) de baja virulencia aislados y de los virus de alta patogenicidad (HP, por sus siglas en inglés) responsables del brote de Norfolk en diciembre de 1991, sólo se han detectado aminoácidos múltiples en el sitio de la hendedura de la hemaglutinina en los virus de los subtipos H5 y H7 remitidos al Laboratorio Internacional de Referencia (IRL, por sus siglas en inglés) que son demostrables como patógenos para los pollos cuando se prueban *in vivo*.

Se demostró que 2 virus de la influenza aviar del subtipo H10 del cepario del IRL satisfacen los criterios internacionales para ser catalogados como de alta patogenicidad, cuando se administran intravenosamente a pollos de 6 semanas de edad. La determinación de la secuencia de sus nucleótidos reveló la ausencia de múltiples aminoácidos básicos en el sitio de la hendedura de la hemaglutinina de estos virus.

Entre los aislamientos de la forma variante del virus de la enfermedad de Newcastle responsable de la reciente panzootia en palomas mensajeras existe la tendencia de no mostrar su virulencia total en pollos sino hasta después de varios pasajes en esta especie. No obstante, extensas investigaciones han fracasado hasta ahora en sus intentos de determinar la base molecular de este fenómeno.

Los virus de la enfermedad de Newcastle aislados a partir de epizootias recientes y enviados al IRL se sometieron a pruebas frente a 26 anticuerpos monoclónicos. La comparación de la capacidad de estos aislamientos de reaccionar ante dichos anticuerpos nos ha permitido llegar a un rastreo epizootiológico confiable y a la distinción entre brotes causados por diferentes virus.

INTRODUCTION

Throughout the world the highly pathogenic forms of Newcastle disease [ND] and avian influenza [AI] are the most feared diseases of poultry and may result in devastating outbreaks with high mortality. For both diseases, diagnosis and control measures are complicated by the presence of viruses of low virulence that may be endemic in feral birds or, for ND, used as live vaccines. Thus it is important to have a clear definition of these diseases for trade and control purposes, and this in turn requires an understanding of the basis for pathogenicity of the causative viruses.

For both viruses it has been shown that the main functional glycoprotein: the haemagglutinin (H), for AI virus and the fusion protein (F), for ND virus, is produced in a precursor form [H0 and F0] which requires post translational cleavage [H0 to H1 and H2, F0 to F1 and F2] by host proteases before the protein is functional and the virus particle infectious[6]. For both viruses the main difference between viruses of high and low virulence for chickens is the range of host proteases capable of bringing about cleavage of the precursor protein. Avirulent viruses are limited to cleavage by host proteases such as trypsin and trypsin-like enzymes and thus restricted to replication at sites in the host where such enzymes are found. In contrast virulent viruses appear to be cleavable by a ubiquitous protease[s], which remains to be fully identified but appears to be one or more proprotein-processing subtilisin-related endoproteases of which furin is the leading candidate, and this enables these viruses to replicate throughout the animal damaging vital organs and tissues which brings about disease and death in the infected bird[7]. Comparisons of the amino acid sequences at the H0

cleavage site of AI viruses of high and low pathogenicity revealed that all highly pathogenic [HP] AI viruses possessed multiple basic amino acids [arginine - R and lysine - K] at that site either as a result of apparent insertion or apparent substitution[9]. The additional basic amino acids producing a motif recognised and cleavable by the ubiquitous protease[s]. Similarly, virulent ND viruses have the motif ^{112}K/R-R-Q-K/R-RáF^{117} at the F0 cleavage site but viruses of low virulence ^{112}G/E-K/R-Q-G/E-RáL^{117} [3]. The presence of either phenylalanine or leucine at residue 117, the N-terminus of the F1 protein, may be extremely important in modulating cleavage.

However, AI virus A/chicken/Pennsylvania/1/83 which had the sequence P-Q-K-K-K-Rá at the cleavage site did not conform to this rule, showing low virulence for chickens. Retrospective analysis demonstrated that this was due to a glycosylation site sequentially removed but structurally close to the cleavage site, which, it was assumed, on glycosylation resulted in a carbohydrate chain which interfered with access to the cleavage site by the ubiquitous enzyme[8]. Loss of this glycosylation site by point mutation occurred in the field and resulted in the emergence of HPAI virus with unchanged amino acids at the cleavage site. As a result definitions of HPAI viruses were modified to include all H5 and H7 viruses with multiple basic amino acids at the cleavage site regardless of their *in vivo* virulence.

INFLUENZA VIRUSES SUBMITTED TO THE INTERNATIONAL REFERENCE LABORATORY (IRL)

Countries of the European Union [EU] and those with certain trading agreements with the EU are obliged to submit H5 and H7 influenza virus isolates to the IRL for nucleotide sequencing to deduce the amino acid sequence at the cleavage site of the haemagglutinin, other countries have submitted such viruses for their own information or at the request of the IRL.

In recent years a total of 24 such viruses was received [14 H7, 10 H5] and the deduced amino acids at the cleavage site and the virulence of the isolates, measured by intravenous pathogenicity index [IVPI] tests, are shown in Table 1. With the exception of isolate A/turkey/England/87-92/91 (H5N1), which had the same cleavage site motif as HPAI isolates obtained from the same outbreak but showed low virulence for chickens, multiple basic amino acids at the cleavage site of the haemagglutinin were only detected in viruses of H5 that were demonstrably pathogenic for chickens when tested *in vivo*.

PATHOGENIC H10 AI VIRUSES?

An AI virus of H10N5 subtype which had been isolated from a mandarin duck held in quarantine in Singapore following importation from Europe was submitted to the IRL. Surprisingly, this virus caused 8/10 deaths in an IVPI test and thus fell within the international definitions of HPAI. Another virus of H10 subtype, A/turkey/England/384/79 (H10N4) had also been reported to show similar unexpectedly high pathogenicity[2]. These 2 viruses and an H10 virus of low pathogenicity, A/chicken/England/378/85 (H10N4), were subjected to nucleotide sequencing to deduce the amino acid sequence at the haemagglutinin cleavage site. All 3 viruses possessed the same motif: -PEIMQGRáGLF-. It would therefore appear that the demonstrable virulence of the 2 viruses by intravenous inoculation is not related to the ability of the viruses to replicate systemically as a result of cleavage by the putative ubiquitous protease[s].

PATHOGENICITY FOR CHICKENS OF ND VIRUSES FROM PIGEONS

The ND virus responsible for the panzootic in racing and show pigeons that began in the early 1980s has been shown by both antigenic and genetic criteria to be distinguishable from other ND viruses[4] and has been termed pigeon paramyxovirus type 1 [PPMV-1]. A notable feature of PPMV-1 isolates obtained from pigeons was that, while they were antigenically indistinguishable from each other, their virulence for chickens showed considerable variation with a wide range of values being obtained in IVPI and intracerebral pathogenicity index [ICPI] tests. The variation has been most marked in IVPI tests where birds often remained unaffected following infection. However, isolates of the variant virus from natural outbreaks of chickens showed high pathogenicity indices and it could be demonstrated that for some pigeon isolates passage through chickens greatly increased the values obtained in IVPI tests[1,5]. Nucleotide sequence studies of 15 representative PPMV-1 viruses showed that regardless of their pathogenicity indices 13 had the F2/F1 cleavage site motif ^{112}G-R-Q-K-RáF^{117} and two ^{112}R-R-Q-K-RáF^{117} [4], the latter being more typical of other virulent ND viruses although these 2 viruses both produced low pathogenicity indices [Table 2]. Since the cleavage site motifs did not appear to explain the difference in pathogenicity the entire nucleotide sequences of the F genes was obtained for 2 PPMV-1 isolates, one, 760/83, had an IVPI of 2.01 after 4 passages in chickens, the other, 1168/84, an IVPI of 0.00 after 6 passages in chickens. The deduced amino acid sequence showed only 4 amino acid differences for the 2 viruses[5]. It was considered unlikely that these influenced the pathogenicity of the viruses as sequencing of these areas of a third virus which showed only minimal rise in

pathogenicity after passage revealed this virus to have identical sequences in these areas to 760/83 at both passage levels 0 and 6[5].

These results suggest that the differences in pathogenicity are not related to a modulation of the susceptibility of the basic amino acid motif to the ubiquitous protease[s] analogous to A/chicken/Pennsylvania/1/83 and the viruses should both be able to spread systemically. The fact that measurements of virulence of these viruses are much closer in ICPI tests where the virus is introduced directly into the brain suggests that the differences between the viruses are related to the ability to reach and/or replicate in the brain. However, the factor[s] controlling this are not likely to be associated with the fusion protein.

ANTIGENIC VARIATION IN ND VIRUSES

The antigenic homogeneity of ND virus isolates in conventional tests has been a considerable hindrance in epizootiological investigations of outbreaks of ND, especially in determining the source of the virus responsible for a specific epidemic. In relatively recent years many laboratories have used monoclonal antibodies [mAbs] to demonstrate similarities and differences between ND virus isolates. ND viruses isolated from recent epizootics and sent to the IRL have been tested with a panel of 26 monoclonal antibodies and based on the ability of the virus to react [+] or not [-] with each mAb, profiles have been obtained which have proved significant in epizootiological tracing.

The PPMV-1 variant virus showed a unique mAb pattern and, as a result, the spread of this virus throughout the world in racing and show pigeons could be confirmed. In addition, rapid identification of this virus as causing outbreaks in chickens in Great Britain in 1984 and on the island of Ireland during 1991-92, allowed rapid tracing of the source to food stores infested with infected pigeons.

The countries forming the European Union had been effectively free of ND during the 1980s, but during 1991 a series of outbreaks began which resulted in a total of 540 outbreaks in EU countries during the 5 year period 1991-1995. The viruses isolated from outbreaks during 1991-1994 primarily in The Netherlands, Belgium and Germany but including those in France and Spain all showed the same unique mAb binding pattern confirming the association of these outbreaks. In contrast quite different patterns were seen with viruses isolated from outbreaks in Portugal at this time, while as stated above the outbreaks on the island of Ireland in 1991 were due to PPMV-1 virus. PPMV-1 virus was also responsible for some outbreaks in backyard flocks in Germany in 1993-1995. During this period viruses with a third distinct pattern were obtained from ND isolates from Germany and in 1995 viruses with this binding pattern were seen in Belgium and The Netherlands. In contrast the viruses from outbreaks in Denmark and a single outbreak in Sweden showed the same mAb pattern which was distinct from any of the other viruses from EU countries.

In addition the mAb panel has been used with other ND viruses received at the IRL from other parts of the world. Although, as indicated by the findings in Europe, there appears to be considerable and complex variation in antigenicity use of mAb panels does allow important assumptions concerning the epizootiology of ND viruses to be confirmed or disproved and to date have proven a valuable tool in understanding the spread of ND viruses.

REFERENCES

1. Alexander D.J., and G. Parsons. Pathogenicity for chickens of avian paramyovirus type 1 isolates obtained from pigeons in Great Britain during 1983-85. Avian Path. 15: 487-493. 1986.
2. Alexander, D.J., and D. Spackman. Characterisation of influenza A viruses isolated from turkeys in England during March-May 1979. Avian Path. 10: 281-293. 1981.
3. Collins M.S., J.B. Bashiruddin, and D.J. Alexander. Deduced amino acid sequences at the fusion protein cleavage site of Newcastle disease viruses showing variation in antigenicity and pathogenicity. Arch Virol 128: 363-370. 1993.
4. Collins M.S., I. Strong, and D.J. Alexander. Evaluation of the molecular basis of pathogenicity of the variant Newcastle disease viruses termed 'pigeon PMV-1 viruses'. Arch Virol 134: 403-411. 1994.
5. Collins M.S., I. Strong, and D.J. Alexander. Pathogenicity and phylogenetic evaluation of the variant Newcastle disease viruses termed "pigeon PMV-1 viruses" based on the nucleotide sequience of the fusion protein gene. Archiv. Virol. 141: in press.
6. Rott, R. Molecular basis of infectivity and pathogenicity of myxoviruses. Archiv. Virol 59: 285-298. 1979.
7. Stieneke-Grober, A., M. Vey, H. Angliker, E. Shaw, G. Thomas, C. Roberts, H-D. Klenk, and W. Garten. Influenza virus hemagglutinin with multibasic cleavage site is activated by furin, a subtilisin endoprotease. EMBO J. 11: 2407-2414. 1992.
8. Webster, R.G., and Y. Kawaoka. Avian influenza. Crit. Rev. Poult. Biol., 1: 211-246. 1988.
9. Wood, G.W., J.W. McCauley, J.B. Bashiruddin, and D.J.Alexander. Deduced amino acid sequences at the haemagglutinin cleavage site of avian influenza

A viruses of H5 and H7 subtypes. Archiv. Virol.130: 209-217. 1993.

Table 1. Intravenous pathogenicity indices in 6-week-old chickens (IVPIs) and deduced amino acid sequences at the cleavge site of the haemagglutinin of H5 and H7 AI viruses submitted to the international reference laboratory during 1991-1995.

Virus	IVPIs	Cleavage site sequence
H5 viruses		
A/turaco/England/2004/91 (H5N2)	0.00	-P-Q-R-E-T-RáG-L-F-
A/turkey/England/50-92/91 (H5N1)	3.00	-P-Q-R-K-R-K-T-RáG-L-F-
A/turkey/England/87-92/91 (H5N1)	0.00	-P-Q-R-K-R-K-T-RáG-L-F-
A/goose/Italy/934/92 (H5N2)	0.00	-P-Q-R-E-T-RáG-L-F-
A/emu/Netherlands/405/94 (H5N9)	0.00	-P-Q-R-E-T-RáG-L-F-
A/chicken/S. Africa/992/94 (H5N9)	0.00	-P-Q-R-E-T-RáG-L-F-
A/ostrich/S. Africa/992a/94 (H5N9)	0.00	-P-Q-R-E-T-RáG-L-F-
A/parrot/Zimbabwe/4248/95 (H5N2)	0.00	-P-Q-R-E-T-RáG-L-F-
A/parrot/Zimbabwe/4066/95 (H5N2)	0.00	-P-Q-R-E-T-RáG-L-F-
A/ostrich/Neths/380393/96 (H5N2)	0.00	-P-Q-R-E-T-RáG-L-F-
H7 viruses		
A/ostrich/S.Africa/1609/91 (H7N1)	0.00	-P-E-I-P-K-G-RáG-L-F-
A/psittacine/Italy/1384/91 (H7N2)	0.88	-P-E-I-P-K-G-RáG-L-F-
A/ostrich/S.Africa/1062/91 (H7N1)	0.00	-P-E-I-P-K-G-RáG-L-F-
A/chicken/Victoria/1/92 (H7N3)	2.71	-P-E-I-P-K-K-K-K-RáG-L-F-
A/gull/Italy/692-2/93 (H7N2)	0.00	-P-E-I-P-K-G-RáG-L-F-
A/conure/England/766/94 (H7N1)	0.00	-P-E-I-P-K-G-RáG-L-F-
A/parakeet/Neths/873/94 (H7N1)	0.00	-P-E-I-P-K-G-RáG-L-F-
A/parrot/England/1174/94 (H7N1)	0.00	-P-E-I-P-K-G-RáG-L-F-
A/bluebird/Singapore/F92-9/94 (H7N1)	0.00	-P-E-I-P-K-G-RáG-L-F-
A/iora/Singapore/F89-11/95 (H7N1)	0.58	-P-E-I-P-K-G-RáG-L-F-
A/chicken/Pakistan/447/95 (H7N3)	2.76	-P-E-T-P-K-R-K-R-K-RáG-L-F-
A/chicken/Pakistan/CR2/95 (H7N?)	2.98	-P-E-T-P-K-R-R-K-RáG-L-F-
A/chicken/Queens/667-6/95 (H7N3)	3.00	-P-E-I-P-R-K-R-K-RáG-L-F-
A/turkey/Ireland/PV74/95 (H7N7)	0.00	-P-E-I-P-K-G-RáG-L-F-

Table 2. Deduced amino acid sequences at the F0 cleavage site for PPMV-1 viruses, adapted from Collins et al[4].

Viruses	**amino acid sequence**	**ICPI**	**IVPI**
8 pigeon isolates	^{109}SGGGRQKR-FIG^{119}	1.36*	0.32*
3 chicken isolates	^{109}SGGGRQKR-FIG^{119}	1.67*	2.26*
760/83 chick passage 0	^{109}SGGGRQKR-FIG^{119}	1.48	0.28
760/83 chick passage 3	^{109}SGGGRQKR-FIG^{119}	1.54	2.01
340/91	^{109}SGERRQKR-FIG^{119}	0.66	0.22
1606/91	^{109}SGERRQKR-FIG^{119}	1.36	0.44

* mean values

CHARACTERIZATION OF AVIAN INFLUENZA H5N2 ISOLATES RECOVERED FROM CHICKENS IN MEXICO

CARACTERIZACION DE LOS AISLAMIENTOS VIRALES H5N2 PROCEDENTES DE POLLOS EN MEXICO

D. A. Senne[A], E. Rivera[B], B. Panigrahy[A], M. Fraire[C], Y. Kawaoka[D], and R. G. Webster[D]

[A]U.S. Department of Agriculture, Animal and Plant Health Inspection Service,
Veterinary Services, National Veterinary Services Laboratories
P.O. Box 844, Ames, IA 50010
[B]Campana Nacional contra la Influenza Aviar, Recreo No. 14 Piso 12
Col. Actipan del Valle, Mexico, D.F. 03230
[C]Comision Mexico Estados Unidos para la Prevencion de la Fiebre Aftosa y
Otras Enfermendades Exoticas de los Animales, KM. 15.5 Carretera Mex. Toluca
Palo Alto, Delegacion Cuajimalpa, Mexico D.F. 05110
[D]Department of Virology/Molecular Biology, St. Jude Children's Research Hospital
332 N. Lauderdale, P.O. Box 318, Memphis, TN 38101

RESUMEN

Se caracterizaron 33 aislamientos H5N2 del virus de la influenza aviar procedentes de pollos mexicanos, respecto a: 1) perfil de aminoácidos en el sitio de la hendedura de la hemaglutinina, 2) patogenicidad para el pollo y 3) propiedades antigénicas de aislamientos selectos, según se determinó mediante un panel de anticuerpos monoclónicos. Los análisis realizados con anticuerpos monoclónicos apoyan a la evidencia molecular reciente de que el virus mexicano H5N2 está relacionado con el virus H5N2 aislado de aves cosetñas en Estados Unidos en 1991. Además, se observó heterogeneidad entre los aislamientos que sugiere que, con el correr del tiempo, han evolucionado diferentes subpoblaciones. Todos los aislamientos apatógenos tuvieron la secuencia R-E-T-R/G en el sitio de la hendedura. Por otra parte, los virus de patogenicidad media y alta tuvieron una de 2 secuencias en el sitio de la hendedura, a saber: R-K-R-K-T-R/G ó R-K-R-K-R-K-T-R/G. La presencia de aminoácidos básicos múltiples en el sitio de la hendedura es consistente con la de los virus de alta patogenicidad. Estos resultados son significativos en tanto que este hallazgo representa el primer informe documentado de la evolución natural de un virus no altamente patógeno, genotípica y fenotípicamente, a un virus altamente patógeno.

Avian influenza (AI) is a disease caused by influenza virus type A of the family *Orthomyxoviridae*. The viruses are distributed worldwide. The genome of AI virus is comprised of eight separate segments of single-stranded RNA. There are two major surface glycoproteins that project from the envelope of the virus--the hemagglutinin (HA) and neuraminidase (NA). Fourteen HA (H1 - H14) and 9 NA (N1 - N9) subtypes are currently recognized. Because RNA viruses lack proofreading capabilities, the frequency of mutations during replication of AI viruses is high, giving rise to antigenic variants by processes referred to as antigenic drift and antigenic shift. Infections with AI viruses can range from asymptomatic, to a respiratory disease with decreased egg production, to a fulminating, systemic disease with high mortality. The severe form of the disease has been associated only with subtypes H5 and H7. Laboratory confirmation of the disease and virus characterization, including the assessment of pathogenicity, is necessary to help implement appropriate control measures.

Laboratory characterization of field isolates of AI virus include identification of HA and NA subtype and the assessment of pathogenicity or pathogenicity potential. In 1981, a recommendation was made at the First International Symposium on AI that chickens should be used to evaluate pathogenicity of AI virus isolates and that viruses that kills 6 or more of 8 inoculated chickens should be classified as highly pathogenic avian influenza (HPAI) virus[1]. When this criterion was used during the outbreak of HPAI in the northeastern U.S. in 1983, it was concluded that in many cases, chicken inoculation was not adequate because numerous discrepancies were observed between repeated inoculations and field situations[10]. Recent studies have provided a better understanding of the molecular basis of pathogenicity. Although not yet fully defined, pathogenicity with AI viruses is a polygenic phenomenon, with several genes contributing to expression of pathogenicity. The HA gene, however,

plays a dominant role in pathogenicity[14]. Presence of multiple basic amino acids at the cleavage site of the HA glycoprotein is shown to be a characteristic of highly pathogenic viruses or viruses that have the potential to become highly pathogenic[5,7,11,12,15].

In April 1994, AI virus subtype H5N2 was isolated for the first time from commercial chickens in Mexico. Affected birds were showing signs of respiratory disease, a drop in egg production, and increased mortality. In December 1994 and January 1995, several flocks in the states of Puebla and Queretaro suffered high mortality and lesions characteristic of HPAI. In this study, we report the characterization of 33 isolates of H5N2 viruses isolated from chickens from Mexico between April 1994 and August 1995.

Evaluation of Isolates by Monoclonal Antibodies. A panel of 23 monoclonal antibodies to A/Chicken/Pennsylvania/1370/83 (H5N2) (CP1370) was used to evaluate the antigenic properties of selected isolates by the hemagglutination-inhibition (HI) test. The HI test was performed in microtiter plates with ascites fluid and 4 HA units of antigen[8]. Results showed considerable antigenic variation among the Mexican isolates (Table 1), including those isolated early in the outbreak, e.g., CM1374, CH1368, and CQ1373. This would suggest that the virus had been circulating in poultry for an extended period of time prior to its isolation and that mutations, resulting in changes in the antibody binding epitopes, had occurred. In addition, reactivity patterns of the Mexican isolates are similar to those isolated from shorebirds in Maryland in 1991 (RD244) and from live-bird markets in New York and New Jersey and Pennsylvania (CP13609) in 1993[3].

Chicken Pathogenicity Test Results. Isolates were tested for pathogenicity in chickens by inoculating 0.2 ml of a 1:10 dilution of infectious egg allantoic fluid into 4- to 8-week-old Specific Pathogen Free (SPF) chickens by the intravenous route. Inoculated chickens were housed in isolation chambers under negative air pressure and observed for 10 days for signs of illness or death. Birds that died were necropsied and examined for lesions of AI. Isolates that killed 4 or 5 of 8 chickens were classified as moderately pathogenic, whereas isolates that killed 6 or more chickens were classified as highly pathogenic[6].

Pathogenicity of Mexican H5N2 viruses in SPF chickens is presented in Table 2. Of the 6 viruses that produced mortalities in chickens, 4 isolates (CQ19, CH910, CQ853 and CQ20) killed 8 of 8 chickens and 2 isolates, CP607 and CP602, respectively, killed 5 of 8 and 4 of 8 chickens. The average time of death of chickens, in days, for the 6 moderately and highly pathogenic viruses were as follows: CP607, 6.8; CP602, 5.8; CQ19, 4.5; CP910, 3.88; CQ853, 2.5; and CQ20, 2. Isolate CQ20 killed 2 of 8 chickens in less than 18 hours postinoculation. The shorter time of death of chickens may be related to the increased number of basic amino acids (six) at the HA cleavage site, allowing efficient cleavage of the HA in a wide range of host cells, compared to moderately and highly pathogenic isolates that had only 4 basic amino acids adjacent to the cleavage site.

HA Cleavage Site Sequence. To assess the pathogenicity potential of the 33 H5N2 AI viruses, the amino acid sequence at the cleavage site of the HA was determined as described[11]. Three cleavage site sequences were detected (Table 2). All nonpathogenic viruses had the sequence R-E-T-R/G at the cleavage site, whereas isolates that produced mortality (moderately and highly pathogenic viruses) in experimentally inoculated chickens had either R-K-R-K-T-R/G or R-K-R-K-R-K-T-R/G at the cleavage site. The acquisition of multiple basis amino acids at the HA cleavage site, as seen in the moderately and highly pathogenic Mexican H5N2 viruses, correlates with an increase in pathogenicity for chickens. The HA cleavage site sequences of these viruses are consistent with cleavage site sequences of highly pathogenic viruses[7,10,15].

DISCUSSION

The isolation of H5N2 AI virus from chickens in Mexico represents the first occurrence of AI infection in that country. This probably contributed to the early spread of the virus in commercial operations because AI was not initially suspected as a differential in early cases of the disease. The question as to the possible origins of the virus were partly answered by the test with a panel of monoclonal antibodies and comparing the results of the Mexican H5 viruses to H5 viruses recently isolated from other geographical areas. The different reactivity patterns seen with early Mexican H5 viruses would suggest that mutations in the HA gene had already occurred and that antigenic subpopulations of the virus had evolved and were circulating in poultry at the time the disease was first diagnosed. The antigenic relationship found between the Mexican H5N2 viruses and H5N2 virus recovered from ruddy turnstones in Maryland in 1991 would suggest that migratory shorebirds may have been responsible for the introduction of the virus in Mexico[3]. The relationship between the Mexican H5N2 and ruddy turnstone isolate was further confirmed by phylogenetic studies of the HA gene[3]. From these studies it can be concluded that monoclonal antibodies can serve as a valuable tool to quickly evaluate relationships between viruses within the same subtype. In addition, testing with monoclonal antibodies can be performed quicker and with less resources than phylogenetic studies.

The characteristics of the disease in Mexico, in many respects, were similar to the outbreak of H5N2 AI in northeastern United States in 1983[2]. In both outbreaks, the disease produced by early isolates was a mild respiratory disease with increased mortality and decreased egg production. After several months of unabated spread, the virus had undergone mutation and produced a disease with high mortality. Recent studies have provided evidence that HPAI viruses do not constitute unique lineages but arise from nonpathogenic precursors that are maintained in aquatic bird reservoirs[9]. The acquisition of a series of basic amino acids at the cleavage site of the nonpathogenic Mexican H5N2 progenitor gave rise to a virus with characteristics of HPAI virus. This supports the hypothesis of Röhm. This is in contrast to the change observed with the H5N2 virus that caused the outbreak in the U.S. in 1983. The 1983 nonpathogenic virus already had a series of basic amino acids at the cleavage site; however, a point mutation in the HA gene caused the loss of a carbohydrate side chain in the vicinity of the cleavage site. This event was responsible for the change in virulence[4,13]. The change in the cleavage site sequence of the Mexican H5N2 virus is significant in that it represents the first documented natural evolution of a nonpathogenic virus, with a typical nonpathogenic HA cleavage sequence for H5 viruses, to one that is highly pathogenic.

The impact of HPAI in commercial poultry, regardless of geographical boundary, can be enormous. The cost of eradicating the HPAI that occurred in the U.S. in 1983 exceeded $60 million dollars with an indirect cost to the industry of more than $250 million. There is no estimate to date on the economic impact the outbreak of AI has had on the Mexican poultry industry, but undoubtedly it is considerable. Much of the cost of eradicating the HPAI in the U.S. was associated with the destruction of infected flocks. In Mexico, destruction of infected flocks was not considered because of economic reasons. Depopulation of infected premises has been voluntary, and most infected flocks were eliminated through controlled marketing. For this reason, efforts to control the disease, with a long term goal of eradication, have been centered around several programs. These programs include an extensive vaccination program, education of industry personnel in biosecurity and management techniques to reduce spread of disease, a national surveillance program, and a commitment from regulatory officials and the poultry industry to work toward eventual eradication of the disease.

Although vaccination appears to be effective in reducing clinical disease it must be emphasized that continued surveillance must be carried out to determine if the H5N2 virus continues to circulate in poultry populations. As long as H5N2, regardless of its pathogenicity, continues to circulate in poultry, continued episodes of HPAI may occur.

REFERENCES

1. Easterday, B. C. Report of the panel on development of uniform identification and terminology of avian influenza viruses. In: Proc. 1st Intl. Symp. on Avian Influenza, Beltsville, MD. p. viii. 1981.
2. Fichtner, G. The Pennsylvania/Virginia experience in eradication of avian influenza (H5N2). In: Proc. 2nd Intl. Symp. on Avian Influenza, Athens, GA. pp. 33-38. 1986.
3. Horimoto, T., E. Rivera, J. Pearson, D. Senne, S. Krauss, Y. Kawaoka, and R. G. Webster. Origin and molecular changes associated with emergence of a highly pathogenic H5N2 influenza virus in Mexico. Virology 213: 223-230. 1995.
4. Kawaoka, Y., C. W. Naeve, and R. G. Webster. Is virulence of H5N2 influenza viruses in chickens associated with loss of carbohydrate from the hemagglutinin? Virology. 139:303-316. 1984.
5. Kawaoka, Y., and R. G. Webster. Sequence requirement for cleavage activation of influenza virus hemagglutinin expressed in mammalian cells. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 85:324-328. 1988.
6. McCapes, R. H. Report of the committee on transmissible diseases of poultry and other avian species. In: Proc. 91st Ann. Meeting, USAHA, Salt Lake City, UT. pp. 374-398. 1987.
7. McCauley, J. W., G. W. Wood, J. B. Bashiruddin, and D. J. Alexander. Nucleic acid sequencing in the diagnosis of avian influenza. In: Proc. 3rd Intl. Symp. on Avian Influenza, Madison, WI. pp. 281-292. 1992.
8. Palmer, D. F., M. T. Coleman, W. R. Dowdle, and G. C. Schild. Advanced laboratory techniques for influenza diagnosis. Immunol. Ser. 6:51-52. 1975.
9. Röhm, C., T. Horimoto, Y. Kawaoka, J. Süss, and R. G. Webster. Do hemagglutinin genes of highly pathogenic avian influenza viruses constitute unique phylogenetic lineages? Virology. 209:664-670. 1995.
10. Senne, D. A., J. E. Pearson, Y. Kawaoka, E. A. Carbrey, and R. G. Webster. Alternative methods for evaluation of pathogenicity of chicken Pennsylvania H5N2 viruses. Proc. Anim. Health Assoc., Athens, GA. 1987.
11. Senne, D. A.,B. Panigrahy, Y. Kawaoka, J. E. Pearson, J. Süss, M. Lipkind, H. Kida, R. G. Webster. Survey of the hemagglutinin (HA) cleavage site sequence of H5 and H7 avian influenza viruses: Amino acid sequence at the HA cleavage

site is a marker of pathogenic potential. Avian Dis. In Press. 1996.
12. Vey, M., M. Orlich, S. Adler, H. -D. Klenk, R. Rott, and W. Garten. Hemagglutinin activation of pathogenic avian influenza viruses of serotype H7 requires the protease recognition motif R-X/K/R-R. Virology. 188:408-413. 1992.
13. Webster, R. G., Y. Kawaoka, and W. J. Bean, Jr. Molecular changes in A/Chicken/Pennsylvania/83 (H5N2) influenza virus associated with acquisition of virulence. Virology. 149:165-173. 1986.
14. Webster, R. G., and R. Rott. Influenza virus A pathogenicity: The pivotal role of hemagglutinin. Cell. 50:665-666. 1987.
15. Wood, G. W., J. W. McCauley, J. B. Bashiruddin, and D. J. Alexander. Deduced amino acid sequences at the haemagglutinin cleavage site of avian influenza A viruses of H5 and H7 subtypes. Arch. Virol. 130:209-217. 1993.

HETEROGENEIDAD EN LA PROTEINA DE LA HEMAGLUTININA ENTRE AISLAMIENTOS DEL VIRUS DE LA INFLUENZA AVIAR H5N2 PROCEDENTES DEL CENTRO DE MEXICO

HETEROGENEITY IN THE HEMAGGLUTININ PROTEIN AMONG THE H5N2 AVIAN INFLUENZA ISOLATES FROM CENTRAL MEXICO

M. L. Perdue, M. García, J. Crawford and J. Latimer

USDA, Southeast Poultry Research Laboratory
934 College Station Road,
Athens, Georgia 30605

ABSTRACT

A systematic evaluation was made of the molecular structure of the hemagglutinin (HA) protein of numerous H5N2 avian influenza isolates arising from central Mexico. No two isolates exhibited the same nucleotide sequence for the HA gene and the variation in sequences was not confined to a single region of the protein. Phylogenetic comparisons with all other known H5 sequences suggests that these strains, as well as recent H5N2 U.S. strains had progenitors in the stable circulating H5 strains of migratory waterfowl. The variation associated with emergence of the highly pathogenic phenotype, namely a single base transition and the insertion/duplication of 6 bases near the proteolytic cleavage site, suggested a mechanism by which virulence might emerge following introduction of avian influenza viruses from migratory waterfowl. Other outbreaks of AI, including those of the H7 subtype, may have involved a similar molecular mechanism. A general model is proposed by which virulence-generating insertions in the HA gene may occur.

INTRODUCCION

Aun cuando la patogenia de los virus de la influenza aviar parece estar dictada por una compleja relación entre múltiples genes virales (1, 2), ciertamente uno de los más importantes de estos genes es el que codifica para la proteína de la hemaglutinina (HA). La hemaglutinina es el componente antigénico principal de todos los ortomixovirus. Es la encargada de especificar el sitio de unión con el receptor (RBS, por sus siglas en inglés) para adherirse a las células huésped (3, 4) y es mediadora de la fusión con la membrana (5). El antisuero neutralizante dirigido exclusivamente contra la hemaglutinina es completamente capaz de evitar la replicación y la enfermedad (6). Esto no disminuye la importancia de las otras proteínas virales tales como la otra glucoproteína de superficie, la neuraminidasa, pero la localización, la abundancia, la variabilidad, la capacidad de unión con los receptores y la actividad de fusión de la hemaglutinina, la coloca a la cabeza en orden de importancia. La variabilidad del gene de la hemaglutinina representa un fenómeno bien caracterizado denominado pequeñs desviación genética (N del T: del inglés: genetic drift) (7). La constante mutación

del gene de la hemaglutinina da como resultado una constante variación y una continua selección inmune de la estructura de la proteína de la hemaglutinina, la cual aparentemente se ha adaptado a, a lo largo de varios milenios, a aceptar numerosos cambios en la estructura sin que exista una alteración significativa de su funcionalidad básica. Consecuentemente, la mutación ha dado como resultado la selección, en la naturaleza, de cuando menos 14 subtipos distintos de cepas A de la influenza, basada en la sola variación de la proteína de la neuraminidasa. Todos estos subtipos parecen haber sido generados por selección en especies de aves y la mayoría, sino es que todos, continúan circulando en las aves no comerciales, particularmente en las aves acuáticas migratorias (8, 9).

Dos preguntas muy difíciles respecto al surgimiento de la influenza aviar de alta patogenicidad en la avicultura comercial son cómo se introducen los virus y qué ocurre genéticamente después de que se convierten en residentes. Los 2 brotes recientes de influenza aviar en Norteamérica sugieren que los virus se introducen como cepas apatógenas que progresan a la virulencia después de una alteración genética, particularmente en el gene de la hemaglutinina. En noreste de Estados Unidos durante 1983, un virus H5N2 apatógeno infectó a los pollos causándoles síntomas respiratorios leves que despertaron poca preocupación. Sin embargo, después de 6 meses el panorama de la enfermedad cambió dramáticamente y los efectos de la infección viral se tornaron el letales, produciendo síntomas de la peste aviar clásica (10). Después de realizar un análisis molecular substancial, se obtuvieron las bases para implicar a un solo cambio genético en la proteína de la hemaglutinina (pérdida de un carbohidrato como sitio de adición) como determinante principal de la desviación hacia la virulencia (11). Este cambio pareció bloquear el acceso a otra región importante de la proteína de la hemaglutinina, que es su sitio de hendedura proteolítica (PCS, por sus siglas en inglés), el cual es responsable de la generación de 2 subunidades de la hemaglutinina así como de la liberación del péptido de fusión que es responsable de mediar la fusión a las células huésped y de la entrada de los genes del virus. En el caso del brote en Estados Unidos, el sitio de la hendedura era idéntico tanto en las cepas apatógenas del principio como en las cepas patógenas que se encontraron después. Las diferencias en patogenicidad parecen deberse principal, sino es que solamente, a la presencia inhibitoria del carbohidrato. En la mayoría de los casos, la alta patogenicidad está especificada por un sitio de hendedura constituido por un aumento en la concentración de 4 a 6 aminoácidos básicos. Por otra parte, las cepas apatógenas tienen sólo 2 aminoácidos básicos en el sitio de la hendedura. El incremento en la cantidad de aminoácidos básicos permite que las proteasas de las células fuera de los tractos alimentario y respiratorio reconozcan al sitio de la hendedura proteolítica, produzcan la ruptura de la hemaglutinina y permitan que el virus se replique sistemáticamente (12).

Las cepas que se aislaron en el centro de México en 1993 y 1994 fueron apatógenas originalmente, situación similar a la observada en Estados Unidos 10 años atrás. Sin embargo, la desafortunada progresión a la alta patogenicidad en las cepas de México implicó un proceso diferente al de la Unión Americana. Se demostró que el incremento en la virulencia se debió a la adquisición de una inserción de 2 aminoácidos básicos en el sitio de la hendedura de la hemaglutinina (13, 14; véase el Cuadro 1). El proceso por el cual ocurrió esta inserción es un tema de gran actualidad en esta presentación. Aun cuando no existe evidencia bioquímica firme que demuestre que la inserción ocurrió como un solo evento genético, nosotros presentamos evidencia circunstancial abundante que muestra el mecanismo más probable de la inserción. Además, la comparación de las secuencias de los nucleótidos de numerosos aislamientos procedentes de México nos permite colocarlos en árboles filogenéticos y compararlos con otras cepas H5N2 tanto del pasado como del presente.

ENFOQUE

La hemaglutinina constituye un gran porcentaje de la proteína viral total de los virus de la influenza tipo A (Cuadro 1). Sus 2 características bioquímicas marcadoras, antes citadas, son el sitio de unión al receptor y el péptido de la fusión (FP, por sus siglas en inglés) (véase la Figura 2). Siendo los responsables de la unión a las células huésped y de la fusión con sus membranas, respectivamente, las secuencias de estos 2 sitios guardan un alto grado de conservación entre los aislamientos del virus de la influenza aviar (15). No obstante, las variaciones en las secuencias de los aminoácidos circundantes, pueden tener un profundo efecto sobre la actividad de estos sitios. En el caso del RBS que rodea a los epítopes antigénicos, este atraviesa por un cambio continuo que ejerce influencia directa sobre la capacidad de los anticuerpos del huésped de neutralizar al virus al atacar a la proteína de la hemaglutinina. En el caso del péptido de fusión (FP), la variación en el sitio de la hendedura proteolítica que la precede, tiene un efecto dramático sobre si ocurre o no la hendedura dejando disponibles a los aminoácidos del péptido de fusión. De esta manera, la identificación de la variación que ocurra en aislamientos múltiples de un solo brote es un método de gran utilidad que proporciona una ventana que nos permite asomarnos a estudiar el proceso de adaptación del virus y cómo éste esquiva a la respuesta inmune del huésped. Al comparar los árboles filogenéticos de los aislamientos de brotes múltiples, adquirimos información respecto al origen de estos virus y, tal vez, respecto a la manera como realizaron el "salto" propuesto de las aves acuáticas migratorias a la avicultura comercial. El identificar los cambios en la secuencia alrededor del sitio de la hendedura nos permite predecir los mecanismos por los cuales estas cepas adquirieron la virulencia. Es por estas

razones que nos avocamos a realizar una evaluación sistemática de la secuencia de la hemaglutinina y de la estructura de numerosos aislamientos H5N2 procedentes del brote mexicano.

RESULTADOS

El análisis de la secuencia completa de los nucleótidos de la hemaglutinina 1 (HA1) de más de 20 cepas H5N2, reveló que no existen siquiera 2 cepas con un mismo nucleótido ni con una misma secuencia de aminoácidos. El rango de las diferencias de los aminoácidos varió de sólo 2 hasta 26, entre los diferentes aislamientos. Los cambios estuvieron distribuidos principalmente, de manera uniforme a todo lo largo del tramo de la HA1 y, con una posible excepción, no parecieron agruparse en ningún sitio (16). Ninguno de los aminoácidos que constituyen al RBS en sí, se vio afectado por ninguno de estos cambios. Sin embargo, los aminoácidos cercanos fueron variables lo cual es consistente con los hallazgos realizados en los virus de la influenza humana (17). No existieron indicaciones directas de presión inmune en la variación de la hemaglutinina y no se encontraron evidencias inmediatas de cambios específicos en la agrupación, a partir de estas comparaciones. Es posible que, debido a la distribución relativamente amplia y al período relativamente corto en que se realizaron los aislamientos (14 meses) la selección inmune no haya tenido suficiente tiempo como para manifestarse.

Las comparaciones filogenéticas de las secuencias de los aislamientos mexicanos con las de otros aislamientos procedentes de Estados Unidos y de Europa, indican con toda claridad que los aislamientos de México fueron distintos de los obtenidos en Estados Unidos entre 1983 y 1984 y de todos los aislamientos europeos. Sin embargo, los datos indicaron que existe similitud entre los aislamientos recientes de Estados Unidos, los mexicanos y los 2 aislamientos anteriores encontrados en las aves acuáticas de Estados Unidos. La mejor y más lógica interpretación de la evidencia filogenética es que las cepas de los virus H5 originarias de las aves acuáticas que circulan en este tipo de animales desde 1987, son las progenitoras de los aislamientos estadounidenses de 1993 y 1994 y de los aislamientos mexicanos. Dado que las trayectorias de vuelo de la mayoría de las aves migratorias norteamericanas incluyen a Canadá, Estados Unidos y México, es ciertamente posible que ocurran múltiples introducciones geográficas de estos virus H5N2. Si asumimos que las secuencias derivadas de las aves acuáticas en realidad representan a los progenitores de los aislamientos obtenidos a partir de las aves comerciales, entonces las tasas de mutación después de la introducción podrían ser comparadas entre los grupos conocidos de virus de Estados Unidos y de México. Actualmente estamos evaluando dichas tasas en nuestro laboratorio.

Cuando se compararon las secuencias de los sitios de la hendedura proteolítica, fue posible derivar un consenso de secuencia tanto para los aislamientos apatógenos como para los altamente patógenos, los cuales se muestran en el Cuadro 1. Resulta claro que los únicos cambios en la secuencia asociados a la adquisición de virulencia en estas cepas de campo fue una modificación en la posición 970 en la secuencia del código de G a A y la inserción de 6 bases (AAGAAA), lo cual crea un inserto de 2 aminoácidos (R-K). El Cuadro 1 también muestra las secuencias de las hemaglutininas de otros virus H5 y H7 de la influenza aviar, en las cuales parece haberse asociado un inserto con la virulencia. La prevalencia de estos insertos hace surgir la pregunta sobre la posible existencia de un mecanismo común para generarlos. Otra pregunta de gran importancia se refiere a la probabilidad de que surjan espontáneamente, o bien que sean el resultado de la adición creciente de nucleótidos o codones (bloques de 3 nucleótidos). En nuestro laboratorio estamos actualmente haciendo grandes esfuerzos para tratar de contestar estas preguntas, pero los datos existentes hasta ahora sugieren que el inserto se adiciona espontáneamente (18). Los datos adicionales utilizando "primers" específicos de inserto con la reacción en cadena de polimerasa sobre los aislamientos H5N2 de México, ilustran que las mutaciones probablemente se adquieran espontáneamente (Cuadro 2).

Utilizando los datos generados tanto en nuestro laboratorio como en otros, hemos propuesto un modelo que explica cómo puede presentarse la inserción según se ha visto en estos aislamientos H5 y H7. Lo hemos denominado el modelo de la "rueda de purinas deslizantes" y propone que las regiones que contienen altas concentraciones de adeninas y, en menor grado, guaninas (como ocurre con las regiones que codifican para los aminoácidos básicos), seguidas de regiones de estructura secundaria pueden dar como resultado una plantilla única para las inserciones de más adeninas y guaninas y, consecuentemente, más aminoácidos básicos (75% de los nucleótidos que constituyen los codones para Lis y Arg son A o G). El modelo hipotético se describe en forma diagramática en la Figura 3 y puede explicar la generación de todos los insertos enlistados en el Cuadro 1. Esperamos pronto poder presentar datos que apoyen o refuten el modelo basado en estudios *in vitro*, utilizando a estos aislamientos H5 de Estados Unidos y de México.

CUADRO 1. SECUENCIAS DEL SITIO DE LA HENDEDURA PROTEOLÍTICA (PCS) DE AISLAMIENTOS Y BROTES RECIENTES DE LA INFLUENZA AVIAR.

Aislamiento	Nucleótidos	Aminoácidos
H5 Cepas		
CM-HP 94-95	CCCAAAGAAAAAGAAAAACAAGAGGCCTAT	PQRKRKTR¯GLF
CM-nHP 93-94	TT	PQ--RETR GLF
	CCCC------AAAGAGAAACAAGAGGCCTATTT	
ET931B-HP		PQRKRKTR GLF
ET93-nHP	CCGCAAAGAAAAAGAAAAACAAGAGGCCTA	PQ--RKTR GLF
	TTT	
TE91-HP	CCCC-------AAAGAAAAACAAGAGGCCTATTT	PQRKRKTR GLF
TUE91-nHP		PQ--RETR GLF
	CCTCAAAGAAAAAGAAAAACAAGAGGACTA	
H7 Cepas	TTT	
CV76-HP	CCTC-------AAAGAGAAACAAGAGGACTATTT	REIPKKREKR¯GFL
DV76-nHP		FEIPK---KR GLF
	CCTGAAATTCCGAAGAAGAGAGAAGAGAGGTTTA	
	TTT	
	CCTGAAATTCCGA----------AGAAGAGAGGTTTATTT	

DM=pollo/México; ET=emú/Texas; TE=pavo/Inglaterra; TUE=turaco/Inglaterra; CV=pollo/Victoria; DV=pato/Victoria; nHP=no altamente patógeno; HP=altamente patógeno. Las secuencias de los aislamientos mexicanos son el consenso de 5 HP y 13 nHP, respectivamente. El inserto propuesto se muestra en itálicas; la región que nosotros pensamos que se ha duplicado aparece subrayada. Los aminoácidos insertados y alterados aparecen en negrillas. El inserto de nucleótidos no se ajusta exactamente al inserto de aminoácidos, pero en su lugar modifica la secuencia lo que da como resultado un inserto.

CUADRO 2. PRESENCIA DE SECUENCIA DE INSERTOS EN LAS CEPAS H5N2.

Cepas	Ensayo de Hendedura (-) Tripsina	Producto de la PCR
ET93 madre	-	-
ET93 1 bs	+	+
ET93 2 bs	+	+
ET93 1B clone	+	+
M 10/93	-	-
J 1/94	-	-
V 4/94	-	-
H 5/94	-	-
Q 5/94	-	-
J 6/94B	-	-
P 11/94A	+	+
P 11/94B	+	+
P 11/94C	+	nt
P 12/94	+	nt
J 12/94	-	-
Q 1/95	+	+

Se probaron varios aislamientos *in vitro* en busca de la hendedura, en ausencia de tripsina (que es un indicador indirecto de los aminoácidos insertados) y utilizando un conjunto de "primers" de reacción en cadena de polimerasa (PCR) que sólo debe amplificarse a partir de los genes HA que contienen al inserto de 6 bases que aparece en el Cuadro 1. Las muestras ET (emú/Texas) incluyen al pasaje padre, a uno intermedio y a un clone de alta patogenicidad (ET931b). Los aislamientos restantes proceden de los estados de M=México, J=Jalisco, V=Veracruz, H=Hidalgo, Q=Querétaro, P=Puebla en los meses anotados (mes/año). nt=no probado.

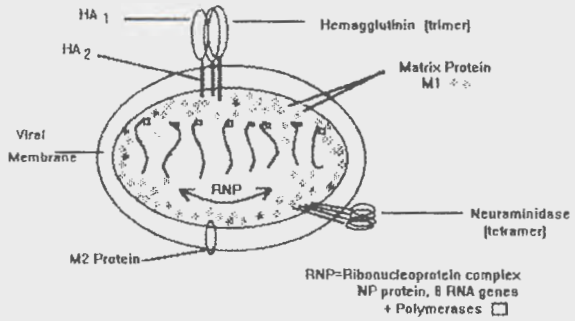


Figura 1. Estructura del virus de la influenza A.

Estructura idealizada de los ortomixovirus que ilustra sólo uno de los cientos de trímeros de la hemaglutinina (HA) sobre la superficie del virus. La hemaglutinina constituye aproximadamente el 25% de la proteína viral total. Dos proteínas estructurales mayores, la matriz (M1) y la núcleoproteína (NP) sostienen en su lugar a la doble capa de lípidos y a los segmentos 8 ARN. Las proteínas menores incluyen a la neuraminidasa, que es otra glucoproteína antigénica de la superficie, las proteínas de la polimerasa que replican al ARN del genoma y producen ácidos ribonucléicos mensajeros (mRNAs) y a la recientemente caracterizada proteína M2 transmembranaria. Los genes 8 ARN varían en tamaño desde 2,341 a 890 nucleótidos, con el gene variable HA que tiene aproximadamente 1,780 nucleótidos de longitud.

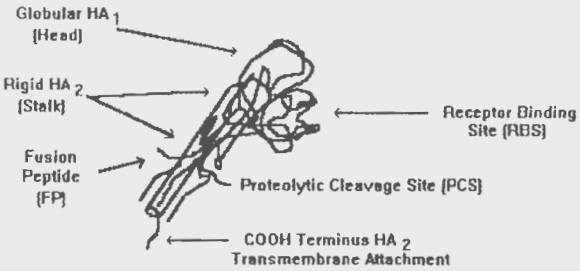


Figura 2. Estructura altamente idealizada de un monómero de hemaglutinina.

Este modelo representa a una tercera parte de una hemaglutinina funcional. La activación de la infectividad implica el reconocimiento del PCS por las proteasas de la célula huésped y la hendedura para exponer al péptido de fusión. Entonces, el monómero completo consiste en la HA_2 de 220 aminoácidos que tiene principalmente una estructura alfa helicoidal y la hemaglutinina HA_1 de 365 aminoácidos cuya conformación es principalmente globular y beta helicoidal. Estas subunidades se mantienen en conjunto gracias a un puente disulfuro sencillo. Después de la unión del virus a la célula huésped, el virus se internaliza y una disminución en el pH da como resultado la reorientación del péptido de fusión hacia la punta de la hemaglutinina, en donde sirve de mediador de la fusión para liberar a los componentes internos del virus hacia la célula.

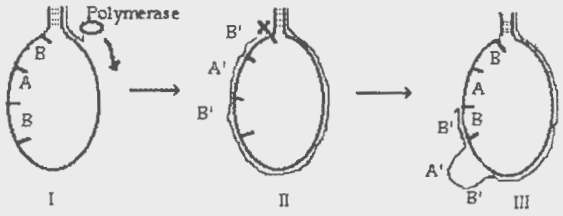


Figura 3. Modelo de la "rueda resbalosa" para el evento de la inserción.

Modelo hipotético que explica la manera como pueden ocurrir las duplicaciones e inserciones en el sitio de la hendedura del virus de la influenza aviar. I. Plantilla con sentido positivo normal que se utiliza para hacer copias de un nuevo ARN del genoma viral. La polimerasa encuentra una región de alta concentración de adeninas, representada por un asa?????. Después de hacer una copia complementaria de las secuencias (en II), la polimerasa stalls of "stutters"????? upon????? encontrándose con una región de estructura secundaria incrementada (X). El ARN complementario tiene entonces la oportunidad de "resbalarse" hacia arriba hasta las regiones complementarias y re-anneal????? (III) dando como resultado la duplicación de la secuencia o secuencias que acaban de copiarse. Hecho esto, se produce una repetida inserción de la información genética similar a las observadas en el Cuadro 2. En el caso de las purinas se sabe que las uridinas pueden aparearse ya sea con adeninas o con guaninas copiando así stretches????? de adeninas que pueden generar stretches????? de uridina, mismas que en realidad pueden aparearse en muchos sitios a lo largo de la rueda. A la larga, sólo quedarán disponibles inserciones de bloques de 3 nucleótidos mediante este mecanismo.

REFERENCIAS

1. Rott, R., Orlich, M. and Scholtissek, C. 1976. J. Virology 19:54-60.
2. Rott, R., Orlich, M. and Scholtissek, C. 1979. J. Gen. Virol. 44:471-477.
3. Weis, W., Brown, S., Cusack, S. Paulson, J. C., Skehel, J. J. and Wiley, D. C. 1988. Nature 333:426.
4. Sauter, N. K., Hanson, J. E., Glick, G. D., Brown, H. H., Crowther, R. L., Park, S. J., Skehel, J. J. and Wiley, D. C., 1992. Biochemistry 31:9609.
5. Wiley, D. C. and Skehel, J. J. 1987. Annu. Rev. Biochem. 56:365.
6. Murphy, B. R. and Webster, R. G. 1990. Inf. Fields, B. N. et al. (eds.). Virology, 2nd edn p. 1091. New York: Raven Press.
7. Webster, R. G., laver, W. G., Air, G. M. and Schild, G. C. 1982. Molecular mechanisms of variation in influenza viruses. Nature 296:115-121.

8. Hinshaw, V. S. and Webster, R. G. 1982. In: A. S. Beare (ed.). Basic and applied influenza research. CRC Press, Inc. Boca Raton, Fla.
9. Webster, R. G., Bean, W. J., Gorman, O. T., Chambers, T. M. and Y. Kawaoka, Y. 1992. Microbiological Reviews 56:152-179.
10. Eckroade, R. J. and Bachin, L. A. 1986. Proceedings of 2nd Int. Symp. on Avian Influenza, US Animal Health Association, p. 22, Univ. of Wisconsin Dup. Serv.
11. Deshpande, K. L., Fried, V. A., Ando, M. and Webster, R. G. 1987. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 84:36-40.
12. Webster, R. G. and Rott, R., 1987. Cell 50:665-666.
13. Swayne, D. E. and Perdue, M. L. 1995. Summary of pathobiologic and molecular epidemiologic findings from experimental studies in chickens with Mexican avian influenza viruses. USAHA Report of Committee on transmissible diseases of poultry and other avian species. In Press.
14. García, M. Brugh, M., Beck, J. R., Swayne, D., senne, D., Pearson, J., Gay, M., Perez Marquez, V., Toscano, A. and Perdue, M. L. 1995. Fourteenth Annual Meeting of the American Society of Virology. Austin, TX. pp. 108.
15. Perdue, M. L., Crawford, J., M. García, M. and Latimer, J. W. 1995. Fourteenth Annual Meeting of the American Society of Virology. Austin, TX. pp. 107.
16. García, M. Crawford, J. M., Latimer, J. W., Rivera-Cruz, E. and Perdue, M. L. 1996. Heterogenicity in the hemagglutinin gene and amergence of the highly pathogenic phenotype among recent H5N2 avian influenza viruses from México. J. Gen. Virol. In Press.
17. Rocha, E., Cox, N. J., Black, R. A., Harmon, M. W., Harrison, C. J. and Kendal, A. P. 1991. Journal of Virology 65:2340-2350.
18. Perdue, M. L., García, M., Beck, J. and Swayne, D. E. 1995. An Arg-Lys insertion at the hemagglutinin cleavage site of an H5N2 avian influenza isolate Virus genes, In Press.

SITUACION Y PERSPECTIVAS DEL PROGRAMA DE ERRADICACION DE LA INFLUENZA AVIAR EN MEXICO

STATUS AND PERSPECTIVE OF THE AVIAN INFLUENZA ERADICATION PROGRAM IN MEXICO

Héctor Campos López, Eduardo Rivera Cruz, Miguel Irastorza Enrich

Secretaria De Agricultura, Ganaderia y Desarrollo Rural

ANTECEDENTES

El 23 de mayo de 1994 se notificó oficialmente a la Dirección General de Salud Animal el aislamiento de tres cepas de virus de Influenza Aviar (IA) procedentes de granjas avícolas de los Estados de Hidalgo, México y Querétaro las cuales fueron tipificadas posteriormente como H5N2 de baja patogenicidad.

De inmediato se inició un programa para identificar las zonas del país donde pudiera existir un virus similar, el cual, si bien no representaba un riesgo directo, tenía el poder de mutación para tornarse altamente virulento.

De junio a diciembre de 1994 se desarrollaron acciones de monitoreo en todo el país, habiéndose aislado el virus de baja patogenicidad en los estados de Aguascalientes, Guanajuato, Guerrero, Hidalgo, Jalisco, México, Morelos, Puebla, Querétaro, Veracruz y el Distrito Federal.

Durante ese período se realizó además la constatación de parvadas y granjas libres, aprobación de laboratorios de diagnóstico y de médicos veterinarios, monitoreos serológicos y virológicos, acciones para fomentar la bioseguridad en granjas y monitoreo para la declaración de Estados libres.

El 13 de enero de 1995, fue confirmado el diagnóstico de IA virus H5N2 de alta patogenicidad en tres granjas de postura comercial del área de Tehuacán, en el Estado de Puebla.

De inmediato se reforzaron en esa zona las acciones de cuarentena estricta para evitar la movilización de aves, productos y subproductos sin

control oficial federal, evaluación de todas las granjas aledañas para determinar la extensión del problema mediante estudios serológicos y de aislamiento viral, investigación epizootiológica de los casos confirmados de IA para determinar su origen y posibilidad de diseminación y reforzamiento de las medidas de bioseguridad en las granjas.

El 7 de enero se reportó, en un núcleo de reproductoras de los Municipios de Villa del Marqués y Atongo, Querétaro, un cuadro clínico sugestivo de IA de alta patogenicidad, que posteriormente fue confirmado por el laboratorio. Posteriormente en el área de Tepatitián, Jalisco se confirmó el diagnóstico de virus de mediana patogenicidad en una granja de ponedoras.

El 23 de enero de 1995, se activó el Dispositivo Nacional de Emergencia de Sanidad Animal para el diagnóstico, prevención, control y erradicación de la IA, mediante publicación en el Diario Oficial de la Federación.

Simultáneamente se autorizó la producción de una vacuna inactivada emulsionada de IA y se autorizó su aplicación únicamente en zonas bajo riesgo, prohibiéndose totalmente su uso en aquellas zonas indemnes o libres de la enfermedad.

SITUACIÓN ACTUAL

Después de muestreos serológicos y virológicos muy detallados y al no comprobarse que hubiera virus de mediana o alta patogenicidad de IA en la avicultura comercial o de traspatio, se declararon libres de estos virus, a Jalisco el 3 de abril de 1995, Puebla el 7 de agosto de 1995 y Querétaro el 12 de diciembre de 1995, fecha en la que también el país quedó libre de IA de alta patogenicidad.

Hasta el 31 de enero de 1996 se encuentran declarados oficialmente libres de IA los Estados de Campeche, Chihuahua, Durango, Quintana Roo, Sinaloa, Sonora, Yucatán y la Comarca Lagunera.

Los Estados indemnes, sin presencia de anticuerpos de la enfermedad son Baja California, Baja California Sur, Coahuila, Colima, Chiapas, Nayarit, Tabasco, Tamaulipas y Zacatecas. Estos estados deberán ser reconocidos oficialmente libres durante el año 1996.

En los quince Estados del resto del país y en el Distrito Federal se continúa el monitoreo para detectar la presencia del virus de IA. De estas entidades, en cuatro Estados no se practica o ya se suspendió el uso de la vacuna. En los Estados de Aguascalientes, Guanajuato, Hidalgo, Jalisco, México, Michoacán, Morelos, Puebla, Querétaro y Tlaxcala, donde se promovió el uso intensivo de la vacuna durante el invierno de 1995-1996, se continuó el monitoreo a través de las aves centinelas colocadas en las granjas comerciales donde se autoriza la vacunación

Al 31 de enero de 1996 se concluyó la despoblación de todas las granjas comerciales donde se identificó el virus de IA de alta patogenicidad. Para esa fecha se tenían 66 granjas cuarentenadas en los Estados de Aguascalientes, Jalisco, Michoacán, Morelos, Puebla, Querétaro y San Luis Potosí y estaba por concluirse la despoblación de las tres granjas del Estado de Nuevo León donde se identificaron aves con anticuerpos de IA. La despoblación total de las granjas cuarentenadas en siete Estados restantes se concluirá en el mes de diciembre de 1996.

PERSPECTIVAS DE ERRADICACIÓN

La meta que se han fijado las autoridades de la Secretaría de Agricultura, Ganadería y Desarrollo Rural y la Unión Nacional de Avicultores, es la de erradicar la IA para el año 1998.

La estrategia para alcanzar esa meta incluye:

a. Incorporación de los Estados de Baja California, Baja California Sur, Coahuila, Colima, Chiapas, Nayarit, Nuevo León, Tabasco, Tamaulipas y Zacatecas a la zona libre de IA durante el año de 1996.

b. Monitoreo serológico en aves centinelas en los Estados de Guerrero, Oaxaca, San Luis Potosí y Veracruz para su incorporación a la zona libre de IA en el primer semestre de 1997.

c. Monitoreo serológico en aves centinelas en los Estados de Aguascalientes, Guanajuato, Hidalgo, Jalisco, México, Michoacán, Morelos, Puebla, Querétaro, Tlaxcala y el Distrito Federal de abril a agosto de 1996 para determinar las entidades en las que deberá prohibirse el uso de la vacuna contra la IA a partir del mes de septiembre de 1996.

d. Autorización del uso de vacuna contra IA de septiembre de 1996 a marzo de 1997 únicamente en granjas comerciales en zonas de riesgo potencial por los antecedentes epizootiológicos de la enfermedad .

e. Reforzamiento de las medidas de bioseguridad en granjas comerciales de enero de 1996 a marzo de 1997.

f. Establecimiento de fondo o fondos de contingencia para IA de julio de 1996 a abril de 1997.

g. Prohibición total del uso de la vacuna contra la IA a partir del mes de abril de 1997

h. Monitoreo serológico en aves centinelas y estudios serológicos de aislamiento viral en granjas y rastros, para determinar la ausencia del virus de IA en todo el país de mayo de 1997 a junio de 1998.

i. Tramitación legal para la declaración oficial del país libre de IA en el segundo semestre de 1998.

SUMMARY

On may 23, 1994, the isolation of three avian influenza virus (AIV) strains from poultry farms in the states of Hidalgo, México, and Querétaro was officially reported to Dirección General de Salud Animal (General Direction of Animal Health). These isolates were typified afterwards as low-pathogenicity H5N2 strains.

A program for the identification of country's areas where similar viruses could exist was immediately started. Even though these viruses did not represent a direct hazard, they had the potential to mutate and become highly virulent.

From June to December, 1994, monitoring actions were implemented all along the country. Low pathogenicity AIV isolates were obtained from the following States: Aguascalientes, Guanajuato, Guerrero, Hidalgo, Jalisco, México, Morelos, Puebla, Querétaro, Veracruz, and the Valley of México.

During that period of time verification of free flocks and farms, approval of diagnostic laboratories and veterinarians, serological and virological monitoring, actions to promote farm biosecurity, and monitoring towards declaring free states were carried out.

On January 13, 1995, the diagnosis of high pathogenicity H5N2 AIV was confirmed in three commercial layer farms located in the area of Tehuacán, Puebla State.

Stringent quarantine actions were immediately reinforced in the area, in order to prevent bird movement, as well as that of products and by-products -unless done under official federal control- evaluation of all surrounding farms to determine the magnitude of the problem through serological surveys and virus isolation, epidemiological investigation of confirmed AI cases to determine their origin and the possibility of spread, and reinforcing biosecurity measures in the farms.

On January the 7th a clinical condition suggesting high pathogenicity AIV was reported in a breeder nucleus located in the municipalities of Villa del Marqués and Atongo, Querétaro State. Laboratory confirmation of this diagnosis was confirmed later on.

Afterwards, the diagnosis of an intermediate pathogenicity virus was confirmed in a layer farm in the area of Tepatitlán, Jalisco State.

On January 23, 1995, Dispositivo Nacional de Emergencia de Sanidad Animal (National Animal Health Emergency Program) was started for the diagnosis, prevention, control and eradication of AI, through its publication in Diario Oficial de la Federación (Official Gazette).

Production of an inactivated, oil emulsion AIV vaccine was simultaneously approved for administration in risk zones. Vaccine use was forbidden in unaffected/disease-free zones.

CURRENT SITUATION

After exhaustive serological and virological surveys, and after demonstrating the absence of intermediate or high pathogenicity AIV in commercial poultry farms or backyard poultry, the following States were declared free of the disease: Jalisco (April 3, 1995), Puebla (August 7, 1995), and Querétaro (December 12, 1995). On December 12, 1995, the country was free of high pathogenicity AI.

Up to January 31, 1996, the following States have been declared as AI-free: Campache, Chihuahua, Durango, Quintana Roo, Sinaloa, Sonora, Yucatán, and Comarca Lagunera.

Unaffected States, with no AI antibodies are: Baja California, Baja California Sur, Coahuila, Colima, Chiapas, Nayarit, Tabasco, Tamaulipas, and Zacatecas. These States should be officially recognized as AI-free during 1996.

In the remaining 15 States and in the Valley of México, monitoring continues to detect the presence of AIV. In 4 of these States, vaccination is either not practiced or it has already been withdrawn. In the States of: Aguascalientes, Guanajuato, Hidalgo, Jalisco, México, Michoacán, Morelos, Puebla, Querétaro, and Tlaxcala - where intensive vaccination was promoted during winter 1995-1996- monitoring continues through sentinel birds placed in commercial farms where vaccination is approved.

By January the 31st, 1996 depopulation of commercial farms where high pathogenicity AIV had been confirmed was completed. By that date 66 farms were under quarantine in the following States: Aguascalientes, Jalisco, Michoacán, Morelos, Puebla, Querétaro, and San Luis Potosí. Depopulation of the 3 farms in Nuevo León, where birds with AI antibodies had been identified was nearly completed. Total depopulation of quarantined farms in the remaining 7 states will be completed by December 1996.

ERADICATION PERSPECTIVES

The goal set up by the authorities of Secretaría de Agricultura, Ganadaría y Desarrollo Rural (Secretariat of Agriculture, Livestock Industry, and Rural Development) together with Unión Nacional de Avicultores (National Poultry Producers Union), is the eradication of AI for 1998.

Strategies to reach that goal include:

a. Incorporation of Baja California, Baja California Sur, Coahuila, Colima, Chiapas, Nayarit, Nuevo León, Tabasco, Tamaulipas, and Zacatecas into the AI-free zone during 1996.

b. Serological monitoring in sentinel birds in the States of Guerrero, Oaxaca, San Luis Potosí, and Veracruz to be included into the AI-free zone during the first half of 1997.

c. Serological monitoring in sentinel birds in the following states: Aguascalientes, Guanajuato, Hidalgo,

agua, el uso o no de alimento peleteado, el mantenimiento y la limpieza de las tolvas de alimento y los derrames del mismo. Además debe tomarse en cuenta el movimiento entre instalaciones e incubadoras, áreas de producción de animales vivos, el gas, la cama, los pollos y pavipollos, la planta de alimentos y los camiones encargados del transporte de animales vivos, muertos y de sus excretas.

The poultry industry is a dynamic enterprise which has experienced tremendous growth and widespread improvement worldwide over the last 20 years. Poultry meat and its products are still the most inexpensive source of animal protein for human consumption. In the USA, per capita consumption from 1975 to 1995 of ready-to-eat broiler meat has gone from 17 kgs to 33 kgs, and for turkey meat from 3.8 kgs to 8.2 kgs.

During the same period, it took 56 days to grow a 1.7 kg broiler, in 1995 it took 46 days to achieve 2.0 kgs. Twenty years ago large tom turkeys spent 140 days to grow to 11 kgs in 1995 those birds grew to 18.2 kgs during the same 20 weeks. These tremendous weight and conversion gains are due to improvements in various areas of production, but at the same time birds have become less forgiving to production mistakes. The impressive growth and consolidation of the US industry have helped to reduce the costs of broiler production from $2.40/kgs to $1.10/kgs.

Poultry production is a high-risk operation. The initial investment in housing, equipment, day-old chicks and poults, labor, feedstuffs, among others is recuperated after the birds are processed and marketed as pounds and kilograms of meat or further processed products.

In order to maximize the return of an investment in the competitive poultry industry there are key areas which can have a major impact on the overall cost of that pound or kilo of meat.

Production costs are made up of a series of items, among them are: feed ingredients, labor, utilities, insurance, taxes, packaging, transportation, maintenance, repairs, vaccination, preventive measures and procedures, treatments and medication, lost production time, housing and equipment.

From 1975 to 1995 there have been major changes and improvements in breeds (strains) of meat birds; hatcheries; nutrition, feedstuffs, milling processing;, water, feed and housing equipment; coccidiostats; preventive treatments; vaccines and vaccination procedures; diagnosis and isolation (of causing producing agents); disinfectants and management production methods.

Some of these changes have a higher impact on the cost of production than others. Feedstuff and labor represent about 70% of the total cost. Disease and field challenges certainly can have an economical impact on the cost of production due to higher mortality, treatment cost, losses in weight, reduction in feed efficiencies, condemnation and trimming at the processing plant.

Our main objective is to keep the birds alive and healthy. Stress and diseases greatly increase costs of production. We know that preventative measures and treatments, coccidiostats, vaccinations, cleaning and disinfection procedures are standards in today's production.

The term prevention indicates avert occurrence of disease and its challenges. This term includes biosecurity which must be an integral part of any poultry production system by minimizing the exposure and introduction of any agent(s) and/or factor(s) that can be harmful to the bird's well being or interfere with production efficiency.

The intent of this biosecurity review is to provide some ideas based on our experience to help in the development or design of biosecurity procedures and programs.

Biosecurity can be externally or internally in origin. Externally from people (workers-visitors), litter or other materials, water, air, chicks, poults, feed, vaccines, insects, wild animals and birds, rodents, insects, viruses, bacteria, molds, toxins, etc. Internally from past flocks, built up litter, buildings, equipment, and flora from the bird's digestive and respiratory tracts.

Infections can come from breeders, hatching eggs, hatcheries, chicks, poults, other poultry species, water fowl, wild birds, scavengers, livestock, people, new vaccines, bird secretions and excretions, body fluids and mortality, beetles, mosquitoes, flies, mites, ants, cockroaches, earthworms, snails, parasites, feed, hatchery and livehaul vehicles.

Viability of viruses, bacteria, molds and parasites will depend on their sensitivity to time; host present; temperatures; water (under pressure, hot and/or steam); dryness; soaps and detergents; disinfectants (alcohol, quaternary ammonium compounds, iodophos compounds, cresols, chloride compounds, organometallics, phenols, formalin, lime, salt); insecticides; rodenticides and wild bird and animal traps.

Farm/ranch biosecurity measures are not only influenced by wire fences, showers and deep disinfection stations but also by people's movements, farm location, poultry concentration in the area, bird densities, cleaning and disinfection products, procedures and methods, downtime between flocks, built up litter vs total cleanout, type of housing, maintenance, cleaning and disinfection (wire mesh, structure, curtains, fans, louvres, fogger lines, water, feed systems) water source, pelleted feed, maintenance and cleaning of feed bins, and feed spills. Movement between facilities and hatcheries, live production areas, gas, litter, chick and poult, feed mill, live, manure and deadhaul trucks.

In order for any biosecurity program and preventive procedures to be effective, they need to be scientific in principal, practical and easy to implement and understand, enforceable, low cost or inexpensive.

REFERENCES

1. Aho, P., Broiler Industry. December 1995.
2. American Association of Avian Pathologists. Biosecurity in the Poultry Industry. 1995.
3. Georgia, University of. Feed consumption recognize differences. Turkey World. 1975.
4. Jensen, L. Turkey Standards. Turkey World. 1975.
5. Linton, A.H., W.B. Hugo, and A.D. Russell. Disinfection in veterinary and farm animal practice. Blackwell Scientific Publications. 1987.
6. Roenigk, W. Increase efficiency basic to global poultry production gains. National Broiler Council. 1995.
7. Zander, D.V., and E.T. Mallison. Principles of disease prevention. Diseases of Poultry Ninth Edition. 1991.

BIOSECURITY AND AVIAN INFLUENZA AS IT RELATES TO THE COMMERCIAL TABLE EGG INDUSTRY

LA BIOSEGURIDAD Y LA INFLUENZA AVIAR Y SU RELACION CON LA INDUSTRIA PRODUCTORA DE HUEVO PARA EL PLATO

Kenton Kreager

Hy-Line International
Dallas Center, IA

RESUMEN

Se sabe que la influenza aviar está presente en varias partes del centro de México y que amenaza con entrar a Estados Unidos. Aún cuando se está presentando en forma suave, puede convertirse repentinamente en una enfermedad seria y altamente patógena, que puede causar gran mortalidad, pérdidas en la producción y que puede dar como resultado cuarentenas y barreras comerciales. Las vacunas pueden reducir la severidad clínica pero no eliminan al virus ni evitan su transmisión. La mejor defensa contra esta enfermedad es un programa bien planeado de bioseguridad, diseñado para evitar la exposición de las parvadas a las fuentes potenciales del virus. Muchas especies de aves se pueden infectar, particularmente las aves acuáticas, los pollos y los pavos. El virus está presente en las heces y en las secreciones respiratorias de las aves infectadas y puede permanecer infectante durante largos períodos dependiendo de la temperatura, la humedad y la presencia de materia orgánica. Todas las granjas necesitan contar con un plan de bioseguridad que tome en consideración a todos los contactos posibles directos e indirectos entre las parvadas comerciales y estas fuentes potencialmente contaminadas.

Most producers recognize the detrimental effect disease can have on layer performance. Some diseases cause only minor disruptions in production, while others can have disastrous effects, leading to high mortality and complete loss of a flock. Maximum genetic performance can only be achieved when the negative effects of disease and other management stresses are minimized. Disease effects are most likely additive and cumulative in their effect on commercial layer performance. A mild bronchitis outbreak alone may cause some minor production loss, but the flock should quickly recover. Bronchitis along with *Mycoplasma gallisepticum* (MG) would cause more severe symptoms and a longer recovery time. If we add coryza to this combination, and perhaps another virus such as avian influenza (AI) or Newcastle, the results could be disastrous. In commercial conditions, we cannot expect our flocks to be completely disease-free, but the fewer diseases our flocks must contend with, the better their performance will be.

Disease control takes many forms and depends on the characteristics of the specific diseases we are considering. Some diseases can be vertically transmitted from breeders, like MG, while others are only horizontally transmitted from bird to bird or through a contaminated environment. Some disease agents are very hardy and persistent in the environment, while others are quite sensitive to inactivation. These specific

characteristics determine the measures necessary to control each disease.

In this presentation I will use AI as an example of a disease that the layer industry definitely needs to control through biosecurity and other means. The egg layer industry has some characteristics that make it a little more difficult, but very important, to avoid AI. The long life span of layers means there is more potential economic loss if a flock is exposed to a highly pathogenic strain while relatively young. The flock may be lost at full potential value of about $2/bird. We tend to house layers on multi-age farms, where accidental exposure of just one flock on the farm will cause all flocks on the farm to eventually be exposed and suffer the same consequences. On such a premise, the virus has the opportunity to keep cycling from older to younger flocks and is very difficult to ever eliminate without a complete depopulation of the entire farm. So, we tend to have more at risk at one location and then have little opportunity to eliminate a problem once it occurs.

Let's look at the specific characteristics of the AI virus and the disease it produces. AI is a viral infection that occurs in many avian species and affects multiple organ systems, leading to a variety of possible symptoms. The virus primarily reproduces in the digestive and respiratory systems, causing signs of diarrhea and respiratory distress. The virus is shed from these organ systems, producing infectious respiratory secretions and feces. The majority of the shedding occurs during the early acute stage of the infection, although fecal shedding has been demonstrated to occur up to 30 days post-infection in ducks. The survival of the virus depends greatly on the environmental condition with regard to temperature, moisture, and presence of organic matter. Cool temperatures, moisture and organic matter favor its survival. During the 1983 Pennsylvania outbreak, infectious virus was recovered from wet manure in one house up to 105 days after all birds had been removed. However, heat, dryness and pH extremes are very detrimental to the virus. It is readily inactivated by detergents and disinfectants.

Some disease agents are felt to be transmitted through the air for some distance, perhaps on fecal dust particles or dried fine particulate respiratory secretions. There has been evidence that Newcastle, turkey coryza, and MG can spread airborne over distances of at least 1.6 km and perhaps more. Air sampling has demonstrated the AI virus 45 meters downwind from an affected premise. In planning new poultry housing, it is probably wise to keep a distance of 3.2 km or more from other poultry farms that are not under your management. This not only reduces the chance of airborne exposure, but minimizes the chance of rodents, flies, and other pests crossing over and potentially carrying disease.

Small, free-living bird and animal species are very difficult to control and are capable of transmitting some diseases. House finches have been found to carry MG in some Eastern states in the U.S.A. Mice and rats are well known disseminators of *Salmonella enteritidis* and other *Salmonella* species. While these wild animals may not actually become infected with and actively shed AI, they may be capable of physically carrying AI virus on their feet or outer body, as with any other contaminated surface. Unfortunately, they often have easy access to the inside of poultry houses, where they are attracted by the presence of feed and water. As much as possible, holes should be patched and openings screened to keep these feral species out.

AI occurs in many different degrees of pathogenicity. It is dangerous to allow the virus to spread even in a mild form, as it can quickly change from low to high pathogenicity with one simple genetic mutation. In the high-path form, mortality rates of 80% can occur. When high-path AI is present, it necessitates quarantine of the area and often results in trade barriers being established between states or countries.

Because the mild form of the disease can be difficult to recognize as AI, it is easy to accidentally track the virus around without even knowing it. To avoid doing so, a routine serological testing program should be used to monitor for the disease. A simple agar gel precipitin (AGP) test on blood serum will detect if a flock has been exposed to AI. It will not determine the type or pathogenicity of the AI, only that the bird was exposed to some type at some time. The early warning that the virus is present on a farm should help avoid making a dangerous situation worse by spreading it. Many other respiratory diseases share the same symptoms, and a blood test is the easiest way to confirm a diagnosis. The frequency and number of samples tested probably depend on the relative risk of getting AI, but should include at least 15 random samples from all flocks, perhaps done on a monthly basis. Breeder flocks in the U.S.A. are recommended to be tested monthly in this manner, in conjunction with other routine testing done under the National Poultry Improvement Plan.

Vaccines are available for AI, both in live (genetically altered) and killed forms. While vaccines will significantly reduce mortality and other detrimental effects of the disease, they do not prevent infection or eliminate the virus. A vaccinated flock is still a potential source of pathogenic virus.

Because of the very serious nature of AI, it is preferable to eliminate the disease through monitoring, quarantine, and depopulation or controlled marketing. It is **not** a disease we want to live with forever.

The best way to control AI is to avoid getting it in the first place. "Biosecurity" is the term we use to

represent everything we do to avoid introducing a new disease onto a farm. The specific measures may depend on the diseases we want to avoid and the characteristics of those diseases, although most diseases warrant similar preventive measures. Let's look again at some of the specific traits of AI and see how those relate to a biosecurity program designed against it.

The virus resides in many avian species, primarily waterfowl (wild and domestic), chickens, and turkeys, so we must consider those species possible sources of virus and avoid all potential contact between these other species and our layer flocks. Most commercial chicken flocks are not outside where they could have direct contact with these other birds, but we humans could be the possible link.

The virus is contained in respiratory and fecal excretions, so we must avoid contact with these materials from wild birds and other flocks. The length of time these materials remain infectious depends on temperature and humidity, so cleaning, drying, heating and disinfecting any potentially contaminated item should effectively inactivate any virus present. We need to think of the inside of our chicken houses as a protected environment, shielded from all potentially contaminated external items. Anything we bring into the house needs to be clean and disinfected and free of potential contamination. There are countless items that need to be considered in this regard, but they include such things as people and their clothing, equipment for vaccinating and debeaking, live haul crates and trucks, feed trucks and delivery personnel, neighbors, other poultrymen, salesmen, and even your service veterinarian.

Another possible source of disease entry for a large multiple age farm is new flocks themselves. Often, this is how diseases like MG, MS, and LT are first introduced to a farm. It may not be known that the flock is infected when it is housed on the layer farm. Then it proceeds to infect neighboring flocks and eventually the entire farm. New pullet flocks should be blood tested for these major diseases, including AI, in time to have results before they are moved. If unexpected positive results are found, plans may be changed to prevent exposing all the existing birds on the farm.

Each farm needs to develop its own set of biosecurity rules based on its particular procedures, risks, and needs. Common biosecurity rules that have been suggested for prevention of AI include the following:

1. Employees should have no live poultry at home--particularly ducks, chickens, or turkeys.
2. Employees may be required to shower-in and/or change into clothes worn only on the farm when arriving at work.
3. No unnecessary visitors should be allowed on the farm. Those that are necessary should likewise shower, change clothes, or at least put on clean disposable boots, coveralls, and hat.
4. Any live-haul trucks for delivery of new pullets or disposal of spent hens should be thoroughly cleaned and disinfected prior to entering the farm or loading new pullets.
5. Feed and egg trucks or other vehicles coming from other poultry farms should be visibly clean and perhaps spray-disinfected prior to entering the farm.
6. Feed delivery and egg collection personnel should not enter the house further than necessary.
7. Keep all other animals out of contact with poultry flocks. Control wild birds, rodents, and insects.
8. Thoroughly clean and disinfect any equipment brought into the house.
9. Lock the poultry house and external gates to prevent unauthorized entry.
10. Conduct a routine serological testing program to monitor for the presence of the AI virus. Test new pullet flocks before housing.

It is easy to make a long list of rules, but the program's success depends entirely on the cooperation of the people on the farm. Most likely, they view these rules as an unnecessary inconvenience for themselves and are likely to disregard some of them when no one is watching. Biosecurity will work only when everyone involved is fully aware of what we are trying to avoid and why these rules make sense. If they understand their own economic well-being depends on the farm's well-being, and that depends on avoiding AI, then maybe they will be more willing to shower-in, change clothes, or ask their friends not to enter the chicken house. Company management personnel must demonstrate an equal personal commitment to abide by the same set of rules. There can be no exceptions.

Disease prevention is not easy. At times it is inconvenient, time consuming, and expensive. However, it needs to be viewed as an investment in the long-term economic well-being of the farm. When it comes to serious diseases like AI, disease prevention may make the difference between a farm's success or failure. Biosecurity isn't an option. It's a vital aspect of total poultry management that must not be ignored.

CONSIDERACIONES SOBRE EL INSTINTO MIGRATORIO DE LAS AVES SILVESTRES Y ANALISIS DE LAS POSIBILIDADES REALES QUE ESTAS HAYAN SIDO EL VECTOR DEL BROTE DE INFLUENZA AVIAR EN MEXICO

CONSIDERATIONS ON THE MIGRATORY INSTINCT OF WILD BIRDS AND ANALYSIS OF THE ACTUAL POSSIBILITIES FOR THESE BIRDS TO HAVE SERVED AS VECTORS FOR THE AVIAN INFLUENZA OUTBREAK IN MEXICO

Estudillo, L. J.

MEXICO

Es difícil encontrar otra enfermedad que presente una gama tan compleja de facetas como la Influenza: La multiplicidad de especies afectadas no sólo aves de diversas especies, mamíferos de órdenes muy distantes entre sí: Ballenas, focas, morsas, nutrias, hurones, murciélagos, renos, caballos, perros, cerdos, carnívoros como el perro y el gato, primates, entre ellos el hombre, diversas especies de peces como salmones y otros, etc, etc.

Es también importante el gran número de serotipos diferentes que existen en el virus de la Influenza, tanto por las diferencias antigénicas en las nucleoproteína así como en la hemoaglutinina y neuranimidazas de la cubierta viral. Asimismo existen marcada diferencia en la virulencia de las diferentes cepas del V.I.A., no sólo para las diferentes especies, sino también un mismo virus idéntico en todos sus componentes antigénicos tiene cepas de alta patogenicidad y otras prácticamente inocuas para un mismo huésped.

Las aves son afectadas por virus del Grupo A, virus muy difundidos en el medio ambiente y que son también responsables de infectar diversas especies de mamíferos, tanto terrestres como acuáticas, peces, etc.

En muy pocas instancias un mismo virus de Influenza tiene capacidad para infectar a especies diferentes, tal es el caso del Virus H1N1 responsable de pandemias humanas, se le ha encontrado ampliamente difundido en cerdos, existen evidencias de infecciones cruzadas entre trabajadores de granjas porcícolas y cerdos en diversos países como China, Japón, así como en Estados Unidos. Asimismo el serotipo viral H7N7 anteriormente solo encontrado en aves, se encontró en focas (Phoca vitulina) del litoral canadiense, las que sufrieron un severo brote, que diezmó sus poblaciones, el virus se recuperó de cerebro, pulmones, intestino, etc. de los animales muertos. El mismo virus fue capaz de infectar experimentalmente cerdos, hurones, y otros carnívoros, trabajadores de laboratorio accidentalmente fueron infectados. Paradójicamente, siendo en apariencia una cepa originada en aves, cuando se inocularon diversas especies de aves el virus no sólo no las enfermó, ni siquiera se pudo replicar, todo esto a pesar de que análisis cuidadosos de los diferentes segmentos del genoma viral mostraron ser prácticamente idénticos al virus encontrado primeramente en aves, en las que era muy altamente patógeno para pollos.

Los ejemplos anteriores constituyen la excepción de la regla, ya que la barrera interespecífica difícilmente la puede pasar el VIA incluso y no pocas veces un V.I.A. de pollo difícilmente infecta pavos y viceversa.

En teoría se han incriminado numerosas especies de aves como vectores y sin fundamento se les ha satanizado como difusores de Influenza, Newcastle, etc.

La clase *aves* comprende 24 órdenes diferentes, 193 familias, 2,059 géneros y casi 10,000 especies, que difieren filogenéticamente, obstáculo difícil de pasar en forma inmediata por el V.I.A.

Es posible agregar que además de que la gran mayoría de las aves silvestres son refractarias al virus de la Influenza, sus hábitos biológicos, etológicos, distribución geográfica, no favorecen su contacto con V.I.A.

A nivel mundial existen solo 1 o 2 instancias de que el V.I A. haya sido capaz de afectar o matar aves silvestres, como golondrinas marinas (Sterna spp) y aun así quedan dudas sustanciales, si no existieran otros factores, en su mortalidad nunca mas se ha vuelto a reportar que el V.I.A. ya no digamos haya matado, sino siquiera haya producido síntomas en aves silvestres en la naturaleza.

De lo anteriormente expuesto, resalta que solo aquellas especies de aves que reúnan las siguientes características pueden ser portadores del V.I.A.

A) Ser susceptibles a la infección y que no mueran.

B) Deben ser aves gregarias que se reúnan en grandes parvadas y que favorezca el contacto de aves susceptibles con las que aun tengan una infección activa. Salta a la vista que aves no gregarias que viven en parejas o solitarias en un territorio propio, no puedan infectarse solas, *la generación espontánea no existe*.

C) Deben tener la capacidad de trasladarse a grandes distancias, es decir ser *migratorias y* tener la posibilidad de entrar en alguna forma en contacto con granjas avícolas, por lo que solamente algunas aves acuáticas encajan en las premisas anteriores.

MIGRACION DE AVES SILVESTRES

Pocos fenómenos de la naturaleza son tan impactantes como el instinto migratorio de las aves, el que rebasa los límites de la comprensión humana, del cual, a pesar de cuantiosas investigaciones quedan grandes lagunas por resolver. La precisión matemática con que se efectúa cada año, la complejidad de sus rutas, el esfuerzo tan extraordinario que un ave tan pequeña como un colibrí tiene que hacer para cruzar sin escalas el Golfo de México, o bien los desplazamientos increíblemente largos de algunos Charadriformes como Chorlitos, Avocetas, Golondrinas Marinas, etc. que vuelan del Ártico a la Antártida. Las aves en su viaje migratorio tienen que librar toda clase de obstáculos geográficos como océanos, desiertos, algunas aves como la Grulla Siberiana (Grus leucogeranus) vuela a 9000 metros de altura para librar el Everest. Para realizar semejantes hazañas, han sido necesarios millones de años de evolución para desarrollar intrincados mecanismos anatómico fisiológicos para almacenar y aprovechar al máximo la energía requerida para semejantes desplazamientos, así como estructuras anatómicas especializadas en el cerebro, retina, oido interno, como el llamado Necten del globo ocular, adaptaciones evolutivas que permiten a estas aves captar los campos magnéticos de la tierra, descomponer, polarizar los rayos solares, perciben el movimiento de rotación de la tierra, etc. estas adaptaciones son las que permiten volar aun de noche sobre el mar sin perderse, llegar cada año desde el Artico al mismo árbol en el centro de la Selva Amazónica. Anualmente cincuenta mil millones de más de 1000 especies de aves emigran periódicamente por todos los confines de la tierra.

AVES ACUATICAS MIGRATORIAS

Diversos Ordenes de Aves Acuáticas poseen hábitos migratorios, por su importancia como posibles vectores del V.I.A. son de mencionarse: a) Anseriformes; b) Charadriformes en menor escala Procellariformes, Pelecaniformes.

a) ANSERIFORMES

El Orden esta constituído por 2 familias, 115 géneros, 292 especies de patos, gansos y cisnes, los que habitan todas las áreas de la tierra exceptuando los desiertos, la mayoría son migratorias bianuales, aun cuando existen especies tropicales sedentarias.

Los patos y gansos se reproducen en el Verano Polar, tanto en el Artico como la Antártida y emigran durante el Otoño e Invierno por corredores fijos a sus lugares de invernación. En Norteamérica la tundra Canadiense, los lagos de Alberta, Saskatchewan y Manitoba son el sitio donde más del 80% de los patos y gansos del Hemisferio Norte se reproducen. Cerca de 150,000,000 de patos y gansos se desplazan anualmente al sur por los mismos corredores: Occidental, Mississippi, Central y Atlántico, la mayor parte de esta migración inverna en las áreas lacustres y costeras de Estados Unidos, una proporción menor continúa su desplazamiento al sur e inverna en México.

En México invernan 33 especies de patos y gansos. Tres regiones son las de mayor importancia. En primer lugar la zona de esteros, ensenadas y lagunas de Sonora, Baja California, Sinaloa, le siguen en orden de importancia, la costa norte de Tamaulipas y la Península de Yucatán. A estos 3 sitios de México arrivan mas del 80% migración invernal, no solo de patos y gansos, sino también de otras aves silvestres acuáticas: 90 especies de Charadriformes: como chorlitos, avocetas, gaviotas golondrinas marinas, etc. y otras aves acuáticas marinas y de litoral como: Cormoranes, gallaretas, pelícanos, Ibis etc. y más de 200 especies de Paseriformes, muchas de estas aves permanecen durante todo el Invierno, otras utilizan estas áreas como lugares de escala en su desplazamiento a la Antártida.

EPIDEMIOLOGIA DE LA INFLUENZA EN AVES ACUATICAS

Las aves acuáticas, de manera especial los patos y gansos, son el mayor reservorio natural del V.I.A., en ellos se han encontrado todas las Hemoaglutininas conocidas excepto la HA13, solo encontrada en gaviotas y ballenas, así como todas las diferentes neuraminidazas.

A nivel mundial numerosas investigaciones han sido realizadas en aves acuáticas por el posible papel que puedan jugar como vectores de la Influenza, no sólo en las aves domésticas, sino también en las pandemias de Influenza humana, la influenza de los cerdos, caballos, focas, ballenas. De estas investigaciones sobresalen por la duración y la amplitud de aspectos cubiertos los estudios realizados en Canadá y Estados Unidos por Hinshaw y colaboradores, así como los efectuados en Alemania por Shaffer y su grupo ambas investigaciones tuvieron una duración de 20 años.

Hinshaw y colaboradores muestrearon muchos miles de patos desde los lugares donde empollan en le norte de Canadá, dándoles un seguimiento por sus rutas migratorias al sur. Las conclusiones más sobresalientes de estos estudios son los siguientes:

a) Las crías nacen seronegativos durante la Primavera y Verano en los meses de Mayo a Julio.

b) Se infectan asintomáticamente en las lagunas donde se congregan en grandes parvadas para terminar su emplume e iniciar su desplazamiento al sur, 2 o 3 meses después en Agosto y Septiembre.

c) Al iniciar su migración 40% de los patos juveniles estan infectados en forma activa, mientras que en las aves adultas el nivel de infeccion es inferior al 5%.

En los lagos de Vermillon en Alberta, se muestrearon 5,000 patos y gansos, obteniéndose 1262 aislamientos virales, 80 % o más correspondieron a aves juveniles y del 4 al 8% a adultos.

De las 42 especies de Anátidos de Norteamérica se aisló V.I. A. de 25 especies, 3 especies de patos aportaron el mayor número de aislamientos: el pato de collar (Anas platirinchus) 28%, el pato golondrino (Anas acuta) y la cerceta azul, (Anas discors) le siguieron en orden de importancia. Es de hacerse notar que las especies anteriores fueron las más abundantes en las áreas muestreadas. De estas aves se identificaron todas las HA excepto la H13, así como todos las NA. Las HA más frecuentemente identificados fueron H6, H3 y H4, siendo las más raras H8, H2, H5, y H12. Las NA más comunes fueron N2, N8 y N6, las menos frecuentes N9, N4 y N3.

En estudios realizados en aves acuáticas marinas y de litoral no Anátidas de Norteamérica. Se encontró que las HA más frecuentes fueron H13 (No reportada en patos) H11 y H14, mientras que H8, H2 y H5 son las más raras. La frecuencia de NA en estas aves difiere también de la de los patos, las mas comunes fueron N6, N9 y N2, los menos frecuentes fueron N1 y N3.

En diferentes puntos de la migración hacia el sur, se capturaron patos y gansos y se muestrearon para determinar el porcentaje de aves con infección activa, encontrándose que a medida que se alejaban del sitio donde nacieron, los porcentajes disminuían notablemente, lo cual no es de extrañar, el V.I.A. es altamente antigénico, por lo cual los patos infectados rápidamente producen anticuerpos y dejan de eliminar virus.

Es de hacerse notar que Canadá siendo el país del mundo donde existe la mayor concentración de patos y gansos, además profusamente infectados con una extraordinaria variedad de serotipos de V.I. A. y que por ende es durante su tránsito en este país en donde ocurre la mayor diseminación de V.I.A., sin embargo *la industria avicola Canadiense no haya tenido mayores problemas de Influenza.* Ha habido algún brote aislado en pavos pero nunca en pollos o gallinas, interesantemente la población de éstos es por lo menos 10 veces mayor a la de pavos, y además los pollos parecen ser menos resistentes a la Influenza que los pavos. *En la actualidad, Canadá no tiene problemas de Influenza en su avicultura.* Contrariamente en los Estados Unidos en lugares como Minnesota y otros Estados diversos serotipos del V.I.A. con frecuencia están presentes en granjas de pavos.

Muestreos efectuados durante 5 años por Skalktrech y colaboradores en diversos sitos del corredor del Mississippi como en Menfis donde fueron muestreados 1500 patos. En los primeros patos que llegaron a esta localidad en Septiembre se encontró que 3% de los patos juveniles muestreados eliminaban V.I.A.; de los patos que llegaron en Noviembre y Diciembre durante el grueso de la arribazón solamente en el 0.4% de los juveniles arrojaron aislamientos positivos.

Los muestreos efectuados en Luisiana solo el 0.2% de los juveniles muestreados fueron positivos.

Estudios realizados en otros corredores migratorios han arrojado resultados similares, así en Arkansas y Georgia en una estadística de varios años sólo en 0.5% de los juveniles mostraron una infección activa.

En California un muestreo efectuado en más de 5,000 patos sólo el 0.7% de los juveniles mostró aislamientos positivos y en Delamarva el 0.9%.

En los estudios anteriores se identificaron 9 de las 13 HA y 9 de las 10 NA. Es importante hacer resaltar que no se detectaron los serotipos H5, H7 que son los serotipos donde se encuentran las cepas patógenas para las aves domésticas.

Halvarson encontró en Minnesota que uno de los serotipos más frecuentemente encontrado en pavos fue el H6N2, serotipo también común en patos y demostró por medio de pruebas de HI cruzadas con virus-sueros de patos y pavos diferencias notables de títulos entre suero-virus homólogos y heterólogos. Condobey en Ohio y Halvarson en Minnesota inocularon pavos y patos con virus de un mismo serotipo encontrados en ambas especies, cuando se inocularon patos y pavos con virus homólogo se infectaron con facilidad, no así cuando pavos fueron inoculados con virus de pato y todavía menos, patos con virus de pavo, en este caso ni siquiera se replicó el virus. Asimismo encontraron gandes diferencias en títulos en pruebas de HI cruzados. En los trabajos anteriores *se demuestra con clandad que existen diferencias genéticas en un mismo serotipo viral ligado a 2 especies de aves diferentes.*

En Europa Suss-Schafer realizaron muestreos extensivos de las aves acuáticas que se reproducen en la tundra Siberiana y que invernan en Europa, Japón, etc., durante 12 años muestrearon en el Báltico Anátidos y aves marinas de diversas especies.

Los resultados de esta investigación fueron similares a los de Norteamérica, menos del 1% de las aves juveniles mostraron infección activa. Se encontraron 40 combinaciones de HA y NA. En esta investigación se utilizaron patos domésticos libres de anticuerpos como centinelas en las áreas de concentración de aves silvestres y se encontraron diferentes resultados en patos domésticos y en patos silvestres. En los primeros H4N6 fue el serotipo más frecuente 30.3%, mientras que en los segundos H2N3 y H1N1 ocupan los primeros lugares, igualmente estos serotipos del Báltico difieren con frecuencia de los encontrados en Norteamérica, es de hacerse resaltar que las HA H5 y H7 también fueron muy raros o no existieron en patos ni en aves marinas que invernan en Europa.

AVES SILVESTRES EN EL BROTE DE INFLUENZA AVIAR EN PENSILVANIA.

Durante el reciente brote de Pensilvania - New Jersey y Virginia se muestrearon 4,132 aves silvestres en las areas cuarentenadas de Pensilvania, 313 en Virginia y 1511 en Maryland. Las aves muestreadas representaron más de 30 especies diferentes de patos, aves marinas como gaviotas, chorlos, golondrinas marinas, etc. Se incluyeron también Paseriformes comunes del área como gorriones, estorninos, etc. de todos estos muestreos solamente se aisló 1 vez el virus H5 N2 patógeno en una perdiz encontrada muerta dentro de un gallinero infectado.

Un segundo muestreo se realizó 6 meses después del primero, tanto en aves migratorias como residentes del área del brote.

Los resultados de esta investigación mostraron que el serotipo mas frecuente en patos fue H6N2, 2% de los patos muestreados portaban anticuerpos contra la HA H5 y un número igualmente bajo fue positivo a la NA N2, solo 2 patos tuvieron anticuerpos H5N2, con los sueros de estas aves se corrieron pruebas de HI cruzada con virus y antisuero H5N2 del virus patógeno de Pensilvania y se encontraron notables diferencias y se concluyó *no estaban relacionados con el virus patógeno.* Gorriones y estorninos capturados dentro de gallineros infectados fueron negativos a aislamiento viral y a anticuerpos.

Como estudio complementario de esta investigación fueron inoculados 50 patos, 50 gansos, varios Charadriformes como gaviotas, volteapidras, etc. recibieron 1 cc del virus de alta patogenicidad que contenía 10-10 DL50 por vías respiratoria, intramuscular, cerebral, digestiva, *ni una sola ave no solamente no enfermó, ni siquiera permitió la replicación viral.*

La conclusión de estas investigaciones fueron determinantes: LAS AVES SILVESTRES NO FUERON VECTORES DEL VIRUS PATOGENO H5N2.

En relación al posible papel que puedan jugar las aves silvestres como transmisores de la Influenza, no es posible pasar por alto el entorno natural de Sudamérica. Este subcontinente no sólo es el lugar del mundo con el mayor número de aves silvestres, también ocurre un gran movimiento migratorio de patos y gansos que se reproducen en el Verano Austral en la Patagonia y otros lugares al sur del continente y que en Invierno se desplazan por diversos países de Suramérica.

Merece mención especial la migración masiva de aves marinas y de litoral a la costa del Pacífico de Sudamérica, esta sin lugar a duda constituye el mayor movimiento del mundo de este tipo de aves, las que son atraídas por los bancos de anchoveta de las corrientes de Humbold que corren paralelas a la costa de Ecuador, Perú, Chile, la magnitud de esta migración es tal que el excremento que dejan en la costa y en las islas aledañas constituye un recurso natural de gran importancia para Perú y Chile países que exportan millones de toneladas de guano.

Es de hacerse notar la proximidad de granjas avícolas no solo a los depósitos de guano sino también a las fábricas de harina de pescado que están en el litoral, los que atraen grandes bandadas de aves marinas, muchas de las cuales, habiéndose acostumbrado a la presencia humana se acercan a las explotaciones avícolas a comer la mortalidad de las granjas.

A pesar de todas circunstancias que en apariencia favorecen la difusión de la Influenza como en ningún otro lugar del mundo *ni un solo país Sudamericano tiene problemas de Influenza en su avicultura.*

Es también digno de mencionarse la avicultura China, país que tiene una gran producción de pollo y huevo, así como de patos. En las granjas de patos se han efectuado cuantiosos aislamientos de V.I.A., en algunas explotaciones hasta el 50% de las muestras han sido positivas y se han encontrado hasta 5 o 6 serotipos diferentes. Las granjas de patos y pollos no pocas veces están próximos, en ocasiones en un mismo sitio, producen pollos y patos, a pesar de la alta exposición que tienen las granjas avícolas *China no tiene problemas de Influenza en su avicultura.*

ANALISIS DE POSIBILIDADES REALES DE QUE LA INFLUENZA HAYA SIDO INTRODUCIDA A MEXICO POR AVES MIGRATORIAS ACUATICAS

Determinar como se introduce una enfermedad exótica en explotaciones pecuarias no es una tarea simple, sin embargo, es necesario emplear el sentido común sin fanatismos y no guiarse por especulaciones sin fundamentos. Así, cuando se confirmó la presencia del V.I.A. en la avicultura de México, rápidamente sin

bases sólidas se responsabilizó a las aves silvestres, circularon panfletos de "Aves silvestres igual peligro de Influenza" videos oficiales igualmente incriminan a las aves silvestres, conferencistas que describieron brotes de la enfermedad ocurridos en grandes complejos avícolas, con fallas de bioseguridad, múltiples edades etc., también inculparon a los patos, a los gorriones, palomas, etc. y no a sus deficiencias.

Como anteriormente se informó, en México el 80% de la migración de patos, aves marinas y de litoral procedentes del norte, se da primordialmente en la zona de esteros, lagunas, marismas, desembocaduras de ríos de los Estados de Sonora, Baja California y Sinaloa, siguiendo en importancia la costa norte de Tamaulipas y la Peninsula de Yucatán. Los Anátidos permanecen hasta la Primavera antes de regesar al norte a sus áreas de reproducción, algunas aves marinas y de litoral continúan su migración septentrional.

Es de hacer notar, que las *únicas áreas de México que permanecieron siempre libres de Influenza Aviar son justamente los Estados donde llega el grueso de la migración de las aves silvestres.*

De manera alguna puede ser motivo de sorpresa el hallazgo anterior por las siguientes razones:

I) Se ha visto que no es fácil para el V.I.A. romper la barrera interespecífica, el paso de una especie a otra no es común, *se desconece el mecanismo y el tiempo que tarda para adaptarse a un nuevo huésped diferente del ortginal.*

II) El virus de la Influenza es altamente antigénico. Hinshaw y colaboradores demostraron que el máximo de infección ocurre en la tundra Canadiense, donde hasta un 40% de patos juveniles antes de iniciar su vuelo al sur están activamente infectados, los mismos patos, a medida que se alejan de Canadá se van inmunizando, de tal manera que cuando llegan al sur de Estados Unidos, menos del 0.5% albergan virus, es obvio que cuando estas aves arriban a México, la inmunidad sea mayor y estén prácticamente libres.

Incluso se ha demostrado que inoculando pollos con V.I.A. patógeno, los sobrevivientes 3 semanas después, tienen un grado alto de inmunidad y ya no eliminan virus.

III) El virus de la Influenza es lábil a condiciones ambientales adversas. No son comparables la intensidad de la luz solar, temperaturas, etc. de la Tundra Canadiense, donde prevalecen temperaturas de -30°C y más bajas, durante por lo menos 6 meses, favoreciendo la sobrevivencia del V.I.A. en las lagunas donde se reunieron millares de patos infectados activamente, cuyas deyecciones contienen cantidades masivas de virus, los cuales permanecen activos hasta la Primavera y Verano Artico cuando nacen las nuevas generaciones de patos susceptibles.

En México las condiciones son totalmente diferentes. Para empezar, el posible grado de infección de los patos es casi nulo, después, la radiación solar y temperaturas de las costas de Sonora, Sinaloa o Yucatán son letales para el V.I.A.

La posibilidad de que la Influenza haya sido traída a México por aves acuáticas migratorias no Anátidas del Orden de los Charadriformes, Procellariformes.... aves de distribución mundial, cuyas migraciones invernales son las más extensas de todas las aves silvestres, es todavía más remota que las de los Anátidos, tanto por sus hábitos ya que son más territoriales, con densidades de población menores, menor grado de infección que los patos, etc. Casi no valdría la pena de mencionarles, sin embargo, un conocido experto aseguró que el virus de la Influenza H5N2 de México corresponde al encontrado en un Charadriforme, el Chorlito piedrero o Voltea Piedras Arenaria Interpres, y muchos han aceptado sin cuestionar la anterior aseveración y han encontrado ya *"al responsable de la Influenza en México"*. Por los hábitos del Chorlito Piedrero, sería difícil encontrar un "cliente" más complicado, esta ave efectúa una de las migraciones más largas y complejas que se conocen: En el Verano se reproduce en todo el Círculo Polar Artico y se desplaza hasta la Antártida!.

Tanto en su migración invernal al sur como en su retorno al Artico en el Verano, toca las costas de todos los países de America, Europa, Asia, Africa, Australia, etc. sin que se le haya nunca relacionado con Infuenza de aves domésticas, en México, las colonias de Chorlito Piedrero que anidan en Groenlandia, Alaska, Canadá, descienden por el Pacífico, haciendo escala en Baja California, Sonora, Sinaloa para proseguir por el Pacífico por toda la costa hasta la Patagonia. En su retorno al sur, toca las costas de los países del Atlántico, de Suramérica. En México se detiene en la Península de Yucatán y de allí sigue al Norte. *Ante estos hechos, cualquier comentario es inútil.*

MUESTREO SEROLOGICO VIROLOGICO DE AVES MIGRATORIAS

Con el fin de investigar el status serológico-virológico relacionado con el V.I.A. de las aves acuáticas que emigran del Norte, se capturaron aves que invernan en las costas de México, así como en las áreas lacustres del Valle de México.

Diversas especies de patos y aves acuáticas no Anátidas fueron capturadas y se seleccionaron las especies más abundantes.

ANATIDOS.

Las siguientes especies de patos fueron muestreados:

- Cerceta de ala azul (Anas discors) "Blue Wingled Tail".

- Pato Cucharón (Anas clypeata) "Shoveler".
- Pato Golondrino (Anas acuta) "Pintail".
- Pato de Collar (Anas platyrhynchos) "Mallard".
- Pato de Cabeza Roja (Aythya Americana) "Red headed".
- Pato del Altiplano (Anas p. diazi) "Mexican duck".
- Pato Chalcuan (Anas american) "American wigegon".
- Pato Charretero (Aix sponsa) "Wood ducks".
- Pato pijiji (Dendrocygna autumnales) "Fulvous Tree duck"

De todos estos patos se tomaron muestras de sangre para pruebas de HI con el virus H5N2 de baja patogenicidad, virus con sólo 2 pases en embrión de pollo desde su aislamiento original. Igualmente se tomaron hisopos cloacales y se inocularon en embriones de pollo de 9 días de edad, se dieron 2 o 3 pases antes de declararlos negativos.

AVES CHARADRIFORMES

Fueron muestreadas las siguientes especies:
- Agachonas (Gallinago capella) "Snipe"
- Playeritos (Caladris fuscicolis) "Sand piper".
- Chorlitos (Pluviales dominica) "Plovers"
- Tildios (Charadrius vociferos) "Kill deer".

A estas aves se les sometió al mismo tratamiento de los patos. Se les tomaron muestras de sangre e hisopos cloacales para pruebas al H1 e inoculación de embriones.

Finalmente se investigó la capacidad del virus H5N2 de baja patogenicidad de infectar aves diferentes del pollo:

Se inocularon patos y chorlitos libres de anticuerpos H5N2 por vía endovenosa con el virus H5N2 lCC 10_{-7} DL50; de la misma manera fueron inoculados pavos domésticos, Faisanes de Collar (Phasianus colchicus), Codornices Japonesas (Coturnix coturnix), para ver si el virus era capaz de infectar otros Galliformes.

Todas las aves inoculadas se mantuvieron aisladas en observación durante 3 semanas en busca de sintomatología y se les tomó hisopos cloacales y con ellos se inocularon embriones, para ver si eliminaban virus, también se pusieron pollos libres anticuerpos con las aves inoculadas para determinar si seroconvertian.

RESULTADOS

Todos los sueros de patos y Charadriformes fueron totalmente negativos a anticuerpos H5N2, asimismo no fue posible aislar de ninguna de estas aves el virus H5N2.

Ninguna de las aves inoculadas con el virus H5N2, de baja patogenicidad: patos, chorlitos, pavos, faisanes y codornices mostró síntomas de enfermedad ni permitió la replicación del virus, los pollos centinelas permanecieron seronegativos.

Resultados negativos en aves acuáticas no son causa de sorpresa, coinciden con investigaciones similares en este tipo de aves ni siquiera un virus H5N2 de alta patogenicidad para pollos pudo infectar ni replicarse en aves acuáticas. En contrapartida, si es de hacerse notar que pavos, faisanes y codornices fueron totalmente refractarios a una exposición enérgica como es la endovenosa a pesar de ser aves galliformes.

CONCLUSION

La posibilidad de que las aves silvestres hayan sido las responsables de la introducción de a *Influenza a México no es sustentable por las siguientes razones:*

I. Las areas de México donde invernan más del 80% de la migración anual de aves silvestres son los Estados de Baja California, Sonora, Sinaloa, Tamaulipas, Estados de la Península de Yucatán: Yucatán, Campeche y Quintana Roo, es decir: *Estados de México que siempre han permanecido totalmente libres de Influenza.*

II. En el muestreo realizado en patos y Charadriformes no se encontró *ni virus ni anticuerpos H5N2.*

III. La incapacidad del virus H5N2 de baja patogenicidad no sólo de enfermar Anátidos y Charadriformes, sino de siquiera replicarse indica claramente un *origen totalmente diferente al de las aves acualcas.* Aún más relevante fue la incapacidad de infectar pavos, faisanes y codornices, aves Galliformes filogenéticamente más próximas al pollo que las Anátidas o Charadriformes.

IV. En contraste con los hallazgos anteriores, *el virus H5N2 de baja patogenicidad se difundió rápidamente por diversas zanas avícolas de México, todo lo cual hace pensar este era un virus plenamente adaptado al pollo.*

La aparición de la Influenza en México coincide con el TLC y la importación masiva de productos avicolas de los Estados Unidos, país donde en diversos estados existe virus H5N2 de baja patogenicidad tal como informó el Dr. Gabriel Meza durante el Congreso Latinoamericano de Chile 1995.

V. Carecen de fudamento las severas críticas que ha recibido México por no erradicar la Influenza de acuerdo a intereses y realidades que no corresponden al país.

Sin ninguna consideración se le señala como *"inminente peligro para la agricultura y la sanidad de las Américas",* asimismo se le recomienda el uso de vacunas recombinantes de las cuales no hay ninguna experiencia de campo que pruebe su eficiencia.

De la misma manera, carecen de base campañas alarmistas donde se invita al turista extranjero a abstenerse de visitar las playas de México porque están llenas *de "aves silvestres infectadas con el V.I.A. de las granjas mexicanas"*. También se informa a los avicultores de Estados Unidos, tengan cuidado con el retorno de las aves migratorias procedentes de México, porque están regresando infectadas, ésto solamente indica desconocimiento del ciclo natural y de la relación Aves Silvestres-Virus de Influenza.

VI. Finalmente es preciso informar a la comunidad internacional la verdadera situación de la avicultura mexicana, la cual afortunadamente dista mucho de ser lo que se ha publicado en el exterior. Mediante acciones conjuntas de autoridades, Médicos Veterinarios y avicultores, con medidas de bioseguridad y una vacuna inactivada. *Los Virus de alta y mediana patogenicidad han desaparecido de México; hace ya mas de año y medio del últmo brote, y, con seguridad, en la misma forma, será erradicado el virus de baja patogenicidad.*

Los M.V.Z. mexicanos hemos afrontado problemas bastante más graves que la Influenza, la que ni remotamente es comparable a la agresividad que tiene un Newcastle Velogénico Viscerotrópico, enfermedad que sin grandes alardes ha sido erradicada de México.

ANALYSIS OF REAL POSSIBILITIES OF THE INTRODUCTION OF AVIAN INFLUENZA TO MEXICO BY MIGRATORY WATERFOWL

Determining how an exotic disease is introduced into a domestic animal operation is not an easy task. Nevertheless it is necessary to use fanaticism-free common sense and not be led by groundless speculations. So, when the presence of the avian influenza virus (AIV) was detected in the Mexican poultry industry, wild birds were immediately blamed with no solid basis. "Wild birds = influenza hazard" pamphlets started to circulate. Institutional videos also incriminate wild birds. Instead of recognizing their own deficiencies, speakers who described AI outbreaks in large poultry complexes full of biosecurity weaknesses, multiple ages, and so on, also blamed ducks, sparrows, pigeons, etc.

As previously reported, 80% migration of ducks, marine birds and seashore fowl coming to Mexico from the North occurs primarily given in areas of estuaries, lagoons, marshes, and river mouths in the States of Sonora, Baja California and Sinaloa, followed by Tamaulipas' North coast and the Yucatán Peninsula. Ducks remain there up to the spring, prior to returning to the North where they breed. Some marine and seashore birds continue their northerly migration.

It is important to point out that ***the only areas in Mexico that always remained free of avian influenza were precisely the States where most migratory wild birds arrive.***

The above mentioned finding can be somehow surprising for the following reasons:

I. It has been seen that it is not easy for AIV to trespass the inter-species barrier (passage from one species to another is uncommon). ***Yet the mechanism and time required by the virus to get adapted to a different, new host remains unknown***.

II. AIV is **highly antigenic**. Hinshaw et al., demonstrated that maximal infection occurs in the Canadian tundra where up to 40% young ducks get actively infected prior to initiating their flight towards the South. These same ducks -as they fly away from Canada- get immunized, so that by the time they get to the Southern United States, less than 0.5% of birds harbor the virus. It is obvious that by the time these birds arrive in Mexico immunity is even higher so that they are practically virus-free.

It has been demonstrated that 3 weeks after the inoculation of birds with pathogenic AIV, survivors have a very high level of immunity and they do not shed virus any longer.

III. Influenza virus is labile when exposed to adverse environments. Environmental conditions such as sun ray intensity, temperature, etc. of the Canadian tundra are not comparable to those in Mexico. In Canada -300 C or less prevail during at least 6 months, thus promoting the survival of AIV in the lagoons where milliards of ducks gather and get actively infected. Feces of these animals contain massive amounts of virus particles, which remain active until up to the arctic spring/summer, when new, susceptible generations of ducks hatch.

In Mexico conditions are completely different; i.e. the possibilities of infection in ducks are almost nil. In addition, solar radiation and temperature in the coasts of Sonora, Sinaloa, and Yucatán, are lethal for AIV.

The possibility for influenza to have been brought to Mexico by non-*Anseriformes* (*Charadriformes*, *Procellariformes*) migratory fowl of worldwide distribution, which winter migrations are the most extensive of all wild birds, is even more remote than that of anatides due to their habits, since they are more territorial, and they have lower population densities and lower level of infection than ducks. It is nearly not worthy to mention that a recognized expert assured that a H5N2 AIV from Mexico corresponds to that found in the ruddy turnstone (*Arenaria interpres*), a plover of the *Charadriformes* order. Many people have accepted such an statement -without challenging it at all- thus they have blamed "the bird as responsible for AI in Mexico".

Due to its habits, it could be very difficult to find a more complicated "customer" than ruddy turnstone, since it performs one of known longest, most complex migrations:

In summer it breeds all along the arctic pole... and it flies all the way to Antarctica!

Both during its winter migration towards the South, and during its return to the Arctic in summer, it touches the coasts of all countries in America, Europe, Asia, Africa, Australia, etc. Yet it had never been associated with AI outbreaks in domestic fowl. In Mexico the colonies of ruddy turnstone that breed in Greenland, Alaska, Canada, etc., fly down the Pacific stopping over in Baja California, Sonora, Sinaloa, before proceeding towards Patagonia all along the coast.

In its way back towards the South, ruddy turnstone touches the coasts of South American Atlantic countries. In Mexico they stop in the Yucatán Peninsula to continue flying towards the North. **In the face these facts, any additional comments out stand.**

Serological/virological sampling of migratory birds

With the purpose of investigating virological/serological AIV status of waterfowl that migrate form the North, birds hibernating in Mexican coasts, and in Valley of Mexico's lakes were captured.

Several species of ducks and non-anatide water fowl were captured, and the most abundant species were selected.

ANATIDES

The following duck species were sampled:

- Blue-wingled tail (*Anas discors*) (Cerceta de agua azul).
- Shoveler (*Anas clypeata*) (Pato cucharón).
- Pintail (*Anas acuta*) (Pato golondrino).
- Mallard (*Anas platyrhynchos*) (Pato de collar).
- Red headed duck (*Aythya americana*) (Pato de cabeza roja).
- Mexican duck (*Anas p. diazi*) (Pato del altiplano).
- American wigegon (*Anas americana*) (Pato chalcuán).
- Wood duck (*Aix sponsa*) (Pato charretero).
- Fulvous tree duck (*Dendrocygna autumnales*) (Pato pijiji).

Blood samples were obtained from all the above mentioned ducks for HI testing using a low pathogenicity H5N2 AIV with only two passages in chicken embryos from their original isolation. Similarly, cloacal swabs were obtained for inoculation of 9-day old chicken embryos. Two to three passages were performed prior to declaring them as negative.

CHARADRIFORMES

The following species were sampled:

- Snipe (*Gallinago capella*) (Agachonas).
- Sand piper (*Caladris fuscicolis) (Playeritos).*
- Plovers (*Pluviales dominica) (Chorlitos).*
- Kill deer (*Charadrius vociferos*) (Tildios).

These birds were treated in the same manner as we did with ducks. Blood samples and cloacal swabs were obtained for HI and embryo inoculation.

Finally the ability of low pathogenicity H5N2 virus to infect birds other than chickens was investigated:

H5N2-antibody-free ducks and chorlitos were intravenously inoculated with the H5N2 virus (1 cc, 10^{-7} DL50). Similarly, domestic ducks, collar pheasants (*Phasianus colchicus*), japanese quails (*Coturnix coturnix*), were also inoculated in order to see whether the virus had the ability of infecting other *Galliformes.*

All inoculated birds were observed in isolation for 3 weeks in the search of symptoms. Cloacal swabs were obtained for the inoculation of embryos to see whether they were spreading viruses. Also, antibody-free chickens were placed with the inoculated birds, in order to look for seroconversion, if any.

RESULTS

All duck and Charadriformes sera were completely negative to H5N2 antibodies. Similarly, all efforts to isolate H5N2 virus from any of these birds were unsuccessful.

None of the birds inoculated with low pathogenicity H5N2 virus (ducks, turnstones, turkeys, pheasants and quails) showed signs of illness on allowed virus replication. Sentinel birds remained serologically negative.

Negative results in waterfowl are not surprising, since this is in agreement with similar pieces of research in which these bird types have been involved. Furthermore, one H5N2 AIV isolate with proven high pathogenicity in chickens was not able to replicate in or infect waterfowl. On the other hand, it is important to point out that -despite belonging to the *Galliformes* order- turkeys, pheasants and quails were completely refractory to a severe intravenous AIV challenge.

CONCLUSIONS

The possibility for wild birds to have been responsible for the introduction of avian influenza to Mexico is not sustainable for the following reasons:

I. The areas in Mexico where more than 80% migratory birds hibernate are the states of Baja California, Sonora, Sinaloa, Tamaulipas, Yucatán, Campeche, and Quintana Roo; in other words, **Mexican States that have always been free of influenza.**

II. In the sampling carried out in ducks and *Charadriformes*, no **H5N2 virus or antibodies** were found.

III. The inability of low pathogenicity H5N2 AIV to cause disease an even to replicate in both anatides and *Charadriformes*, clearly indicates that this virus has a **totally different origin as compared to that of waterfowl.** Even more important was virus inability to infect turkeys, pheasants and quails, since these birds are *Galliformes*

phylogenetically closer to the chicken than anatides or *Charadriformes*.

IV. In contrast with the above mentioned findings **low pathogenicity H5N2 virus was rapidly spread among different poultry areas in Mexico. All these facts lead us to think that this virus was fully adapted to the chicken.**

The entry of avian influenza in Mexico occurred simultaneously with NAFTA and with the massive importation of poultry products from the US, where low pathogenicity H5N2 AIV exists in several States, just as reported by Dr. Gabriel Meza during the Latin American Poultry Congress carried out in Chile, in 1995.

V. Mexico has received severe, yet groundless criticism for not eradicating avian influenza as per interests and realities that do match to those of the country.

With no consideration at all, Mexico has been pointed out as **"imminent danger to The Americas' agriculture and health"**. Similarly, the use of recombinant vaccines has been recommended to Mexico. Though no field experience exists that proves the efficacy of these recombinant vaccines whatsoever.

Similarly, alarmist campaigns inviting foreign tourists not to visit Mexican beaches since they are full of **"wild birds infected with AIV from Mexican farms"** are groundless. Also US poultry producers are being informed to be watchful on the return of migratory birds from Mexico, since they are going back infected. This only indicates a lack of knowledge of the natural cycle, and of the relation that exists between wild birds and AIV.

VI. Finally, it is a must to inform the international community about the true situation of the Mexican poultry industry, which is far from being what has been published in foreign countries. Through jointly actions with the authorities, veterinarians and poultry producers with biosecurity and an inactivated vaccine, **high and intermediate pathogenicity viruses have disappeared from Mexico. The last outbreak occurred more than a year and a half ago. Similarly, low pathogenicity virus will surely be eradicated.**

Mexican veterinarians have faced problems worse than AI. AI is not comparable in aggressiveness to velogenic, viscerotropic Newastle disease -a disease that without pompous exhibition has been eradicated from Mexico.

AVIAN INFLUENZA VACCINE (H5N2) STUDIES IN LIGHT AND HEAVY BREEDS OF CHICKENS

ESTUDIOS CON UNA VACUNA DE LA INFLUENZA AVIAR (H5N2) EN GALLINAS REPRODUCTORAS PESADAS Y LIVIANAS

B. S. Cowen[A], R. A. Wilson[A], S. K. Harris[B], R. L. Hyde[B], and J. E. Pearson[B]

[A]Wiley Laboratory, The Pennsylvania State University, University Park, PA
[B]National Veterinary Services Laboratory, Ames, IA

RESUMEN

Se utilizaron gallinas reproductoras pesadas y livianas a las que se administró una vacuna inactivada H5N2 o bien un placebo, 1 ó 2 veces. A intervalos de 1 a 4 semanas postvacunación se obtuvieron muestras de sangre y el suero se analizó mediante los procedimientos inhibición de la hemaglutinación (HI, por sus siglas en inglés), ensayo de inmunoabsorción ligado a enzimas (ELISA, por sus siglas en inglés) y precipitación en gel de agar (AGP, por sus siglas en inglés). Los pollitos hijos de dichas reproductoras se analizaron respecto a su contenido de anticuerpos maternos y fueron desafiados a los 9 meses después de la vacunación primaria, evaluando la morbilidad, la mortalidad, las lesiones macro y microscópicas y la difusión del virus. Se encontraron anticuerpos antiH5N2 a la primera semana después de la primera vacunación, mediante las pruebas de HI y AGP. La actividad significativa de ELISA se detectó una semana después. Las vacunaciones de refuerzo dieron como resultado incrementos en los niveles de anticuerpos. Los anticuerpos anti-H5N2 pasaron de las reproductoras a la progenie. Se

encontró que ambos grupos de gallinas están bien protegidas contra el virus virulento H5N2 como resultado de la vacunación, aun cuando la vacuna no protege contra la infección.

INTRODUCTION

Because of the current avian influenza (AI) problems in Mexico and past experiences in Pennsylvania, it seemed appropriate to share the findings of research conducted at Pennsylvania State University with an experimental, inactivated oil-emulsion H5N2 vaccine. Although AI vaccination hasn't as yet been used as a control measure in Pennsylvania, it was thought important for the Pennsylvania poultry industry to know what could be expected of AI vaccines and how best to use them. This is a report of the serological and challenge response of commercial table egg and meat breed chickens to this AI vaccine.

MATERIALS AND METHODS

In this study, approximately 100 (females and the appropriate number of males) each of 18- and 19-week-old commercial white leghorn and broiler breeder chickens were subcutaneously administered 0.5 ml of an inactivated, oil-emulsion H5N2 (prepared by Maine Biological Laboratories) or a sham vaccine one or two times (4- and 14- or 15-week booster vaccinations; 25 chickens per vaccine treatment).

At 1-4 week intervals, blood was collected from 10 chickens (i.e. 5 random; 5 repeats) and the harvested sera were subjected to AGP, HI and ELISA test procedures. Chicks were hatched from both chicken breeds and examined for maternal antibody levels at 1, 7, 14 and 21 days of age. Nine to 13 chickens per breed and treatment were challenged (at NVSL) 9 months post primary vaccination by intratracheal inoculation with 20 LD_{50} of A/Chick/Penn:13-70 H5N2 1/85 and then evaluated for morbidity, mortality, gross and microscopic lesions and the duration and numbers of birds shedding virus.

RESULTS

AGP and HI test procedures detected H5N2 antibody as early as one week following the first vaccination. Notable ELISA activity wasn't detected until one week later, but generally persisted longer and at higher levels than precipitin and HI antibody. The light breed chickens tended to respond better serologically to H5N2 vaccine than did the heavy breed.

Booster vaccination resulted in improvements in antibody levels which were generally maintained at higher levels for longer periods of time. More than a 4-week interval between first and second vaccinations improved the serological response. Vaccinated chickens exhibited marked anamnestic responses to challenge virus; an indicator of virus infection.

H5N2 antibody was passed from hen to chicks of both breeds and was detected up to 21 days of age in white leghorn chicks.

Challenge results revealed that both vaccinated light and heavy breed chickens were quite well protected against disease, but not infection and virus excretion. Neither time elapsed nor number of vaccinations had any meaningful impact on protection. The rate of virus isolation was higher from the trachea and persisted longer than that of the cloaca. More broiler breeders shed challenge virus than did white leghorns.

DISCUSSION

This study demonstrated, as have numerous others[1,2,3] that an inactivated, monovalent oil-emulsion AI vaccine is capable of inducing an antibody response and providing protection against morbidity and mortality. It was also noted that, upon challenge, vaccinated birds frequently became infected and excreted virus even though they showed no signs of disease. However, this work suggests that high levels of antibody can successfully inhibit the shed of virus. Therefore, such vaccines have the potential to markedly reduce the severity of disease and the spread of virus in the field.

It is interesting to note that respectable levels of immunity were induced in both chicken breeds by an inactivated, oil-emulsion vaccine without live-virus priming and that the light breeds may be better responders than heavy. An additional point of interest is the finding that a booster vaccination stimulated increased antibody levels, but apparently did not consistently enhance protection against disease.

REFERENCES

1. Brugh, M. C.W. Beard, and H.D. Stone. Immunization of chickens and turkeys against avian influenza with monovalent and polyvalent oil emulsion vaccines. Am. J. Vet. Res. 40:165-169.1979.
2. Stone, H.D. Efficacy of avian influenza oil-emulsion vaccines in chickens of various ages. Avian Dis. 31:483-490. 1987.
3. Wood, J.M., Y. Kawaoka, L.A. Newberry, E. Bordwell, and R.G. Webster. Standardization of inactivated H5N2 influenza vaccine and efficacy against lethal A/Chicken/Pennsylvania/1370/83 infection. Avian Dis. 29:867-872.1985.

RESULTS OF AN H7N3 AVIAN INFLUENZA VACCINATION PROGRAM IN COMMERCIAL MEAT TURKEYS

RESULTADOS DE UN PROGRAMA DE VACUNACION CONTRA LA INFLUENZA AVIAR H7N3 EN PAVOS COMERCIALES PRODUCTORES DE CARNE

D. D. Frame[A], B. J. McCluskey[B], R. E. Buckner[C], and F. D. Halls[D]

[A]Veterinary Department, Moroni Feed Company, Moroni, UT 84646
[B]USDA:APHIS:VS, P.O. Box 3857, Englewood, CO 80155
[C]Utah State University, Snow Field Station, Ephraim, UT 84627
[D]USDA:APHIS:VS, 348 N 875 E, Orem, UT 84057

RESUMEN

En la primavera de 1995 se presentó un brote de influenza aviar subtipo H7N3, en pavos comerciales del estado de Utah, E.E.U.U. Se produjo una vacuna autógena utilizando al virus inactivado H7N3, obteniendo para ello un permiso especial del Departamento de Servicios Veterinarios y del de Biológicos Veterinarios, del Departamento de Agricultura de Estados Unidos (USDA, por sus siglas en inglés). Se vacunaron más de 2 millones de pollos durante el verano y el otoño. Los brotes en las parvadas disminuyeron en forma abrupta después de iniciar el programa de vacunación. Además de las pocas parvadas afectadas al principio del programa de vacunación, ninguna de las otras parvadas vacunadas mostró subsecuentemente signos clínicos de la influenza aviar. Nuestra conclusión es que el programa de vacunación con virus inactivado fue una herramienta exitosa para detener un brote de influenza aviar H7N3 en esta área aislada en la que se producen pavos de edades múltiples.

SUMMARY

In the spring of 1995 an outbreak of avian influenza subtype H7N3 occurred in commercial turkeys located in the Sanpete Valley of Utah. An autogenous killed virus subtype H7N3 vaccine was produced by Maine Biological Laboratories, Inc., Waterville, Maine under special permission from Veterinary Services and Veterinary Biologics, USDA. Vaccination was begun June 20, 1995. When the vaccination program ended (September 30), 2.03 million turkeys had been vaccinated.

Flock outbreaks rapidly decreased after the vaccination program was started. The fluctuating incidence of outbreaks (see Figure 1) is attributable to geographic clustering of susceptible turkey flocks. Other than a few flocks at the beginning of the vaccination program (which we felt were infected before or soon after being vaccinated), no vaccinated flocks showed subsequent clinical signs of avian influenza.

Sentinel turkeys placed in vaccinated flocks showed no subsequent seroconversion to avian influenza virus. We conclude that the killed virus vaccination program was a successful tool in stopping an epornitic of H7N3 avian influenza in an isolated multi-aged turkey growing area.

ACKNOWLEDGMENT

Special thanks are extended to the State of Utah Department of Agriculture, USDA-APHIS-VS, and personnel of Moroni Feed Company for assistance and contributions to this project.

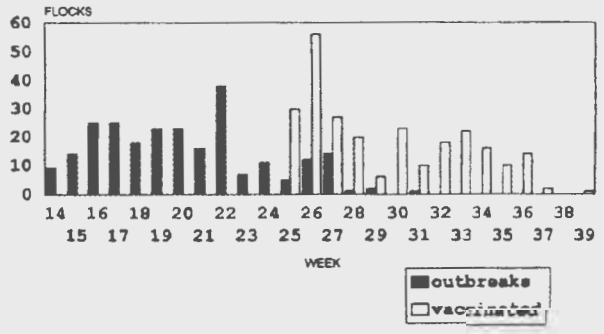


Figure 1. Avian influenza 1995. Outbreaks and vaccinated flocks by week.

ACTUALIZACION SOBRE EL DESARROLLO DE UNA VACUNA RECOMBINANTE CONTRA LA INFLUENZA AVIAR EN LA QUE SE UTILIZA COMO VECTOR AL VIRUS DE LA VIRUELA

AN UPDATE ON THE DEVELOPMENT OF A RECOMBINANT AVIAN INFLUENZA-FOWLPOX VECTORED VACCINE

Thomas R. Mickle[A], Nikki Kinney[A], Jill Taylor[B], Russell Gettig[B], Enzo Paoletti[B], David E. Swayne[C], Joan R. Beck[C], and Robert G. Webster[D]

[A]Select Laboratories, Inc., P. O. Box 2497, Gainesville, GA 30503
[B]Virogenetics Corporation, 465 Jordan Road
Rensselaer Technology Park, Troy, NY 12180
[C]Southeastern Regional Poultry Laboratory, USDA-ARS
934 College Station Road, Athens, GA 30605
[D]St. Jude Children's Research Hospital, P. O. Box 318, Memphis, TN 38101

ABSTRACT

A recombinant avian influenza-fowl pox virus was developed by Virogenetics Corporation in 1988. The construct was prepared by inserting the hemagglutinin coding region from a type A H5N2 influenza virus into a non-essential site in the genome of an attenuated strain of fowl pox virus available as a commercial vaccine. This virus has now been designated as TROVAC-AIV H5. The recombinant has been shown to be safe when inoculated into specific pathogen free chickens and fowl pox susceptible turkeys, ducks, pigeons, and quail. It does not spread from inoculated birds to contacts and the tissue tropism of the fowl pox vector was not altered by insertion of the foreign gene. The duration of immunity against fowl pox and influenza is being determined.

INTRODUCCION

La influenza aviar es una enfermedad importancia económica para la industria avícola. La causa es un virus clasificado como ortomixovirus que puede infectar a diferentes clases de aves. Los signos de la enfermedad pueden variar de una infección respiratoria suave a severa y puede llegar a causar altos niveles de mortalidad en las parvadas. El brote de esta enfermedad, de alta patogenicidad surgido en 1995, ha incrementado el interés en tratar de desarrollar nuevos enfoques para controlarla. El desarrollo de un virus recombinante de la viruela aviar que contiene genes de otros patógenos aviares puede ofrecer la posibilidad de controlar a varias enfermedades con una sola vacuna. El virus TROVAC-AIV H5 ha demostrado ser de gran ayuda en la prevención tanto de la viruela como de la influenza aviares.

MATERIALES Y METODOS

Virus y Cultivo Celular

El virus recombinante viruela-influenza se construyó insertando el ADNc del gene de la hemaglutinina obtenido a partir del virus de la influenza denominado A/Turkey-Ireland/1378/83 (H5N8). El gene de la hemaglutinina está bajo el control de un virus vacunal de la viruela H6 promotor temprano/tardío, el cual fue propagado en un cultivo celular de fibroblastos de embrión de pollo preparado a partir de huevos fértiles SPF. El virus virulento de la influenza aviar utilizado para el desafío fue la cepa A/CK/Querétaro/14588/19/95 (H5N2) y nos fue proporcionado por el Laboratorio Avícola Regional del Sureste de Athens, Georgia, E.E.U.U. El virus virulento de la viruela aviar fue obtenido en los Laboratorios Nacionales de Servicios Veterinarios (NVSL, por sus siglas en inglés), de Ames, Iowa, E.E.U.U.

Aves y Huevos

Los huevos SPF se compraron ya sea a SPAFAS, Inc., Norwich, Connecticut, E.E.U.U., o en Sunrise Farms, Catskill, Nueva York, E.E.U.U. Los pavos, los patos, las palomas y las codornices susceptibles a la viruela fueron comprados a proveedores locales.

Anticuerpos Monoclónicos[1]

El Dr. Robert G. Webster, del Hospital Infantil de Investigación de San Judas, Memphis, Tennessee, E.E.U.U. nos proporcionó una mezcla de anticuerpos

[1]N del T: Del vocablo en inglés monoclonal antibodies, traducido al castellano por algunos autores como anticuerpos monoclonales.

monoclónicos específicos contra los virus de la influenza H5.

Estudios de Seguridad en los Animales para los Cuales Está Diseñado el Producto

Se utilizaron grupos de 20 pollos SPF de un día de edad que fueron inoculados con 10 dosis o bien con 100 dosis del virus recombinante, ya sea mediante inyección subcutánea en el cuello o mediante punción en la membrana del ala. El período de observación duró 3 semanas y durante éste se buscaron signos de reacciones adversas ya sea de influenza o de viruela.

Estudios de Seguridad en los Animales para los Cuales No Está Diseñado el Producto

Se utilizaron pavipollos, pichones, patos jóvenes y codornices jóvenes, todos ellos susceptibles a la viruela, que fueron inoculados con el virus recombinante para determinar si presentaban reacciones adversas. Además, se emplearon aves de las mismas especies que permanecieron sin inocular y que fueron mezcladas con sus congéneres vacunados, con el objeto de observar si el virus experimental podría difundirse con facilidad mediante exposición por contacto.

Ausencia de Reversión a la Virulencia

Treinta pollos SPF de un día de edad fueron inoculados mediante punción en la membrana del ala con el virus de la Semilla Maestra X. Un segundo grupo se inoculó sólo con el virus vector de la viruela. Siete días después se desprendieron las costras de viruela del ala de cada uno de los pollos de los 2 grupos. Se preparó una mezcla de las costras de cada grupo por separado, la cual se homogeneizó y se utilizó para inocular a 2 grupos nuevos de pollos SPF de un día de edad. Los homogeneizados también se utilizaron para inocular monoestratos de fibroblastos de embrión de pollo, con el objeto de recuperar a los virus de la viruela. Se extrajo el ADN del material de las costras y con ello se confirmó la identidad de los 2 virus, analizándolos bajo la técnica de reacción en cadena de polimerasa.

Duración de la Inmunidad

Cien pollos de un día de edad se inyectaron subcutáneamente en la base del cuello con una dosis ($10^{3.5}$ dosis infectantes para el cultivo de tejidos 50% [$DICT_{50}$] por cada 0.2 ml) de TROVAC-AIV H5. Cien pollos compañeros de nacimiento fueron inyectados de la misma manera, con la excepción de que se utilizó como inóculo al virus padre original de la viruela. Se conservaron 50 pollos del mismo nacimiento sin vacunar. Comenzando a las 4 semanas postvacunación, se desafiaron 20 pollos de los 2 grupos vacunados y 10 pollos del grupo control no inoculado, utilizando para el desafío un virus altamente patógeno de la influenza aviar, administrándolo por la vía intranasal. Los pollos se observaron durante 10 días en busca de morbilidad o mortalidad. Se obtuvieron improntas de la tráquea y de la cloaca de todas las aves sobrevivientes para recuperar al virus. Se corrieron pruebas de precipitinas en gel de agar y de inhibición de la hemaglutinación con los sueros obtenidos antes y después del desafío.

RESULTADOS

Estudios de Seguridad en los Animales para los Cuales Está Diseñado el Producto

Todos los pollos vacunados permanecieron saludables durante el período de observación de 3 semanas. No se observó depresión ni signos de viruela ni de influenza. Aun los pollos que recibieron la dosis del virus vacunal multiplicada por 100, se mantuvieron libres de cualesquier reacciones adversas observables.

Estudios de Seguridad en los Animales para los Cuales No Está Diseñado el Producto

TROVAC-AIV H5 fue capaz de replicarse en forma limitada en los pavipollos y las codornices hasta por 14 días. Aun cuando fue posible recuperar al virus a partir de las muestras de piel, en el sitio de la inoculación, el aislamiento no fue posible a partir de la tráquea ni de la cloaca. En un estudio separado diseñado para examinar la transmisión horizontal, no se detectó al virus en ninguno de los experimentos con animales en los que se incluyeron controles por contacto no vacunados. Fue posible recuperar al virus de la viruela a partir del sitio de la inoculación en la base del cuello o en la membrana del ala, pero sólo durante unos cuantos días.

Ausencia de Reversión a la Virulencia

El estudio de pasajes regresivos demostró la seguridad y la estabilidad del virus recombinante, a través de 5 pasajes sucesivos. No hubo incremento alguno observable en la virulencia del virus ni alteración en la apariencia ni en el tamaño de las costras de viruela en la membrana del ala, en comparación con el virus padre original.

Duración de la Inmunidad

Los pollos fueron desafiados con el virus A/Chicken/Querétaro 14585-19/95 (H5N2) a las 4 semanas postvacunación. Se obtuvieron muestras de suero antes del desafío para medir la respuesta inmune a la vacuna. Se obtuvieron muestras mediante impronta de la tráquea y de la cloaca de cada uno de los pollos para intentar la recuperación del virus. Todos los pollos vacunados permanecieron saludables a lo largo de las 8 semanas, mientras que todos los pollos controles murieron de influenza. No se encontraron niveles mesurables de títulos de precipitación en gel de agar ni de inhibición de la hemaglutinación en los animales vacunados ni el los controles antes del desafío. La mayoría de los pollos de los 3 grupos presentó seroconversión después del desafío con el virus de la influenza aviar de alta virulencia.

DISCUSION

Han quedado satisfactoriamente establecidas la seguridad, la estabilidad y la duración de la inmunidad del virus recombinante influenza-viruela de la vacuna

TROVAC-AIV H5. Nuestros estudios indican que el virus persiste en el sitio de la inyección durante un corto período y que no se difunde a los pollos no vacunados mantenidos en contacto con los vacunados. El virus recombinante permaneció sin alteración alguna a lo largo de 5 pasajes regresivos en pollos SPF. La duración de la inmunidad es tan suficiente que se puede utilizar en la inmunización de los pollos de engorda hasta que cumplan las 8 semanas de edad; sin embargo, es importante recordar que todos estos estudios se han realizado en pollos SPF. Será de gran importancia evaluar la eficacia y la duración de la inmunidad de esta vacuna bajo condiciones comerciales de campo, en pollos de engorda procedentes de gallinas que hayan recibido vacunas emulsionadas de la influenza, o bien vacunas activas contra la viruela aviar.

VALUATION OF INACTIVATED H5 AVIAN INFLUENZA VIRUS AND FOWLPOX VIRUS RECOMBINANT VACCINES AND DIAGNOSTIC TEST REAGENTS: IMPLICATIONS IN AVIAN INFLUENZA CONTROL AND PREVENTION STRATEGIES

EVALUACION DE LAS VACUNAS ELABORADAS CON VIRUS INACTIVADO H5 DE LA INFLUENZA AVIAR, DE LAS VACUNAS RECOMBINANTES CON EL VIRUS DE LA VIRUELA Y DE LOS REACTIVOS USADOS EN LAS PRUEBAS DIAGNOSTICAS: IMPLICACIONES EN LAS ESTRATEGIAS DE CONTROL Y PREVENCION DE LA INFLUENZA AVIAR

David E. Swayne and Henry D. Stone

U.S. Department of Agriculture, Agriculture Research Service
Southeast Poultry Research Laboratory, 934 College Station Road, Athens, GA 30605

RESUMEN

Se han utilizado las vacunas para minimizar las pérdidas que produce la influenza aviar, pero el control efectivo sólo se ha logrado a través de la incorporación de la vacunación a un amplio programa estratégico basado en la biocontención y la bioexclusión. Las vacunas elaboradas con el virus inactivado de la influenza aviar, y una vacuna recombinante preparada con el virus de la viruela que contiene al gene H5 del virus de la influenza aviar previnieron la enfermedad y la muerte en pollos desafiados experimentalmente con un virus virulento H5N2 aislado en enero de 1995, a partir de pollos en México. No obstante, ninguna de las vacunas pudo prevenir la infección con el virus de la influenza aviar en los pollos inmunizados que fueron desafiados con el virus altamente virulento H5N2. Estas vacunas redujeron la difusión del virus de desafío en las heces, pero no a través del tracto respiratorio. La prueba de precipitación en gel de agar fue más confiable para supervisar y llevar un control de la seroconversión debida a la vacunación, así como para detectar la respuesta inmune anamnésica, aún cuando las pruebas de inhibición de la hemaglutinación y de inmunoabsorción ligada a enzimas fueron aceptables. La utilidad de la prueba de HI fue altamente dependiente de la cepa viral utilizada para preparar el antígeno H5 para la prueba.

INTRODUCTION

Various strategies have been used for prevention and control of avian influenza (AI). Historically, individual countries have chosen control or eradication requirements to meet their own domestic expectations[8]. However, the implementation of international trade agreements and standardization of health requirements has challenged this nationalist approach.

Control strategies for AI has varied from ignoring the problem to implementation of extreme "stamping out" policies. During 1983-84, this latter method was

used to eliminate highly pathogenic H5N2 avian influenza virus (AIV) in domestic poultry of the Northeastern United States, but this eradication strategy cost the federal government $60 million dollars[9] and underestimated costs to states and the poultry industry. Similar eradication programs have been successful in Australia and the United Kingdom. Although quarantine and slaughter have been effective, especially if implemented early in an outbreak, the process may be expensive, and its initiation and effectiveness are subject to inertia of the political process. The recognition in the 1970s and 1980s of distinctly different clinical forms of avian influenza, i.e. those of low and high pathogenicity, prompted re-examination of control philosophies. For example, outbreaks of AI of low pathogenicity in turkeys of Minnesota have been controlled by a turkey industry supported program utilizing enhanced biocontainment, vaccination, quarantine, and controlled marketing[6,7] (David Halvorson, personal communication). This program has effectively reduced losses and has been less disruptive than traditional "stamping-out" policies. Currently, vaccination is being utilized in the field as a tool for the control of highly pathogenic (HP) AI in instances such as Mexico and Pakistan[10]. In evaluating vaccination as a method for prevention, control or eradication of avian influenza, several issues must be considered. *First*, vaccination alone does not constitute an effective, economical method for the control or eradication of AI. Traditional killed and novel recombinant vaccines prevent clinical illness and death, but do not prevent infection and transmission of virus. *Second*, biocontainment and bioexclusion should be the essential core of effective eradication and prevention strategies, respectively. This is achieved through a multilayered approach incorporating engineering controls in housing design and construction, adequate facility maintenance, exclusion or limited access to farms by service personnel and other persons, appropriate decontamination of shared equipment and outer wear of people, adequate prevention of wild bird access, proper disposal of dead poultry and litter, proper surveillance and diagnostic test methods and schemes, and ongoing evaluation of overall effectiveness of intervention strategies. Vaccination can be an effective adjunct, but cannot substitute for nor replace biocontainment and bioexclusion strategies. *Third*, effectiveness of control and prevention strategies is only as good as the surveillance and diagnostic procedures that ascertain the avian influenza status of a farm or geographic region. Improper testing strategies or inappropriate surveillance methods may provide negative data that can make us feel good, but inaccurate or politically correct information will not stop the spread of the virus or eliminate the disease. *Fourth*, the ultimate goal of the control and prevention strategy should be to eliminate AIV infection from commercial poultry. This is especially important when examining H5 and H7 subtypes of AI. Elimination of the highly virulent AIVs is important, but because of the high mutation rate of AIVs and the natural ability of highly virulent H5 and H7 AIVs to emerge from avirulent viruses, lasting success can only be achieved by elimination of both avirulent and highly virulent AIVs. *Fifth*, live AIV vaccines should never be used. Because of the ability of avirulent AIVs to mutate to high virulence, live AIV vaccine could give rise to highly pathogenic field viruses. In addition, the goal of total AIV eradication in poultry is incompatible with the use of avirulent AIV vaccines.

Experimental studies on inactivated AIV vaccines and fowlpox vaccine recombinants containing inserts of avian influenza genes have been reported previously[1-6,11-13]. This report describes serologic findings of experimental studies utilizing inactivated AIV and fowlpox recombinant vaccines and protection against challenge with HP H5N2 virus of Mexican origin. Additional information is provided concerning serologic monitoring tests and antigen selection.

DESIGN AND DATA

Inactivated vaccines. Ten inactivated mineral-oil based H5 AIV vaccines were tested in 3- to 4-week-old white leghorn chickens including A/turkey/Wisconsin/68 (H5N9) [TW/68], A/chicken/Hidalgo/26654-1368/94 (H5N2) [H5/94], A/chicken/Queretaro/14588-19/95(H5N2) [Q1/95], A/chicken/Chiapas/28159-488/95 (H5N2) and A/chicken/Mexico/31381-7/94 (H5N2). At 3 weeks of age 95% of chickens immunized with TW/68 produced antibodies detected by agar gel precipitin (AGP) and hemagglutinin-inhibition (HI) tests. The geometric mean titer (GMT) for HI test was 1:243 when using TW/68 antigen, but the GMTs were much lower (<1:36) when using H5/95 and Q1/95 test antigens, respectively. By contrast, 70-100% and 0-100% of chickens vaccinated with the other nine H5 vaccines had antibodies detected by AGP and HI tests, respectively. In general, GMTs for HI tests were low when using any of the 3 test antigens. All vaccinated chickens challenged with highly pathogenic Q1/95 had seroconversion at 2 weeks post infection, but GMTs were 2-3 fold higher in TW/68 than chickens in the other 9 AIV vaccine groups. The AGP test was more consistent in detecting antibodies in vaccinated chickens than the HI test. All 10 H5 virus strains provided 90-100% protection against lethal challenge by intranasal inoculated Q1/95.

Recombinant vaccine. Subcutaneous or wing web inoculation of low, medium and high doses of fowlpox-avian influenza hemagglutinin vaccine recombinant at 1

day of age provided 92-100% protection from illness and death following intranasal challenge with HP Q1/95 AIV at 3 weeks of age. At 3 weeks post vaccination, all birds were serologically negative on AGP, but 8% of subcutaneous hemagglutinin-vaccinated chickens had positive sera on HI test. In chickens challenged with Q1/95, 24% of hemagglutinin-vaccinated chickens shed virus in the feces compared with 80% of sham-vaccinated control chickens. In addition, the hemagglutinin-vaccinates excreted lower quantities of challenge virus in the feces than sham-vaccinates. However, there was no difference in the number of shedders nor quantity of virus shed from the oropharynx of hemagglutinin- and sham-vaccinated chickens.

CONCLUSIONS

1. Vaccination has the potential to be a useful tool in control and prevention of AI if used as part of an overall multilayered control strategy emphasizing biocontainment and bioexclusion.

2. Both inactivated AIV vaccines and a fowlpox vaccine recombinant containing a AIV H5 hemagglutinin gene can protect chickens from illness and death if challenged with a HP H5N2 AIV isolated in Mexico during 1995, but current vaccines will not prevent infection by avirulent or highly virulent AIVs.

3. AIV vaccination can, under some conditions, decrease the total number of chickens shedding virus and the quantity of virus shed from the intestinal tract following virulent challenge virus. However, vaccines produced by current technology seem to have little impact on decreasing shedding of challenge viruses from the respiratory tract.

4. Not all H5 virus strains are equally suited as vaccine candidates. If HI titer responses are used to monitor vaccination success, TW/68 is the best candidate. In addition, this virus grows to high titers in 10-day-old embryonated chicken eggs and is protective against a HP H5N2 challenge virus isolated in Mexico. This former characteristic is important in the selection of commercial vaccine virus strains because viruses that grow to high titer in eggs are more economical viable; i.e. commercial failure or success may equated to a difference of 0.1-0.2 cents per dose of vaccine.

5. Fowlpox vaccine recombinants containing an AIV H5 gene have an advantage of eliminating the 42 day withdrawal time of inactivated mineral-oil based vaccines. This makes them potentially useful in the U.S. Broiler Industry. They also will eliminate the potential of injury from accidental human injection of mineral-oil based inactivated vaccines. Recombinant vaccines are adaptable to immunization during handling at hatch, and are effective as administered through subcutaneous or wing-web routes.

6. AGP was the most reliable serologic test for monitoring vaccination response, but ELISA technology has produced a sensitive alternative that is amenable to labor-saving automation. The economic use of HI and AGP in serologic monitoring may be favored under conditions of relative abundance and low cost of laboratory manpower. However, for HI testing the determination of optimal virus stain to be used as the source of test antigen is extremely important for maximizing sensitivity.

ACKNOWLEDGEMENTS

Drs. Max Brugh, C.W. Beard and D.A. Halvorson are thanked for providing information and meaningful critique. Drs. J. Pearson, K. Preston, R. Eckroade, T. Holder, B. Pomeroy and H. Lasher as members of the Avian Influenza Subcommittee, Transmissible Diseases of Poultry, U.S. Animal Health Association are thanked for significant discussions on AI control strategies. Thanks are extended to Dr. T. Mickle and D. Page of Select Laboratories, Inc., for providing the recombinant fowlpox-AIV hemagglutinin vaccine and B. Glidewell-Erickson for providing ELISA serologic tests kits to detect AIV specific antibody. J. Beck and M. Garcia are thanked for excellent technical assistance.

REFERENCES

1. Abraham, A., V. Sivanandan, D. Karunakaran, D. A. Halvorson, and J. A. Newman. Comparative serological evaluation of avian influenza vaccine in turkeys. Avian. Dis. 32:659-662. 1988.
2. Beard, C. W., W. M. Schnitzlein, and D. N. Tripathy. Protection of chickens against highly pathogenic avian influenza virus (H5N2) by recombinant fowlpox viruses. Avian Dis. 35:356-359. 1991.
3. Beard, C. W., W. M. Schnitzlein, and D. N. Tripathy. Effect of route of administration on the efficacy of a recombinant fowlpox virus against H5N2 avian influenza. Avian. Dis. 36:1052-1055. 1992.
4. Brugh, M., C. W. Beard, and H. D. Stone. Immunization of chickens and turkeys against avian influenza with monovalent and polyvalent oil emulsion vaccines. Am. J. Vet. Res. 40:165-169. 1979.
5. Fatunmbi, O. O., J. A. Newman, V. Sivanandan, and D. A. Halvorson. Enhancement of antibody response of turkeys to trivalent avian influenza vaccine by positively charged liposomal avridine adjuvant. Vaccine 10:623-626. 1992.
6. Halvorson, D. A., D. Karunakaran, A. S. Abraham, J. A. Newman, V. Sivanandan, and P. E. Poss.

Efficacy of vaccine in the control of avian influenza. In: Proceedings of the Second International Symposium on Avian Influenza. C. W. Beard, ed. U.S. Animal Health Assocaition. Richmond, Virginia. pp. 264-270. 1986.
7. Karunakaran, D., J. A. Newman, D. A. Halvorson, and A. Abraham. Evaluation of inactivated influenza vaccines in market turkeys. Avian Dis. 31:498-503. 1987.
8. Lancaster, J. E. International responsibility for control of avian influenza. In: Proceedings of the First International Symposium on Avian Influenza. R. A. Bankowski, ed. U.S. Animal Health Association. Richmond. Virginia. pp. 184-191. 1981.
9. Lasley, F. A. Economics of avian influenza: control vs noncontrol. In: Proceedings of the Second International Symposium on Avian Influenza. C. W. Beard, ed. U.S. Animal Health Association. Richmond, Virginia. pp. 390-399. 1086.
10. Salem, M. Avian influenza in Mexico. Proc. Natl. Meet. Poult. Health Processing 30:99-105. 1995.
11. Stone, H. D. Efficacy of avian influenza oil-emulsion vaccines in chickens of various ages. Avian Dis. 31:483-490. 1987.
12. Stone, H. D. Efficacy of experimental animal and vegetable oil-emulsion vaccines for Newcastle disease and avian influenza. Avian. Dis. 37:399-405. 1993.
13. Taylor, J., R. Weinberg, Y. Kawaoka, R. G. Webster, and E. Paoletti. Protective immunity against avian influenza induced by a fowlpox virus recombinant. Vaccine 6:504-508. 1988.

EVALUACION DE 7 VACUNAS COMERCIALES DE INFLUENZA AVIAR

EVALUATION OF 7 COMMERCIAL AVIAN INFLUENZA VACCINES

Palacios, M.R., Rodríguez, V.H., Cerón, H.M.,García-García, J.

CENI-Microbiología, INIFAP, SAGAR. Km 15.5 Carr. México-Toluca, Cuajimalpa, D.F.

ABSTRACT

Seven commercial formalin- or J-propiolactone-inactivated avian influenza (AI) vaccines, either alone or in combination with Newcastle disease (ND) vaccine were evaluated. Groups of 20 specific pathogen free (SPF) chickens were immunized with each product. Blood samples were obtained at 1, 7, 10, 14, and 21 days post-vaccination (PV).

Groups of 18 immunized birds were challenged with a high pathogenicity AI virus (HPAIV). Antibody titters were detected by the hemagglutination inhibition (HI) test. The application of commercial vaccines resulted in 84-100% seroconversion at day 21 PV, with a geometric mean (GM) of 28.4-263.6. None of the vaccinated birds had severe clinical signs after challenge. No mortality was observed. It is concluded that killed vaccines manufactured by authorized laboratories confer excellent protection.

INTRODUCCION

La IA es una enfermedad de difusión mundial, que era considerada exótica en México. Esto fue hasta que un virus subtipo H5N2 de baja patogenicidad (IABP), se notificó en forma oficial el 23 de mayo de 1994, en los Estados de Querétaro, Hidalgo y México. En enero de 1995 la Dirección General de Salud Animal (DGSA) autorizó la elaboración y el uso de vacunas inactivadas y emulsionadas en aceite contra IA, basada en la presencia de los brotes de mediana y alta patogenicidad presentados durante diciembre de 1994 y enero de 1995, en los Estados de Puebla, Querétaro y Jalisco, y en los resultados preliminares de la evaluación de una vacuna experimental realizados en el INIFAP. Las vacunas fueron capaces de evitar la morbilidad y la mortalidad en el 100% de las aves vacunadas con los productos experimentales a partir del día 21 post-inmunización. El objetivo de este trabajo fue conocer la eficiencia de cada una de las vacunas inactivadas, elaboradas en México para prevenir la IA.

MATERIAL Y METODOS

Se utilizaron 20 pollos de la linea Leghorn, SPF, de 6 semanas de edad, para cada producto. Los pollos se mantuvieron en aislamientos independientes 3 dias antes de iniciar el estudio, para su adaptación y durante todo el experimento. Las aves se vacunaron con 0.5 ml

de cada producto y se sangraron por la vena radial al día 1,7,10,14 y 21 post-vacunación. El título de anticuerpos se determinó por la prueba de IH. Las vacunas se identificaron como A, B y C inactivadas con formalina, D y E inactivadas con beta-propiolactona y F y G inactivadas con formalina y combinadas con vacuna de ENC. Un grupo de 15 aves sin vacunar se utilizó como control, Los pollos se desafiaron con la cepa A/Ck/Qro/14588-19/95 (H5N2) de IAAP. El desafío.se realizó instilando 1 ml de fluido alantoideo por la vía ocular, nasal e intratraqueal, con un catéter del calibre 18 conteniendo 100 DLP_{50}.

RESULTADOS

La sero-conversión se observó a partir del día 7 en la vacuna A con una MG de 1.4. para las vacunas B y C se inicio la sero-conversión a partir del día 10, teniendo una MG de 3.5 y 2.1 respectivamente. Para el día 21 se tuvieron porcentajes de 84.2 al 100% de sero-conversión registrando MG de 171.9 para la vacuna A, 98.8 para la vacuna B y 28.4 para la vacuna C.

Para las vacunas inactivadas con beta-propiolactona la vacuna D tuvo mejor resultado al iniciar la sero-converción al día 7 con una MG de 1.0. Al día 21 las vacunas tuvieron MG de 71.7 para la vacuna E y 263.6 para la vacuna D.

De las vacunas combinadas con ENC e inactivadas con formalina la sero-conversion se observo a los 7 dias post-vacunación para la vacuna F con MG de 1.1 y la vacuna G los títulos se detectaron hasta el día 10 con MG de 2.5, al día 21 respondieron en forma adecuada con MG de 44.1 y 138.0 respectivamente. Cabe señalar que en estas dos vacunas se evaluó unicamente la respuesta hacia IA, desconociendo la respuesta anticuerpos para ENC.

Al desafío, la morbilidad se describió como aquellas en las que se observaron varios signos de la enfermedad, consistiendo en edema, amplia necrosis severa de la cresta y barbillas, conjuntivitis severa, inflamación, hemorragias en patas y postración. Con lo anterior señalaremos al grupo G que con el desafío mostro ligero puntilleo de hemorragias en la cresta con duración de 5 días, sin alterar las funciones de los animales. Las aves de los grupos B, C y E solo mostraron ligera inflamación de parpados durante un periodo de 6 días. En todos los casos las manifestaciones se iniciaron 3 días después del desafío. Ninguna de las aves afectadas mostró inapetencia, decaimiento severo u otro signo, el resto de los grupos no mostraron ninguna signología de la enfermedad. Las aves del grupo control presentaron los signos a los 3 días post-desafío, observandose una morbilidad del 100% y una mortalidad del 80% en un periodo de 8 días.

DISCUSION Y CONCLUSIONES

Es interesante señalar que una vacuna representante de los tres grupos indujo a la formación de anticuerpos detectados por IH, 7 días post-administración. Que la mayoria de las aves inmunizadas con estas vacunas sero-convirtieron a los 21 días y ninguna de las aves inmunizadas al desafio mostraron manifestaciónes clínicas de la enfermedad. Las vacunas que mostraron los niveles más bajos de anticuerpos, MG de 28.4 y 44.1 (C y G respectivamente) permitieron la presentacion de lesiones en la cresta, palidez y puntos de necrosis en las aves desafiadas, probablemente originadas por una estasis vascular. Las vacunas B; C y E no alcanzaron a inducir la sero-conversión del 100% de las aves vacunadas, algunas de ellas permitieron la presentación de una ligera inflamación de parpados acompañados de ligero decaimiento. Es importante señalar que las vacunas B y F son elaboradas por la misma empresa. Sin embargo, la vacuna combinada obtuvo mejores resultados en esta evaluación. Con anterioridad se probó otro lote de vacuna del laboratorio A obteniendose resultados del 95% de sero-conversión al día 21 post-administración con una MG de 142.0, por lo que se puede inferir que existen variaciones entre lote y lote. Sin embargo, parece ser que no son substancialmente diferentes. En cuanto a la variable de calidad de la emulsión, parece que pudiera tener alguna relación con la calidad del producto, ya que en el lote de vacunas de IA, inactivadas con formalina la buena emulsión dio mejores resultados al compararla con la vacuna que presentó una franca separacion de las fases, sin llegar a romperse la emulsión. Calidades similares de emulsión parecen ser no importantes como en el caso de las vacunas combinadas en la que una vacuna presentó fases ligeramente separadas (F) fue mejor que una buena emulsión (G).

Los resultados aqui presentados sugieren que las vacunas comerciales contienen una buena antigenicidad ya que conducen a una sero-conversión del 84 al 100% al día 21 post-inmunización. Demostrando también que una vacuna emulsionada induce una temprana formación de anticuerpos, lo cual concuerda con los resultados obtenidos con vacunas experimentales realizados por el Dr. Brough, y el Dr Xie. Tambien se confirma que a pesar de la ausencia de anticuerpos detectable por la prueba de IH las aves son reistentes al desafío con cepas de alta patogenicidad. Por lo que la inmunidad humoral parece no ser la más importante en la protección, en caso de infecciones causadas por el virus de IA.

REFERENCIAS

1. Brugh, M., Beard, C.W., Stone, H.D. Immunization of Chickens and Turkeys Against Avian Influenza with Monovalent and Polyvalent Oil Emulsion Vaccines. *Am. J. Vet. Res.* 40: 165-169, 1979
2. Brugh, M., and Perdue, L. M. Emergence of Highly Pathogenic Virus During Selective Chicken Passage of the Prototype Mildly Pathogenic Chicken/ Pennsylvania/83 (H5N2) Influenza Virus. *Avian Diseases* 35: 824- 833, 1991
3. Karunakaran, D., Newman, J.A., Halvorson, D.A., and Abraham, A. Evaluation of Inactivated Influenza Vaccines in Market Turkeys. *Avian Diseases* 31: 498-503, 1987
4. Stone, D.H. Efficacy of AvianInfluenza Oil-Emulsion Vaccines in Chickens of Various Ages. *Avian Diseases* 31: 483-490, 1987
5. Xie, Z., and Stone, D.H. Immune Response to Oil-Emulsion Vaccines with Single or Mixed Antigens of Newcastle Diseases, Avian Influenza, and Infectious Bronchitis. *Avian Diseases* 34: 154-162, 1990

EVALUACIÓN DE VACUNAS INACTIVADAS DE IA EN MÉXICO, PRUEBAS DE LABORATORIO Y DE CAMPO

EVALUATION OF INACTIVATED AVIAN INFLUENZA VACCINES IN MEXICO: LABORATORY AND FIELD TRIALS

García-García Juan, Rodríguez Velasco Humberto, Hernández Magdaleno Alejandro, Cerón Hernández Mario, Blasco Ruiz Karla

CENI-Microbiología, INIFAP, SAGAR, Km 15.5 Carr. México-Toluca, Palo Alto, Cuajimalpa D. F., C. P. 05110, México

ABSTRACT

Inactivated vaccines against avian influenza (AI) have been used to control the disease in Mexico. Preliminary evaluation of vaccines using different inactivating agents, as well as evaluation of all commercially used vaccines were carried out. In all cases vaccines induced antibodies in more than 84% of birds at day 21 post-vaccination (PV). Protection against challenge was >80% and 100% at 7 and 21 days PV, respectively in all cases. The administration of reduced doses of commercial vaccines allowed the occurrence of severe clinical manifestations of the disease with some mortality. Vaccine virus inactivation was correct in all cases as evidenced by no seroconversion and by challenge susceptibility of sentinel birds that were placed in contact with hyper-vaccinated birds.

ANTECEDENTES

La Influenza Aviar (IA), ha sido considerada dentro de las enfermedades mas importantes que afectan a la avicultura comercial. La enfermedad es causada por diferentes subtipos del virus de influenza tipo A. Las pérdidas económicas que se tienen ante un brote de Influenza Aviar (IA), de alta patogenicidad (IAAP), resultan ser considerables sí el brote no es identificado con prontitud; debido a su potencial de diseminación en la parvada y a las granjas cercanas al lugar del brote. Cuando se presenta un virus de IA subtipos H5 y H7; la recomendación internacional es el sacrificio de la parvada o parvadas afectadas. En México durante los meses de diciembre de 1994 y enero de 1995 se identificaron dos brotes de IAAP. Estos brotes fueron la consecuencia de ciclos de replicación del virus de IA de baja patogenicidad que durante 1994 se encontraban afectando a diferentes regiones avícolas del país, causado por la mutación en el amino ácido -3 y la inserción de dos amino ácidos básicos en las posiciones -5 y -6 del fragmento HA1 de la hemoaglutinina (H). De tal manera que se realizaron investigaciones preliminares sobre la protección que podría conferir una vacuna experimental que se había elaborado a partir de ur fluido alantoideo de embriones inoculados con el virus A/Ck/CPA-238/94, inactivado con beta-propiolactona, por la Productora Nacional de Biológicos Veterinarios (PRONABIVE). El protocolo de elaboración de la vacuna lo estableció el Gobierno Federal a través de la Dirección General de Salud Animal, autorizando a varios laboratorios su producción y comercialización. Para preparar una

vacuna con el objeto de prevenir la IA, es necesario considerar que se debe mantener la estructura antigénica del virus. De particular importancia es el mantenimiento de la H, ya que en ella radican epítopes importantes para inducir la respuesta inmune. La dificultad para adquirir la beta-propiolactona propició que algunos laboratorios utilizaran como agente inactivante a la formalina, Los costos de manejo favorecieron la utilización de vacunas combinadas, especialmente con vacuna de la Enfermedad de Newcastle (ENC). La búsqueda de otras alternativas motivó la investigación para valorar vacuna inactivada con etilenimina binaria y la vacuna recombinante. El INIFAP, por las instalaciones que cuenta permitió valorar todas las vacunas inactivadas, tanto en su capacidad para inducir la formación de anticuerpos como para determinar el nivel de protección al desafío que se obtiene con el uso de ellas. Se valoraron también la eliminación del virus de desafío y la respuesta secundaria con el objeto de establecer niveles que permitieran diferenciar anticuerpos vacunales de anticuerpos post-exposición al virus. Se realizaron estudios para conocer la duración de la inmunidad, así como también para determinar la edad apropiada de administración y la interferencia de anticuerpos maternales con la vacunación. Finalmente se realizó una evaluación de las vacunas comerciales, a partir de muestras de retención, para asegurar que el producto que se encuentra en el mercado reunía los requisitos de concentración antagénica, protección e inocuidad requeridos para controlar el problema.

RESULTADOS

En el Cuadro 1 se presentan las medias geométricas y el porcentaje de seroconversión de pollos inmunizados con vacuna inactivada con formalina

Cuadro 1. Medias geométricas y porcentaje de seroconversión de pollos inmunizados con vacuna inactivada con formalina

Días post-vacunación	Reciproca de la dilución	porcentaje de seroconversión
7	17	33%
14	35	59
21	142	95
28	275	100

En el Cuadro 2 se presentan las medias geométricas y los porcentajes de seroconversión de pollos inmunizados con vacuna inactivada con etilenimina binaria.

Cuadro 2. Medias geométricas y porcentaje de seroconversión de pollos inmunizados con vacuna inactivada con etilenimina binaria.

Días post vacunación	Reciproca de la dilución	Porcentaje de seroconversión
7	0	0
14	48	0
21	100	100
28	199	100

En el Cuadro 3 se comparan los resultados de morbilidad y mortalidad post-desafío para una vacuna inactivada con formalina y una vacuna inactivada con etilenimina binaria.

Cuadro 3 Morbilidad y mortalidad post-desafío de aves inmunizada con vacuna inactivada con formalina y vacuna inactivada con etilenimina binaria.

Días post-vacunación	Vacuna inactivada con formalina	Vacuna inactivada con etilenimina binaria
7	3/3/10	8/2/15
14	1/1/10	1/1/15
21	0/0/10	0/0/15
28	0/0/10	0/0/15

Las aves que fueron vacunadas se desafiaron a los 7, 14, 21 y 28. Después del desafío se midieron anticuerpos a los 7, 14, 21 y 28 días. Los resultados indican que si el desafío se realiza en breve tiempo después de la vacunación, la respuesta secundaria es menor al compararla con la respuesta obtenida en las aves desafiadas a los 28 días de haberse vacunado.

La evaluación serológica y de protección al desafío obtenida con las 7 vacunas comerciales se presenta en un trabajo adjunto al presente. La administración de 4 dosis de cada una de las vacunas no tuvo ningún efecto adverso en las aves vacunadas. Estas no mostraron signos de enfermedad al desafío realizado 21 días después de la administración de la vacuna. Junto a estas aves se colocaron aves susceptibles para identificar sí estas seroconvertían o mostraban resistencia al desafío. Las aves de todos los grupos no seroconvirtieron y fueron susceptibles al desafío.

En los Cuadros 4, 5 y 6 se muestran los resultados de morbilidad y mortalidad observados en aves que fueron inmunizadas con la dosis completa, con 0.05ml y con 0.005 de las vacunas. Se observa que al administrar menor cantidad de la vacuna se presenta morbilidad en todos los casos y mortalidad con algunas vacunas.

Cuadro 4. Morbilidad y mortalidad observada en aves vacunadas con dosis normal y reducida de la vacuna de IA

	Morbilidad/mortalidad/total de aves		
Vacunas inactivadas con formalina	Vacuna A	Vacuna B	Vacuna C
Grupo 1. Dosis 0.5 ml	0/0/3	0/0/3	0/0/3
. Dosis 0.05 ml	1/1/3	1/0/3	2/0/3
Grupo 3 Dosis 0.005 ml	2/1/3	2/0/3	3/3/3

Cuadro 5. Morbilidad y mortalidad observada en aves vacunadas con dosis normal y reducida de la vacuna de IA

	Morbilidad/mortalidad / total de aves	
Vacunas inactivadas con beta-propiolactona	Vacuna D	Vacuna E
Grupo 1. Dosis 0.5 ml	0/0/3	0/0/3
. Dosis 0.05 ml	1/1/3	2/0/3
Grupo 3 Dosis 0.005 ml	2/0/3	2/0/3

Cuadro 6. Morbilidad y mortalidad observada en aves vacunadas con dosis normal y reducida de la vacuna de IA

	Morbilidad/mortalidad/total de aves	
Vacunas inactivadas con formalina mixtas	Vacuna F	Vacuna G
Grupo 1. Dosis 0.5 ml	0/0/3	0/0/3
. Dosis 0.05 ml	1/0/3	1/0/3
Grupo 3 Dosis 0.005 ml	2/1/3	0/0/3

CONCLUSIONES

Con los resultados anteriores es posible señalar que todas las vacunas inactivadas brindan una protección adecuada al desafío. Sin embargo en todos los casos se observó que el virus de desafío replica en las aves vacunadas, con variable eliminación viral que ocasiona morbilidad y mortalidad variable en aves susceptibles puestas en contacto después del desafío. Además que en todos los casos fue posible aislar el virus 5 días después del desafío.

REFERENCIAS

1. Brough, M., Beard, C.W., Stone, H.D. Immunization of chikens and turkeys against avian influenza with monovalent and polyvalentoil emilsion vaccines. (1979) Am. J. Vet. Res. 40. 165-169.
2. Brugh, M., Perdue, M.L. Emergence of highly pathogenic virus during selective chiken passage of prototype mildly pathogenic chiken/Pennsylvania/83 (H5N2) Influenza Virus. (1991). Avian Diseases 35: 824-833.
3. Gelb, J. , Killian, S.L. Serum antibody responses of chikens following sequential inoculations with different infectious bronchitis virus serotypes (1987) Avian Diseases 31: 513-522
4. Karunakaran, D. , Newman, J.A.., Halvorson, D.A., Abraham, A. Evaluation of inactivated influenza vaccines in market turkeys. (1987). Avian Diseases 31: 498-503.
5. King, D.J. Evaluation of different methods of inactivation of Newcastle Disease Virus and Avian Influenza Virus in egg fluids and serum (1991) *Avian Diseases* 35: 505-514
6. Stone, H.D. Efficacy of avian Influenza oil-emulsion vaccines in chikens of various ages. (1987). Avian Diseases 31: 433-490.
7. Xie, Z., Stone, H. Immune response to oil emulsion vaccines with single or mixed antigens of Newcastle Disease, Avian Influenza, and Infectious Bronchitis. (1990) Avian Diseases 34: 154-162

INFLUENZA AVIAR EN SWAN LAKE

AN AI OUTBRAKE IN SWAN LAKE

Benjamín Lucio M. [A] y Susan Trock [B]

[A] Unit of Avian Medicine - Avian Disease Program Department of Microbiology and Immunology
College of Veterinary Medicine, Cornell University, Ithaca, NY 14853

[B] United States Department of Agriculture Animal and Plant Health Inspection Service
Veterinary Services - Northeast Region 1 Winner's Circle, Albany, NY 12235

RESUMEN

El Miércoles 25 de Octubre de 1995 aislamos en nuestro laboratorio de la Universidad de Cornell un virus de influenza aviar H7N2. El virus provino de pollo de engorda presentados para diagnóstico el día Lunes 23. El Jueves 26 se notificó a las autoridades Estatales la posibilidad de influenza aviaria y se impuso cuarentena a la granja infectada y una granja sospechosa. El Viernes 27 el Laboratorio Nacional de Servicios Veterinarios [National Veterinary Services Laboratory (NVSL)] identificó el virus como H7N2. El día 7 de Noviembre se sacrificaron todos los animales presentes en la granja y se inició una encuesta para determinar la difusión de la infección. A excepción de los mercados de aves vivas de la Ciudad de Nueva York el virus de influenza aviar fué eliminado del Estado de Nueva York. Los eventos ilustran la importancia de actuar con decisión y rapidez en el control de la influenza aviar. Historia clínica. Los pollos afectados estaban siendo criados en el mismo edificio en el que operaba una planta de sacrificio y procesamiento. En la granja también había pollos de engorda "rojos" y "grises", gallinas "sedosas", codornices, perdices y patos. Todas estas aves estaban destinadas al mercado de aves vivas de la Ciudad de Nueva York. El cuadro clínico descrito por el técnico que presentó el caso fué de problemas respiratorios, cabeza hinchada y mortalidad que se había duplicado en los últimos cuatro días. Un día antes del envío al laboratorio la mortalided había sido de 130 pollos en una parvada de 10,000. A la necropsia se encontró edema facial, perihepatitis, pericarditis, e inflamación de los sacos aéreos. Durante nuestra visita a la granja, realizada el 24 de Octubre se observó tos o estornudo en 70 a 80% de la parvada y conjuntivitis, cabeza hinchada, estertor traqueal o una combinación de ellos en 20 a 30% de los pollos. No se observaron signos en ninguna de las otras especies presentes en la granja. Dos días después de la inoculación se sacrificaron dos embriones de pollo inoculados con líquido sobrenadante de una molienda de tráquea y pulmón. El líquido amnio-alantoideo de estos embriones aglutinó glóbulos rojos de gallina. Cuando la hemoaglutinación no fué inhibida con suero contra el virus de la enfermedad de Newcastle, el virus fué identificado tentativamente con influenza aviar y fue enviado para su identificación al NVSL. El 27 de Octubre, el personal de NVSL identificó al virus como influenza aviar H7N2. Ese día el Departamento de Agricultura y Mercados del Estado de Nueva York impuso una cuarentena a la granja infectada y a una granja en la que se sospechaba pudiera estar presente la enfermedad. Una vez que el dueño aceptó la compensación, el 7 de Noviembre el personal del Departamento de Agricultura de los Estados Unidos y del Departamento de Agricultura y Mercados del Estado de Nueva York sacrificó los animales y la granja fué limpiada y desinfectada. El Departamento de Agricultura y Mercados del Estado de Nueva York y la Universidad de Cornell mantuvieron una vigilancia estrecha sobre la granja sospechosa y otras granjas con relaciones comerciales o en proximidad geográfica con la granja afectada. Durante la semana que siguió al aislamiento e identificación del virus, el personal del Departamento de Agricultura y Mercados del Estado de Nueva York tomó muestras de sangre e hisopos traqueales. La Universidad de Cornell colocó aves sentinelas y realizó pruebas serológicas con el objeto de detectar la presencia de influenza aviar. Al finalizar el mes de Enero de 1996 no se ha encontrado evidencia de influenza aviar en el Estado de Nueva York. La excepción son los mercados de aves vivas del la Ciudad de Nueva York, en los que el Departamento de Agricultuta ha aislado H7N2. A estos mercados llegan aves de varios estados y de una multitud de pequeñas gramjas que crían pollo de engorda , otras aves de corral y aves de presa. Aunque no fue posible determinar el origen del virus de Swan Lake, las dos posibilidades mas fuertes son: que el virus se haya originado en los patos que se criaban en la misma granja y que tenían contacto con patos silvestres, o que el dueño de la granja lo haya introducido con su camión o jaulas usadas para el transporte de pollo vivo a la Ciudad de Nueva York.

SUMMARY

On Wednesday, October 25, 1995 we isolated in our laboratory at Cornell University an avian influenza virus H7N2. The virus was obtained from broiler chickens submitted on Monday, October 23. On Thursday, October 26, the State officials were notified of the possible presence of avian influenza in New York State. The infected farm and a suspect farm were quarantined that day. On Friday, October 27, the National Veterinary Services Laboratory (NVSL) identified the virus as avian influenza H7N2,. On November 7, 1995 the farm was depopulated by United States Department of Agriculture personnel, and a survey was started to determine the spread of the infection. Except for the New York City live-bird markett, avian influenza virus is not present in New York State. This case illustrates the importance of fast and decisive action in the control of avian influenza. Clinical history. The infected broilers were raised in the same building where a processing plant was operated. In the farm were raised also: "red" and "gray" broilers "silkies," quail and muscovy ducks for the live-bird market in New York City. The chickens had respiratory distress, swollen heads, and the mortality had doubled daily for the last four days. The day before submission, in a flock of 10,000 broilers, one hundred and thirty chickens died. Postmortem examination revealed edema of the facial tissues, perihepatitis, pericarditis, and inflammation of the air sacs. A farm visit on the following day, revealed that 70 to 80% of the flock was sneezing and coughing. Twenty to 30% of the chickens had conjunctivitis, swollen heads, and/or tracheal rales. Two days post-inoculation two chicken embryos, inoculated with supernatant liquid of homogenized trachea and lung were chilled. Hemagglutinating activity was found in the amnio-allantoic fluid. When anti-Newcastle disease virus did not inhibit the hemagglutination activity our laboratory tentatively identified the isolate as avian influenza virus (AIV). The National Veterinary Services Laboratory (NVSL) in Ames, Iowa identified the virus as avian influenza H7N2 on October 27. On that day the New York State Department of Agriculture and Markets (NYSDAM) imposed a quarantine on the infected farm, and on a suspect farm. After the owner of the infected flock accepted compensation, officers of the USDA and the NYSDAM depopulated the farm on November 7. The NYSDAM and Cornell University (CU) kept a close watch on the suspect farm, and farms with trade ties to the infected farm, and/or in geographical proximity. During the week following the isolation and identification of the virus officers from the NYSDAM took tracheal swabs, and blood samples from birds on these farms. CU placed sentinel birds, and obtained eggs for antibody determination. To the end of January, 1996 all samples have been found negative for avian influenza virus infection. At the moment, H7N2 avian influenza virus is present only in the live-bird markets in New York City, as shown by USDA surveys. These markets receive birds from many small farms where broilers, other poultry and game birds are raised. It was not possible to determine the origin of the virus causing the Swan Lake outbreak. Two strong possibilities exist: there were muscovy ducks raised at the same farm. These birds were likely to have contact with feral water fowl. The other possible source is the hauling truck, used to transport chickens to New York City.

EFECTO DE UN VIRUS DE I.A. DE BAJA PATOGENICIDAD (VIABP) SOBRE PARAMETROS PRODUCTIVOS DE AVES REPRODUCTORAS PESADAS.

THE EFFECTS OF A LOW PATHOGENICITY AVIAN INFLUENZA VIRUS ON PRODUCTIVE PARAMETERS IN BROILER BREEDERS

López, C. R.

Incubadora Jalisco S.A.de C.V. Tiziano 5552 Fccto. La Estancia Zapopán Jalisco

ABSTRACT

Low pathogenicity avian influenza virus-(LPAIV) had distinct effects on broiler breeder performance depending on age of exposure. In mature birds (47 and 60 weeks) the infection produced strong clinical manifestations, in addition to increased mortality, (1% increase per week over normal rates) up to 14% drop in egg production, up to 11% less hatchability during the worst stage, and a very

important increase in eggs inadequate for incubation (up to 5.2% during a one-month period after the outbreak).

In contrast, young 24-week-old birds affected by LPAIV showed no significant clinical manifestations or mortality due to AIV. Even more, egg production parameters were higher than the standards for the strain. Yet, impact was noticed in hatching egg production, since cull rate of porous/misshapen eggs was 3.09%. In addition a lower hatchability (up to 2% at laying cycle ends), was noticed, togehter with an increase in second class and culled chicks (>2.5%).

INTRODUCCION

A finales de 1993 se presentaron en el area de Guadalajara, una gran cantidad de problemas respiratorios atipicos en parvadas pollo de engorda, aves de postura comercial y reproductoras pesadas (2). Muchos de estos problemas guardaban cierta similitud con las patologias propias de cada granja, algunas veces, si en la granja habia habia E.R.C.C., o Coriza infecciosa o Laringotraqueitis estas ya no se presentaban en forma normal sino que se conjuntaban con un nuevo agente que hacia más graves los cuadros clínicos. Sin embargo, en todas las granjas era comun encontrar un problema respiratorio que siempre se acompañaba de un fuerte estertor traqueo-bronquial, pulmones hepatizados, traqueas sanguinolentas y una subita mortalidad.(1)

Fué a mediados de marzo de 1995 cuando en una nuestras granjas dc reproductoras pesadas de 60 semanas de edad, tuvimos una aguda mortalidad,acompañada de un cuadro depresivo-respiratorio en donde la señal más importante fué un retrazo en el consumo de alimento, el cual tardaron las aves en consumir más de 12 horas.

Afortunadamente para nosotros por esos dias el DINESA realizaba un muestreo serologico en la zona y se tuvo la suerte de haber enviado muestras de sangre 3 dias antes de la manifestación clínica en donde aparecierón 3 sueros positivos de 105 que se habian enviado. Dada la cercania entre nuestros nucleos de producción y la facil diseminación del virus la exposición de las aves de otros nucleos fué de tan solo 6 dias.

SIGNOS Y LESIONES

Los sintomas y lesiones variaron de acuerdo con la edad de las aves, siendo más severa su presentación en aves adultas y casi inaparente en aves jovenes.

Los signos más importantes que se observaron fueron;

*consumo tardio de alimento
*tristeza y abatimiento
*plumaje erizado
*mortalidad explosiva
*blefaro-conjuntivitis
*execiva cantidad de moco en boca
*fuerte estertor traqueo-bronquial
*cianosis de cresta y barbillas

Las lesiones más significativas en este caso fuerón;

*necrosis de cresta
*traqueitis y severa congestión mucosa en boca y vias respiratorias altas
*tapon traqueal y en algunas ocaciones pseudomembrana
*hemorragias petequiales en corazón y espacios intercostales
*hemorragias petequiales en grasa abdominal
*infiltración de exudado caseoso en pulmones
*pneumonia aguda
*prolapso

CURSO DE LA ENFERMEDAD

Despues del diagnostico, rapidamente fueron tratadas las aves con una enrofloxacina oral al 10%, proporcionando 10 mg./Kg. de peso vivo durante 5 dias y además, reforzando este tratamiento con expectorantes y multivitaminicos. El resultado fué sorprendentemente favorable, pues al no haber complicaciones las aves cursaron la enfermedad en solo una semana, y a partir de ahi iniciarón su recuperación. Insisto nuevamente que las respuestas a los tratamientos fué tambien mejor a medida que las aves fuerón más jovenes, pues incluso en la parvada de 24 semanas la enfermedad curso solo con un leve estornudo.

IMPACTO ECONOMICO-PRODUCTIVO

* AVES JOVENES

1.-No hubo manifestaciones clínicas importantes

2.-No se ve alterada en forma importante la mortalidad

3.-No existen problemas que causen baja en la producción de huevo

4.-Se altera gravemente la calidad del cascarón apareciendo una gran cantidad de huevos deformes, porosos y fragiles (>3.5%)

5.-Nacimientos bajos y pobre calidad de pollito con aparición de un alta cantidad de pollito de 2a.

AVES MADURAS (47 semanas)

1.- Estas aves soportarón más favorablemente la enfermedad y auque tuvierón bajas en producción, nacimientos y tambien aparecierón huevos deformes, la recuperación que mostraron fue tan rapida y exitosa que sus resultados finales fueron los de una parvada normal.

AVES ADULTAS (60 semanas)

1.-Manifestaron clínicamente la enfermedad en forma muy fuerte.

2.-Hubo un aumento significativo de la mortalidad durante 3 semanas

3.-Recuperación rapida de los parametros productivos.

CONCLUSIONES

1.- Es importante implementar al maximo todas las medidas posibles de bioseguridad en nuestras granjas que permitan la no introducción del virus de la Influenza Aviar, pues por más benigno que resulte un brote, las secuelas en producción son muy importantes economicamente.

2.-Implementar la vacunación con virus muerto a edad temprana (12 a 21 dias) y reforzarla antes de que las aves entren a producción para mantener lo más intacto posible el aparato reproductor de la gallina

3.-Usar aves centinelas que nos permitan reconocer la posible infección con virus de campo y reconocer a tiempo la presencia del viral para proteger aves no vacunadas aún.

4.-En definitiva, aves jovenes infectadas con el VIABP antes de entrar a su étapa productiva, veran alterados sus parámetros productivos de huevo incubable y pollito durante toda su vida productiva.

5.- Aunque en aves adultas es más impactante la manifestación clinica y se afectan algunos parámetros productivos en forma importante, su poder de recuperación es tal, que el impacto productivo en el resumen final de la parvada no es tan costoso.

BIBLIOGRAFIA

1. Borrego Elias J.L. Comunicación personal (1996)
2. Ortiz M. Ariel, Rodriguez S. Luis, García F. Alejandro and Aguirre F. Jaime: First outbreaks of avian influenza in México. Proceedings of the forty-fourth Western Poultry Disease Conference. (1995) Sacramento California U.S.A.
3. Shane S. Situación actual de la influenza aviar en el mundo. Memoria del septimo curso de actualización avi-mex. (1995) Cd. de México

EVALUACION DE LA VIRULENCIA DE UN VIRUS DE INFLUENZA AVIAR (H5N2) AISLADO DE CODORNICES (Coturnix coturnix japonica) CON SIGNOS NERVIOSOS Y ALTA MORTALIDAD.

EVALUATION OF THE VIRULENCE OF ONE AVIAN INFLUENZA VIRUS (H5N2) ISOLATED FROM QUAIL (*Coturnix coturnix japonica*) WITH NERVOUS SIGNS AND HIGH MORTALITY

Hernández-Magdaleno. A[1] ., Casaubon, H.T[2]., Aspargilla, S.M.[3], García, G.J.[1]

[1]Centro Nacional de Investigación en MIcrobiología Veterinaria, INIFAP-SAGAR
Km. 15.5 Carretera México-Toluca, Palo Alto, Cuajimalpa, 05110, D.F.

[2]Departamento de Producción Animal: Aves, FMVZ, UNAM

[3]Comisión México-Estados Unidos para la prevención de la Fiebre Aftosa y otras Enfermedades Exóticas de los animales

ABSTRACT

Studies were carried out to evaluate the virulence of the A/codorniz/Guanajuato/95-528/95 (H5N2) avian influenza virus (AIV) strain, that was isolated from a 5,000-quail farm. Respiratory and nervous problems had been previously reported in the flock. Mortality was 50%. Test results in chickens and quails determined that the strain was a low virulence one, since it caused no clinical signs or mortality. Antibodies against this particular virus have the ability to protect chickens against challenge with a highly pathogenic strain, which means that the virus still retains its antigenic characteristics. Further research will be needed to determine any other factors contributing to the presence of this condition, since the quail-isolated AIV strain causes no clinical signs or mortality.

INTRODUCCION

En el mes de septiembre de 1995 se remitieron al Departamento de Producción Animal: Aves (DPA: AVES) de la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia de la Universidad Nacional Autónoma de México, 5 codornices procedentes de una explotación dedicada a la producción de huevo. La granja ubicada en el poblado de Aguacaliente, Municipio de Acámbaro, Estado de Guanajuato contaba con 5,000 animales de diferentes edades. Los animales fueron enviados para realizar un diagnóstico integral del problema, ya que desde hacía un mes se empezaron a detectar problemas respiratorios y un aumento drástico de la mortalidad alcanzando un pico del 50% durante el mes de septiembre. La historia clínica que se tiene de la granja, es que en el mes de agosto, el propietario adquirió 100 animales machos en Tlaquepaque, Jalisco, los cuales fueron introducidos sin ningún control sanitario. Posteriormente en el área de postura la producción disminuyó practicamente a cero, se presentaron problemas respiratorios en un 80% de los animales, signología nerviosa y diarrea. Los resultados del diagnóstico realizadó en el DPA: Aves, fueron: a la necropsia no se encontraron cambios patológicos aparentes, en el estudio bacteriológico no se pudo aislar ningún patógeno, los resultados de las pruebas de ELISA para Reovirosis, Infección de la Bolsa de Fabricio y Bronquitis Infecciosa negativos, al aislamiento viral se determinó la presencia de un virus de Influenza Aviar (IA). La cepa aislada fue remitida al Laboratorio de la Comisión México- Estados Unidos para la prevención de la Fiebre Aftosa en donde se confirmó la presencia de un virus de Influenza Aviar H5N2. Parte de la cepa fue enviada al CENI-Microbiología para conducir las pruebas, en donde recibió un pase en embrión de pollo para su posterior utilización.

OBJETIVO

Evaluar la virulencia de la cepa A/Codorniz/Guanajuato/ 95-528/95 (H5N2) en pollos y codornices.

MATERIAL Y METODOS

El trabajo se realizó en las unidades de aislamiento de alta seguridad del CENI-Microbiología llevandose a cabo en cuatro fases:

MORTALIDAD PARA EL EMBRION DE POLLO: Se inocularon 30 embriones libres de patógenos específicos (LPE) con 0.1 ml de una dilución 1:10 de la cepa original vía cavidad alantoidea. Los embriones fueron incubados 72 hr bajo condiciones estándares y ovoscopiados diariamente. Posteriormente se procedió a cosechar el fluido alantoideo para su titulación y ocuparlo como fuente de virus para las otras pruebas.

PRUEBA DE PATOGENICIDAD EN POLLOS: 8 aves LPE de cuatro semanas de edad fueron inoculados con 0.2 ml por vía intravenosa de fluido alantoideo infectado con la cepa, se mantuvieron en observación durante 10 días y se tomaron muestras de sangre antes de la inoculación y al final de la prueba.

PRUEBA DE PATOGENICIDAD EN CODORNICES: 20 codornices de 4 semanas de edad libres de anticuerpos contra IA, se dividieron en dos grupos de 10 animales cada uno, el primer grupo se inoculó por vía intravenosa y el otro por vía intratraqueal, ambos con 0.2 ml de la cepa. Las aves se observaron por 14 días.

PRUEBA DE PROTECCION CONFERIDA ANTE UNA CEPA DE ALTA PATOGENICIDAD: 50 aves LPE de 14 días de edad se inocularón vía intratraqueal con 0.2 ml de fluido alantoideo con un título viral de 1,024 unidades hemoaglutinantes por cada 50 microlitros. 14 días post inoculación las aves fueron desafiadas con la cepa A/Ck/Querétaro/14588-19/95 (H5N2) altamente patógena. Las aves se desafiaron con 0.2 ml de la cepa con un título viral de $1x10^{6.6}$ DLP_{50}/ ml por vía intratraqueal. Se incluyeron 20 aves LPE libres de anticuerpos contra IA como testigos.

PRUEBAS SEROLOGICAS: Todas las aves utilizadas en las pruebas fueron sangradas antes y después de finalizar su observación para determinación de anticuerpos contra IA por medio de la prueba de Inhibición de la Hemoaglutinación.

RESULTADOS

La cepa estudiada no produjo la muerte de los embriones que fueron inoculados con ella después de 72 horas de incubación y el fluido alantoideo que se cosecho tuvo un título de 1,024 unidades hemoaglutinantes. En la prueba de patogenicidad en pollos, no produjo mortalidad ni signos clínicos.

En los dos grupos de codornices inoculadas no hubo manifestación de signos clínicos ni mortalidad. Los pollos que fueron expuestos inicialmente a la cepa aislada de codornices quedaron protegidas al desafío de una cepa de alta patogenicidad, la cual fue capaz de producir 100% de mortalidad en los animales testigos que no habían sido expuestos anteriormente. En todos los casos se pudieron detectar anticuerpos contra IA después de la exposición inicial a la cepa y no se observaron signos clínicos ni mortalidad.

DISCUSION

La capacidad de la cepa de crecer en el embrión de pollo sin provocar su muerte es indicativo de que sólo replica en las células de la membrana corioalantoidea y no en otras células del embrión. No se pudo reproducir la enfermedad en codornices que fueron inoculadas por vía intravenosa e intratraqueal, ni tampoco en los pollos inoculados por vía intravenosa, lo cual clasifica a la cepa como de baja patogenicidad. Los anticuerpos que se desarrollaron hacia el virus fueron capaces de prevenir la mortalidad en las aves que fueron desafiadas con la cepa de alta patogenicidad, la cual mató al 100% de los animales libres de anticuerpos, lo que determina que la cepa aislada de codornices conserva sus características antigénicas con la cepa de alta patogenicidad. En base a los resultados obtenidos, la cepa A/Codorniz/Guanajuato/95-528/95 (H5N2) es de baja patogenicidad tanto para las codornices como para los pollos, ya que no produjo morbilidad ni mortalidad, pero si una respuesta serológica hacía el virus y los anticuerpos producidos hacia él protegieron a los pollos ante el desafío de una cepa de alta patogenicidad. Hacen falta estudios más amplios para poder determinar con exactitud los factores que en asociación con el virus de IA causaron el cuadro nervioso y alta mortalidad en las codornices.

REFERENCIAS

1. Cerón, H.M. y col. Estudios básicos de las cepas de desafío de Influenza Aviar y evaluación de la prueba de patogenicidad. *Vet. Méx.*, 26:106 (1995)

ESTUDIO MORFOLÓGICO Y CONSIDERACIONES SOBRE LA EVOLUCIÓN DE LAS LESIONES CUTÁNEAS CAUSADAS POR 5 AISLAMIENTOS DE VIRUS DE INFLUENZA AVIAR(I. A.) EN MÉXICO.

MORPHOLOGICAL STUDY AND CONSIDERATIONS ON THE EVOLUTION OF SKIN LESIONS CAUSED BY 5 AVIAN INFLUENZA VIRUS ISOLATES IN MEXICO

M.T. Casaubon H.[1] , A. Hernández M.[2] , J. Gracía G.[2] , M.L. Rosales M[3] .

[1]Departamento producción animal :aves UNAM ; [2] Centro Nacional de Investigación en Microbiología (INIFAP-SAGAR) ; [3] Departamento de Patología (Microscopía Electrónica) UNAM.

ABSTRACT

Anatomopathological studies carried out at the Diagnosic Service Department, Veterinary Medicine and Animal Husbandry Faculty, National Autonomous University of Mexico, showed strong differences regarding both characteristics and severity of skin lesions in birds due to avian influenza virus (AIV) infection, depending on the pathogenicity of the strain involved. Two hypotheses were proposed regarding the possible pathogenesis of such lesions, and a preliminary morphological study was performed. In this report, microscopical and ultra-structural findings in the epithelium of the comb, wattles, sternal region, metatarsus, phalanx and foot pad of highly pathogenic AIV-infected Indian River and leghorn birds are described. Results are not totally conclusive, particularly those regarding skin lesions, which could have been the result of *in vivo* hemagglutination. But we were able to clearly demonstrate that highly pathogenic AIV replicates in a wide variety of cells, including endothelial cells, which could explain blood vessel damage, increased permeability and extravasation of a large amount of serohemorrhagic exudate with scarce leukocytes, poor tissue irrigation, and hence epidermal necrosis.

INTRODUCCIÓN

Con base en observaciones realizadas a lo largo del servicio de diagnóstico en el Depto. de Prod A.:Aves. UNAM , y en particular en el estudio anatomopatológico de 5 casos en los que se logró el aislamiento del virus de la Influenza Aviar (I.A.), se planteó la siguiente hipótesis: de que la patogenicidad de las diferentes cepas del virus de la I.A. inducen

diferente morbilidad , mortalidad así como variable severidad de lesiones principalmente a nivel cutáneo, dependiendo de la especie y línea de aves que es afectada . Siendo además que, en la literatura consultada son escasos los reportes en relación a la descripción de las lesiones y su patogenia en brotes de I.A., el objetivo del presente trabajo es señalar los resultados del estudio histológico y ultramicroscópico preliminar, de las lesiones observadas en cresta, barbillas, párpados , piel de la región pectoral , de metatarsos y de falanges, en pollos Indian River y Leghorn, inoculados, ambos grupos, con una cepa de alta patogenicidad llevado a cabo para determinar la localización del virus de I.A. y explicar el posible origen de la cianosis y áreas de necrosis apreciadas en epitelios de aves que sufren infección por una cepa de alta patogenicidad. (1,2,3,4).

MATERIAL Y MÉTODOS

En el laboratorio de Investigación en Influencia Aviar del Centro Nacional de Investigación en Microbiología, se inocularon 16 aves, 8 Indian River de 7 semanas de edad y 8 Leghorn de 4 semanas de edad, instilando 0.2ml de líquido alantoideo por vía intravenosa y 1ml traqueal , con virus de la cepa A/Ck / Querétaro / 14588-619 / 95 (H5 N2) Alta patogenicidad (10^6 DLP 50% 3 semanas / ml de líquido alantoideo) . La toma de muestras para histopatología y microscopía electrónica de llevaron a cabo a los 8 días postinoculación en los pollos de engorda y a los 5 días los Leghorn .

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Semiología : Se apreció depresión, somnolencia, sacudimiento de cabeza frecuente, polipnea, plumaje erizado y diarrea verde acuosa.

Morfopatología : Macroscópicamente, las aves de ambos grupos no presentaron en hígado, páncreas y riñón cambios significativos salvo hiperemia de leve a moderada y algunas hemorragias pequeñas dispersas; en órganos linfoides predominó hiperemia de leve a moderada, petequias en moderada cantidad, atrofia moderada de la bolsa de Fabricio y necrosis puntiforme en bazo; en corazón , dilatación leve del ventrículo derecho e hiperemia severa de vasos coronarios; en pulmón, hiperemia severa y edema moderado; en laringe, laringitis necrótica focal unilateral y en tráquea, traqueitis hemorrágica difusa severa .

La morfopatología macroscópica y microscópica de las lesiones cutáneas resultaron ser más severas en los pollos de engorda que en las aves Leghorn , encontrándose en los primeros: blefaritis serohemorrágica severa con focos de necrosis. El epitelio de las barbillas, cresta, región esternal, metatarsos, dedos y cojinete plantar se encontró muy tumefacto debido a acúmulo de abundante exudado serohemorrágico en tejido subcutáneo , cianótico y con varias áreas de necrosis de la epidermis que sufría descamación mientras que, en las aves Leghorn no se apreciaron áreas de necrosis en epidermis y la tumefacción fue moderada. En el estudio microscópico de los cortes de epitelio fue sorprendente la gran cantidad de pigmento de origen hemático disperso en todo el corte y la hiperemia severa en los numerosos capilares subepidérmicos asociados especialmente a áreas de necrosis de la epidermis, que se encontraban ocluidos por glóbulos rojos lisados (núcleos desnudos) a pesar de que el resto de la muestra estaba bien preservada. El tejido conjuntivo de la dermis se apreció severamente infiltrado por exudado serohemorrágico pero con moderada cantidad de heterófilos y leucocitos mononucleares. Aunque la hiperemia en dermis era igualmente severa a la descrita en la región subepidérmica, en dermis no se observaron vasos ocluidos por glóbulos rojos lisados. Dichas observaciones sugirieron que probablemente el virus se había replicado en las células endoteliales y consecuentemente se incrementó la permeabilidad, se generó abundante exudado serohemorrágico que se infiltró en el tejido conjuntivo laxo de dermis , hubo hemoconcentración local y se desarrolló estasis sanguínea por lo que los glóbulos rojos se lisaron y la epidermis sufrió necrosis por falta de irrigación. Otra hipótesis es que el virus provoque hemoaglutinación in vivo y por ende los capilares se obstruyan y así se desarrolle el exudado serohemorrágico y la necrosis de la epidermis adyacente.

En el estudio ultraestructural se observaron grandes acúmulos de virus en el interior de extensas cisternas localizadas en el citoplasma de heterófilos , leucocitos mononucleares, células endoteliales y fibroblastos o en pequeños grupos en el núcleo y membrana celular. Las células infectadas se apreciaron muy tumefactas y con todos los organelos desordenados, cisternas del retículo endoplásmico y crestas de las mitocondrias dilatas, y los núcleos con grumos de heterocromatina. Numerosos glóbulos rojos extravasados así como los que se encontraban en la luz vascular presentaban alteraciones del citoplasma y del núcleo que denotan destrucción y gran cantidad de material amorfo que pudiera corresponder a depositos de metales, adosado a toda la membrana. Dada la severa hemólisis observada en la microscopía, estas partículas metálicas pudieran corresponder a hierro procedente de la desnaturalización de la hemoglobina. Para lograr distinguir la presencia de formas virales que pudieran estar mezcladas con este posible material metálico se requeriría llevar a cabo estudios de microscopía inmunoelectrónica.

CONCLUSIONES

Los resultados del presente estudio preliminar no son concluyentes en cuanto a si el virus induce a hemoaglutinación en vivo. Sin embargo, sí se puede afirmar que el virus se replica en gran variedad de células incluyendo células endoteliales lo cual pudiera explicar la generación de abundante exudado serohemorrágico pobre en leucocitos y la estasis sanguínea responsables de irrigación deficiente y por lo tanto de la necrosis de la epidermis.

LITERATURA CONSULTADA

1.- Compans R.W. and Choppin P.W. Orthomyxovirus and Paramyxoviruses. In: Ultrastructure of animal virus and bacteriphages. Vol. 5 of Ultrastructure in biological systems. (Dalton A.J. and Françoise Haguenau, eds.)pp. 213-237. Academic Press, Inc. New York and London 1973.

2.- Easterday B.C. and Hinshaw V.S. Influenza. In: Diseases of poultry. 9nd ed., (Calnek B:W:, John Barnes H., Beard C.W., Reid W.M., Yoder H.W. Jr., eds.) pp. 532-551. Iowa State University Press, Ames, Iowa 1991.

3.- Meulemans, G. Infections a Orthomyxovirus. In: Manuel de Pathologie Aviaire. (Brugere-Picoux, J. et Silim, A., eds.) p.107-111. Imprimerie du Cercle des Elèves de l'Ecole Nationale Vétérinaire d'Alfort, Maissons-Alfort, France, 1992.

4.- Ridell, C.: Avian Histopatology. American Association of Avian Pathologists, Saskatchewan, 1987.

ESTUDIOS BASICOS DE LAS CEPAS DE DESAFIO DE INFLUENZA AVIAR Y EVALUACION DE LA PRUEBA DE PATOGENICIDAD

BASIC STUDIES WITH AVIAN INFLUENZA CHALLENGE VIRUSES, AND EVALUATION OF THE PATHOGENICITY TEST

[1]Cerón, H. M., [1]Rodríguez, V. H., [1]Hernández, M. A.,[1]Blasco, R. K., [1]García-García, J., [2]Webster, R. G.

[1]CENI-Microbiología, INIFAP, SAGAR. Km. 15.5 Carr. México-Toluca, Palo Alto, Cuajimalpa, D.F. C.P. 05110
[2]Hospital de St. Jude Memphis Tennessee

ABSTRACT

High pathogenicity avian influenza viruses (AIV) cause death of susceptible chickens when administered intravenously (IV). These viruses have basic amino acid-rich sequences in the HA1-HA2 binding peptide. The purpose of this research was to characterize two AIV challenge strains used in potency tests, vaccine manufacturing, and to standardize the pathogenicity test in chickens using different routes and different amounts of hemagglutinating units (HAU's), as well as to estimate chicken embryo lethal dose (CELD). One hundred percent mortality was observed with challenge viruses at 8 days. Nevertheless, average killing time varied with the strain, administration route and dose rate. Intramuscularly (IM) injected, Querétaro strain caused death faster than Puebla strain. When both strains were administered IV killing time varied in direct proportion with virus concentration. Chicken embryo titter was $10^{-11.2}$ CELD50 for the Puebla strain, and $10^{-6.6}$ CELD50 for the Querétaro strain. Both strains presented homology in amino acid sequence in the HA1-HA2 binding peptide. These results indicate that 2 high pathogenicity AIV's that retain similar structures in their hemagglutinin were isolated in two different locations. These viruses showed biological variations.

INTRODUCCION

En diciembre de 1994 y en enero de 1995 fueron detectados dos brotes de IA de alta patogenicidad (IAAP) en dos Estados de la república, Puebla y Querétaro. El primero en gallinas de postura y el segundo en reproductoras pesadas. Se realizó un aislamiento viral en ambos brotes. Los aislamientos fueron identificados como A/Ck/Puebla/14585-622/94 (H5N2) y A/Ck/Querétaro/14588-19/95 (H5N2). Debido a las lesiones observadas en cada brote se decidió hacer un estudio comparativo de las dos cepas, para su posible utilización como cepas de referencia en el desafío de aves vacunadas.

MATERIAL Y METODOS

Prueba de patogenicidad:

Se utilizaron aves SPF, de cuatro semanas de edad, para formar tres grupos de 8 aves cada uno; las cuales fueron desafiadas con fluido alantoideo obtenido a partir de embriones SPF de 12 días de edad, el fluido se ajustó a 32UHA, 16UHA y 8UHA para ser inoculadas por vía intramuscular(IM) y endovenosa(IV) con 0.2ml/ave tanto para la cepa Querétaro como Puebla. Las aves fueron desafiadas en las unidades de aislamiento de alta seguridad del Centro Nacional de Investigaciones en Microbiología (CENI-Microbiológia), INIFAP, a todos los animales se les proporcionó alimento comercial y agua ad libitum.

Dosis letal embrión de pollo 50%(DLEP 50%):

Se utilizaron 5 embriones SPF de 9 días de edad por dilución, los cuales fueron inoculados por vía alantoidea con 0.2 ml. Las diluciones del virus fueron de 10^{-1} hasta 10^{-12}.

Estudios moleculares:

Los estudios moleculares fueron realizados en el Hospital de St. Jude Memphis Tennessee en colaboración con el Dr. Webster para determinar la secuencia de amino ácidos del péptido de conexión HA1-HA-2.

RESULTADOS

1) Prueba de patogenicidad.- La mortalidad observada en todos los casos fue del 100% en 8 días (gráfica 1). Sin embargo, el tiempo promedio de muerte varió dependiendo de la cepa, la ruta de administración IM o IV y la concentración en UHA, 32UHA, 16UHA y 8UHA. Cuando ambas cepas se administraron por vía endovenosa el tiempo de muerte varió en relación directa a la concentración utilizada.
2) DLEP 50%.- Al realizar la titulación en embrión de pollo con la cepa Puebla se obtuvo un título de $10^{-11.2}$ DLEP 50% y con la cepa Querétaro un título de $10^{-6.6}$ DLEP 50%.
3) Dosis letal en pollo 50%(DLP 50%).-El título obtenido en pollos fue de $10^{-5.3}$ DLP 50% con la cepa Puebla.
4) Estudio molecular.- La secuencia de amino ácidos en el sitio de rompimiento de la hemoaglutinina, en ambas cepas demostró el motivo R-K-R-K-T-R, compatible con virus de alta patogenicidad, a partir del producto generado por PCR.

CONCLUSIONES

Las dos cepas aisladas (Puebla y Querétaro) mostraron ser compatibles con virus de alta patogenicidad, a partir del producto generado por PCR. Al compararse con otras cepas internacionales los virus mostraron la misma secuencia que la cepa A/Ty/England/92-60/91 (H5N2).

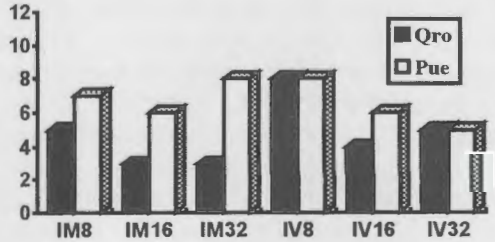
Mediante la prueba de patogenicidad se comprobó que ambas cepas causaron la muerte del 100% de las aves en 8 días. Independientemente de la vía de administración y la cantidad.

Sin embargo, el tiempo promedio de muerte varió en relación a la concentración utilizada, por lo que para comparar cepas de IAAP mediante la prueba de patogenicidad en pollos es recomendable administrar la misma concentración basada en el título de hemoaglutinina.

REFERENCIAS

1. Horimoto, T., Rivera, E., Person, J., Krauss, S., Kawaoka, Y., Webster, R.G. (1995) Origin and Molecular Changes Associated with Emergence of a Highly Pathogenic H5N2 Influenza Virus in México. *Virology*. 223-230
2. Saito, T., Horimoto, T., Kawaoka, Y., Senne, D.A., Webster, R.G. (1994) Emergence of Potentially Pathogenic H5N2 Influenza Virus in Chickens. *Virology*. 201: 277-284
3. Webster, R.G., Bean, W.J., Gorman, O.T., Chambers, T.M., Kawaoka, Y. (1992) Evolution and Ecology of Influenza A Viruses. *Microbilogical Rev*. 152-179

GRAFICA 1
Evaluación de la prueba de patogenicidad



UHA

AVIAN INFLUENZA VIRUS ANTIBODY DETECTION BY COMPETITIVE ELISA

DETECCION DE ANTICUERPOS CONTRA EL VIRUS DE LA INFLUENZA AVIAR MEDIANTE ELISA COMPETITIVA

V. Sivanandan, C. K. Perera, K. V. Nagaraja, and D. A. Halvorson

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

RESUMEN

El diagnóstico rutinario de la influenza aviar se realiza utilizando la prueba de precipitación en gel de agar (AGP, por sus siglas en inglés). Sin embargo, han existido instancias de falla en la detección de anticuerpos contra el virus de la influenza aviar en parvadas de pavos infectados. Es por este motivo que se desarrolló una prueba de ELISA en la que se utiliza la nucleoproteína del virus de la influenza aviar específica de tipo. Se utilizaron placas de Immulón 1, que fueron recubiertas con 100 Il de nucleoproteína del subtipo H9N2 del virus de la influenza aviar diluida en forma óptima. Las placas se lavaron 3 veces con una solución que contenía solución salina fosfatada amortiguada y Tween 20 (PBST, por sus siglas en inglés) y los sitios inespecíficos se bloquearon con 100 Il de leche descremada en polvo al 5% en solución salina fosfatada amortiguada (PBS). Las placas se lavaron 3 veces y se agregaron 50 Il del suero problema a cada pozo. Inmediatamente después se añadieron 50 Il de anticuerpos monoclónicos contra la nucleoproteína. Las placas se incubaron 1 hora a 370C y se agregaron 100 Il de IgG de conejo antirratón marcada con fosfatasa. Después de un período de 1 hora de incubación a 370C, se agregaron 100 Il del substrato pNPP a cada pozo. Se leyeron los valores de densidad óptica a 405 nm, que fueron convertidos a valores de porcentaje de inhibición utilizando una fórmula especial. Veintitrés muestras negativas a la prueba de precipitación en gel de agar resultaron positivas mediante la prueba de ELISA competitiva en los pavos infectados experimentalmente, mientras que 58 muestras negativas a la prueba de precipitación en gel de agar procedentes de parvadas comerciales de pavos resultaron ser positivas ante la prueba de ELISA competitiva. Los resultados de este estudio indican que la prueba de ELISA competitiva (C-ELISA, por sus siglas en inglés) es una prueba rápida y sensible para la detección de anticuerpos contra el virus de la influenza aviar.

Routine serological diagnosis of avian influenza is done using agar gel precipitation (AGP) test. However, there have been instances of failure to detect antibodies from avian influenza virus (AIV) infected turkey flocks. Hence a competitive ELISA was developed using type specific nucleoprotein of AIV. Immulon 1 plates were coated with 100 Tl optimally diluted nucleoprotein of H9N2 subtype of AIV. The plates were washed 3 times with phosphate buffered saline-Tween 20 (PBST) and the nonspecific sites were blocked with 100 Tl of 5% dry skimmed milk in PBS. The plates were washed 3 times and 50 Tl of test serum was added to each well. This was immediately followed by the addition of 50 Tl of monoclonal antibody to nucleoprotein. The plates were incubated for 1 hour at 370C and 100 Tl of phosphatase labelled rabbit antimouse IgG was added to each well. After an incubation period of 1 hour at 370C, 100 Tl of substrate pNPP was added to each well. OD values read at 405 nm were converted to percentage inhibition values using a formula. Twenty three AGP negative samples were positive by C-ELISA in experimentally infected turkeys while 58 AGP negative samples from commercial turkey flocks were found to be positive by C-ELISA. The results from this study indicates that C-ELISA is a rapid and sensitive test to detect antibodies against AIV infection.

VALORACIÓN DE LA PRUEBA DE HI UTILIZADA EN EL MONITOREO SEROLOGICO DE LA INFLUENZA AVIAR

EVALUATION OF THE HEMAGGLUTINATION INHIBITION TEST FOR SEROLOGICALLY MONITORING OF AVIAN INFLUENZA

Soto, P.E.[1], Heneidi, Z.A.[2], Vazquez, A.D.[3], Aranda, M. ME[3],
Gonzalez, J.[1], Reyes, P.[4], Gay, G.M.[3] y J. G. García[5]

1) LABORATORIO AVI-MEX, S.A. DE C.V., México
2) DIRECCION GENERAL DE SALUD ANIMAL, SAGAR, México
3) DIAGNOSTICOS CLINICOS VETERINARIOS, S.A. DE C.V., México
4) ARMOUR HATCHERIES DE MEXICO, S.A. DE C.V., México
5) INIFAP - SAGAR, México

ABSTRACT

An evaluation of the hemagglutination inhibition (HI) test used for the detection of avian influenza (AI) antibodies was carried out. The same number-coded serum samples were submitted to several laboratories. Great variations were detected among results (low homogeneity). When one serum sample was divided and sent to one same laboratory, low repeatability of results was also observed, in all laboratories. Given these results, it is suggested that in the face of the detection of >1:40 circulating antibody levels in non- vaccinated birds, or in sentinel birds, a new monitoring be performed 15-21 days later, in order to detect increased antibody levels, and increased % of positive serological results, which obviously occurs after the infection of a flock with an active AI virus.

INTRODUCCION

A partir del primer reporte oficial de la presencia de un virus de influenza aviar (VIA) en México y debido a que únicamente se tiene evidencia de la presencia del serotipo H5N2, se determinó la utilización de la prueba de inhibición de la hemoaglutinación (HI) con fines de monitoreo y vigilancia sobre la presencia de este serotipo en particular, aunque también deberá utilizarse la precipitación en gel de agar para la detección de cualquier otro serotipo presente (6,7,8,11,13).

La prueba de HI deberá interpretarse como positiva ante la detección de reacciones en diluciones $\geq$ 1:10 (6,7,8). Sin embargo, a nivel de campo, existen numerosos comentarios sobre una gran variabilidad de resultados de las pruebas de HI tanto para aves no vacunadas, como para aves con una o dos vacunas. Estas variaciones normalmente se refieren por un lado, a que 2 laboratorios podrían reportar resultados muy diferentes de un mismo grupo de sueros, mientras que por otro lado se ha reportado que una parvada no vacunada puede arrojar resultados serológicos positivos y negativos a la prueba de HI aún de los mismas aves (anilladas y numeradas), bajo el esquema de monitoreo serológico semanal, con serología que varía de $\geq$ 1:10 hasta $\leq$ 1:40 (12,18).

El nivel de seropositividad en HI determinado por las autorideades mexicanas debe ser reevaluado, ya que reportes internacionales de la serología detectada con VIA muestra una elevación substancial de los anticuerpos, los cuales llegan hasta niveles de 512 ó 1024 apenas 10 días postinfección, pudiendo alcanzar niveles de hasta 32,768 a los 39 días postinfección, y manteniendose en un 30% superiores a 512 hasta 80 dias postinfección (14).

Así mismo tampoco existe un reporte que indique para cada enfermedad en particular, hasta que nivel puede considerarse como falso positivo ó sospechoso, y a partir de que nivel puede ya considerarse como francamente positivo un resultado de HI. Sin embargo, los niveles francamente positivos para enfermedades virales como Newcastle y bronquitis infecciosa se consideran arriba de 1,500, mientras que para el sindrome de la baja de postura es suficiente con 1:128 (1, 12, 19).

Sin embargo, existen una serie de variables comunes en el laboratorio que pueden influenciar los resultados de las pruebas de HI, entre las que se encuentran:

- La temperatura ambiente elevada (37°C ó más), aumenta la degradación del antigeno, "lo cual incrementa falsamente los titulos de HI, (3)".
- Falla en la verificación de la concentración de eritrocitos a 0.5% por espectrofotometria o por medio de tubos de Fish Hopkins (1,3): "Una mayor concentración (0.75%) aumenta los falsos positivos y una menor concentración (0.25%) aumenta los falsos negativos".
- Tiempos entre la mezcla suero+antígeno, con la adición de eritrocitos (3).
- Criterio usado para la lectura de la prueba ($\pm$ 1 log 2), (1).
- Un mal lavado de las placas, cuando estas se reutilizan. "Una placa mal lavada puede disminuir la

actividad de HA, por lo cual el título de anticuerpos de cualquier suero puede verse incrementado y un suero negativo puede dar un resultado falso positivo". (Gay, G. M. comunicación personal).

Dados estos antecedentes, existe la probabilidad de obtener resulados diferentes de mismas muestras en diferentes laboratorios.

OBJETIVO

De este trabajo fué el de valorar la homogenicidad en los resultados de esta prueba de HI para IA entre algunos laboratorios de diagnóstico, así como el de valorar la repetibilidad de resultados que obtiene un laboratorio al trabajar 1 solo suero dividido en 10 muestras.

MATERIAL Y METODO

Sueros: Se tomaron sueros procedentes de aves SPF de 4 semanas de edad; sueros de pollos de engorda comerciales de 56 días de edad, vacunados con vacuna emulsionada contra la IA a los 8 días de edad, con centinelas negativos; aves reproductoras pesadas de 50 semanas de edad, no vacunadas contra la IA supuestamente no infectadas con este virus; y aves reproductoras ligeras de 80 semanas de edad, con centinelas negativos, y que fueron vacunadas a las 30 y 35 semanas de edad (2 veces) con vacuna emulsionada contra la IA. Todos los sueros fueron tomados el mismo día y enviados a los diversos laboratorios en un plazo máximo de 48 horas en popotes de plástico estériles refrigerados.

Prueba Serológica: Inhibición de la hemoaglutina ción (HI) cuya técnica se obtuvo de CPA, SAGAR el día 8 de marzo de 1995, bajo el nombre de Diagnóstico Serológico de Influenza Aviar (9) . Esta prueba debe realizarse con 4 UHA y eritrocitos de pollo al 0.5%. La seropositividad debe darse con resultados $\geq$ 1:10, y siguiendo hasta 1:80; en caso de duda, se recomienda monitorear nuevamente 14 a 21 días después del primer muestreo (6,7 y 8).

Diseño Experimental: La prueba fué dividida en 2 fases.

Fase 1.- Valoración de la homogenicidad de resultados de mismos sueros en 7 diferentes laboratorios.

Fase 2.- Valoración de la repetibilidad de resultados de un laboratorio con mismos sueros (7 laboratorios).

La fase 1 se realizó con 3 grupos de 10 sueros cada 1. El primer grupo correspondió a sueros provenientes de aves reproductoras pesadas de 50 semanas no vacunadas y supuestamente no infectadas con un VIA. (Cuadro No. 1).

CUADRO No. 1

Valoración de resultados obtenidos en la prueba de HI para Influenza Aviar, en 7 laboratorios diferentes, trabajando los mismos 10 sueros numerados provenientes de aves reproductoras de 50 semanas de edad, no vacunadas contra Influenza Aviar y supuestamente no infectadas.
(Homogenicidad de resultados en diferentes laboratorios)

Laboratorio	Suero Numero: 1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
A	0	10	0	10	0	10	20	10	10	40
B	*	20	< 10	20	20	10	40	10	40	80
C	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/
D	0	0	0	0	0	10	10	0	0	20
E	0	0	*	20	10	0	80	0	10	0
F	0	0	0	40	0	40	80	0	20	80
G	0	20	0	0	10	0	10	0	0	10

* Suero insuficiente / No hay resultado

El segundo grupo correspondio a sueros provenientes de pollos de engorda comerciales de 56 días de edad, con aves centinelas negativos y que fueron vacunados con vacuna emulsionada a los 8 días de edad. (Cuadro No. 2).

CUADRO No. 2

Valoración de resultados obtenidos en la prueba de HI para Influenza Aviar, en7 laboratorios diferentes trabajando los mismos 10 sueros numerados provenientes de aves de 56 días de edad con la aplicación de una vacuna emulsionada contra la IA a los 8 días de edad.
(Homogenicidad de resultados en diferentes laboratorios)

Laboratorio	Suero Numero: 1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
A	0	0	10	*	0	*	0	10	40	0
B	< 10	40	40	80	320	40	< 10	80	160	< 10
C	< 5	< 5	< 5	< 5	< 5	< 5	< 5	10	20	< 5
D	20	10	10	40	20	20	20	20	40	0
E	0	40	640	320	160	20	0	40	80	0
F	0	10	320	320	160	40	0	80	40	0
G	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/

* Suero insuficiente / No hay resultado

El tercer grupo corresponde a sueros provenientes de aves reproductoras ligeras de 80 semanas de edad, con centinelas negativos, y que fueron vacunadas a las 30 y 35 semanas de edad (2 veces), con vacuna emulsionada contra la IA. (Cuadro No. 3).

CUADRO No. 3

Valoración de resultados obtenidos en la prueba de HI para Influenza Aviar, en 7 laboratorios diferentes, trabajando los mismos 10 sueros numerados provenientes de reproductoras de 80 semanas de edad con vacuna emulsionada contra la IA a las 30 y 35 semanas de edad.
(Homogenicidad de resultados en diferentes laboratorios)

Laboratorio	Suero Numero: 1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
A	*	160	640	160	160	160	*	320	20	80
B	160	160	80	80	*	20	640	160	640	160
C	*	20	*	*	20	20	10	80	40	40
D	80	40	80	80	10	10	80	80	80	80
E	320	80	320	*	80	40	*	640	*	80
F	640	*	320	160	80	80	2560	2560	160	160
G	640	320	40	40	40	640	160	20	160	20

* Suero insuficiente

La fase 2 se realizaó con 2 grupos de 10 gallinas cada 1. El cuarto grupo correspondió a gallinas provenientes de aves SPF de 4 semanas de edad (Cuadro No. 4).

CUADRO No. 4

Valoración de resultados obtenidos en la prueba de HI para Influenza Aviar, trabajando cada laboratorio un mismo suero repartido en 10 muestras. Análisis de 7 laboratorios sueros provenientes de aves SPF de 4 semanas de edad.
(Repetibilidad de resultados de un mismo laboratorio)

Laboratorio	Suero Numero: 1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
A	80	0	0	0	0	0	0	0	0	0
B	< 10	< 10	< 10	< 10	< 10	< 10	< 10	< 10	< 10	< 10
C	< 5	< 5	< 5	< 5	< 5	< 5	< 5	< 5	< 5	< 5
D	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
E	0	0	*	0	*	0	0	0	0	0
F	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
G	0	0	0	0	0	20	0	0	0	0

* Suero insuficiente

El quinto grupo correspondió a gallinas reproductoras ligeras de 80 semanas de edad, con centinelas negativos y que fueron vacunadas en 2 ocaciones (30 y 35 sem. de edad) con vacuna emulsionada.

CUADRO No. 5

Valoración de resultados obtenidos en la prueba de HI para Influenza Aviar, trabajando cada laboratorio un mismo suero repartido en 10 muestras. Análisis de 7 laboratorios. Sueros provenientes de aves reproductoras. Sueros provenientes de aves reproductoras de 80 semanas de edad vacunadas 2 veces, con vacuna emulsionada contra la IA a las 30 y 35 semanas de edad.
(Repetibilidad de resultados en un mismo laboratorio)

Laboratorio	Suero Numero: 1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
A	*	320	80	160	*	*	320	*	320	*
B	*	320	320	*	640	80	640	640	640	640
C	160	80	10	80	*	*	160	20	40	*
D	> 80	20	> 80	> 80	20	> 80	> 80	> 80	> 80	> 80
E	80	640	*	*	*	*	*	*	*	*
F	80							320	1280	1280
G	80	40	40	20	20	20	20	160	40	40

* Suero insuficiente

Análisis de Resultados: Cada cuadro se analizó en forma independiente. Luego se realizaron los comentarios de los 3 primeros cuadros por un lado y de los 2 ultimos por otro lado. Finalmente se realizó una conclusión de todos los cuadros y se virtieron sugerencias.

RESULTADOS

De la primera fase, en el primer grupo se observa una muy baja homogenicidad en los resultados de los diferentes laboratorios ante los mismos sueros de aves no vacunadas y supuestamente no infectadas, detectándose un 93% de sueros $\leq$ 1:40 y únicamente 7% de sueros en niveles de 1:80, sin que exista una correlación clara entre los 7 laboratorios.

Del segundo grupo también se detecta muy baja homogenicidad en los resultados de los 7 diferentes laboratorios. Se observa una enorme diferencia en todos los resultados donde existe un suero No. 3, por ejemplo, que en 3 laboratorios dá resultados $\leq$ 1:10 y en otros 2 laboratorios resultados $\geq$ 1:320.

Del tercer grupo se observan variaciones aún mayores que en el grupo 2, observándose que mientras el laboratorio C arroja resultados de 1:10 y 1:80 en los sueros 7 y 8, el laboratorio F detecta niveles de 2,560 en ambos sueros.

De la Segunda Fase, en el cuarto grupo se observa una buena repetibilidad de resultados con sueros de aves SPF en 5 de 7 laboratorios. 2 laboratorios (A y G) obtienen resultados de 1:80 y 1:20 respectivamente en 1 de 10 ocaciones con el mismo suero.

En quinto grupo se observa que ningún laboratorio fué capaz de mantener una buena repetibilidad de los resultados de 1 mismo suero en 10 ocaciones, con grandes variaciones en algunos laboratorios, como los C, E y F.

DISCUSION

Los resultados obtenidos por los 7 laboratorios diferentes en la fase 1 de este estudio, nos indican que existen grandes diferencias entre los resultados de los diferentes laboratorios con respecto a un mismo suero, lo cual va más allá de $\pm$ 1 log 2, considerado como normal por efecto del criterio para la lectura de la prueba. Así mimo nos permite observar que una parvada no vacunada y posiblemente no infectada, puede tener falsos positivos o bién, puede estar iniciando un brote, por lo cual es recomendable volver a realizar esta prueba 15 a 21 días después, para poder ver el incremento en el % de sueros positivos y en los niveles de los mismos. De lo contrario, posiblemente se trate de reacciones falsas propias de la prueba.

También nos permite observar que los resultados de aves vacunadas van a tener muy grandes variaciones entre todos los laboratorios, teniendose laboratorios que siempre arrojan resultados muy bajos (Lab. C) o por el contrario resultados muy altos (Lab. F) .

En cuanto a los resultados de la Fase 2, se observa buena repetitividad de resultados en un mismo laboratorio con aves no vacunadas y no infectadas, mientras que con aves con muchos anticuerpos se observó mucha variabilidad en todos los laboratorios, teniendo variaciones mayores a 1 log 2 en por lo menos 1/10 sueros idénticos.

SUGERENCIAS

Dados los resultados obtenidos en este estudio, se sugiere analizar a profundidad la sensibilidad y especificidad de la prueba de HI para IA serotipo H5N2, y por lo pronto, tener cuidado con la interpretación que se obtiene de los resultados de las pruebas de HI con fines de monitoreo y vigilancia.

BIBLIOGRAFIA

1. A Laboratory Manual for the Isolation and Identification of Avian Pathogens, 3rd Ed. AAAP. USA, 1989.
2. Borrego, E.J.L. y E. Soto: Presentación clínica de Influenza Aviar en gallinas de Postura en México. 6° Curso Avimex, México, pp 89-92, 1994.
3. Brugh, M., Beard, C.W. and W. J. Wilkes. The Influence of Test Conditions on Newcastle Disease Hemagglutination - Inhibition Titers. Av. Diseases. Vol. 22, No. 2 pp 320-328, USA, 1978.

4. Brugh, M. and C.W. Beard.: Collection and Processing of Blood Samples dried on Paper for Microassay of Newcastle disease and Avian Influenza virus antibodies. Am. J. Vet Res. 41: 1495-1498. 1980.
5. Camacho, F.E., Gonzalez, J. y E. Soto: Presentación clínica de Influenza Aviar en pollo de Engorda en México 6° Curso Avimex, México pp 85-88, 1994.
6. Diario Oficial de la Federación: 3 de Agosto de 1994.
7. Diario Oficial de la Federación: 30 de Enero de 1995.
8. Diario Oficial de la Federación: 3 de Enero de 1996.
9. Diagnóstico serológico de Influenza Aviar, CPA, SAGAR México. Marzo 08, 1995.
10 Easterday, B.C. and V. S. Hinshaw: Influenza. In Diseases of Poultry 9th Ed. B.W. Calnek. Iowa State University Press. USA. 1991.
11. Gay, G.M., Soto, P. E. y J. Merino: Aislamiento e Identificación del virus de la Influenza Aviar en México. 6° Curso Avimex, México, pp 77-84, 1994.
12. Gay, G.M., Aranda, M, M.E. y D. Vazquez: Estudio comparativo de las pruebas de inhibición de la hemoaglutinación y precipitación en agar para la detección de anticuerpos contra el virus de influenza Aviar. XX Conv. Aneca, México, 1995.
13. Mateos, P.A.: Presencia de virus de Influenza Aviar en México. Curso de Actualización sobre Influenza Aviar. Aneca, México, pp 17-21, 1994.
14. Menlemans, G., Carlier, M.C., Gonza, M. y P. Petit: Comparison of Hemagglutination-Inhibition, Agar Gel Precipitin, and Enzyme-Linked Immunosorbent Assay for Measuring Antibodies against Infuenza virus in chicken. Av. Diseases 31: 560-563, 1987.
15. Pearson, J.E.: Criterio para la caracterización del virus de Influenza Aviar para tomar acciones reguladoras y la Influenza Aviar en Estados Unidos de 1986-1994. Curso de Actualización sobre Influenza Aviar, Aneca, México pp 23-34, 1994.
16. Rivera, C.E.: Medidas Oficiales de Control de la Influenza Aviar en México. Curso de Actualización sobre Influenza Aviar, Aneca, México, pp 35-37, 1994.
17. Soto, P. E. Influenza Aviar. 6° Curso Avimex, México, pp 69-75, 1994.
18. Soto, P. E. y Col: Comportamiento de Aves Vacunadas contra el VIAAP en México. 7° Curso Avimex, México, pp 82-97, 1995.
19. Villegas, P.: Interpretación de Resultados Serológicos en Avicultura. Univ. de Georgia. Depto de Medicina Aviar. VII Curso Progenitoras Arbor Acress S.A. de C.V. México, pp 105-112, 1993.

ELISA FOR THE DETECTION OF ANTIBODY TO AVIAN INFLUENZA TYPE A VIRUS IN CHICKEN AND TURKEY SERUM

PRUEBA DE ELISA PARA LA DETECCION DE ANTICUERPOS CONTRA EL VIRUS DE LA INFLUENZA AVIAR TIPO A EN EL SUERO DE POLLOS Y PAVOS

C. M. Lamichhane[A], D. E. Swayne[B], M. Blankfard[A], B. Erickson[A], and J. Beck[B]

[A]Kirkegaard & Perry Laboratories, Inc.
2 Cessna Court, Gaithersburg, MD 20879
[B]U.S. Department of Agriculture, Agricultural Research Service
Southeast Poultry Research Laboratory, 934 College Station Road, Athens, GA 30605

RESUMEN

La influenza aviar ha surgido como una enfermedad con potencial significativo de afectar gravemente a la producción avícola comercial, generando grandes pérdidas. Esta enfermedad es producida por ortomixovirus del tipo A que están ampliamente distribuidos entre las especies de aves. Además, los mamíferos tales como las focas y el cerdo doméstico se pueden infectar y pueden jugar un papel en el surgimiento de nuevas cepas del virus.

La prueba de precipitinas en gel de agar y la de inhibición de la hemaglutinación (HI, por sus siglas en inglés) son las pruebas serológicas estándar que se efectúan

para la detección de anticuerpos séricos específicos contra el virus de la influenza aviar. La prueba de precipitación en gel de agar se realiza para detectar anticuerpos específicos de grupo contra el virus del tipo A, mientras que la prueba de HI se emplea para la detección de anticuerpos específicos del subtipo (anticuerpos específicos contra las proteínas de las hemaglutininas de la envoltura viral).

En este estudio se desarrolló una prueba de inmunoabsorción ligada a enzimas (ELISA) para la discriminación rápida, eficiente y a gran escala de los pollos y pavos infectados con el virus de la influenza aviar tipo A. La sensibilidad y la especificidad de grupo de esta prueba de ELISA se compararon con las de las pruebas de precipitación en gel de agar y de HI bajo condiciones tanto controlada como de exposición de campo. Durante el curso de la infección temporal experimental de pollos libres de patógenos específicos con virus tanto de alta como de baja patogenicidad del subtipo H5N2 de la influenza aviar, nuestra prueba de AI-ELISA fue capaz de detectar a los anticuerpos específicos contra el virus de la influenza aviar desde la primera semana posterior a la infección.

La sensibilidad del sistema desarrollado de ELISA se comparó con los resultados obtenidos con las pruebas de precipitación en gel de agar y de HI. La especificidad de la prueba de ELISA se determinó probando 26 antisueros monoespecíficos desarrollados contra varios patógenos aviares y sueros de campo negativos a anticuerpos contra el virus de la influenza. Tanto la sensibilidad como la especificidad de nuestra prueba de ELISA son comparables a las de las pruebas de precipitación y de HI. Disertaremos sobre la eficacia de la prueba de ELISA para la detección de anticuerpos contra el virus tipo A de la influenza aviar.

Avian influenza (AI) has emerged as a disease with significant potential to disrupt commercial poultry production resulting in extensive losses. Avian influenza is caused by type A orthomyxoviruses, which are widely distributed in avian species. In addition, mammals, including seals and domestic swine, can be infected and may play a role in the emergence of new strains of virus.

Agar-gel precipitin (AGP) and hemagglutination inhibition (HI) are the standard serological tests performed for the detection of specific serum antibody to avian influenza virus (AIV). AGP is performed for the detection of the group specific type A antibodies, whereas HI is performed for the detection of subtype specific antibodies (antibodies specific to hemagglutinin proteins of the viral envelope).

This study has developed a highly reliable AI-ELISA test for the rapid and efficient large scale screening of AIV type A infection in chickens and turkeys. The sensitivity and group specificity of the AI-ELISA were compared with those of the AGP and HI tests under conditions of both controlled and field exposure. During the course of the temporal experimental infection of the specific pathogen free chickens with both high or low pathogenic H5N2 AIV subtype, the AI-ELISA was able to detect specific AI antibody as early as one week post infection.

The sensitivity of the ELISA system developed was compared with results obtained in AGP and HI tests. Specificity of the ELISA was determined by testing 26 mono-specific antisera raised against various avian pathogens and AI antibody negative field sera. Both the sensitivity and specificity of ELISA is comparable to AGP and HI tests. The efficacy of the ELISA for detection of antibody to AIV type A virus will be discussed.

A STRATEGY FOR DEALING WITH NEW VIRUS DISEASES OF POULTRY

UNA ESTRATEGIA PARA HACER FRENTE A LAS ENFERMEDADES VIRALES NUEVAS EN LAS AVES

M. S. McNulty

Department of Agriculture for Northern Ireland, Veterinary Sciences Division
Stormont, Belfast, Northern Ireland BT4 3SD

RESUMEN

Durante aproximadamente los últimos 20 años se ha descrito una serie de enfermedades nuevas en las aves de corral, muchas de las cuales son producidas por virus. Podemos predecir que en el futuro continuarán surgiendo nuevas enfermedades virales, por lo que se necesitará reconocerlas y controlarlas con efectividad. En este trabajo

propondremos una estrategia para lograrlo, cuyos elementos son: el desarrollo de una concientización de que ocurrirán enfermedades nuevas, la definición precisa de las nuevas enfermedades cuando aparezcan, la determinación de su etiología, la aclaración de su epizootiología y, finalmente, el desarrollo e implementación de las medidas de control.

INTRODUCTION

Over the last 20 years or so, a number of new diseases of poultry have emerged. Most of these are probably caused by viruses. They include egg drop syndrome, runting stunting syndrome, turkey rhinotracheitis/swollen head syndrome, hydropericardium syndrome, Newcastle disease caused by the pigeon variant of avian paramyxovirus type 1 (PMV-1), big liver and spleen disease (reviewed in 10), Muscovy duck parvovirosis[6], spiking mortality syndromes in broiler chickens[4] and turkey poults (H.J. Barnes, T.P. Brown and J.S. Guy, personal communications).

Thus, assuming that history will repeat itself, it is anticipated that new virus diseases will emerge in domestic poultry in the future. When new virus diseases appear, it is essential that they are quickly recognized and controlled. The purpose of this paper is to outline a strategy designed to achieve these aims. The elements of the strategy are as follows: development of an awareness that new diseases will appear, accurate definition of new diseases when they appear, determination of their etiology and elucidation of their epidemiology, and finally, development and implementation of control measures. Each of these elements is described in more detail below.

AWARENESS

All those involved in the poultry industry should be aware of the possibility of the appearance of new diseases. Fortunately, given the pre-eminence of a comparatively small number of primary breeding companies worldwide, and the considerable traffic in hatching eggs, live birds, meat products and vaccines, there is a good awareness of international disease trends among poultry veterinarians, and new and/or exotic diseases are usually included in a differential diagnosis. However, this is sometimes reflected in a tendency to assume, whenever unexpected problems occur, that this is due to the importation of a new virus or a new disease. Consequently, this may result in a failure to properly investigate other more mundane explanations, such as failures in vaccination.

Given that feral bird populations represent the most likely source of previously unknown viruses for the poultry industry, it is important that all practicable steps are taken to prevent wild birds coming into direct and/or indirect contact with poultry.

DEFINITION

In order that subsequent investigations can be brought to a satisfactory conclusion, new diseases must be adequately defined in terms of their clinical and pathological features. If this is not done, there will be problems in defining the prevalence and distribution of the disease. Similarly, without an adequate definition, it will be difficult to determine whether attempts to experimentally reproduce the disease have been successful; this will obviously complicate attempts to determine the cause of the disease.

When a new disease appears, there is a natural tendency to name it after the major presenting signs or lesions. However, such definitions are not particularly useful, especially where they are based on disease signs which are not very specific, e.g., depression of growth, respiratory signs, death, etc.

For example, runting stunting syndrome (RSS) has been diagnosed virtually worldwide on the basis of the appearance of runted and stunted broiler chickens with retarded feathering. A variety of other, inconsistently appearing signs and lesions has been described, some of which have been regular features and some geographical areas but not in others[11]. Given the variety in descriptions of RSS, it is not clear whether we are dealing with:

a) one universal syndrome of poor growth and retarded feathering, accompanied by a variety of other signs and lesions, perhaps induced by generalized immunosuppression and caused by local secondary agents; or

b) a number of different and unrelated syndromes.

This uncertainty regarding the nature of the disease has undermined attempts to determine its etiology and to investigate its epidemiology. If possible, a more restrictive definition should be used when naming new diseases/syndromes. For example, Goodwin et al.[7] have suggested that RSS should be diagnosed when sicknesses attributable to small intestinal pathophysiological deficits cannot be linked to known nutritional deficiencies or pathogens, and unique small intestinal microscopic lesions are found that contain virus. The nature of the associated virus can then be used to further classify the condition as, e.g., reovirus associated enteritis, enterovirus associated enteritis, etc.

A good description of the sequential development of signs and lesions observed in naturally occurring outbreaks of a disease may also give clues as to its pathogenesis. Where thymic and/or bursal lesions occur,

do they precede or follow changes in other organs? The former might indicate a primary immunosuppression, predisposing to secondary invasion.

Despite the critical importance of disease definition, it is usually low on the priority list. Faced with a new disease situation, many poultry organizations react by changing various management practices, often in an uncontrolled way. When it is realized that a "quick fix" is not achievable, a search for an etiological agent is instigated. If this runs into difficulties, detailed studies of the pathology and pathogenesis of the disease are undertaken, in the hope that this will help to identify the cause of the problem.

Where a particular etiologic agent has been associated with a new disease, attempts to determine its presence or absence may be of use in identifying outbreaks of disease in other locations. For example, outbreaks of swollen head syndrome may or may not be associated with infection with avian pneumovirus; serological testing can be used to clarify the situation.

ETIOLOGY

When faced with a new disease in the field, certain epidemiological features may indicate whether it is infectious or not, e.g., association with specific breeder flocks, persistence on sites, evidence of spread through direct and indirect contact, etc. Confirmation will depend on isolation of the etiologic agent and experimental reproduction of the disease. The failure to identify the etiological agent in some of the new diseases listed in the introduction, coupled with the recognition of a number of new viruses that are difficult or impossible to grow in commonly used in vitro systems (reviewed in 10), underlines the limitations of current diagnostic methods.

In a dual attempt to demonstrate transmissibility and to isolate the causative agent, investigators frequently experimentally inoculate birds with extracts of organs obtained from field cases of new diseases. In this situation the nature of experimental subject, i.e., breed affected in the field or specific pathogen free (SPF), its age and the route of exposure are of crucial importance. For example, the effects of a putative etiologic agent of RSS on growth are much more difficult to assess in slowly growing SPF chickens than in broilers; conversely there may be a question regarding the susceptibility of broilers because they possess a wide spectrum of maternally derived antibodies.

While the isolation of a virus from a diseased organ does not necessarily imply cause and effect, the failure to fulfil Koch's postulates experimentally with candidate etiologic agents does not necessarily exclude them as primary causes of disease either. Failure of a genuine etiologic agent to experimentally reproduce the full spectrum of disease seen in the field may be due to absence of predisposing factors in the experimental situation, i.e., stress, management factors, genetics, appropriate secondary agents, etc.[8] or to the logistical difficulty of reproducing a disease with comparatively low morbidity in a limited number of experimentally infected birds.

In most laboratories, isolation of a virus in vitro is dependent upon the ability of the virus to cause a cytopathic effect in cell cultures or a lethal effect in chick embryos. However, not all viruses are cytopathic or embryo lethal. The sensitivity of in vitro virus isolation systems is greatly increased if detection of viral antigen is used as the marker of viral growth rather than ability to produce cytopathology. The easiest and more reliable way to detect viral antigens is by immunofluorescent staining of acetone-fixed cell culture preparations or cryostat sections of appropriate organs or tissues. Some laboratories use immunoperoxidase techniques instead. The use of direct immunofluorescence using pooled sera from birds experimentally inoculated with field material in diagnostic investigations of new diseases may result in detection of unsuspected or new viruses. For example, this approach enabled us to detect an enterovirus-like virus in the villous epithelial cells in the small intestines of 1- to 6-day-old broilers with RSS[12].

The development of monoclonal antibody-based typing methods for discriminating between different isolates of the same virus represents a great advance over conventional pathotyping and polyclonal antiserum-based serotyping techniques. These have been particularly useful in diagnosing outbreaks of Newcastle disease in domestic poultry caused by pigeon PMV-1[2,3].

In recent years, virus diagnostic techniques based on detection of viral nucleic acids have been developed. Some of these, e.g., polymerase chain reaction (PCR) amplification of viral nucleic acid sequences have potentially very high sensitivity and specificity and are very much in vogue. However, with most acute virus infections, viral antigen is present in large amounts in infected tissues/organs and can be detected more rapidly, cheaply and easily by immunofluorescence than nucleic acids can be detected by PCR. PCR is particularly useful if:

a. the target nucleic acid to be amplified contains sequences which reveal important epidemiological information about the virus in question (e.g., pathotype, serotype or serogroup) (reviewed in 5 and 10);

b. the diagnostic investigation is started some time after the appearance of disease so that only small amounts of virus may be present; or

c. latent virus is being sought.

EPIDEMIOLOGY

Unless the clinical signs and pathological lesions of a virus disease are pathognomonic, and unless infection always results in disease, diagnostic tests for detecting the virus and/or its antibody must be developed before the epidemiology of the disease can be elucidated. Tests for viral antibodies, particularly those such as ELISAs that are comparatively easy to perform and can be carried out in large numbers, are especially useful. They can be used to determine the prevalence of infection, the duration of time the virus has been in a particular location (assuming historical sera are available for testing), whether subclinical infections occur, the commonest age at exposure, etc. Testing of SPF flocks will allow an assessment of the likelihood of contamination of poultry vaccines.

Viruses that spread in breeder flocks around peak egg production are likely to be vertically transmitted in the egg. However, where egg transmission occurs, it is usually at a low frequency, i.e., less that 5% embryos infected. Horizontal transmission depends on when, how, and how easily infection is subsequently spread. There may be an inverse age resistance, a developing age resistance or all ages may be equally susceptible. Infections that are spread via the respiratory tract tend to spread faster and possibly further than those spread by fecal-oral contact. Some viruses have a lower infectious $dose_{50}$ (ID_{50}) for birds than others - viruses with a low ID_{50} will spread faster than those with a high ID_{50}. The duration of virus shedding and titers of virus shed are important factors in the consideration of control measures. Viruses that are excreted in high titers over a prolonged period of time are much more difficult to eradicate than those with short periods of excretion. These aspects of the epidemiology of a virus can be assessed by experimental infections and also by analysis of field outbreaks of disease.

Similarly, other important factors such as the resistance of the virus to standard disinfection/fumigation procedures, the ability to infect other avian species and possible vectors can be investigated. It is more difficult to determine whether latency occurs; attempts to reactivate virus by high doses of immunosuppressant drugs and to detect latent genomes by PCR are possible approaches.

CONTROL

The control strategy to be adopted will be dictated by the epidemiological findings. Table 1 lists those epidemiological factors that would favor control of a new virus disease by eradication, i.e., slaughter of diseased flocks. However, some diseases have been eradicated in the absence of many of the factors listed in Table 1.

If a new disease can be eradicated cheaply and comparatively easily, eradication is obviously the best means of control. For example, egg drop syndrome was eradicated from broiler breeders in Northern Ireland by batching and serological testing of young birds during the rearing period, and culling reactors[9].

In practice however, most virus diseases of poultry are controlled by vaccination. Commercial vaccines are normally either naturally occurring or laboratory attenuated live vaccines or inactivated adjuvanted vaccines. In general live vaccines stimulate good but transitory local mucosal immune responses, whereas inactivated vaccines stimulate good humoral antibody responses. Priming of breeder flocks with live vaccine followed by use of inactivated vaccine is used to produce high levels of maternally derived antibodies that may protect young chicks against early viral challenge. Vaccination regimes in different countries differ depending on the known and perceived risks.

The use of recombinant DNA technology offers the prospect of developing new vaccines against the classical virus diseases and those new diseases caused by viruses that are difficult to grow in laboratory systems or have not yet been attenuated. This might involve insertion and expression of the appropriate viral genes in a suitable vector system, e.g., turkey herpesvirus or fowl pox virus, or development of subunit adjuvanted vaccines through expression of appropriate viral genes in prokaryotic or eukaryotic expression systems. The future use of recombinant vaccines will be determined by their price and their efficacy.

Precise identification of the etiologic agent is not necessarily a prerequisite for development of effective vaccines. In the past, inoculation with vaccines based on formalized diseased tissues has stimulated immune responses which were sufficient to prevent the development of clinical signs following field exposure. Although the etiologic agent of hydropericardium syndrome has not yet been identified, a formalized vaccine prepared from livers from affected birds has given encouraging results in field trials, even when used in the face of a disease outbreak[1].

REFERENCES

1. Afzal, M., and I. Ahmad. Efficacy of an inactivated vaccine against hydropericardium syndrome in broilers. Vet. Rec. 126:59-60.1990.
2. Alexander, D.J., G.W.C. Wilson, P.H. Russell, S.A. Lister, and Parsons. Newcastle disease outbreaks in fowl in Great Britain during 1984. Vet. Rec. 117:429-434. 1985.
3. Alexander, D.J., R.J. Manvell, P.A. Kemp, G. Parsons, M.S. Collins, S. Brockman, P.H. Russell,

and S.A. Lister. Use of monoclonal antibodies in the characterization of avian paramyxovirus type 1 (Newcastle disease virus) isolates submitted to an international reference laboratory. Avian Pathol. 16:553-565. 1987.
4. Brown, T.P., P.V. Brunet, E.M. Odor, D.W. Murphy, and E.T. Mallinson. Microscopic lesions of naturally occurring and experimental "spiking mortality" in young broiler chickens. Avian Dis. 35:481-486. 1991.
5. Cavanagh, D. Advances in avian diagnostic technology. Proc. Xth International Congress of the World Vet. Poult. Assoc., pp. 57-70. 1993.
6. Fournier, D., and D. Gaudry. Recent discoveries on waterfowl pathology: a new parvovirus of Muscovy ducks in France - field vaccination trials. In: New and Evolving Virus Diseases of Poultry. M.S. McNulty and J.B. McFerran, eds. Commission, Brussels, pp. 183-194. 1994.
7. Goodwin, M.A., J.F. Davis, M.S. McNulty, J. Brown, and E.C. Player. Enteritis (so-called runting stunting syndrome) in Georgia broiler chicks. Avian Dis. 37:451-458. 1993.
8. Kouwenhoven, B. Environment, husbandry, genetic and nutritional interactions in infectious diseases in poultry. Proc. Xth International Congress of the World Vet. Poult. Assoc., pp. 113-126. 1993.
9. McFerran, J.B. Egg drop syndrome. 1976 (EDS '76). Vet. Quart. 1:176-180. 1979.
10. McNulty, M.S. Recurrent and emerging diseases. Proc. Xth International Congress of the World Vet. Poult. Assoc., pp. 3-17. 1993.
11. McNulty, M.S., and J.B. McFerran. The runting stunting syndrome - general assessment. In: Virus Infections of Birds. J.B. McFerran, and M.S. McNulty, eds. Elsevier, Amsterdam. pp. 519-529. 1993.
12. McNulty, M.S., G.M. Allan, T.J. Connor, J.B. McFerran, and R.M. McCracken. An entero-like virus associated with the runting syndrome in broiler chickens. Avian Pathol. 13: 429-439. 1984.

(This article was first published in the proceedings of the Society for Veterinary Epidemiology and Preventive Medicine (1994), and is reproduced, with amendments, with the permission of its editor.)

Table 1. Epidemiological factors favoring control by slaughter of diseased flocks[a]

Pathognomonic signs/lesions
Reliable diagnostics available
Low prevalence
Significant economic impact
No subclinical infections
Short period of virus excretion
Faecal-oral, not respiratory spread
High ID_{50} of causative virus
Horizontal transmission only
No vectors/alternative hosts
No latency
Susceptible to standard disinfection/fumigation methods
If vaccine used, serology can distinguish between vaccinal antibodies and field exposure.

[a]In general, factors are listed in decreasing order of importance.

ADENOVIRUS AND INCLUSION BODY HEPATITIS IN CHICKENS

ADENOVIRUS Y HEPATITIS POR CUERPOS DE INCLUSION EN AVES DOMESTICAS

Pedro Villegas

Department of Avian Medicine, College of Veterinary Medicine
University of Georgia, Athens, GA 30602

RESUMEN

Durante la última década, las infecciones por adenovirus en pollos han aumentado considerablemente. La mayoría de los adenovirus aislados de aves no se consideran patógenos pues cuando se inoculan en aves susceptibles no causan una enfermedad aparente. La presencia de agentes inmunosupresores o de condiciones de estrés pueden ser factores contribuyentes para que los adenovirus causen enfermedad. Sin embargo, se han identificado varios adenovirus que son capaces de producir condiciones patológicas y mortalidades sin necesidad de la presencia de otros factores. Los adenovirus asociados con la hepatitis por cuerpos de inclusión e hidropericardio son quizás los virus que por sí solos emergen como patógenos. La hepatitis por cuerpos de inclusión se ha observado en varios países de América Latina, lo mismo que en Australia y Paquistán. Las lesiones se caracterizan por necrosis hepática, hepatitis, palidez de la médula ósea y atrofia bursal, acompañadas algunas veces por hidropericardio. Las mortalidades varían del 5 al 40% y se observan a partir de la 3a. semana, llegando a sus máximos valores a la 4a. ó 5a. semana. En Australia, el control de la enfermedad se logró mediante la vacunación de las reproductoras con un adenovirus del serotipo 8 aislado de los lotes afectados. El virus se administró entre 10 y 14 semanas de edad. La progenie de las aves vacunadas fue protegida contra la enfermedad.

During the past decade, adenovirus infections in chickens have increased considerably. Most adenovirus isolated from poultry are considered to be nonpathogenic since when inoculated in susceptible birds no major pathology is observed. Immunosuppressive agents or severe stress can become contributing factors for adenovirus to induce pathological conditions. However, several adenovirus isolates have been identified that are capable of inducing disease conditions and mortality without the presence of other factors. Viruses associated with inclusion body hepatitis (IBH) and hydropericardium are perhaps the viruses that by themselves have emerged as serious pathogens. IBH has been observed in broilers in several Latin American countries as well as in Australia and Pakistan. The lesions are characterized by liver necrosis, hepatitis, pale bone marrow, and bursal atrophy, with hydropericardium observed in some cases. Mortality ranges from 5 to 40% are most frequently observed after the 3rd week of life, reaching a peak during the 4th and 5th week. In Australia, the control of the disease was achieved by vaccination of the breeder flocks with a serotype 8 adenovirus isolated from the affected flocks. The virus was administered by the oral route between 10 and 14 weeks of age. Progenies from vaccinated breeders were protected.

AVIAN INFECTIOUS BRONCHITIS VIRUS: RNA RECOMBINATION IN VITRO

RECOMBINACION *IN VITRO* DEL ARN DEL VIRUS DE LA BRONQUITIS INFECCIOSA

Kristi M. Moore, Mark W. Jackwood, and Deborah A. Hilt

Department of Avian Medicine, University of Georgia, Athens, GA 30602

RESUMEN

Se ha informado sobre el surgimiento *in vivo* de virus variantes del virus de la bronquitis infecciosa (VBI) debido a la recombinación del ARN en sitios crucero, determinada por las relaciones filogénicas existentes entre diversas cepas de este virus. En el presente informe examinamos la recombinación *in vitro* del ARN del VBI mediante la transferencia del gene de la J-galactosidasa de *Escherichia coli,* de un ARN de transfección hacia el genoma viral de la cepa Beaudette del VBI. Se construyó el plásmido pMJMgalN-3Z y contiene las secuencias del VBI, un promotor SV40 y el gene de la J-galactosidasa después de un promotor SP6. La polimerasa del ARN dependiente del SP6 DNA se utilizó para sintetizar una transcripción del ARN que se utilizó para transfectar células primarias de riñón de embrión de pollo infectadas con la cepa Beaudette del VBI. Después de la purificación de la placa se observó la expresión de la J-galactosidasa en las células primarias de riñón de embrión de pollo infectadas con los virus recombinantes. El gene J-galactosidasa se detectó en las células infectadas mediante hibridaciones de mancha (en inglés: "dot blot") del ARN, utilizando una sonda del gene J-galactosidasa. Se detectó el ARN de la J-galactosidasa mediante reacción en cadena de polimerasa con transcriptasa reversa y mediante hibridaciones siguiendo la técnica del sur. También se determinó que el gene J-galactosidasa no se incorporaba al ADN celular mediante la hibridación con la técnica del sur en los intentos de aislamiento de plásmidos ni en el ADN del genoma.

It has been reported that avian infectious bronchitis virus (IBV) variant viruses arise in vivo due to RNA recombination at crossover sites determined by phylogenic relationships between IBV strains. In this report, we examined IBV RNA recombination in vitro by transfer of the *E. coli* ß-galactosidase gene from a transfecting RNA into the viral genome of the Beaudette strain of IBV. The plasmid, pMJMgalN-3Z, was constructed, and contains IBV sequences, a SV40 promoter, and the ß-galactosidase gene following a SP6 promoter. The SP6 DNA dependent RNA polymerase was used to synthesize a RNA transcript which was used to transfect primary chicken embryo kidney cells infected with the Beaudette strain of IBV. Following plaque purification, expression of ß-galactosidase was observed in primary chicken embryo kidney cells infected with recombinants. The ß-galactosidase gene was detected in infected cells by RNA dot blot hybridizations using a ß-galactosidase gene probe. The ß-galactosidase RNA was detected by reverse transcriptase polymerase chain reaction and southern hybridizations. It was also determined that the ß-galactosidase gene was not incorporated in cellular DNA by southern hybridization on plasmid isolation attempts and genomic DNA.

(The full-length article will be submitted for publication in *Archives of Virology*.)

EVOLUTION OF INFECTIOUS BRONCHITIS VIRUS DEPENDS ON THE EXCHANGE OF GENETIC MATERIAL BETWEEN EXISTING VIRUSES

LA EVOLUCION DEL VIRUS DE LA BRONQUITIS INFECCIOSA DEPENDE DEL INTERCAMBIO DE MATERIAL GENETICO ENTRE VIRUS EXISTENTES

Ellen Collisson[A], Yuan Xu[A], David Junker[B], Lisa Hock[B], and Li Wang[A]

[A]Department of Veterinary Pathobiology, College of Veterinary Medicine
Texas A&M University, College Station, TX 77802
[B]Syntro Research Laboratories, San Diego, CA 92121

RESUMEN

La incapacidad de las vacunas para controlar los brotes del virus de la bronquitis infecciosa (VBI) en las aves, se deben parcialmente a continuas modificaciones antigénicas. Las variaciones en el gene de la espícula del VBI, que es responsable de la fijación del virus a la célula huésped, puede producir cepas que escapan a la protección que confieren las vacunas. Pueden ocurrir modificaciones genéticas en el genoma del VBI a partir de cambios en nucleótidos sencillos, pero según se ha sugerido mediante las determinaciones de la secuencia del gene de la espícula, es necesario que también ocurran mutaciones que creen nuevas cepas, derivadas de cambios en regiones de gran tamaño, entre 2 virus progenitores, incluyendo a cepas parecidas a los virus vacunales tipo Mass. Existe una cantidad impresionante de virus que tienen genes de espícula con sitios obvios de recombinación, los cuales fueron encontrados frecuentemente en una región entre la terminal amino de la espícula y la región hipervariable de la espícula, mientras que no se han encontrado sitios de cruzamiento en la región hipervariable en sí. Los estudios *in vitro* en los que se utilizaron células de riñón de pollo que fueron coinfectadas con las cepas Ark y Mass produjeron genomas que desplegaron sitios de cruzamiento de recombinación en la espícula, en la región observada en las cepas de campo. Una vez más, dichos sitios no se encontraron en la región hipervariable. Es posible reproducir experimentalmente cambios similares en las secuencias de los nucleótidos de la espícula tanto en pollos como en embriones coinfectados. La recombinación de las cepas del VBI, en la que a menudo participan cepas parecidas a las vacunales, es un mecanismo común para la evolución de cepas nuevas.

Infectious bronchitis virus (IBV) is in the *Coronaviridae* family, along with a number of other pathogens of agricultural importance, including turkey coronavirus. The major proteins of the infectious viral particle are the outer protein forming large spike-like projections, the membrane protein mostly embedded in the cell host derived bilipid membrane, and nucleocapsid protein that coats the viral genome (Figure 1). The genome or hereditary material of IBV consists of RNA[2]. Attachment of virus to the host cell is thought to depend on interactions between cell receptors and the spike protein. Antibodies specific for determinants on the spike are capable of neutralizing viral attachment and thus, infection[3,6]. Whereas strains of IBV vary greatly in both pathotype and serotype, we have concentrated much of our research efforts on determining the mechanisms for variation in the IBV genome.

Molecular studies of the genome have identified a highly variable region (HVR) near the amino end of the spike[8]. This HVR is thought to strongly impact, if not dictate, serotype determination[1,5]. Therefore, the gene encoding the amino or external half of the spike has been targeted for genetic and antigenic characterization. As illustrated in Figure 2, nucleotide sequencing of a number of viruses has provided evidence that variations can occur through genetic drift (accumulation of single base mutations) or through genetic shift (rapid changes resulting from the exchange of hereditary material between two viruses[7,8]).

Following sequencing of spike genes, it was apparent that the overall homology between two strains did not adequately predict the origins of the gene. For example, the spike gene of the Texas PP14 isolate was overall 69% homologous to Mass and 94% to Ark but if the sequences of regions were compared on a one to one basis, it was obvious that a large segment at the amino end was only 77% like Ark and actually originated from a Mass-like parent with 96% homology[7]. These shifts in homology within the spike sequences could be found in most IBV strains examined, and can be explained by the

occurrence of recombination between two parental strains. IBV studies showed that coronavirus recombination apparently occurs in nature. Not only are exchanges of material common for IBV, but abrupt changes in sequence identity tended to be located in a region immediately upstream of the spike HVR and, in these studies, were not identified within the HVR. It was also of interest that Mass-like strains were commonly implicated as a source of one parent.

These studies still provided only circumstantial evidence that recombination occurs between IBV strains. It was necessary to reproduce such exchanges of genomic information under controlled experimental conditions. Therefore, embryos were co-infected with Ark and Mass strains and RNA genomes of progeny viral particles purified with density gradients were extracted and examined for recombination. Recombinants were detected by PCR using one primer specific for only Ark and the second primer specific for only Mass (Figure 3). The region amplified, spanned the hypervariable region of spike genes and included the commonly identified cross over region described in naturally occurring recombinants (Figure 4). PCR products were sequenced to confirm that the generated cDNA was derived from both parental Ark and Mass genomes. Co-infection of chicks and CK cells also results in viral RNA that consisted of both Ark and Mass sequences. The recombination sites were found to lie upstream of the hypervariable region as in natural isolates. None were found within the hypervariable region.

To further confirm that recombination could occur between viral RNA, a second region was selected for amplification. A HVR in the 3¢ end of the IBV genome has been described that is completely absent in the Mass strain. Detection of recombination between Gray and Mass RNA sequences were examined by presenting Mass infected cells with naked RNA containing only sequences from the 3¢ end of the Gray genome. Infectious virus with the presence of the 3¢ HVR could be found only if the Gray sequences had been inserted into the Mass viral genome. In fact, purified viral particles were identified with RNA of Gray origin with the 3¢ HVR. Kottier et al[4] also experimentally reproduced recombinants with cross-over sites within the nucleocapsid gene lying adjacent to the 3¢ HVR.

Exchanges of RNA can occur between strains of IBV both in nature, and under experimental conditions, have been demonstrated in the spike gene and in the 3¢ terminal region of the genome. The origin of incorporated RNA may be infectious virus or non-replicating RNA. Recombination is common and probably plays a major role in the evolution of IBV in nature. But the involvement of the Mass-like strains in so many recent isolates is of special concern because of the implications of Mass-derived vaccines in the appearance of new strains.

ACKNOWLEDGEMENTS

This work has been supported by the Southeastern Poultry and Egg Association #29 & 260, USDA National Competitive Research Initiative Grants Program #RF-93-762, USDA Formula Animal Health (Section 1433) #TEXO-6824 and the Texas Advance Technology Program #99902-063.

REFERENCES

1. Cavanagh, D., P.J. Davis, and A.P.A. Mockett, Amino acids within hypervariable region 1 of avian coronavirus IBV (Massachusetts serotype) spike glycoprotein are associated with neutralization epitopes. Virus Res. 11:141-152. 1988.
2. Collisson, E., A. Williams, R. Parr, and L. Wang. An overview of the molecular biology of infectious bronchitis virus. Poultry Science Rev. 4:41-55. 1992.
3. Ignjatovic, J., and L. Galli. The S1 glycoprotein but not the N or M proteins of avian infectious bronchitis virus induces protection in vaccinated chickens. Arch. Virol. 138:117-134. 1994.
4. Kottier, S.A., D. Cavanagh, and P. Britton. Experimental evidence of recombination in coronavirus infectious bronchitis virus. Virology. 213:569-580. 1995.
5. Kusters, J.G., E.J. Jager, J.A. Lenstra, G. Koch, W.P.A. Posthumus, R.H. Meloen, and B.A.M. Van Der Zeijst. Analysis of an immunodominant region of infectious bronchitis virus. J. Immunology 143:2692-2698. 1989.
6. Parr, R., and E.W. Collisson. Epitopes on the spike protein of a nephropathogenic strain of infectious bronchitis virus. Arch. Virol. 133:369-383. 1993.
7. Wang, L., D. Junker, and E.W. Collisson. Evidence of natural recombination in the S1 gene of infectious bronchitis virus. Virology. 192:710-716. 1993.
8. Wang, L., D. Junker, L. Hock, E. Ebiary, and E.W. Collisson. Evolutionary implications of genetic variations in the S1 gene of infectious bronchitis virus. Virus Res. 34:327-338. 1994.
9. Williams, A.K., L. Wang, L.W. Sneed, and E.W. Collisson. Analysis of a hypervariable region in the 3¢ non-coding end of the infectious bronchitis virus genome. 26:19-27. 1993.

Figure 1. Coronavirus Particle.

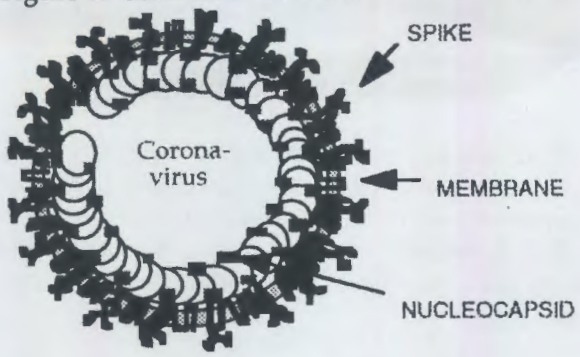


Figure 1. Coronavirus particle.

Figure 2. Regions of shifts in homology.

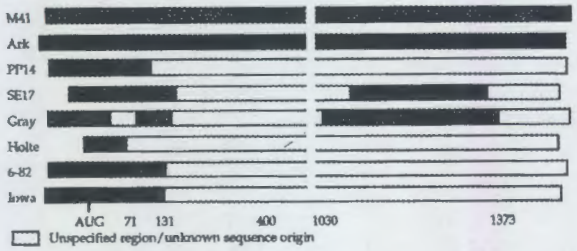


Figure 2. Regions of shifts in homology.

Figure 3. Amplification of 600 bases in a hybrid spike gene.

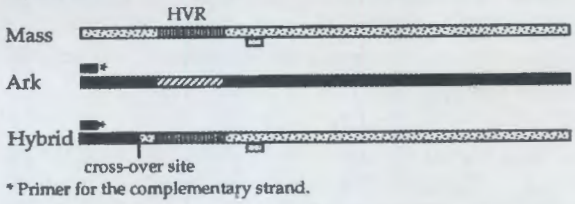


Figure 3. Amplification of 600 bases in a hybrid gene.



Figure 4. PCR of hybrids. Lanes 1 & 4.

UPDATE ON IBV ISOLATIONS IN THE USA AND SOME IMPROVEMENTS ON THE RT-PCR/RFLP SEROTYPE IDENTIFICATION TEST

ACTUALIZACION SOBRE LOS AISLAMIENTOS DEL VIRUS DE LA BRONQUITIS INFECCIOSA EN ESTADOS UNIDOS Y SOBRE ALGUNOS MEJORAMIENTOS EN LA PRUEBA DE IDENTIFICACION DE SEROTIPOS RT-PCR/RFLP

Mark W. Jackwood, Kristi M. Moore, and Deborah A. Hilt

Poultry Diagnostic and Research Center
University of Georgia, Athens, GA 30602

RESUMEN

El virus de la bronquitis infecciosa (BI) continúa siendo una de las principales causas de pérdidas económicas en la industria avícola debido al surgimiento de virus variantes y a la incapacidad de las vacunas de proteger cruzadamente contra diferentes serotipos o virus variantes. En este estudio utilizamos la técnica de reacción en cadena de polimerasa con transcriptasa/polimorfismo de restricción de la longitud de los fragmentos (RT-PCR/RFLP) para identificar a los serotipos de diversos aislamientos recientes del virus de la BI en Estados Unidos.

La extracción del ARN y la RT-PCR/RFLP se realizaron de acuerdo a la técnica previamente descrita (Kwon). Se utilizó el primer 3' para la reacción en cadena de

polimerasa S1OLIGO3', según se había descrito previamente, pero se modificó la secuencia del primer 5' designado como S1OLIGO5'. La secuencia del primer modificado, designado como NEWS1OLGO5' es la siguiente: 5'-TGAAACTGAACAAAAGAC-3'.

Presentaremos un resumen de los aislamientos del virus de la BI tipificados en Estados Unidos desde marzo de 1995. Hemos logrado identificar a 5 nuevos virus variantes utilizando nuestra prueba rápida de RT-PCR para el análisis del serotipo. Ante esta prueba, los virus variantes no resultaron parecidos entre sí; sin embargo, su patogenicidad y la similitud de su serotipo con los virus vacunales conocidos permanecen aún no determinados. A partir de los datos de este estudio parece que el virus variante de California está localizado en la costa oeste. La variante de Georgia, que fue uno de los factores principales en el brote de BI de 1992 en la región sureste, ha perdido totalmente su importancia. Probablemente esto se deba al amplio uso de la vacuna tipo Arkansas en el sureste, que protege a las aves contra este virus variante.

Determinamos la secuencia del gene de glucoproteína S1 en diversos virus variantes, así como en los serotipos Conn y Fla del virus de la BI. Comparamos los datos en un programa de alineación computarizada con todas las secuencias conocidas de los aislamientos de Estados Unidos. En base a dicha alineación parece que existe una región en el primer tercio del gene que difiere entre serotipos y variantes del virus. Hemos analizado la secuencia de diversos aislamientos de un mismo serotipo, encontrando que las diferencias entre serotipos parecen ser consistentes dentro de un serotipo. Por lo tanto, parece posible la identificación y serotipificación de un aislamiento del virus de la BI mediante la determinación directa de la secuencia de nucleótidos en dicha región.

Infectious bronchitis virus continues to be a major economic burden to the poultry industry because of emerging variant viruses, and the inability of vaccines to cross-protect between different serotypes or variant viruses. In this study, we used reverse transcriptase-polymerase chain reaction/restriction fragment length polymorphism (RT-PCR/RFLP) to identify the serotype of a number of recent IBV isolates in the U.S.A.

Viral RNA extraction, and RT-PCR/RFLP were conducted as previously described (Kwon). The 3' PCR primer S1OLIGO3' was used as previously described but the sequence of the 5' primer designated S1OLIGO5' was modified. The sequence of the modified primer, designated NEWS1OLIGO5', is 5'-TGAAACTGAACAAAAGAC-3'.

identify the serotype of an IBV isolate by direct nucleotide sequencing of that region.

Table 1. IBV isolations in the USA from March 1, 1995 to August 21, 1995.

State	Ark	Conn	Mass	DE 072	CA	GA	Other
AL	3						
AR			1				
CA	2	7	2		6		1
GA	11						1
MS							1
NC		1					
NY			1	2			2
PA	1						
SC			1				
VA	7		1				

Ark = Arkansas type
Conn = Connecticut type
Mass = Massachusetts type
DE 072 = Delaware variant virus
CA variant = California variant virus
GA variant = Georgia variant virus
Other variants = variant viruses that are not DE 072, CA variant or GA variant.

A summary of IBV isolates typed in the U.S.A. since March of 1995 is presented in Table 1. We have identified 5 new variant viruses using our rapid RT-PCR serotype analysis test . The variant viruses did not resemble each other in our test. However, their pathogenicity and serotype similarity with known vaccine viruses remains to be determined. From this data it appears that the California variant virus is localized on the west coast. The Georgia variant, which was a major factor in the 1992 IB outbreak in the southeast, is no longer a factor. This is probably due to the extensive use of the Arkansas type vaccine in the southeast which protects birds from that variant virus.

We sequenced the S1 glycoprotein gene of a number of variant viruses as well as the Conn and Fla serotypes of IBV. We compared that data in an computer alignment program with all of the known sequences for the U.S.A. isolates. Based on that alignment there appears to be a region in the first third of the gene that differs between serotypes and variants of the virus. We have analyzed the sequence of a number of isolates of the same serotype and found that differences between serotypes appear to be consistent within a serotype.

(Manuscript to be submitted to *Avian Diseases*.)

CHARACTERIZATION OF INFECTIOUS BRONCHITIS VIRUS ISOLATES FROM CALIFORNIA, 1994-1995

CARACTERIZACION DE AISLAMIENTOS DE VIRUS DE LA BRONQUITIS INFECCIOSA DE CALIFORNIA, DE 1994 A 1995

P. R. Woolcock[A], M. D McFarland[A], J. Case[B], and M. W. Jackwood[C]

California Veterinary Diagnostic Laboratory System, University of California, Davis
[A]Fresno Branch Laboratory, 2789 South Orange Avenue, Fresno, CA 93725
[B]Davis Central Reference Laboratory, P.O. Box 1770, Davis, CA 95617
[C]University of Georgia, Department of Avian Medicine, 953 College Station Road, Athens, GA 30602

RESUMEN

Se han realizado aproximadamente 350 aislamientos del virus de la bronquitis infecciosa (VBI) a partir de casos de campo remitidos para necropsia y confirmados mediante la prueba de inmunofluorescencia indirecta, utilizando anticuerpos monoclónicos. La caracterización de estos aislamientos se ha intentado utilizando anticuerpos monoclónicos específicos del tipo. Aproximadamente una tercera parte de los aislamientos no pudo ser tipificada como Ark99, Conn ni Mass41, utilizando los anticuerpos monoclónicos. Se han utilizado las técnicas de electroforesis en gel de poliacrilamida, la reacción en cadena de polimerasa con transcriptasa reversa y la de polimorfismo de restricción de longitud de los fragmentos, para caracterizar más a fondo a estos aislamientos no tipificables del VBI. Se han identificado varios aislamientos tipo "Cal". Durante la disertación presentaremos los resultados en forma más detallada.

In the Spring of 1994 we started using monoclonal antibodies in an indirect fluorescent antibody (IFA) test to identify infectious bronchitis virus (IBV) group antigen in frozen sections of the chorioallantoic membrane (CAM) of inoculated embryonating chicken eggs (ECEs). Approximately 350 isolations of IBV have been made from field cases submitted for necropsy and confirmed by this method. Further, specific characterization of these isolates has been requested and this has been attempted using more than one method.

The structure and genetic map of IBV needs to be considered when determining the virus type. IBV is a coronavirus and is the type strain of the genus *Coronavirus* in the family *Coronaviridae*. It is an enveloped virus approximately 60-220 nm in diameter, covered with a fringe of club shaped surface projections ~20 nm long and 10 nm wide. The virus particles may appear pleomorphic as well as circular. The genome consists of single stranded, positive sense RNA. The virion contains 3 structural proteins: an internal nucleocapsid basic phosphoprotein bounded by a lipid bilayer, a membrane or matrix protein, partly embedded and partly exposed at the surface, and a spike (S) glycoprotein which has club like projections which extend from the surface of the virion.

Changes in the amino acid sequence of the S glycoprotein, particularly in the S1 region can lead to antigenic drift. The 3-dimensional structure of the S glycoprotein is thought to be important in determining the antigenicity. Genetic recombination which occurs more frequently in RNA viruses than DNA viruses is also thought to be important in IBV antigenic variation.

Various methods can be used to further characterize IBV isolates:

1. Classic serotyping using serotype specific antisera in virus neutralization assays in ECEs.
2. Monoclonal antibodies in IFA, immunoperoxidase or dot blot assays.
3. Polyacrylamide gel electrophoresis (PAGE) and Western immunoblotting of the viral polypeptides. The virus type is based upon the migration pattern of the viral polypeptides.
4. Reverse transcriptase-polymerase chain reaction (RT-PCR) and restriction fragment length polymorphism (RFLP) is based upon the electrophoresis banding pattern of the fragments produced following the use of restriction enzymes on the S1 subunit of the spike glycoprotein which has been amplified by RT-PCR.

More than one third of the isolates of IBV made in our laboratory could not be typed with monoclonal antibodies specific to Ark99, Conn or Mass41 (supplied by Dr. S. Naqi). Such results can be misleading because the type specific monoclonal antibodies used, each recognize a single epitope unique to that serotype on the S glycoprotein. It is possible for a mutation to occur at this epitope so that the specific monoclonal antibody will not identify the virus.

Many of these untypable IBVs have been examined by PAGE. PAGE is not a serological test, but known IBV serotypes are believed to have specific polypeptide banding patterns. Several Cal types have been identified by this method; also several Conn/Ark types, a result more difficult to interpret. Results with a limited number of untypable IBVs examined by RT-PCR and RFLP indicate a good correlation with PAGE results in respect to Cal types. Some Conn types, which could not be identified by monoclonal antibodies or PAGE, have been identified. Some recombinant IBVs may also have been isolated.

More detailed results of these characterization studies will be presented.

INTERFERON MODULATION OF MAREK'S DISEASE VIRUS LATENCY

MODULACION DE LA LATENCIA DEL VIRUS DE LA ENFERMEDAD DE MAREK CON INTERFERON

B. W. Calnek[A], L. M. Volpini[A], B. Sneath[A], M. J. Sekellick[B], and P. I. Marcus[B]

[A]Cornell University, Ithaca, NY 14853
[B]The University of Connecticut, Storrs, CT 06269

RESUMEN

Las infecciones con virus de la enfermedad de Marek entran en una fase de latencia después de los 6 ó 7 días iniciales de la infección citolítica temprana. La infección latente normalmente se activa, produciendo antígeno viral interno, después de que los linfocitos infectados se cultivan 48 horas *in vitro*. Un medio condicionado, obtenido de esplenocitos estimulados con mitógenos o aloantígenos, suprimió la expresión de antígeno viral interno en este sistema y en una línea celular linfoblastoide de enfermedad de Marek. El factor activo del medio condicionado es interferón. Tanto el interferón natural como el interferón recombinante son capaces de suprimir la expresión del antígeno viral interno dependiendo de la dosis usada. Además, los anticuerpos monoclonales contra el interferón de pollo reducen la actividad supresora del antígeno viral interno del medio condicionado. En los esplenocitos, el efecto supresor fue evidente a los 14 a 21 días, pero no a los 7 días postinfección, lo que indica diferentes etapas de latencia. El interferón aparentemente interfiere con las primeras etapas de la multiplicación viral puesto que inhibe la expresión de los genes tempranos-inmediatos. Se requieren estudios adicionales para caracterizar los eventos moleculares, base de la expresión del genoma viral de la enfermedad de Marek y para investigar por qué la susceptibilidad a la modulación con interferón varía en las diferentes etapas después de que se ha establecido la latencia.

Marek's disease virus (MDV) infections enter latency after an initial 6-7 days of early cytolytic infection. Latently infected lymphocytes normally "turn on" to produce viral internal antigen (VIA) after 48 hours of in vitro cultivation. Conditioned medium (CM) from mitogen- or alloantigen-stimulated splenocytes was able to suppress the expression of VIA in this system and also in a MD lymphoblastoid cell line. We have now learned that the active factor in CM is interferon. Both natural and recombinant interferon (IFN) were able to suppress VIA expression in a dose-dependent fashion, and monoclonal antibody against chicken IFN could reduce the VIA-suppressive activity of CM. In splenocytes, the suppressive effect was apparent at 14-21 but not 7 days post infection, suggesting different stages of latency. IFN apparently interferes with an early stage of virus replication since immediate-early gene expression was inhibited. Additional studies are necessary to characterize the molecular events that underlie the modulation of MD viral genome expression and to learn why the susceptibility to IFN modulation differs at different times after latency is established.

EFFICACY OF MAREK'S VACCINES IN COMMERCIAL BROILERS

EFICACIA DE LAS VACUNAS DE MAREK EN POLLO DE ENGORDA

Enrique Montiel[A], J.K. Rosenberger[B] and S. Cloud[B]

[A]Select Laboratories Inc. P.O Drawer 2497, Gainesville, GA 30504
[B]University of Delaware, Department of Animal and Food Sciences. Newark, DE 19717

RESUMEN

Se utilizaron pollos de engorda comerciales de un día de edad que fueron vacunados con vacunas comerciales y experimentales contra la enfermedad de Marek, con el objeto de determinar su capacidad para estimular la inmunidad protectora contra el desafío con un aislamiento nuevo del virus de la enfermedad de Marek identificado como MDV T.K. Las vacunas se administraron mediante inyección subcutánea al día de edad y el desafío de los pollos se realizó por la vía respiratoria, utilizando un sistema de animales diserninadores, los cuales se prepararon inoculando pollos de engorda comerciales de un día de edad procedentes de una misma parvada de reproductoras posadas, con una costra flogística que contenía al virus MDV T.K., a una dosis de 5 x 10^6 linfocitos por ave, colocándolos durante 2 semanas en casetas limpias diseñadas para el semiaislamiento de colonias de aves. Los pollos vacunados se desafiaron exponiéndolos a los pollos diseminadores infectados el día de la vacunación y a los 5 dias de edad. Los grupos de pollos vacunados se colocaron en los mismos períodos para servir como controles desafiados. Se realizaron observaciones cotidianas de los animales en busca de mortalidad y lesiones. A las 8 semanas después, todos los animales sobrevivientes se sacrificaron y se les practicó la neeropsia. Todas las aves con lesiones macroscópicas (tumores visibles) se consideraron como positivas. Una vacuna, la CVI988-A, demostró consistentemente mejores resultados como entidad vacunal única durante las pruebas. No obstante, los mejores resultados durante las pruebas se obtuvieron con la combinación CVI988-A + HVT (N del T: HVT = virus herpes del pavo).

Day old commercial broilers were vaccinated with commercial and experimental Marek's vaccines in order to determine their ability to provide protective immunity against the challenge with a newly isolated Marek's Disease Virus (MDV) identified as the MDV T. K. isolate. The vaccines were administered by subcutaneous injection at day of age and the chickens were challenged by the respiratory route using a shedder system. The shedder birds were prepared by inoculating day old commercial broilers from a single broiler/roaster breeder flock with buffy coat containing the MDV T. K. isolate at a dose of 5 x 10^6 lymphocytes per bird and placing them in clean semi-isolation colony houses for 2 weeks. The vaccinated chickens were challenged by exposing them to the infected shedders the day of vaccination and a five days of age. Groups of unvaccinated chickens were placed at the same time periods to serve as challenge controls. The birds were observed daily for mortality and lesions. Eight weeks after challenge all survivors were sacrificed and necropsied. All the birds with gross lesions (visible tumors) were considered as positive. One vaccine, CVI988-A, showed consistently better results as a single entity vaccine during the trials. However, the best results during the trials were obtained by using the CVI988-A + HVT vaccine combination.

FIELD TRIAL AND EFFICACY OF POLYVALENT MAREK'S DISEASE VACCINES COMBINED WITH A LIVE ATTENUATED STRAIN OF INFECTIOUS BURSAL DISEASE VIRUS

PRUEBA DE CAMPO Y EFICACIA DE LAS VACUNAS POLIVALENTES CONTRA LA ENFERMEDAD DE MAREK COMBINADAS CON UNA CEPA ATENUADA DEL VIRUS DE LA INFECCION DE LA BOLSA DE FABRICIO

Girish Sarma and Julio Cruz-Coy

Tri Bio Laboratories, Inc.
1805 Tapawingo Drive, Gainesville, GA 30501

RESUMEN

Se evaluó la seguridad de campo y la eficacia de 2 vacunas combinadas contra la infección de la bolsa de Fabricio y contra la enfermedad de Marek (HVT + IBD y HVT + SB - 1 + IBF) y varias vacunas polivalentes contra la enfermedad de Marek, en pollos tanto positivos como negativos a anticuerpos maternos (aves productoras de carne y aves productoras de huevo). Antes de su uso, las vacunas se reconstituyeron con su diluente estéril, de acuerdo a las instrucciones de los fabricantes y se inocularon subcutáneamente a los pollos de un día de edad. Con el objeto de evaluar la eficacia de las vacunas, los pollos vacunados y no vacunados se desafiaron con un virus virulento de la enfermedad de Marek (cepas RB1/B o MD-5) y del virus de la infección de la bolsa de Fabricio (cepa estándar de desafío). Las pruebas de seguridad en el campo se realizaron en pollos de engorda comerciales en diferentes áreas geográficas de Estados Unidos. Entre las vacunas polivalentes contra la enfermedad de Marek, las trivalentes fueron las que dieron las tasas de protección más elevadas cuando se desafiaron con los virus virulentos de la enfermedad de Marek. De las 2 combinaciones Marek-Gumboro, la vacuna que contenía al virus herpes de pavo más la cepa SB-1 más el VIBF proporcionó una protección significativamente mayor contra el desafío virulento con el virus de la enfermedad de Marek que la vacuna HVT + IBF. Sin embargo, ambas vacunas proporcionaron una protección excelente contra el desafío con el virus virulento de la IBF.

Field safety and efficacy of two combined bursal disease plus Marek's disease (MD) vaccines (HVT + IBD and HVT + SB - 1 + IBD) and several polyvalent MD vaccines were evaluated in both maternal antibody positive and negative chicks (both meat and egg type). Prior to use, the vaccines were diluted in sterile diluent as per manufacturer's directions and inoculated subcutaneously into one-day-old chicks. In order to evaluate the efficacy of the vaccines, the vaccinated and unvaccinated control birds were challenged against virulent MD (Strain RB1/B or MD-5) and IBD (standard challenge strain) viruses. Field safety trials were done in commercial broilers in different geographical areas of the country. Among the polyvalent MD vaccines, the trivalent vaccines provided the highest rate of protection when challenged against virulent MD viruses. Of the two MD plus IBD combined vaccines, HVT + SB-1 + IBD vaccine provided significantly higher protection against virulent MD virus challenge than the HVT + IBD vaccine. Both vaccines however, provided excellent protection against virulent IBD virus challenge.

REPRODUCIBILITY OF EFFICACY TESTS FOR MAREK'S DISEASE VACCINES

REPRODUCIBILIDAD DE LAS PRUEBAS DE EFICACIA DE LAS VACUNAS CONTRA LA ENFERMEDAD DE MAREK

R. L. Witter[A], L. D. Bacon[A], and R. M. Nordgren[B]

[A]USDA-Agricultural Research Service, Avian Disease and Oncology Laboratory
East Lansing, MI
[B]Solvay Animal Health, Mendota Heights, MN

RESUMEN

Se evaluaron los efectos de la cepa, del estado de anticuerpos maternos y del tipo de complejo mayor de histocompatibilidad (MHC, por sus siglas en inglés) del pollo huésped, así como la cepa y la preparación del virus vacunal, respecto a la eficacia protectora relativa de 2 virus vacunales de la enfermedad de Marek, serotipo 1. Se observó una cierta influencia de los anticuerpos del huésped y del estatus del MHC sobre la eficacia relativa de las vacunas problema. Aun cuando fue comparable la eficacia de 2 preparaciones de la vacuna elaborada con el virus de la enfermedad de Marek serotipo 1, sí se encontraron diferencias significativas entre las 2 preparaciones elaboradas con un segundo virus vacunal. Estos datos identifican importantes variables de prueba que sugieren la necesidad de la estandarización de los virus de reserva, requiriéndose también técnicas para el ensayo.

INTRODUCTION

In vivo assays to measure the comparative efficacy of Marek's disease (MD) vaccines are widely used but the percent protection often varies between replicates[2,3]. More importantly, efficacy rankings of vaccines may occasionally vary. This is disconcerting, especially when results obtained in different laboratories do not agree. This study was prompted by conflicting results on two different serotype 1 MD vaccines evaluated by the USDA-ARS Avian Disease and Oncology Laboratory (ADOL) and by a commercial vaccine producer. In our laboratory using 15x7 antibody (ab) + chickens, vaccine A consistently protected a higher proportion of chickens than vaccine B, whereas in the commercial laboratory using SPAFAS ab- chickens the converse relationship was found. The purpose of this study was to examine test variables that may account for this and other such differences.

MATERIALS AND METHODS

The major variables of the assay relate to vaccine virus, challenge virus or host chicken. Host chicken-related variables tested in these studies included the chicken line, ab status and major histocompatibility complex (MHC) type. The chicken types were an F_1 cross between ADOL lines $15I_5$ and 7_1 (15x7), SPAFAS, and a commercial white leghorn cross (WL-A). The 15x7 and SPAFAS chickens were free of maternal antibodies to MD (ab-). A second source of 15x7 chickens and the WL-A chickens were from parents immunized with MD vaccines of multiple serotypes and were considered to be positive for maternal antibodies (ab+). Although the 15x7 chickens were fixed at the B-locus (MHC), variation was expected in the SPAFAS and commercial cross chickens. Experimental chicks from these 2 latter groups were blood typed by hemagglutination at 3 weeks of age.

The vaccine viruses were both licensed serotype 1 MD vaccines, and are designated A and B, respectively, as the purpose of this paper is to evaluate assay variables rather than vaccines. Preparations of both vaccines were prepared at ADOL (ADOL-A and ADOL-B) and the commercial laboratory (COM-A and COM-B). There were some differences in origin and passage history between the 2 preparations of the same vaccine strain.

Three replicate trials were conducted where the 4 vaccine preparations were administered to each of 4 chicken types at a dose of 2000 plaque-forming-units (PFU) at 1 day of age by the intra-abdominal route. Groups of about 17 chickens were challenged at 5 days post-vaccination with 500 PFU of the virulent RB1B strain of MD virus. Groups of 5 vaccinated, nonchallenged chickens were bled at 8 days post-vaccination and tested for vaccine viremia by inoculation of 10^6 buffy coat cells into chicken embryo cell cultures. The experiment was terminated at 8 weeks post-challenge. Chickens were evaluated for MD lesions by gross necropsy and the percent protection was tabulated as previously described[2].

RESULTS AND DISCUSSION

The strains of chicken appeared to differ in susceptibility to MD challenge (Table 1) but, interestingly, these differences did not significantly influence the percent protection (Table 2). Protection of the relatively resistant WL-A chickens (66%) was comparable to those obtained in more susceptible strains (76-87%).

The ab status of chickens markedly influenced vaccine virus viremia (data not shown) in agreement with earlier reports[4]. In 15x7 chickens, the presence of ab seemed more detrimental to the efficacy of vaccine B than vaccine A (Table 2).

In WL-A chickens, MHC haplotypes 2/15 and 2/21 were equally represented. Although the mean protection of all 4 vaccines in the 2 haplotypes did not differ, some effects on individual vaccines may be apparent. For example, protection by COM-A vaccine was least in WL-A 2/15 chickens but best in WL-A 2/21 chickens. Conversely, COM-B vaccine ranked first in 2/15 chickens but last in 2/21 chickens. In SPAFAS chickens, a large number of haplotypes were present. Analysis of data pooled from all 4 vaccines on the 4 major haplotypes, 15/15, 15/19, 15/21 and 19/21, revealed no differences in MD susceptibility or protection. This is in agreement with previous studies where B15 and B21 were comparable for MD protection by serotype 1 vaccines[1]. Based on our comparisons of 15x7 chickens with SPAFAS or WL-A chickens, it does not appear that chickens fixed at the B-locus better differentiated the efficacy of serotype 1 MD vaccines than chickens of mixed haplotypes.

Table 1. MD Lesion Response

Chicken	Percent MD lesions in chickens vaccinated with				
	ADOL-A	COM-A	ADOL-B	COM-B	None
15x7 ab-	14.6	4.4	6.4	21.7	93.2 b
15x7 ab+	12.8	10.6	19.6	34.0	81.3 b
SPAFAS ab-	15.2	12.8	11.4	36.2	91.5 b
WL-A ab+	9.1	14.9	7.1	15.6	34.0 a

Means followed by same letter designation do not differ ($P > 0.05$)

The efficacy of 2 preparations of vaccine A appeared comparable in these trials whereas the two preparations of vaccine B differed (Table 2). Similar conclusions were supported by the viremia data (data not shown). The 2 preparations of vaccine A were from a common ancestor stock but had been passaged independently in different laboratories. The vaccine COM-B was derived from ADOL-B and had been subjected to further passage. Passage levels were not identical between the 2 preparations of either vaccine. One may conclude that propagation techniques, including passage level, may influence efficacy but does not always do so. However, the possibility that vaccine efficacy may be altered by additional propagation in different laboratories should be carefully controlled.

Table 2. Percent protection.

Chicken	Percent protection in chickens vaccinated with				
	ADOL-A	COM-A	ADOL-B	COM-B	mean
15x7 ab-	84	95	93	77	87 a
15x7 ab+	84	87	76	58	76 a
SPAFAS ab-	83	86	88	60	79 a
WL-A ab+	73	56	79	54	66 a
mean	83 b	86 b	85 b	64 a	

Means followed by same letter designation do not differ ($P > 0.05$)

In conclusion, several variables have been identified that may influence vaccine efficacy tests and the ranking of different MD vaccines. However, even when such variables were standardized, ADOL assays failed to confirm earlier results in the commercial laboratory. Although the commercial laboratory had originally found that protection of vaccine B $\geq$ vaccine A, when the tests were duplicated at ADOL using the same chickens and virus stocks, we found vaccine A > vaccine B. Furthermore, results of trials conducted at ADOL in 2 different time periods also differed. Our earlier data with ADOL-produced vaccines using 15x7 ab+ chickens indicated that A>B whereas the % protection by the 2 vaccines did not differ significantly in the present trials.

Reproducibility of efficacy test data will continue to be a problem until more is known about the variable factors that affect results. Until that time, however, one should appreciate the potential for variation and the limitations of the assay system in detecting small differences in protective efficacy between MD vaccines. Probably the best approach is to standardize as many variables as possible and to obtain data from many replicates before making conclusions.

REFERENCES

1. Bacon, L. D. and R. L. Witter. Serotype specificity of B-haplotype influence on the relative efficacy of Marek's disease vaccines. Avian Dis. 38:65-71. 1994.
2. Witter, R. L. Influence of serotype and virus strain on synergism between Marek's disease vaccine viruses. Avian Pathol. 21:601-614. 1992.
3. Witter, R. L. Safety and comparative efficacy of the CVI988/Rispens vaccine strain. In: 4th International Symposium on Marek's Disease, 19th World's Poultry Congress, Vol. 1. World's Poultry Science Assoc. Amsterdam. pp. 315-319. 1992.
4. Witter, R. L., R. F. Silva, and L. F. Lee. New serotype 2 and attenuated serotype 1 Marek's disease vaccine viruses: selected biological and molecular characteristics. Avian Dis. 31:829-840. 1987.

CONTROL OF MAREK'S DISEASE IN THE UNITED STATES AND SOME OTHER COUNTRIES BY THE USE OF MAREK'S DISEASE VACCINE, RISPENS STRAIN

CONTROL DE LA ENFERMEDAD DE MAREK EN ESTADOS UNIDOS Y EN ALGUNOS OTROS PAISES MEDIANTE EL USO DE LA CEPA VACUNAL RISPENS

S. Kumar, Robert Liauw, and W. Boclair

Vineland Laboratories, IGI, Inc.
Vineland, NJ 08360 USA

RESUMEN

En diversas áreas del país con elevada densidad de población de pollos de engorda se han incrementado dramáticamente los decomisos por enfermedad de Marek desde 1992. La introducción de la cepa Rispens tipo 1 en 1993 (cepa C/R6) y más recientemente de vacunas de bajo pasaje elaboradas con el virus del Instituto Central Veterinario 988 (CVI 988) ha disminuido grandemente las tasas de decomisos en estas granjas. Presentaremos los estudios de eficacia comparativa realizados en 3 plantas distintas de incubación y en 3 zonas geográficas diferentes. Los estudios indican que las vacunas elaboradas con la cepa CVI 988 en combinación con el virus herpes del pavo (HVT, por sus siglas en inglés) protegieron a las aves vacunadas mejor que la vacuna combinada HVT+SB1. Más aún, de las 2 vacunas estudiadas elaboradas con la cepa Rispens CVI 988, una protegió a las aves vacunadas mejor que la otra.

INTRODUCTION

Increased challenge exposure with Marek's disease (MD) in high density broiler/roaster production areas (particularly the Delmarva Peninsula) has been reported[1].

The Marek's disease virus isolated and attenuated by Bart Rispens in the Netherlands has been used successfully in different parts of the world. It was a virus of low pathogenicity isolated from a clinically healthy flock of chickens and was designated as Strain CVI 988. Earlier reports by Bulow[2] on the pathogenicity of CVI 988 in susceptible Rhode Island red chickens prevented the importation of this strain of virus into the United States. In the interim, cloned viruses derived from the original virus were developed and were named CVI 988C and CVI 988 C/R6. Both of these virus strains were subsequently imported into the United States. Vaccines were licensed but it was the general impression among the poultry veterinarians that the CVI 988C vaccine was not acceptable. Subsequently, the CVI 988 C/R6 was licensed and is being used on a limited scale. More recently, Witter and co-workers[3] studied the efficacy and safety of the low passage CVI 988 viruses as well as that of R2/23 vaccines. They indicated that each of these 2 serotype 1 vaccines generally supported the safety and efficacy of the serotype 1 class of MD vaccines.

To date 3 Marek's vaccines of the CVI 988 type have been licensed by the United States Department of Agriculture. The safety of one of the licensed CVI 988 vaccines (vaccine A) has been proved conclusively. Over 500 million chicks have been vaccinated in the United

States alone with no adverse reports on the safety of the vaccine. This paper will present data on the efficacy of CVI 988 vaccines and turkey herpesvirus (HVT)+SB1 vaccine and compare the 2 licensed CVI 988 vaccines for their efficacy under field conditions.

RESULTS AND DISCUSSION

Comparative condemnation data after use of vaccine A versus vaccine B are presented in Table 1. At hatchery 1, chicks were vaccinated with either A or B vaccine on alternate weeks for a period of 4 weeks and placed in farms demonstrating a history of high Marek's challenge. Both CVI 988 vaccines were used in combination with HVT vaccines. Similar dosage was used and all chicks were machine vaccinated subcutaneously at 1 day of age. The broiler chicks vaccinated belonged to feather sexable high yielding birds raised in the Delmarva area.

It is apparent from Table 1 that birds vaccinated with HVT+Rispens vaccine A outperformed birds vaccinated with HVT+Rispens vaccine B. Birds vaccinated with either vaccine A and vaccine B outperformed birds vaccinated with the HVT+SB1 vaccine.

Table 1. Comparative trial with two Rispens Marek's disease vaccines (A and B) used in combination with HVT in hatchery 1.

		% Condemnations		
Vaccine used	Number of Flocks	Leucosis	Sep Tox	Total
HVT+SB1	13	0.998	0.41	1.831
Rispens+HVT (A)	18	0.308	0.4	1.362
	12	0.61	0.28	1.171
Rispens+HVT (B)	10	0.873	0.29	1.569
	15	0.636	0.50	1.985

Based on the preliminary results presented above further vaccinations of broilers of feather sexable high yielding breeds at hatcheries 1 and 2 were performed with Rispens A+HVT vaccine. In 1995, 2.5 million broilers were vaccinated subcutaneously with this vaccine and raised in the Delmarva area. Leucosis and total condemnation data from hatchery 1 for September 1995 indicated 0.032% leucosis and .074% total condemnations. For hatchery 2 the corresponding values were 0.054% leucosis and 0.619% total condemnation. For October for hatchery 1, the number of birds exhibiting leucosis was 0.042% with a total condemnation of 1.025%. For hatchery 2, the corresponding values observed were 0.048% and 0.634%, respectively. For the month of November 1995 for hatchery 1, the number of birds exhibiting leucosis was 0.139 and total condemnation 1.487 and for hatchery 2 the number of birds exhibiting leucosis was 0.140 and total condemnations was 1.283. Partial results for the month of December 1995 indicated values of 0.058 and 1.354 for hatchery 1 and 0.119 and 1.231 for hatchery 2.

Rispens vaccine A was used at hatchery 3 using an HVT+SB1 or HVT+SB1+C/R6 combination. In 1993, this hatchery used only HVT+SB1 combination vaccine. In 1994 HVT+SB1+CVI 988 C/R6 vaccine was used and finally in 1995 HVT+SB1+Rispens (vaccine A) was used. The total number of birds vaccinated at this hatchery was 1.7 million in 1993 and 1994, and 3.3 million in 1995. All vaccinations were done using the Embrex in ovo vaccination method. The birds were held for 10 weeks before slaughter. The results of average condemnations for a 4 month period from 1993 - 1995 due to leucosis are presented in Table 2. It is apparent that at hatchery 3 which used HVT+SB1 in the year 1993 condemnations were very high. During 1994 with the use of CVI 988 C/R6 the condemnations came down in comparison to 1993 when only HVT+SB1 was used. During 1995 when low passage Rispens (vaccine A) was used with HVT+SB1 the condemnations were the lowest observed.

Table 2. Leucosis condemnations at hatchery 3 during 1993-1995.

Vaccine Used	Year	Sep 95	Oct 95	Nov 95	Dec 95
HVT+SB1	1993	0.30	0.44	0.79	0.70
HVT+SB1+CR6	1994	0.11	0.19	0.31	0.52
HVT+SB1+ Rispens (A)	1995	0.08	0.06	0.08	0.17

Additional data from other field trials done in different areas of the United States involving high Marek's challenge flocks are presented in Table 3. It is clear from the table that Rispens (vaccine A) in combination with HVT+SB1 was able to control the condemnations related to Marek's Disease to a significantly greater extent.

Table 3. Field trial data on the use of Rispens vaccine (A) in different areas of the United States in flocks demonstrating high Marek's challenge.

Trial No.	Vaccine Used*	Total number of birds in flock	% Condemnations	
			Leucosis	Total
1	HVT+SB1	54,000	0.82	1.17
	HVT+SB1 +Rispens (A)	49,000	0.01	1.36
2	HVT+SB1	81,000	0.56	3.01
	HVT+SB1 +Rispens (A)	79,000	0.02	1.23
3	HVT+SB1	81,000	0.21	0.72
	HVT+SB1 +Rispens (A)	79,000	0.02	0.35

*In all trials vaccinations were conducted on the same farms on consecutive flocks.

Additional trials done with layers have shown excellent results with significant reduction in grow-out mortality. Favorable results were obtained in similar studies done in Holland, Columbia and Taiwan with Rispens vaccine A.

REFERENCES

1. Rosenberger, J.K. Control of Marek's Disease. Vineland Update. 52. 1995.
2. Bulow, V.V. Further Characteristics of the CVI 988 strain of Marek's Disease Virus. Avian Path. 6:395-40. 1977.
3. Witter, R.L., L.F. Lee, A.M. Fadly. Characteristics of CVI 988/Rispens and R2/23, Two prototype vaccine strains of serotype 1 Marek's Disease Virus. Avian Dis. 39:269-284. 1995.

EVALUATION OF ELISA TITERS TO INFECTIOUS LARYNGOTRACHEITIS

EVALUACION DE LOS TITULOS DE ELISA CONTRA LA LARINGOTRAQUEITIS INFECCIOSA

Jean E. Sander and Stephan G. Thayer

Department of Avian Medicine, College of Veterinary Medicine
The University of Georgia, Athens, Georgia 30602-4875

RESUMEN

La laringotraqueítis infecciosa es una enfermedad respiratoria que puede causar grandes pérdidas económicas en áreas de población avícola densa. Entre las vacunas disponibles comercialmente existen las derivadas de cultivo de tejidos y las originadas en embrión de pollo. Para determinar los niveles de anticuerpos asociados a la administración de estas vacunas, al desafío de campo y los niveles de protección, se utilizaron 7 grupos de 33 ó 34 pollos leghorn libres de patógenos específicos que se alojaron en unidades de aislamiento con bioseguridad. Se emplearon también grupos individuales de pollos que sirvieron como testigos negativos o testigos vacunados (una dosis completa por ave de vacuna originada en embrión de pollo o en cultivo de tejidos, administradas mediante instilación ocular) y se desafiaron mediante la administración intratraqueal de una cepa proporcionada por el Departamento de Agricultura de Estados Unidos, con un título de $10^{4.1}$ DIE_{50}, o bien pollos no vacunados pero desafiados con la cepa viral del USDA a varias dosis ($10^{2.1}$, $10^{3.1}$ ó $10^{4.1}$ DIE_{50}). Los pollos de todos los grupos se sangraron cada semana y su suero se sometió a pruebas de anticuerpos utilizando una prueba de ELISA disponible comercialmente. La respuesta de anticuerpos a la aplicación de la vacuna originada en embrión de pollo dio como resultado un título medio geométrico de 400 a 600, que demostró ser protectivo contra un severo desafío de campo. Los testigos negativos no presentaron títulos mientras que los pollos vacunados y/o desafiados mostraron títulos detectables dentro de las 2 semanas posteriores a la exposición y dichos títulos permanecieron altos durante la siguientes 4 a 7 semanas. La mortalidad se inició a los 3 días y continuó hasta los 10 días postdesafío.

Infectious laryngotracheitis (LT), an upper respiratory disease of chickens, can cause serious economic loss in areas of high chicken density. Commercially available vaccines include both a tissue culture derived (TCO) and a chicken embryo derived (CEO) virus. To determine the antibody levels associated with vaccine administration, field challenge, and protection, 7 groups of 33-34 specific pathogen free leghorn chickens were house in biosecured isolation units. Individual groups served as either negative controls, vaccinated (1 full dose per bird of CEO or TCO administered by eyedrop) and challenged (intratracheal administration with USDA strain LT at $10^{4.1}$ EID_{50}), or unvaccinated/challenged with USDA strain of LT at various dose levels ($10^{2.1}$, $10^{3.1}$, or $10^{4.1}$ EID_{50}). Chickens in each group were bled weekly and serum tested for antibody using the commercially available ELISA test kit. The antibody response using CEO vaccine resulted in a titer of 400 to 600 GMT which proved to be protective against severe field challenge. Negative controls had no titers while vaccinated and/or challenged chickens had detectable titers within 2 weeks of exposure, and these titers remained high for the next 4-7 weeks. Mortality began at 3 days post challenge and continued for up to 10 days.

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

COINFECCION VIRAL DEL VIRUS DE LARINGOTRAQUEITIS INFECCIOSA (VLTI) CON EL DE BRONQUITIS INFECCIOSA (BI), VIRUS DE LA ENFERMEDAD DE NEWCASTLE (VEN) Y CON ADENOVIRUS EN POLLOS DE ENGORDA

INFECTIOUS LARYNGOTRACHEITIS VIRUS, INFECTIOUS BRONCHITIS, NEWCASTLE DISEASE VIRUS AND ADENOVIRUS COINFECTION IN BROILERS

Salem, M.[1], E.M. Odor[1], C. Pope[2], J. Rosenberger[2], S. Cloud[2], and M. Murphy[2]

[1]Poultry Diagnostic Lab, RD #6, Box 48 Georgetown, DE 19947
[2]Department of Animal and Food Science, University of Delaware, Newark, DE 19713

ABSTRACT

More than 400 infectious laryngotracheitis (ILT) cases were reported in broilers in the Delmarva peninsula. In addition to typical ILT lesions, lesions corresponding to other viral respiratory diseases were reported. Mortality average was higher in dually ILT/infectious bronchitis (IB) infected birds. Fifty eight IB virus (IBV), 8 Newcastle disease virus (NDV) and 30 adenovirus isolations were confirmed in coexistence with ILT virus (ILTV). Biosecurity without vaccination was not enough to prevent spread of ILTV. The spray method of vaccination could not provide enough protection. Nevertheless, most full-dose commercial vaccines administered in the drinking water at 2 or 3 weeks were effective against experimental challenge. Vaccine outbreaks were observed 3 or more weeks after application, probably due to reactivation of ILTV vaccine virus after IBV, NDV, adenovirus or ammonia challenge.

REPORTE DE CASO

Sorprendéntemente la epizootia del año en el area de Delmarva en el invierno 1994-1995 fue LTI. Esta enfermedad no habia sido diagnosticada en esta area avícola en casi 2 años, por tal razón, la vacunación contra LTI no formaba parte del programa de los pollos de engorda o parrilleros. La población avícola de Delmarva con exepción de las reproductoras era totalmente susceptible. El primer caso de LTI ocurrió en Septiembre de 1994. Los es fuerzos coordinados de la industria avícola para contener el brote con bioseguridad y sin vacunación no dieron resultado. La epizootia se difundió lentamente de una area reducida de aproximadamente 10 km cuadrados al principio, creciendo concéntricamente

para después extenderse a toda la península con predominio en la zona centro norte. La cima de la epizootia ocurrio en Diciembre y prácticamente desapareció en Abril de 1995. (Fig 1, Cuadro 1). Más de 400 casos de LTI se presentaron en este periodo. La mayoría de los diagnósticos se hicieron por aislamiento viral y/o histopatología y muy pocos clínicamente en el campo. Desde el caso inicial resultó interesante observar que además de las lesiones clásicas de LTI tales como traqueitis hemorrágica, formación de pseudomembranas traqueales, edema traqueal y conjuntivitis, se observaron en forma clara, lesiones en la parte baja del aparato respiratorio. Estas lesiones se observaron en 39% de los casos diagnósticadas como LTI. Los lesiones del aparato respiratorio bajo fueron pneumonia o pleuropneumonia y aerosaculitis torásica y/o abdominal de moderada a severa. Los diagnósticos clínicos de LTI coexistiendo con BI, con enfermedad de Newcastle (EN), o con adenovirus fueron confirmados con aislamiento viral. De los casos totales de LTI los diagnósticos de coinfección con BI fueron 58. Los rangos de mortalidad fueron de 1 a 50 por cada mil pollos diariamente al tiempo del envío del caso, con un promedio de 12.6/1000. Los casos de LTI coexistiendo con IB fueron 8 con un rango de mortalidad de 1 a 8/1000 y con un promedio de 5.0/1000 diario. Los casos de LTI coexistiendo con adenovirus (los adenovirus aislados no fueron serotipeados) fueron 30 con un rango de mortalidad de 2 a 35/1000 y con un promedio de 5.7/1000 diario. Los casos con aislamiento de VLTI sólo, fueron > 267 con un rango de mortalidad de 1 a 40/1000 y con un promedio de mortalidad de 7.7/1000.

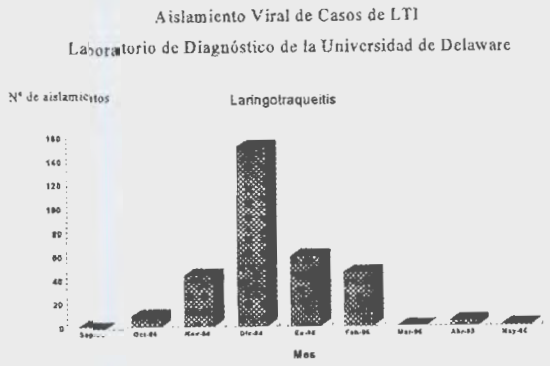
VACUNACION

La vacunación contra LTI se inició en Octubre de 1994 con una decisión conjunta de la industria avícola de vacunar en forma localizada al rededor del brote y se extendió gradualmente a todo la peninsula. Para Enero de 1995 todas las compañías vacunaban todas sus parvadas contra LTI. Al inicio se utilisaron como vías de aplicación las del agua y aspersión, pero más delante sólo se utilisó el método del agua de bebida a las 2 semanas de edad con vacunas de virus de embrión de pollo. Estudios de titulación y de desafío hechas en la Universidad de Delaware tomando aves de diferentes compañías y diferentes métodos de vacunación mostraron lo siguiente: a) El método de aspersión tal como se utilisó en el campo no da protección adecuada. b) Una vacuna específica no dió protección adecuada en el agua de bebida. c) La vacunación simultanea contra LTI, BI y EN en el agua de bebida a las 2 o a las 3 semanas de edad no interfirió con la protección al desafío contra VLTI. Sin embargo la protección contra el desafío contra BI y EN bajo este programa no se ha definido. d) Casi todas las vacunas comerciales contra LTI protegieron contra el desafío cuando se aplicaron a dosis completa o cuando la dosis se repite a las 2 horas o al siguiente día por vía agua de bebida. (La mayoria de las vacunas no habían sido aprobadas para aplicarse por la via del agua de bebeda en los E.U.).

BROTES DE VACUNA

Se presentaron muchos casos de aves con signos clínicos de LTI a las 3 o mas semanas pos vacunación contra LTI, en estos casos se sospechó de una reactivación del VLTI vacunal por coinfección con otros virus respiratorios como BI, EN y adenovirus, o por los efectos irritantes de amoniaco excesivo (comun en las granjas). La mayoria de éstos casos también mostraran lesiones consistentes con BI y/o EN, o keratoconjuntivitis por amoniaco. Además la mortalidad no se incrementó en forma geométrica como ocurre en los brotes calientes de campo, ésta ráramente excede a 4/1000 por dia, y dura 4 a 5 dias con reducción al 3er día. Histológicamente se observo menor daño en los tejidos que en los casos de aves no vacunadas.

Figura 1



Cuadro 1

Aislamientos Virales en 1994

Mes	VBI	VBI + otros	VEN	VIBF	VLTI	VLTI + otros
Enero	10	7	4	0	0	0
Febrero	7	3	4	7	0	0
Marzo	5	1	3	0	0	0
Abril	3	4	3	0	0	0
Mayo	1	1	1	1	0	0
Junio	0	1	0	1	0	0
Julio	1	1	0	0	0	0
Agosto	4	2	1	0	0	0
Septiembre	1	0	0	0	0	1
Octubre	5	2	0	0	9	12
Noviembre	7	3	0	1	43	29
Diciembre	10	3	1	0	151	28
Total	54	28	17	10	203	70

TRACHEAL CRYPTOSPORIDIOSIS AND HERPESVIRUS INFECTIONS LARYNGOTRACHEITIS: AN EXPLORATORY STUDY

ESTUDIO EXPLORATORIO DE LA CRIPTOSPORIDIOSIS TRAQUEAL Y LA INFECCION CON EL VIRUS HERPES DE LA LARINGOTRAQUEITIS

John Brown[A] and Mark A. Goodwin[B]

[A]University of Georgia, School of Veterinary Medicine Department of Medical Microbiology, Athens, GA 30602
[B]Georgia Poultry Laboratory, P.O. Box 20, Oakwood, GA

RESUMEN

En 1994, se presentó repentinamente una alta incidencia de diagnósticos histológicos de criptosporidiosis traqueal, seguidos inmediatamente de un brote de infecciones por el virus herpes de la laringotraqueítis. Por esta causa investigamos nuestra base de datos médicos de 1989 a 1995. El análisis de estos datos determinó que existió una significativa regresión lineal ($F=49.5$, $df=1/5$, $P<0.001$) de los casos de laringotraqueítis sobre el porcentaje de casos de criptosporidiosis. Se observó una correlación positiva significativa ($r=0.99$, $n=7$, $t=6.8$, $P<0.001$) entre la criptosporidiosis y la laringotraqueítis infecciosa. Debe entenderse con claridad, independientemente de la fuerte relación que pueda demostrarse, de que este hallazgo de ninguna manera establece una situación causa-efecto. Sin embargo, estos resultados sugieren que valdría la pena hacer un estudio analítico de ambas enfermedades.

In 1994, a sudden high frequency of histologic diagnosis of tracheal cryptosporidiosis ("crypto") was followed immediately by an outbreak of herpesvirus infections laryngotracheitis ("ILT"). For this reason, we searched our medical data base for 1989 - 1995. Analysis of these data determined that the percent of cases of ILT regresses with significant ($F=49.5$, $df=1/5$, $p<0.001$) linearity on the percent of cases of crypto. There was a significant ($r=0.99$, $n=7$, $t=6.8$, $p<0.001$) positive correlation between crypto and ILT. It should be clearly understood that no matter how strong a relationship can be demonstrated that this in no way establishes "cause and effect." However, these results suggest that an analytical study involving crypto and ILT might be profitable.

(Full paper submitted to *Poultry Science*.)

UTILIZACION DE NIVELES MAXIMOS DE INCLUSION DE SOYA INTEGRAL EN DIETAS PARA POLLO DE ENGORDE

UTILIZE FULL FAT SOYBEAM MEAL IN POULTRY RATIONS

Navarro H.[1/], Forat M.[2/], Casarín A.[3/], López C.[4/] y Miles R.[5/]

1/ Asociación Americana de Soya. Rio Sena 26, México D.F. 06500.,
2/ Inst. Int. de Inv. Animal Querétaro. Mex.,
3/ Servicios Especiales en Nutrición Animal Qro. Mex.
4/ FMVZ, UNAM, Mex.
5/ Univ. of Florida, Gainesville, USA

SUMMARY

Given the increasing interest in Latin America to utilize fullfat soybean meal (FFSBM) in poultry rations, a 15, 25 and 35% inclusion rate of FFSBM was evaluated in broiler growing and finishing diets. The performance was evaluated by sex, as well as with all the birds together. The inclusion of up to 35% did not

affect any of the production parameters evaluated (daily feed consumption, daily weight gain, feed conversion and productivity index) for male growing and finishing broilers, or when data was analyzed with both sexes together. However, a statistical significant difference was registered among the four experimental groups of female birds during the growing phase. The performance of the female birds during the finishing period was similar to the male group. A 35% inclusion rate is a nutritional and economical feasible alternative in broiler diets. The elaboration of male and female diets might be advisable in some occasions.

INTRODUCCION

La utilización de la soya como fuente principal de proteína en la alimentación de las aves, ha cobrado gran importancia para cubrir la creciente demanda en los requerimientos nutricionales resultado del mejoramiento genético. Este avance permite lograr los parámetros productivos que hacen que el sector avícola siga siendo competitivo. Muchas de las economías del mundo en busca de su modernización han abierto sus fronteras a bienes y servicios del exterior. La avicultura no ha podido sustraerse a esta corriente, buscando una nueva estrategia en la compra, procesamiento y utilización de insumos que permitan diferentes alternativas, como el frijol de soya (1). De éste se obtiene la soya integral (SI), que se caracteriza por su alta concentración proteínica (37%) y energética (3,800 kcal de E.M./kg). Esto, aunado a los costos y a la calidad con que en la mayoría de los casos se obtiene, plantea como nueva incógnita para la industria, el saber hasta cuanto incluir de este ingrediente y obtener la mayor rentabilidad en las aves.

Al igual que la harina de soya (HS), la SI debe someterse a un tratamiento térmico antes de utilizarse, incluso con aquellas variedades de soya que presentan niveles bajos de inhibidores de tripsina (2, 6). Para que la proteína de soya sea altamente disponible, el valor de la actividad ureásica (AU) debe ser bajo (0.02 a 0.5) y el de solubilidad de la proteína entre un 75 y 85 % (3).

Cuando se utilizan niveles medianos o altos de SI en las dietas de pollos de engorde (PE), se logra satisfacer en gran medida el alto requerimento de energía y en su totalidad el de ac. linoleico, en cualquiera de las fases de alimentación. Como ventaja adicional puede incorporarse en aquellas plantas donde no se pueden agregar grasas líquidas en forma eficiente, o cuando la disponibilidad y calidad de los granos no es del nivel deseado. En la Comunidad Económica Europea, como resultado del alto costo de los granos cerealeros, el nivel de consumo de SI alcanza niveles de hasta 2 millones de toneladas/año (4).

Con esta perspectiva, se realizó la presente investigación con el objetivo de evaluar el efecto de la inclusión de la SI a diferentes niveles en dietas de PE, sobre los principales parámetros productivos y considerando que los últimos trabajos a este respecto se realizaron hace más de veinte años (5).

MATERIAL Y METODOS

El estudio se realizó en el IIIA, localizado en Querétaro, Mex. a 1800 msnm. Se utilizaron 1,280 pollos de engorde Arbor Acres de ambos sexos, distribuidos al azar en cuatro tratamientos con ocho repeticiones (4 de hembras y 4 de machos) de 40 aves cada una.

La dieta de iniciación (1-14 días), fue proporcionada a todos los tratamientos, (siendo la HS la principal fuente de proteína) y con una composición nutricional de: 23% de PC, 2950 Kcal/kg de EM, 1.28% de lisina, 0.6% de metionina, 0.96% de Met+Cis, 0.28% de triptófano, 0.87% de treonina y 1.42% de ac. linoléico. La SI utilizada fue obtenida tras la extrusión seca del frijol soya, y el análisis bromatológico arrojó un valor de 37% de PC y 20% de grasa, 0.35 de AU y 92% de solubilidad. Por el elevado contenido de cascarilla de la SI, los valores de AU y solubilidad tienden a ser más altos que los registrados en la HS.

Del dia 15 al 35 correspondió la fase de crecimiento, con cuatro raciones isocalóricas e isoproteícas: Una dieta control en base a HS y tres con 15, 25 y 35 % de SI respectivamente. Su composición nutricional fue 21% de PC, 3170 Kcal/kg de EM, 1.15% de lisina, 0.52% de metionina, 0.85% de Met+Cist, 0.25 % de triptófano, 0.82 % de treonina, 3.68 % de ac. linoléico, 40 ppm de xantofilas amarillas y 20 ppm de rojas.

Del dia 36 al 54 correspondió la fase de finalización, con cuatro raciones isocalóricas e isoproteícas: Una dieta control en base a HS y tres con 15, 25 y 35 % de SI respectivamente. Su composición fue 19% de PC, 3180 Kcal/kg de EM, 1.0% de lisina, 0.46% de metionina, 0.76% de Met+Cist, 3.78% de ac. linoléico, 40 ppm de xantofilas amarilllas y 20 ppm de rojas. Esta baja concentración de pigmentos para el mercado mexicano se realizó con la intención de evitar una saturación de pigmento y poder observar cualquier variación en el nivel de pigmentación, relacionada con el nivel de inclusión de SI.

La medición de la pigmentación se realizó sobre la pechuga, en canal caliente y húmeda y con escaldado a 520C. Se tomaron 4 aves/repeticion y utilizando el Reflectómetro Minolta modelo 301 con lenguaje CIE L*a*b*. El peso de la canal se realizó con visceras (método usual de mercadeo en algunas regiones de México). Para determinar el peso de la grasa abdominal, se separó el cojinete adiposo abdominal.

El análisis estadístico se realizó utilizando el paquete Number Cruncher Statistical System 1988.

RESULTADOS

Tras el análisis estadístico de la información generada, se presentan los resultados obtenidos al final de cada fase de alimentación y al término del periodo experimental.

Los valores medios de los parámetros analizados a los 54 días de edad para pollos mixtos, no muestran significancia estadística a un intervalo de confianza del 95% ($P>0.05$) para ninguna de las variables presentadas en el cuadro 1. Así mismo numéricamente, estos valores no indícan una tendencia definida respecto a los diferentes niveles de inclusión de la SI. Por lo que existe una equivalencia entre los tratamientos, independientemente del nivel de adición de la SI. De lo que se desprende que en la práctica es factible utilizar niveles tan altos como los evaluados en este estudio. Al analizar la información referente a los machos en las fases de crecimiento y finalización, no se observó significancia en los valores medios de las variables estudiadas (cuadro 2). Esta información concuerda con los resultados obtenidos para las aves mixtas al final del periodo experimental (cuadro 1).

En el caso de las hembras al analizar las tres variables durante el periodo de crecimiento si hubo una respuesta estadística ($P<0.05$), como se presenta en el cuadro 3. Registrándose un mejor comportamiento productivo en el grupo control (menor consumo de alimento/ave/día, mayor ganancia de peso/ave/día y menor índice de conversión), el cual fue diferente a los tratamiento donde se incluyó la inclusión de 35% de SI. Esta situación es difícil de explicar, ya que las concentraciones intermedias de 15 y 25 % de SI, tuvieron un menor desempeño, no siguiendo una respuesta lineal. Sin embargo, es importante señalar que estas diferencias no se observaron en el periodo de finalización, donde la tendencia en el comportamiento, fue estadísticamente similar a los pollos machos (cuadro 3).

Utilizando un análisis descriptivo para los costos de producción, se observa en el cuadro 4 que las aves alimentadas con raciones de crecimiento y finalización conteniendo un 25% de SI, obtuvieron el mejor retorno económico. Sin embargo, esta diferencia en relación a los otros 3 tratamientos fue marginal. Por lo anterior, puede decirse que aún con niveles de 35% de adición de SI, el costo por concepto de alimentación resulta atractivo y en competitividad económica respecto a las dietas tradicionales que no la incluyen.

DISCUSION

1) La utilización de SI en niveles de hasta 35% de inclusión, no afecta los principales indicadores productivos del PE, conservandose similares a los obtenidos en dietas sin SI.

2) El uso de SI en dietas para PE permite contar con la opción de substituir parcial o totalmente otras fuentes energéticas como aceites vegetales o grasas de orígen animal, ya que a niveles elevados de SI se cubre en gran medida la totalidad de la necesidad energetica.

3) Los niveles de pigmentación en piel, no se ven afectados en función al incremento en la utilización de SI.

4) La condición de la grasa abdominal tampoco se ve afectada por los distintos niveles de SI en la dieta. De aquí se desprende que al no aumentar la grasa abdominal, aumenta el rendimiento en canal de las aves.

5) En cuanto al costo por la utilizacion de SI, aún en niveles de inclusion elevados (35 %), este resulta atractivo y en competitividad económica respecto a las dietas tradicionales sin SI.

6) Con las diferencias en cuanto a consumo diario de alimento, ganancia diaria de peso y conversión alimenticia que se observaron en el periodo de crecimiento, se pone de manifiesto la necesidad de contar con dietas para hembras y para machos. Esto permite que al manejar criterios distintos de formulación, se optimize el uso de los ingredientes y se mejore el comportamiento productivo de las aves.

BIBLIOGRAFIA

1. Buitrago J.A. Soya integral en alimentación de aves. Asociación Americana de Soya Cali, Colombia. 1992.
2. Herkelman, K.L., G.L., Cromwell, T.S. Stahly, and T.W. Pfeiffer. Utilization of low trypsin inhibitor soybeans by pigs and poultry. Ky. Swine Res. Rep.- Progress Rep. 321:33-36. 1989.
3. Lepley, K. Fullfat soybean meal in poultry and livestock feeds. American Soybean Association, St. Louis Mo., U.S.A. 1984.
4. Monari, S. Fullfat Soya Handbook. American Soybean Association, Brussels, Belgium. 1990.
5. Waldroup, P.W. and T. Cotton. Maximum usage of cooked full-fat soybeans in all-mash broiler diets. Poult. Sci. 53:677-680. 1974.
6. Zhang, Y., M. Parsons, and T. Hymowitz. Effect of soybeans varying in trypsin inhibitor content on performance of laying hens. Poult. Sci. 70:2210-2213. 1991.

Cuadro 1- PARAMETROS OBTENIDOS A LOS 54 DIAS DE EDAD EN POLLOS MIXTOS.

TRATAM	CONSUMO/ AVE/DIA	GANANCIA PESO/DIA	INDICE CONVER	INDICE PRODUCT 1/	color rojo	color amarillo	GRASA ABDOM	PESO CANAL
CONTROL	107.4	48.5	2.214	186	3.32	34.37	64.1	2.302
15%	105.9	47.5	2.229	180	3.27	34.62	67.9	2.303
25%	103.2	46.3	2.228	175	3.37	34.84	62.1	2.275
35%	105.8	46.9	2.255	177	3.44	34.30	61.5	2.306
Prob.	P>0.05	P>0.05	P>0.05	P>0.05	P>0.05	P>0.05	P>0.05	P>0.05

1/ Indice de productividad = A x V/C x 100
donde:
IP = Indice de productividad.
A = Consumo medio ave/día.
V = Número de aves vivas al término del proceso.
C = Conversión alimenticia.

Cuadro 2- PARAMETROS PRODUCTIVOS DEL POLLO DE ENGORDA MACHO EN LA FASE DE CRECIMIENTO Y FINALIZACION.

	CRECIMIENTO (14-35 DIAS)			FINALIZACION (36-54 DIAS)		
TRATAM	CONSUMO/ AVE/DIA	GANANCIA PESO/DIA	INDICE CONVER	CONSUMO/ AVE/DIA	GANANCIA PESO/DIA	INDICE CONVER
CONTROL	99.4	53.1	1.871	178.1	70.0	2.544
15 %	100.4	53.4	1.880	174.1	67.4	2.583
25 %	102.0	51.1	1.996	165.4	71.4	2.316
35 %	101.5	50.5	2.009	171.4	73.2	2.341
Probabilidad	P>0.05	P>0.05	P>0.05	P>0.05	P>0.05	P>0.05

Cuadro 3- PARAMETROS PRODUCTIVOS DEL POLLO DE ENGORDA HEMBRA EN LA FASE DE CRECIMIENTO Y FINALIZACION.

	CRECIMIENTO (14-35 DIAS)			FINALIZACION (36-54 DIAS)		
TRATAM	CONSUMO/AV E/DIA	GANACIA PESO/DIA	INDICE CONVER	CONSUMO/AVE/ DIA	GANANCIA PESO/DIA	INDICE CONVER
CONTROL	95.4 a	49.7 a	1.919 a	161.5	57.8	2.794
15 %	97.2 b	47.9 b	2.029 b	153.4	54.8	2.799
25 %	96.0 b	45.8 b	2.096 b	151.1	56.3	2.683
35 %	101.0 c	45.3 c	2.229 c	157.2	59.9	2.624
Probabilidad	P<0.05	P<0.05	P<0.05	P>0.05	P>0.05	P>0.05

Cuadro 4.- COSTOS DE PRODUCCION DE POLLOS DE ENGORDA MIXTOS A LOS 54 DIAS DE EDAD ALIMENTADOS CON DIFERENTES NIVELES DE INCLUSION DE SOYA INTEGRAL

TRAT	CONSUMO ACUMULADO	CONVERSION ALIMENTICIA	COSTO ALIM 1/	COSTO/ POLLO 2/	COSTO/Kg CARNE 3/	% DEL COSTO 4/
Cont.	5.748	2.214	1.375	7.905	3.044	99.05
15 %	5.658	2.229	1.366	7.730	3.044	99.05
25 %	5.570	2.228	1.360	7.579	3.030	98.6
35 %	5.721	2.255	1.363	7.801	3.073	100.0

1/ Costo por kg de alimento promediando las tres fases de alimentación.
2/ Costo de producción por pollo vivo a 54 días considerando únicamente el costo del alimento.
3/ Costo de producción por kg de carne producido tomando en cuenta solamente el costo del alimento.
4/ Porcentaje relativo del costo de producción, otorgandole el 100% al de mayor costo.

SPECIFIC ENZYMES IMPROVE THE METABOLISABLE ENERGY OF SELECTED FEEDSTUFFS IN BROILER DIETS

USO DE ENZIMAS ESPECIFICAS PARA MEJORAR LA ENERGIA METABOLIZABLE DE INGREDIENTES SELECTOS EN LAS DIETAS PARA POLLOS DE ENGORDA

T. Hastrup*, W.D Cowan** and L. Christensen*

*Novo Nordisk A/S, DK 2880 Bagsvaerd, Denmark
**Novo Nordisk Bio-Industries S.A., 282 Chartridge Lane, Chesham, Buckinghamshire, HP5 2SG, UK

RESUMEN

Una preparación comercial de carbohidrasa (Bio-Feed® Plus CT) incrementó en 9, 10.8 y 15.8%, la energía metabolizable disponible en el trigo, la harinilla de trigo y la harina de semilla de nabo, pero no tuvo efecto significativo sobre el maíz, la pasta de soya ni el chícharo. La otra preparación comercial de carbohidrasa (Energex® MG) incrementó la energía metabolizable disponible del maíz, la pasta de soya, la pasta de semilla de nabo y el chícharo en 2.9, 7.2, 30.6 y 6.5% respectivamente. En el caso de las dietas elaboradas a base de trigo y de pasta de semilla de nabo el valor de la proporción entre la energía metabolizable disponible y la dosis de las 2 enzimas mostró un rango lineal de 0 a 500 mg de enzima por Kg de dieta. Estos resultados deben ser tomados en consideración al formular dietas con carbohidrasas.

INTRODUCTION

It is well known that specific exogenous enzymes can improve the AMEn of selected feedstuffs and diets (Leong et al., 1962; Rotter et al., 1990; Annison, 1992). Applying this information in dietary formulations is not new, either (Cowan, 1990; Rotter et al., 1990).

In order to verify the effect of two carbohydrase products on the availability of energy in selected feedstuffs a joint project was started between The Research Station for Small Stock Husbandry, Belgium and Novo Nordisk A/S, Denmark. AMEn was chosen as this is the most commonly used definition of the dietary energy available to poultry (NRC, 1994).

This paper reports the results of 3 trials investigating the influence of enzyme addition on the AMEn of selected feedstuffs (Huyghebaert, 1993ab and 1994). The application of the results to least-cost diet formulation is discussed.

MATERIALS AND METHODS

One-day-old male Ross broiler chicks were obtained from a local commercial hatchery. From days 1 to 16 they were fed a commercial chick starter mash diet. On day 16, the birds were weighed individually. Birds having relatively high or low body weight were discarded. Groups of four birds were then assigned randomly to the pens, housed in battery cages. The adaption period lasted from day 16 to 21. From day 21 to 25 the balance trial was carried out. The procedure was in accordance with the European reference method for the in vivo determination of metabolisable energy (Bourdillon et al., 1990). For each treatment five replicates were used.

The composition of the basal diet was: sorghum 56 %, soybean meal 32 %, animal fat 6 %, vegetable oil 1 %, minerals, vitamins, trace elements and amino acids 5% . The nutrient content was in accordance with NRC, 1994. The inclusion levels of the feedstuffs under study were 50 % for cereals, 30 % for cereal by-products and 25 % for protein feedstuffs. The inclusion was at the expense of all ingredients of the basal diet.

The respective enzyme supplementation was 0 and 500 mg/kg for the basal diet, wheat middlings, maize, soyabean meal and peas based diets. For the wheat and rapeseed meal based diets the supplementation was 0, 250 and 500 mg/kg.

The Humicola insolens enzyme preparation (Bio-Feed Plus CT) contained the following main enzyme activities: Xylanase (800 FXU/g), Pentosanase, Hemicellulase, Fungal -glucanase, Endoglucanase and Cellulase. The Aspergillus sp. enzyme preparation (Energex MG) contained the following main enzyme activities: Fungal - glucanase (75 FBG/g), Hemi-cellulase, Pectinase, -galactocidase and Endoglucanase.

The chicks were fed the respective mash diets at a level of 90 % of ad libitum and their excreta were

quantitatively collected daily. The excreta were blended, freeze-dried, equilibrated and finally ground before analysis. Samples of feeds and freeze-dried excreta were analyzed for gross energy (GE) and nitrogen.

The AMEn-content of the experimental diets were calculated from their respective excreta/feed ratio's as well as their corresponding GE-contents. A correction for N-retention to zero was made by using an energy equivalent of 34.36 kJ/g N-retained.

The results were analyzed by a one-factorial analysis of variance. The significant treatment differences were identified by a LSD-multiple range test, according to Statgraphics version 5 (1991). The AMEn-values for the feedstuffs under study were calculated by difference, assuming additivity for AMEn. The effect of the enzyme was only ascribed to the AMEn-values of the test ingredients. On wheat and rapeseed meal the dosage/response of the exogenous enzymes was calculated by means of linear regression analysis.

RESULTS & DISCUSSION

None of the enzyme products had a significant effect on the basal diet (Table 1 & 2). This support the reliability of ascribing the effect of the enzyme only to the test ingredient.

Dietary supplementation with Bio-Feed Plus CT resulted in a distinct increase in the AMEn of wheat (varieties 1, 2, 3) of 6.8%, 8.1% and 12.0%, respectively. Also the effect on wheat middlings was high (10.8%). This effect on wheat and wheat byproducts was to be expected as Bio-Feed Plus contains a high amount of xylanase activity.

The effect on the AMEn of maize was low with both carbohydrase products. This was anticipated as the level of soluble NSP is low. However, Energex MG did have a significant effect on the AMEn of maize. For soyabean meal (SBM), rapeseed meal (RSM) and peas it is clear that the different enzyme products have a different effect on AMEn. This group of feedstuffs contains a high content of pectic substances. Not surprisingly Energex MG gave the best result in this group as it contains pectinase activity.

The results on rapeseed meal was surprisingly high for both enzyme products - 15.8% and 30.6% for Bio-Feed Plus CT and Energex MG, respectively.

The regression analysis showed a linear connection between the dosage of carbohydrase and the AMEn of the wheat and rapeseed meal from 0 to 500 mg/kg diet.

There are several ways of using the information from Table 1, 2 & 3 in practical diet formulation to take into account the energy liberated by the enzyme product e.g:

* An energy value could be added to the enzyme product when included in the diet. The energy value of the enzyme on wheat and RSM can be derived from the slope of the model (Table 3)

* The total energy specification of the diet could be reduced by 3-4%

* The energy specification of the feedstuffs could be regulated according to quality and quantity of enzyme products added

The first two ways are not very accurate as they do not take into account the differences in effect of the enzyme from diet to diet. The observed AMEn-results speaks in favour of the last way of application in practical diet formulation.

The shown result stress that carbohydrases are highly substrate specific and dosage related (Table 1, 2 and 3). However, as substantial variation exist in field conditions it is recommended to use the improvements in metabolic energy conservatively. Feeding trials indicate that in practice the concept of adjusting the ME of the feedstuffs to the enzyme can be used to reformulate diets with a greater cost effectiveness (data not reported).

Generally, the addition of the enzyme products increased the N-retention in the broilers (Huyghebaert 1993ab & 1994). This suggest an increase in amino acid digestibility. Hev et al., (1995) found that Bio-Feed Plus CT improved the ileal digestibility of all essential amino acids in wheat by 3 to 4 percentage units. However, more research is needed to establish more accurately the effect of enzymes on amino acid digestibility.

The results show that the ME of selected feedstuffs added enzyme can be very different from feedstuffs without enzyme. This factor should be taken into account when formulating diets. They also show that the response is related to the type/dose of enzyme.

REFERENCES

1. Annison G. (1992) Animal Feed Science And Technology. 38:105
2. Bourdillon A.., Carré B., Conan L., Duperray J., Huyghebaert G., Leclerq B., Lessire M., Macnab J. And Wiseman. (1990) British Poultry Science 31:557
3. Cowan, W.D. (1990) Avicultura Professional Vol 7, No 3: 107
4. Hew, L.I., Ravidan V., Mollah Y., Gill R.J., And Bryden W.L. (1995) Proceding Australian Poultry Science Symposium. 7:189
5. Huyghebaert G. (1993a) R.V.K. Rapport No 534
6. Huyghebaert G. (1993b) R.V.K Rapport No 559
7. Huyghebaert G. (1994) R.V.K. Rapport No 565
8. Leong, K.C., Jensen L.S And Mcginnis J. (1962) Poultry Science 41: 36

9. National Research Council. (1994) Nutrient Requirements Of Poultry. 9de. Washington, D.C.: National Academy Press.
10. Rotter B.A. (1990) Poultry Science 69:1174
11. Statgraphics Version 5. (1991) Reference Manual. Statistical Graphics Corporation. Rockville, M.D., Usa.

TABLE 1 EFFECTS OF BIO-FEED PLUS CT ON AMEN OF SELECTED FEEDSTUFFS. THE ENZYME DOSAGE IS 500MG/KG FEED (MODIFIED AFTER HUYGHEBAERT 1993AB & 1994).

Diet	**AMEn-diet** MJ/kg	**AMEn-feedstuff** MJ/kg	**Relative**
Basal diet (B)	11.79±0.19	-	100.0[a]
B+enzyme(e)	11.82±0.12	-	100.3[a]
B+wheat 1	11.76±0.18	11.28	100.0[a]
B+wheat 1+e	12.15±0.21	12.05	106.8[b]
B+wheat 2	11.51±0.33	10.77	100.0[a]
B+wheat 2+e	11.94±0.24	11.64	108.1[b]
B+wheat 3	11.23±0.23	10.67	100.0[a]
B+wheat 3+e	11.87±0.25	11.95	112.0[b]
B+wheat middlings	10.15±0.34	5.26	100.0[a]
B+wheat middling+e	10.32±0.21	5.82	110.8[b]
B+maize	13.12±0.07	13.50	100.0[a]
B+maize+e	13.16±0.10	13.59	100.7[a]
B+soyabean meal	11.10±0.19	9.01	100.0[a]
B+soyabean meal+e	11.18±0.22	9.35	103.7[a]
B+rapeseed meal	10.77±0.12	4.88	100.0[a]
B+rapeseed meal+e	10.96±0.90	5.65	115.8[b]
B+peas	11.29±0.22	9.80	100.0[a]
B+peas+e	11.35±0.15	10.02	102.3[a]

[ab] Unlike superscripts within a column in a row are significantly different at P<0.05

TABLE 2 EFFECT OF ENERGEX MG ON AMEN OF SELECTED FEEDSTUFFS. THE ENZYME DOSAGE IS 500MG/KG FEED (MODIFIED AFTER HUYGHEBAERT 1993B & 1994).

Diet	AMEn-diet MJ/kg	AMEn-feedstuff MJ/kg	Relative
Basal diet (B)	11.79±0.19	-	100.0a
B+enzyme(e)	11.81±0.30	-	100.2a
B+maize	13.12±0.07	13.50	100.0a
B+maize+e	13.31±0.03	13.89	102.9b
B+soyabean meal	11.10±0.19	9.01	100.0a
B+soyabean meal+e	11.26±0.20	9.66	107.2b
B+rapeseed meal	10.77±0.12	4.88	100.0a
B+rapeseed meal+e	11.14±0.20	6.37	130.6b
B+peas	11.29±0.22	9.80	100.0a
B+peas+e	11.45±0.03	10.43	106.5b

ab Unlike superscripts within a column in a row are significantly different at P<0.05

TABLE 3 THE RELATIONSHIP BETWEEN THE DOSAGE (X)(MG/KG) OF ENZYME AND THE AMEN (Y) (MJ/KG) OF THE WHEAT AND RAPESEED MEAL BASED DIETS (MODIFIED AFTER HUYGHEBAERT 1993AB).

Feedstuff	Enzyme	Dosages (mg/kg)	Model (complete diet)
Wheat 1	*Humicola insolens*	0, 250, 500	y = 11.75 + 0.00077x
Wheat 2	*Humicola insolens*	0, 250, 500	y = 11.54 + 0.00087x
Rapeseed meal	*Aspergillus sp.*	0, 250, 500	y = 10.78 + 0.00075x
Rapeseed meal	*Humicola insolens*	0, 250, 500	y = 10.78 + 0.00039x

EFECTO DE LA AFLATOXINA B_1 SOBRE LA FARMACO-CINETICA DE ALGUNAS SULFAS EN POLLOS DE ENGORDA

EFFECT OF AFLATOXIN B1 ON THE PHARMACOKINETICS OF SOME SULFA DRUGS IN BROILERS

Quezada T.,T.[1] Martínez A., A.[1] Jaramillo J., F.[2] Valdivia, F.A.[1] y Rodríguez V., M.L.[2]

Centros Agropecuario[1] y Básico[2] de la Universidad Autónoma de Aguascalientes, Aguascalientes, México.

ABSTRACT

An experiment including 25 one-day old broiler chicks was performed to determine the effect of hepatic and renal lesions, together with other changes resulting from aflatoxin B1 (AFB1) toxicity on the pharmacokinetics of some sulfa drugs. One group (T2) was fed a concentrate containing 2.0 ppm pure AFB1. The other group (T1) received an AFB1-free ration. Body weight, feed intake, and conversion index were recorded during growout in order to follow up the effects of aflatoxicosis. Intoxicated (T2) chickens were assigned to 2 nine-bird groups (T21, and T22). The first group was used to test sodium sulfacetamide at a dose rate of 100 mg/kg. The second group was used to test sulfanilamide, at a dose rate of 50 mg/kg. After 4 weeks of AFB1 toxicity blood samples were obtained, and the following variables were evaluated: hematocrit (% Ht) red blood cell adenosine triphosphate (ATP mmol/dl), ATP/hemoglobin (ATP/Hb)(mmol/g), plasma Hb (Hb, g/dl), and blood glucose (mg/dl) by enzymatic assay. Clearance constant (*Ke*) was then determined by spectrophotometry of sulfacetamide and sulfanilamide plasma concentrations (mg/dl). These determinations were also made at 35 days of age in the control group. Birds were killed and total and relative weights of livers and kidneys were determined. Data was submitted to statistical variance analysis. Intoxicated birds showed significantly decreased body weights, ATP, ATP/Hb in whole blood, and sulfacetamide Ke. Total and relative liver and kidney weights were significantly increased. No differences were found in glucose, Ht, Hb, and sulfanilamide Ke.

INTRODUCCIÓN

La producción de pollos en México ha presentado en la última década un incremento sustancial, debido a la implementación de la tecnología de vanguardia en el manejo, genética y alimentación de estas aves. Sin embargo, los alimentos se pueden contaminar con hongos, generando, con su consumo, una vía de entrada de ciertas toxinas que ocasionan enfermedades clínicas de repercusión económica significativa, siendo la aflatoxicosis la de mayor importancia (1). Los hongos del género Aspergillus, principalmente *A. flavus* y *A. parasiticus*, producen sustancias conocidas como aflatoxinas (AF), algunas de las cuales se han identificado como agentes cancerígenos (2). Por lo tanto, las materias primas que se utilizan en la alimentación para las aves constituye una amenaza permanente para los productores dedicados a la crianza y explotación avícola (3).

Una vez que son ingeridas por las aves, la distribución de las AF se realiza en todos los tejidos corporales, siendo el hígado y los riñones los órganos que muestran mayor captación de dichas toxinas (4). A dosis bajas, las micotoxinas producen en los pollos cambios morfológicos en el hígado y alteraciones renales que se manifiestan por el engrosamiento de las membranas

glomerulares (5,6). Estos cambios afectan la actividad metabólica de ambos órganos y como consecuencia producen una serie de trastornos bioquímicos y fisiológicos (7). Por ello, se han realizado algunos estudios toxicológicos tendientes a demostrar los efectos nocivos de las AF en los pollos. Este trabajo tiene como objetivo estudiar el efecto de la aflatoxina B_1 (AFB_1) sobre la producción celular de sustratos energéticos y la excreción de las sulfonamidas en pollos intoxicados con esta micotoxina.

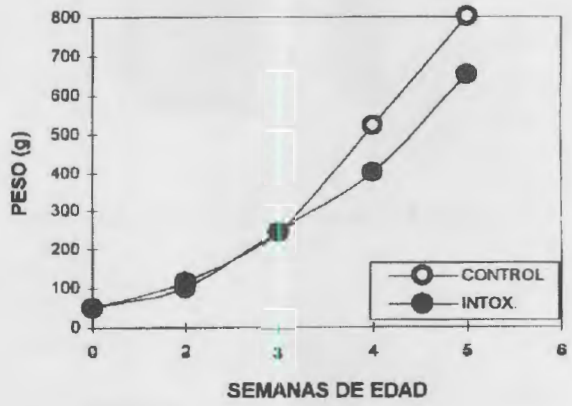
MATERIALES Y MÉTODOS

Se utilizaron 50 pollos machos (Arbor Acress) de un día de edad, con peso promedio de 50 g, y se dividieron al azar en 2 grupos (25 aves/grupo): uno control y otro tratado. Al grupo tratado se le administró diariamente en el alimento 2.0 ppm de AFB_1 y al control 0 ppm. Para efectuar un seguimiento de los efectos de la aflatoxicosis, se determinaron semanalmente el peso y el consumo de alimento, así como el índice de conversión. Los pollos intoxicados (T_2) se dividieron a su vez en dos grupos de nueve aves por grupo (T_{21} y T_{22}). A las cuatro semanas de tratamiento con la AFB_1, las aves de los grupos T_{21} y T_{22} se anestesiaron con pentobarbital sódico (25 mg/Kg de peso, vía intravenosa), y se canalizaron la arteria y vena tarsial. Se obtuvieron muestras de sangre al tiempo 0 (antes de administrar las sulfas) para determinar las siguientes variables: hematócrito (Ht en %), adenosintrifosfato en sangre (ATP en mmol/dl), adenosintrifosfato en hemoglobina (ATP/Hb en mmol/g), hemoglobina plasmática (Hb en g/dl) y glucosa sanguínea (mg/dl). El microhematócrito se midió utilizando una centrífuga para microhematócrito (10,000 r.p.m., durante 3 min), la hemoglobina se determinó con un hemoglobinómetro, las cuantificaciones de ATP en sangre y en hemoglobina se realizaron por método enzimático (8) y la glucosa por ensayo enzimático (9). Las sulfas en estudio fueron administradas por vía intravenosa a las dosis siguientes: sulfacetamida sódica (grupo T_{21}) 100 mg/Kg de peso y la sulfanilamida (grupo T_{22}) 50 mg/Kg. Posteriormente, se obtuvieron muestras de sangre arterial, para determinar la cinética de eliminación de estos fármacos, a los 5, 10, 20, 30, 60, 90 y 120 minutos. La cuantificación de las sulfas en sangre se realizó por espectrofotometría. Los pollos pertenecientes al grupo control fueron estudiados de manera semejante a lo anteriormente descrito, a los 35 días de edad. Finalmente, todos los pollos fueron sacrificados y se disecaron el hígado y los riñones para la determinación de sus pesos y la toma de muestras para realizar estudios histopatológicos. Con los datos obtenidos se hizo un análisis de varianza utilizando un diseño completamente azarizado (10).

RESULTADOS

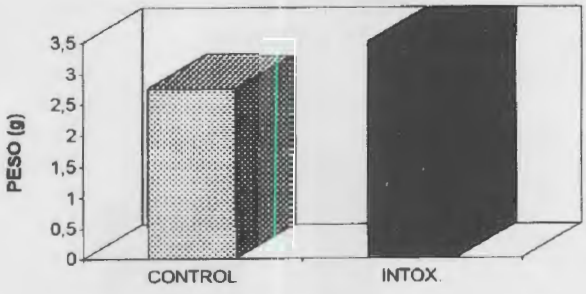
En la figura No. 1, se observa una disminución significativa del peso corporal de los animales intoxicados con respecto a los controles, a partir de los 21 días de tratamiento.

FIG. 1. PESO CORPORAL DE LOS POLLOS



En la figura No. 2, se muestra el incremento significativo del peso relativo de los hígados de los pollos intoxicados con relación a los controles, al final de tratamiento.

FIG. 2. PESO RELATIVO DE LOS HIGADOS DE POLLOS DE ENGORDA



El efecto de la AFB_1 sobre el aumento del peso relativo de los riñones se muestra en la figura No. 3.

Las disminuciones significativas de las concentraciones de ATP en sangre total y ATP en hemoglobina (ATP/Hb) de los pollos intoxicados se puede observar en las figuras Nos. 4 y 5, respectivamente.

El curso temporal de la cinética de eliminación para la sulfacetamida sódica en los grupos de pollos intoxicados y controles se muestran en la figura No. 6; puede observarse un retraso significativo en la velocidad de eliminación de esta sulfa en el grupo de animales intoxicados. En el resto de los parámetros estudiados no se encontraron diferencias significativas.

FIG. 3. PESO RELATIVO DE LOS RIÑONES DE POLLOS DE ENGORDA

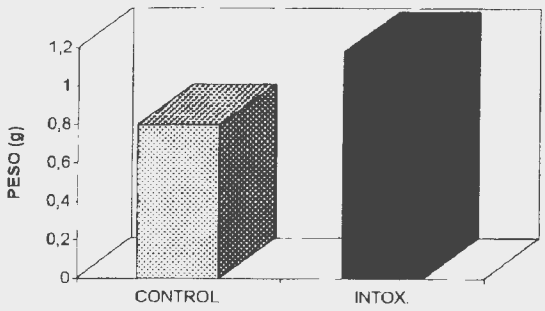


FIG 4. ATP EN SANGRE TOTAL DE POLLOS DE ENGORDA

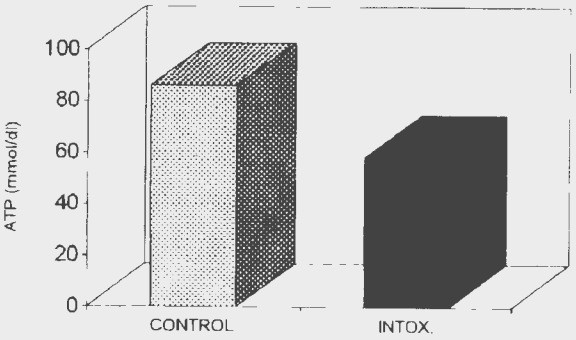
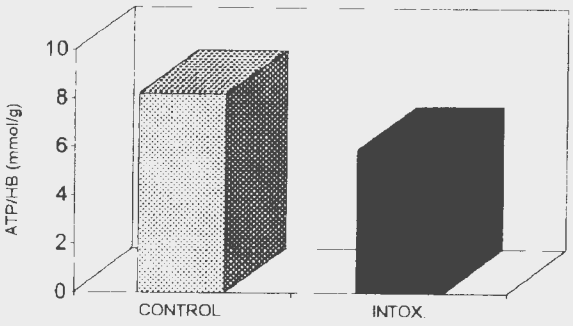


FIG. 5. CONCENTRACION DE ATP/HB EN POLLOS DE ENGORDA

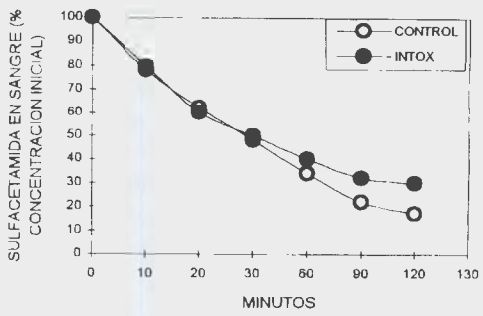


DISCUSIÓN

Algunos estudios sobre los efectos tóxicos producidos por la aflatoxicosis han sido reportados desde hace varios años (6, 10, 11). A pesar de ello, se siguen realizando diversos trabajos relacionados con la toxicidad producida por estas micotoxinas, tanto en pollos como en otros animales de importancia económica, encontrándose que las aflatoxinas causan grandes pérdidas por sus efectos nocivos en esas especies, a la vez que constituyen un gran riesgo para la salud humana. El propósito de analizar las alteraciones en la cinética de eliminación de algunas sulfas en pollos intoxicados con AFB_1, obedece a que durante la aflatoxicosis el hígado y los riñones sufren alteraciones morfológicas y fisiopatológicas y al hecho de que ambos órganos participan en los procesos de biotransformación y eliminación de estos fármacos. En los pollos intoxicados, la AFB_1 produjo disminución del crecimiento y disminución de la eficiencia en la conversión de alimento. Estos resultados concuerdan con lo reportado por otros autores (6, 7, 8, 12). De la misma manera, los efectos observados sobre los pesos relativos y absolutos de hígado y riñones son semejantes a los datos que han sido reportados por Osuna en 1989 y Quezada y col. en 1993. De esta manera, se confirma el daño selectivo de la AFB_1, sobre estos órganos y se demuestra su repercusión e importancia en los procesos de destoxificación de xenobióticos. Los resultados de este estudio confirman también que el riñón es un órgano blanco que se ve afectado seriamente durante la aflatoxicosis, ocasionando con ello alteraciones funcionales y bioquímicas propias de este órgano (13, 14, 15).

Los valores de los hematócritos y de las concentraciones de hemoglobina obtenidos en este estudio no reflejan anemia inducida por la ingestión de AFB_1 y difieren de los datos reportados por Huff y colaboradores en 1988 (13). Por otra parte, los valores obtenidos sobre las concentraciones de glucosa en sangre no muestran diferencias significativas entre las poblaciones estudiadas. Sin embargo, si encontramos diferencias en la cinética de eliminación de la sulfacetamida sódica pero no en la velocidad de eliminación de la sulfanilamida. Esto puede ser explicado por las características de distribución de estas dos moléculas en sangre y tejidos y por su fijación a proteínas plasmáticas. También encontramos diferencias significativas en los valores de ATP en sangre y ATP en hemoglobina de las poblaciones estudias. Estos datos representan el punto de partida para estudiar los mecanismos de producción de energía en los pollos intoxicados y las alteraciones derivadas de este proceso sobre el metabolismo de células hepáticas y renales de aves tratadas con AFB_1.

FIG. 6. CINETICA DE ELIMINACION DE LA SULFACETAMIDA SODICA EN POLLOS DE ENGORDA



REFERENCIAS

1. OSUNA, S. (1989)." Micotoxinas de importancia en avicultura". Curso de actualización sobre micotoxicosis aviar. Asociación Nacional de Especialistas en Ciencias Avícolas de México. México D. F. marzo, 82 - 99.
2. MARTH, E. H. Y DOYLE, M. P. (1979)." Update on Molds: Degradation of Aflatoxin". Food Technol. No.1: 81 - 87.
3. ROSILES, R. Y PEREZ, A. (1981). " Consideraciones generales sobre algunas micotoxinas en alimentos para animales domésticos durante los años 1977 a 1980". Vet. Méx., 12(3): 229 - 233.
4. HAMILTON, P. B. (1978)." Fallacies in our understanding of mycotoxins". J. Food Prot., 41: 404 - 408.
5. LUTHY, J., ZWEIFEL, U., SCHLATTER, CH. (1980). " Metabolism and tissue distribution of ^{14}C aflatoxin B_1 in pigs". Fd. Cosmet. Toxicol., 18(3): 253 - 256.
6. HUFF, W. E., KUBENA, L. F., HARVEY, R. B., CORRIER, D. E. and MOLLENHAUER, H. H. (1986)." Progression of aflatoxicosis in Broiler Chickens". Poult. Sci., 65: 1891 - 1899.
7. CYSEWSKY, S. J., PIER, A. C., ENGSTROM, G. W., RICHARD, J. L. DOUGHERTY, R. W. Y THURSTON, J. R. (1977). " Clinical Pathologic Features of Acute Aflatoxicosis of Swine. Am. J. Vet. Res., Vol. 29: 1577 - 1580.
8. ADAMS H. (1963). "Adenosine 5'-Triphosphate Determination with Phosphoglycerate Kinase. in Methods of Enzymatic Analysis. De. by HU Bergmeyer, Academic Press, New York. pp 539 - 543.
9. TRINDER, P. (1969). "Determination of glucose in blood using glucose oxidase with an alternative oxygen acceptor. Ann. Clin. Biochem. 6: 24.
10. SAS/STAT: (1985). Guide for personal computers, version 6 edition. Sas Institute Inc., Box 8000, Cary. North Carolina ISBN 0-917382-84-6.
11. HAMILTON, P.B. (1987). "Aflatoxicosis en animales de granja, en Aflatoxin in Maize" a Proceedings of the Workshop, Eds. Zuber, M.S., CIMMYT, México: 58 - 65
12.. QUEZADA T.T., CUELLAR P.L.H., MARTINEZ A.A., VALDIVIA F.A. Y REBOLLAR S.E. (1993). "Secuencia de los efectos de la aflatoxina B1 sobre el riñón e higado de pollos en desarrollo". XVIII Convención Nacional Aneca, Cancún, Quintana Roo, México. 226 - 231
13. HUFF, W.E., HARVEY, R.B. and KUBENA, L.F. (1988). "Toxic Synergism Between Aflatoxin and T-2 Toxin in Broiler Chickens". Poult. Sci., 67: 1418 - 1423.
14. MOLLENHAUER, H. H. CORRIER, D.E. , HUFF, W.E., KUBENA, L.F. HARVEY, R. B. and DROLESKEY, R.E. (1989). "Ultrastructure of hepatic and renal lesions in chickens fed aflatoxin". Am. J. Vet. Res., 50 (5): 771 - 777
15. HUFF, W.E. and DOERR, J.A. (1981). "Synergism Between Aflatoxin A in Broiler Chickens". Poult. Sci., 60: 550 - 555.

EFECTO DE NIVELES ELEVADOS DE SEMILLA DE JAMAICA (*Hibiscus sabdariffa*) EN DIETAS PARA POLLO DE ENGORDA

THE EFFECT OF HIGH LEVELS OF JAMAICA (*Hibiscus sabdariffa*) SEEDS IN BROILER DIETS

Jínez, M.T.; Cortes, C.A.; Avila, G.E.; Casaubon, H.M.T. y Salcedo, E.R.

Centro de Enseñanza, Investigación y Extención en Producción Avícola de la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia de la Universidad Nacional Autónoma de México.

ABSTRACT

Jamaica seeds contain approximately 30% protein and 18% fat, making this ingredient a good energy/protein source. This study was carried out with the purpose of including jamaica seeds in broiler diets and to observe their effect on productive parameters, hepatic histological changes, and hepatic function tests. A random design was followed. Experimental treatments included jamaica seeds in broiler diets at different levels (0, 10, 20, and 30%). Three 20-bird replicates were used per treatment. Weight gains (2,458, 2,408, 2,543, and 2,406 g, respectively) and

feed intakes (4,792, 4,713, 4,957, and 5,321 g, respectively) at 49 days with 0, 10, 20, and 30% jamaica seeds were similar (P>0.05) among treatments. Regarding feed conversions (1.850, 1.930, 1.910, and 2.080), statistically significant (P<0.05) differences existed among treatments, being most favorable for the feed with no jamaica seeds. As far as hepatic function tests are concerned, aspartate- amino-transferase, alanine-amino-transferase, serum alkaline-phosphatase, and total proteins and lipids were similar (P>0.05) among treatments. Histologically, no liver damage was found that could be attributed to the use of jamaica seeds. This information indicates that jamaica seeds can be included in the diet, at the expense of sorghum and soybean meal with no adverse effects on growth, hepatic function, or liver histological architecture.

INTRODUCCION

La jamaica es una planta hermafrodita anual o bianual, herbacea o subarbustiva de la familia de las malvaceas, originaria de Africa que alcanza una altura de 0.5 a 3 metros, con los tallos robustos y leñosos en su base, de color morado rojo brillante o verde, hojas dígito partidas en tres lóbulos crenado dentados, flores solitarias, sésiles, con el cáliz y las bracteas gruesas y rojas, de sabor ácido, corola amarilla, fruta y una cápsula.

En América latina la jamaica es cultivada principalmente en México, El Salvador y Honduras. México es el único de ellos que cultiva la jamaica para la obtención de cálices, los otros dos paises han desarrollado el cultivo de la variedad para fibra.

La semilla poco se aprovecha o queda tirada en el campo. En México, la jamaica es cultivada en climas cálidos de las costas de Guerrero, Colima y Nayarit, se producen 3981.5 toneladas de semilla de las cuales la mayor parte (3973), corresponden al estado de Guerrero.

En México el principal objetivo del cultivo de jamaica es la obtención de su cáliz (flor), para el empleo en la industria alimenticia y farmaceutica. La semilla es un subproducto atractivo por contener alrrededor de 20% de proteína y 20% de grasa; razón por la cual fue investigada su inclusión a niveles elevados en dietas a base de sorgo y pasta de soya para pollos (Cuadro 1).

MATERIAL Y METODOS

Semilla de Jamaica:

La semilla de jamaica fué donada por la Asociación de Productores de Semilla de Jamaica del estado de Guerrero, municipio de Ayutla. La donación fué de una tonelada.

Pollos:

Para la realización del trabajo se utilizarón 240 pollitos de engorda de la línea comercial Arbor Acres mixtos de un día de edad, que se distribuyeron al azar en grupos de 20 aves por corral. Se emplearon 12 corrales con cama de viruta de madera en una caseta, 6 de cada lado con pasillo central y ventanas protegidas por cortinas de lona en ambos lados.

Los pollos fueron criados 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 se encuentra en Zapotitlán, Tlahuac, D.F.

Diseño Experimental:

Los tratamientos experimentales consistieron en incluir la semilla de jamaica como se indica a continuación:

1.- Dieta testigo (DT)
2.- Dieta con 10% de semilla de jamaica (10-Ja)
3.- Dieta con 20% de semilla de jamaica (20-Ja)
4.- Dieta con 30% de semilla de jamaica (30-Ja)

Variables Estudiadas:

Los pollos se criaron hasta la séptima semana, llevándose registros productivos. A la cuarta y séptima semana de edad se hicieron pruebas de funcionamiento hepático (Aspartato Amino Transferasa, Alanina Amino Transferasa, Fosfatasa Alcalina Serica, Proteínas Totales y Lípidos Totales) y de histopatologia de muestras de hígado.

CUADRO 1
COMPOSICION DE LAS DIETAS DE INICIACION (0-3 SEMANAS) Y FINALIZACION (3-7 SEMANAS) PARA POLLO DE ENGORDA.

INGREDIENTES	INICIACION	FINALIZACION
Sorgo	48.7	53.31
Pasta de Soya	42	35.5
Semilla de Jamaica*	-----	-----
Otros	9.3	11.19
Total	100%	100%
APORTE NUTRICIONAL CALCULADO DE LAS DIETAS		
PROTEINA %	22.47	19.9
LISINA%	1.33	1.15
METIONINA%	0.56	0.56
MET.+ CIST.	1.01	0.95
FOSF. DISP.	0.49	0.46
EM.Kcal/Kg.	2918	3035

*SE INCLUYO 0, 10, 20 y 30% DE SEMILLA DE JAMAICA A EXPENSAS DEL SORGO Y LA SOYA.

RESULTADOS

Los resultados promedio obtenidos sobre el comportamiento productivo para consumo de alimento, ganancia de peso y conversión alimenticia a las siete semanas de experimentación se pueden observar en el Cuadro 2. El consumo de alimento fué mayor con 30% de semilla de jamaica, sin embargo estadísticamente no existieron diferencias significativas (P>0.05) para el consumo de alimento entre tratamientos. Los resultados obtenidos para ganancia de peso, no obstante observarse diferencia numérica a favor de los pollos alimentados con 0 y 20% de semilla de jamaica, el análisis estadìstico no indico diferencia entre tratamientos.

CUADRO 2
PARAMETROS PRODUCTIVOS EN 49 DIAS CON POLLOS ALIMENTADOS CON SEMILLA DE JAMAICA.

% de semilla	Ganancia de peso. (g)	Consumo de alimento (g)	Conversion alimenticia (g)
Testigo	2485	4765	1850
10%	2408	4662	1930
20%	2543	4653	1910
30%	2406	5088	2080

Para conversión alimenticia se puede notar claramente, que a medida que aumento el nivel de semilla en la dieta como reemplazo del sorgo y la soya empeoró la conversión alimenticia. Claramente se aprecia que con 30% de semilla de jamaica, se requirió una mayor cantidad de alimento por cada unidad de ganacia.

En el Cuadro 4, están los resultados histopatológicos de higados encontrados; los cuales no mostraron ninguna alteración debida a la semilla de jamaica. Ya que se encontró mayor porcentaje de degeneración turbia en los animales testigo y con 10-Ja. En cuanto a la degeneración grasa esta fué evidente unicamente con 10,20 y 30-Ja. solamente.

CONCLUSION

Se puede concluir en base a los aumentos de peso así como a las pruebas de funcionamiento hepático y el estudio histopatológico que la utilización de semilla de jamaica hasta en un 30% como reemplazo de pasta de sorgo y pasta de soya en la dieta, no afecta el comportamiento productivo de pollos de engorda alimentados por 49 dias y que esta práctica puede resultar ventajosa en los sitios donde la semilla este disponible y a precios bajos, no obstante que a este nivel la conversión alimenticia sea mayor.

CUADRO 3
VALORES OBTENIDOS DE ASPARTATO (AST) , AMINO TRANSFERASA(ALT), ALANINA AMINO TRANSFERASA y FOSFATASA ALCALINA SERICA (FAS), PROTEINAS TOTALES (PT) y LIPIDOS TOTALES (LT) A LA 4a. y 7a. SEMANA

	TESTIGO	10%	20%	30%
AST	200	149	135	157
ALT	18	17	15	25
FAS	1656	1692	1875	2220
2o. MUESTREO 7a. SEMANA				
AST	111	132	134	111
ALT	20	15	38	10
FAS	2281	1403	1390	2220
PT	2.6	2.4	2.3	3
LT	891	678	975	876
2o. MUESTREO 7a. SEMANA				
PT	4.2	4.7	3.7	3.3
LT	606	627	492	742

AST. 70-220 Unidades por litro. FAS. 1633-9311 U.I., PT. 2.4-5.34. miligramos/ 100mililitros, LT.450-1684 miligramos/decilitro.

CUADRO 4
HISTOPATOLOGIA HEPATICA A LA 4a. y 7a. SEMANA DE EDAD DE POLLOS QUE CONSUMIERON SEMILLA DE JAMAICA

% DE SEMILLA	TESTIGO	10%	20%	30%
Degeneración turbia	0 %	33.3% S	33.3% M	0
Degeneración grasa	66.6 % L	100 % M	100 % M	33.3 % S
2o. MUESTREO 7a. SEMANA				
Degeneración turbia	66.6% S	66.6%S	66.6%S	33.3%S
Degeneración grasa	0.0%	33.3%L	100%M	66.6%M

L = leve, M– moderada,

CAN EGG PRODUCERS AFFORD TO NOT BEAK TRIM THEIR FLOCKS?

¿PUEDEN DARSE EL LUJO LOS PRODUCTORES DE HUEVO DE NO PRACTICAR EL CORTE DE PICO EN SUS PARVADAS?

Donald Bell

Highlander Hall, University of California, Riverside, CA 92521

RESUMEN

Se estudió una parvada comercial de gallinas leghorn blancas Hyline W-36 para determinar los efectos económicos de no cortar el pico, en comparación con la práctica habitual del despique a las 7 semanas. Se utilizó un total de 71,040 aves para el segmento de postura de este experimento. Las pollonas de 16 semanas de edad se encasetaron en 32 filas, en una granja comercial completamente automatizada. Se compararon 16 réplicas de 2,200 aves con el pico cortado, con una cantidad similar de aves con el pico intacto. Se llevaron los registros durante 40 semanas, de la 18a. a la 58a. semanas de edad.

La producción/ave/día, la cantidad de huevos/ave encasetada, la mortalidad total, el peso promedio del huevo, la masa total de huevo y el consumo diario de alimento se vieron afectados significativamente por los tratamientos (P=<.001). El ingreso total por la venta de huevos menos el costo del alimento por ave encasetada fue prácticamente idéntico (US$3.99 para las aves con el pico cortado *vs.* US$4.00 para las aves con el pico intacto) a las 58 semanas de edad. La proyección de los resultados a las 78 semanas dio como resultado una ventaja de US$0.24 para las aves con el pico cortado.

INTRODUCTION

The majority of egg producers in the U.S. practice beak trimming in order to control cannibalism in their flocks. Numerous experiments have studied different trimming procedures, the age at which the flock is trimmed relative to attaining the highest subsequent performance, and the details of trimming which include blade temperatures, cauterization times, and the amount of beak to remove. Most of the research, where non-trimmed controls were used for comparison, demonstrated a reduction in mortality as a result of trimming. Other experiments showed variable trimming effects on body weight, age at sexual maturity, egg weight, egg production and feed consumption. Few of the researchers studied results over the normal productive life of their flocks and none of the published reports analyzed the net economic effects of the procedures studied. The purpose of the current experiment was to measure the efficacy of not trimming the beaks of a low mortality strain of white leghorns in a practical commercial environment.

MATERIALS AND METHODS

Seventy-five thousand Hyline W-36 replacement pullets were reared in an environmentally controlled commercial brood-grow cage house from one day of age to 16 weeks. At 7 weeks of age, approximately one-half were beak trimmed by an experienced service crew. Alternating rows were used for the non-trimmed half. The method of trimming resulted in the top beak extending 4 mm from the external nares and the bottom beak to be 1 mm longer. The flock was moved to an environmentally controlled 90,000 bird lay house equipped with five back to back (4 tiers) rows. The test birds were placed in 8 rows with the outside rows excluded from the experiment. A double Latin Square design was used with sixteen 2220 bird replicates for each of the two treatments.

Daily records were kept for eggs and mortality for ten 4-week periods. Egg weights, individual bird weights and feed consumption were sampled on one day at the mid-point of each period. Eggs were counted by electronic counters. Feed, egg, and body weights were measured from a representative location within each row. Feed measurements utilized an inserted feed trough over the regular mechanical feeder. This measured the 24 hour feed consumption of 36 hens.

Data were summarized every 28 days and statistically analyzed at the conclusion of the experiment (ANOVA). Egg weights were converted to egg value using standardized prices (55¢ per dozen for large eggs) for each size category and normal distribution of individual egg weights within the sampled case weights. All feed was charged at the rate of 16.5 cents per kg.

RESULTS

The traditional reason for beak trimming a flock is to lower the incidence of cannibalism. The results of a beak trimming experiment is, therefore, strongly affected by the strain of birds used - some strains exhibiting very little cannibalistic tendencies while others are very prone to this vice. The Hyline W-36 is known for its very low rate of mortality and in this experiment averaged only 0.10% per week. Even though, the non-trimmed birds exhibited a total almost 40% higher than the trimmed birds (4.73% vs 3.39%)(p=<.001).

Egg production during the first 8 weeks was significantly higher in the non-trimmed birds, during the middle periods egg production was practically identical, but during the last 8 weeks, the trimmed birds laid at a higher rate. Overall, the non-trimmed birds laid at a 2% higher rate and produced 4.2 more eggs per hen housed (p=<.001). Egg size and total egg mass favored the non-trimmed birds (p=<.001). Egg weight averaged 58.9 grams per egg for the trimmed treatment compared to 59.7 grams per egg for the non-trimmed treatment. Average egg value did not differ between trimmed and untrimmed groups even though a significant difference in average egg weight was observed. Egg weights favored the non-trimmed birds during all periods but one.

Body weight was significantly lower in the beak trimmed birds. At the start of the experiment, this difference was 139 grams. At 58 weeks of age, the difference was 95 grams. A comparison of body weights against the breeder standard showed much better agreement between the standard and the beak trimmed birds than for the non-trimmed birds compared to the standard. In addition, a significantly greater flock uniformity was seen in the beak trimmed birds. Every 4 weeks, 192 individual body weights were taken for each treatment and uniformity (standard deviations) favored the trimmed birds in every period.

As a result of reduced body weights and slightly lower egg mass, the beak trimmed birds consumed significantly less feed than their untrimmed sisters. For the 40 weeks of the experiment, this amounted to a savings of 5.5% (p=<.001). An analysis of expected feed consumption based upon differences in body weight and egg mass accounted for 80% of the differences experienced (National Research Council - 1994). It was concluded that feed wastage was not a significant contributor to the differences in feed consumption experienced.

The economic analysis applied to the results of this experiment reveal a $0.16 egg income minus feed cost advantage for the non-trimmed treatment by the end of period 3 as a result of its higher rate of egg production during the first 12 weeks of lay. This accumulative advantage decreased in period 4 and by period 10, the profitability of both treatments was essentially the same ($3.99 vs $4.00 for the trimmed vs non-trimmed treatments respectively). During periods 9 and 10, the trimmed birds actually experienced a 5¢+ profit per hen advantage for each 4-week period. When this is projected to the remaining weeks of a normal 78 week cycle, the beak trimmed flock would experience a $0.24 per hen housed advantage over the non-trimmed birds. It is not known whether such advantages would extend into later cycles of production.

INFLUENCE OF PRODUCTION FACTORS ON BROILER CONDEMNATIONS

INFLUENCIA DE LOS FACTORES DE PRODUCCION SOBRE LA CANTIDAD DE DECOMISOS EN POLLOS DE ENGORDA

S. F. Bilgili and A. B. Horton

Department of Poultry Science, Auburn University, Auburn, AL 36849-5416

RESUMEN

Se recolectaron los datos de producción y de decomiso de canales (aves enteras o sus partes) de un complejo integrado verticalmente durante un período de un año, lo cual representa más de 16 millones de pollos de engorda sacrificados. Se calcularon los coeficientes de correlación entre la producción seleccionada y las variables de los decomisos, para los datos en su totalidad, así como dentro de los 3 pesos de mercado que este complejo tiene como objetivo.

La edad de la parvada, el peso promedio al mercado, el tiempo de descanso de las casetas entre parvadas, la cantidad de engordas con la misma cama, la densidad de población, la cantidad de animales por bebedero y el tiempo de espera en el rastro, se identificaron como factores significativos que afectan la cantidad de decomisos tanto de aves enteras como de sus diversas piezas. En general, la cantidad de aves muertas a la llegada a la planta y los decomisos de animales enteros o sus partes se incrementaron, al tiempo que disminuyó la viabilidad con el peso y la edad promedio de las parvadas. Entre los casos de campo parece que se incrementó la cantidad de decomisos de aves enteras debidos a septicemia, toxemia y magulladuras, al tiempo que disminuyó la incidencia de tumores con la edad y el peso.

Considerando el tamaño y volumen de producción actuales de los complejos que existen típicamente en Estados Unidos, las restricciones operativas y financieras que a menudo se aplican durante la fase de producción en vivo, pueden tener una influencia significativa sobre la obtención de un producto saludable, según se demostró en este estudio.

INTRODUCTION

Broiler production in the U.S. exceeded 7 billion in 1994, with and average weight of 2.1 kg[4]. During this period, over 300,000 metric tons of product was lost due to ante-mortem and post-mortem condemnations resulting from dead-on-arrivals (DOA) and disease conditions. Few studies [1,2] have focused on relationship between the live production factors and carcass condemnations in the processing plant. A year-long study was conducted to identify live production practices associated with broiler carcass condemnations under commercial conditions.

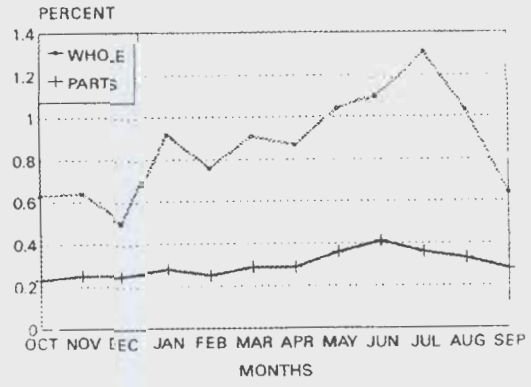
MATERIALS AND METHODS

Live production and carcass condemnation data were collected form a vertically integrated broiler complex in Alabama. Eighty broiler farms were identified as experimental units (2-5 houses per farm) and monitored for a period of one year. Data from a total of 315 experimental units, representing over 16 million broilers processed, were systematically entered into the Auburn University main-frame computer via the Statistical Analysis System [3]. Carcass condemnation data (whole bird and parts) consisted of proportion of whole birds condemned at carcass inspection for disease causes (leukosis, septicemia/toxemia, tumors, severe bruises, airsacculitis, and cellulitis), as well as parts trimmed (whole bird basis). The analysis of the data involved simple statistics generated by data sorting and Pearson product-moment correlations among the selected variables.

RESULTS AND DISCUSSION

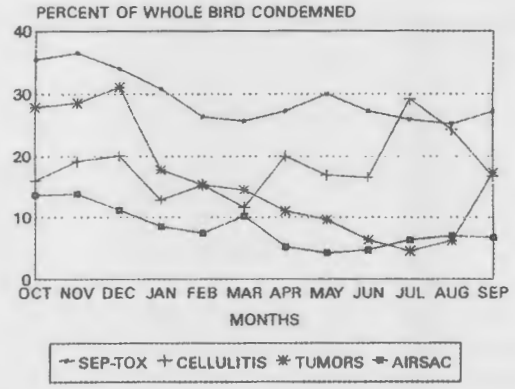
Whole bird and parts condemnations by flock placement dates are presented in Figure 1.

FIGURE 1. FIELD CONDEMNATIONS BY FLOCK PLACEMENT DATE



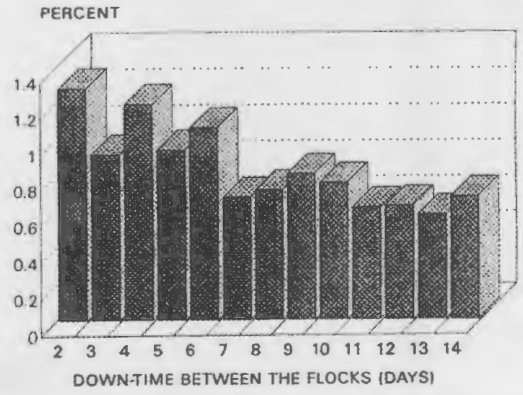
In this complex, condemnations were higher for flocks placed in summer months as compared to those placed in the fall. Cellulitis and septicemia/toxemia was the primary causes of whole bird condemnations for flocks placed in summer months (Figure 2).

FIGURE 2. CONDEMNATIONS BY FLOCK PLACEMENT DATE



A significant ($p<.01$) and a positive correlation was observed between the whole bird and parts condemnations (r=.65). Whole bird and parts condemnations increased (r=.50 and r=.49) with flock age (42-67 d) and average market weight (1544-3134 g). Plant holding time (0-8.5 h) and down-time between the flocks (2-35 days) correlated with parts (r=.44) and whole bird condemnations (r=-.26), respectively (Figure 3).

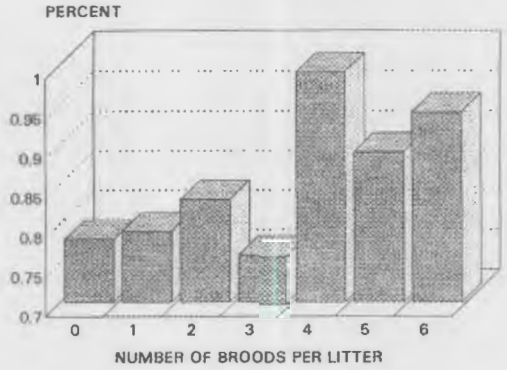
FIGURE 3. WHOLE BIRD CONDEMNATIONS DUE TO DOWN-TIME



Placement density (kg/m^2) and number of broods raised on used litter (0-6) were identified as significant factors influencing whole bird condemnations (Figures 4 and 5).

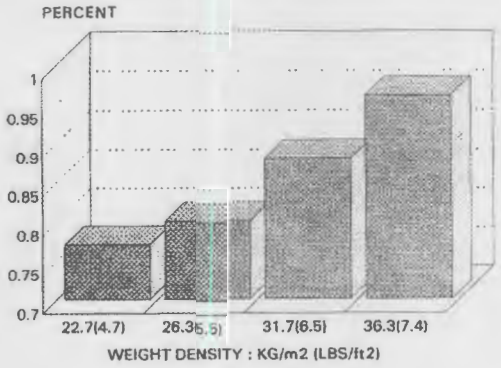
Table 1 summarizes the selected production and condemnation data for the three market weights (<1930 g, 1930-2384 g, and >2384 g) targeted by this complex. In general, livability decreased and DOA and condemnations increased with market weight/age. Whole bird condemnations due to tumors showed substantial decrease with market weight/age.

FIGURE 4. WHOLE BIRD CONDEMNATIONS DUE TO USED LITTER



Significant correlations were found between the number of broods on used litter (0-6) and livability (r=-.29), and number of birds per drinker (10-19) and whole bird condemnations (r=.31) for the market weight <1930g; flock age and whole bird condemnations (r=.33) for the market weight 1930-2384 g; and flock age and whole bird condemnations (r=.60) and plant holding time (0-8.5 h) and DOA (r=.25) for the market weight >2384 g.

FIGURE 5. PLACEMENT DENSITY AND WHOLE BIRD CONDEMNATIONS



The results of this study indicate that constraints placed during the live production phase of broilers have significant influence on carcass condemnations in the plant.

(*Partially presented at the XII European Symp. on the Quality of Poultry Meat, September 25-29, 1995, Zaragoza, Spain)

Table 1. Production and condemnation data (Mean ± SD)

	Market weight (g)		
	< 1930	1930-2384	> 2384
Number of flocks	114	111	87
Flock age (days)	44.2±1.8	51.1±2.7	58.5±.37
Average weight(g)	1752±86	2152±132	2715±191
Livability (%)[1]	96.3±2.04	95.9±2.8	93.5±3.7
DOA (%)[2]	31±.31	.33±.22	.45±.42
Whole bir condemnations (%)[3]	.67±.37	.79±.50	1.16±.64
Leukosis*	.16±.30	.09±.19	.23±.34
Septicemia/toxemia*	25.2±10.3	25.7±10.7	41.4±13.0
Tumors*	25.2±15.0	16.1±14.0	5.7±6.9
Bruises*	.98±84	2.2±1.4	2.3±1.5
Airsacculitis*	7.9±5.3	9.2±10.7	9.2±9.8
Cellulitis*	11.9±8.1	28.9±15.1	12.9±10.0
Parts condemnations	.26±.10	.19±.08	.47±.25

[1] (Number of birds caught/number of chicks placed) * 100

[2] Dead-on-arrivals at the plant.

[3] Whole carcasses condemned for field related causes.

[4] Carcass parts trimmed and condemned (whole bird basis).

* As a proportion of whole bird condemnations.

REFERENCES

1. Bilgili, S.F., and A.B. Horton. Influence of production factors on broiler carcass quality and grade. In: Proceedings of the XII European Symposium on the Quality of Poultry Meat, pp.13-20. Zaragoza, Spain. 1995.
2. Bremner, A.S. Downgrading and condemnation of carcasses following inspection. In: Meat Quality in Poultry and Game Birds, pp. 134-149. Eds. G. C. Mead and B. M. Freeman. 1980.
3. SAS Institute. SAS Users Guide. Statistics. SAS Institute, Raleigh, NC. 1990.
4. United States Department of Agriculture. Poultry Slaughter. National Agricultural Statistics Service, Washington, DC. 1995.

ANÁLISIS DE RESULTADOS DE GALLINAS REPRODUCTORAS PESADAS SEGÚN SU PESO CORPORAL

ANALYSIS OF PRODUCTION RESULTS OF BROILER BREEDERS, ACCORDING TO THEIR BODY WEIGHTS

Rojas, O.A.[1], León, P.F.[1] y Quintana, L.J.A.[2].

[1] Reproductoras del Valle de México.
[2] Depto. P. A. Aves, F.M.V.Z., U.N.A.M.

ABSTRACT

Records from 8 Avian Farms broiler breeder flocks were analyzed. The flocks, housed from 1993-1995 in conventional open-sided houses were managed in an all-in all-out system. Average population was 10,000 hens per farm at the onset of lay.

Each flock was divided in 3 groups, depending on hen body weight over the strain's standard at 25 weeks of age: Group A, birds weighing 13%; group B, 8%; and group C, 4% respectively, over the standard.

Birds that started laying eggs with 13% over weight (3.320 Kg [7.31 lbs]) as compared to target weight recommended by the breeder company, had the highest productivity at the end of the cycle, as compared to those with a similar-to-the-standard weight (2.920 kg [6.44 lbs]). Birds in group A had up to 40% body weight increases at the end of the cycle (20% of actual weight) instead of the 30% of the standard.

INTRODUCCION

Se analizaron registros de producción de 8 parvadas de reproductoras pesadas de la estirpe Avian Farm, durante los años de 1993 a 1995 de una empresa productora de huevo fértil localizada en el Valle de México, en casetas de ambiente natural bajo el sistema todo dentro todo fuera, con una población promedio de 10,000 hembras por granja al iniciar postura.

Cada parvada se dividió en 3 grupos de la siguiente manera:

GRUPO A: Aves con un 13% de sobrepeso a las 25 semanas

GRUPO B: Aves con un 8% de sobrepeso a las 25 semanas.

GRUPO C: Aves con un 4% de sobre peso a las 25 semanas.

Los parámetros evaluados son los siguientes:

Peso a las 25 semanas de edad.
% de postura a las 25 semanas.
Peso a las 31 semanas de edad.
Porcentaje de incremento de peso de las 25 a las 31 semanas.
Peso al pic de producción.
Pic de Producción.
Peso a las 60 semanas de edad.
Huevos totales por ave encasetada.

RESULTADOS

Las aves con mayor peso a las 25 semanas iniciaron la postura a esa edad y a menor peso corporal se retrasó la postura.

Las aves que aumentaron entre 9 y 12% de peso a las 31 semanas, con respecto a su peso inicial tuvieron mayor pic de producción (85.6%), que las que aumentaron mayor porcentaje de peso.

El promedio de postura entre las 25 y 60 semanas de edad fué mayor en las aves que se encontraban con mayor peso a las 25 semanas (70.3), siendo menores los promedios, a medida que las aves aumentaron más de peso.

En cuanto a la producción de huevos totales por ave encasetada, las aves que aumentaron 13% de peso en promedio a las 25 semanas con respecto al estandar produjeron mayor cantidad de huevos.

DISCUSION

De acuerdo con observaciones de campo, el estado de carnes de las aves a las 25 semanas de edad, no correspondia a la conformación óptima, por lo que se decidió procurar un sobrepeso (10%) arriba de la recomendación de la casa comercial, con lo cual se obtuvo el inicio de producción a las 25 semanas de edad, ya que con pesos cercanos al estandar, se retrasaba el inicio de la postura.

En relación al peso a las 31 semanas de edad, el manual para esta estirpe recomienda un aumento del 20%, donde teóricamente se obtendría el pic de postura, sin embargo con un incremento de peso del 11% promedio se obtuvo el mayor pic de postura a las 33 semanas. Las parvadas con un peso inicial similar al recomendado en el manual con un incremento de peso

de 13-25%, obtuvieron un menor pic de postura a las 34 semanas de edad.

El manual de la estirpe recomienda un incremento de peso de 30% a las 60 semanas y en este caso las parvadas con mejor productividad, aumentaron 22.5% de peso en promedio.

Las parvadas que inician la postura con un 13% de sobrepeso (3.320 Kg) en relación a lo recomendado por la casa comercial , tienen mayor productividad al final del ciclo que aquellas con un peso similar al estandar (2.920 Kg). Aumentando hasta 40 % al final del ciclo (20% del peso real) en vez de 30% que indica el estandar.

CUADRO NO. 1

GRUPO	PESO A 25 SEMANAS	% DE PESO ARRIBA DEL ESTANDAR A 25 SEMANAS	PESO A 31 SEMANAS	% DE AUMENTO DE PESO DE 25 A 31 SEM.	PESO A 60 SEMANAS	% DE AUMENTO DE PESO DE 25 A 60 SEM
A	3,320	13	3,680	11	4,070	22
B	3,160	8	3,610	14	4,180	32
C	3,050	4	3,620	19	4,180	37
CONTROL	2,920	0	3,440	18	3,800	30

CUADRO No. 2

GRUPO	PESO 25 SEM.	% PRODUCCION	PIC DE PRODUCCION	PROMEDIO POSTURA	HUEVO TOTAL POR AVE ENCAS.
A	3.320	5.2	85.6	70.3	154
B	3.160	3.8	84.1	68.5	147
C	3.050	1.5	84.7	66.9	148

INTERNET AL SERVICIO DE LA INDUSTRIA AVICOLA

INTERNET NOW SERVING THE POULTRY INDUSTRY

[1]Ceniceros, R.M., [2]Varona, B.J., [1]Téllez, I.G., [1]Paasch, M.L.

[1]DEPARTAMENTO DE PRODUCCION ANIMAL AVES FMVZ UNAM
[2]LABORATORIOS SANFER S.A. DE C.V.

ABSTRACT

The transfer of personal information and data is one of today's major needs. Current resources of information exchange include satellites and computer networks. Internet is the most representative of the latter. The poultry industry is rapidly growing worldwide, so that each individual related with this activity needs to be permanently updated. Internet is the best option today. Internet is an international conglomeration of computer networks linked by a common collection of technical protocols that allow the users of many of the networks to communicate and use the services offered by any of them. Internet offers access to both data and services through Ftp, Gopher, Archie, and World Wide Web. In addition, Internet supports written communication through electronic mail and several forms of electronic conferences. In the American continent only 3 countries have information highways, i.e. Mexico, Canada and the United States. All other countries are connected to Internet through telephone lines, satellites, and by other means. By the year 2000 Internet will include more than 100 million computers, and over one million interconnected networks. Data traffic will exceed that of voice, and it will be available all around the world. Internet will be distributed in Mexico through a great amount of channels (i.e:

companies like Cablevision, Multivision, Telmex, IBM, and others), and it will have thousands of applications, representing transactions for more than one trillion US dollars per day.

INTRODUCCION

A la fecha, INTERNET tiene unos 35 millones de usuarios, cifra que se estima se duplicará en el próximo año. Lo que equivale a que cada segundo y fracción un nuevo usuario, en algún país del mundo realiza su primera conección. El número de servicios disponibles crece al mismo ritmo. Los usuarios son en su mayoría gente joven, profesionista e inquieta, lo cual hace de INTERNET un mercado global sumamente interesante, que puede atacarse con formas no tradicionales de comercialización.

Las principales redes que hay en México son la del Instituto Politécnico Nacional con 10 o 12 instalaciones; la de diversas Universidades públicas , con 7; la del Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología, con 4 y la red de la Universidad Nacional Autónoma de México, con 14. Estas redes unen computadoras de todo tipo: grandes y pequeñas; de acceso público o privado; universitarias; gubernamentales; militares; experimentales y comerciales en más de 160 países del mundo.

En las computadoras y redes que forman INTERNET se pueden encontrar grandes cantidades de información sobre prácticamente cualquier tema y en su mayoría esta información es gratuita. Por ello INTERNET es útil para toda persona independientemente de la actividad que realice y de su conocimiento de computación.

HISTORIA

Los inicios de la INTERNET se remontan a hace unos 30 años, cuando la corporación RAND, una de las principales en Estados Unidos durante la guerra fría, planteó una pregunta estratégica: ¿ Cómo podrían las autoridades de los Estados Unidos comunicarse eficazmente después de una guerra nuclear?; la respuesta propuesta fue una red que no tuviera una autoridad central y que fuera diseñada de tal forma que aún dañada en alguna de sus partes, las demás pudieran comunicarse sin dificultad.

Los principios fueron simples, todos los nodos ("conexiones terminales") deberían ser iguales en estatus, cada uno con autoridad para originar, recibir y retransmitir mensajes. Cada mensaje debería ser dividido en paquetes, cada uno de ellos direccionados , es decir, cada paquete contendría información acerca del nodo fuente y del nodo destino. La ruta que tomara el paquete para llegar a su destino no debería ser importante.

Conforme la INTERNET creció, surgió la necesidad de asegurar su desarrollo y evolución de alguna forma ordenada, de manera que ésta no se llegara a convertir en un caos. Para tal propósito se crearon varios organismos, que al ir evolucionando conformaron lo que hoy se conoce como la "INTERNET SOCIETY", la cual tiene carácter internacional y sus principales objetivos son el desarrollo, mantenimiento, difusión y evolución de los estándares de la red; crecimiento y evolución de la arquitectura de la red; asistencia técnica a los paises en desarrollo; colección y difusión de información acerca de la INTERNET; coordinación con otros gobiernos e instituciones para lograr la efectividad de los anteriores propósitos.

Los miembros de este organismo están obligados por un común acuerdo al mantenimiento, la viabilidad y acceso global de la INTERNET, entre ellos están compañías, agencias de gobierno y fundaciones que han sido creadas por la INTERNET.

INTERNET

Desde sus inicios y hasta el año pasado la INTERNET había servido primordialmente al sector académico, sin embargo en diciembre pasado el sector privado de EUA superó por primera vez en la historia al sector académico en cuanto al número de computadoras en la INTERNET. Esto se ha debido a un conjunto de factores entre los que se cuentan la mayor necesidad de información tecnológica por parte de las empresas, la disponibilidad de mejores y más económicos equipos y servicios de cómputo y telecomunicaciones además de la aparición de novedosas herramientas de software que facilitan la utilización de la INTERNET.

Fuera de los Estados Unidos, las potencias industriales europeas son las que cuentan con mas computadoras en la INTERNET. Entre los países de habla hispana España ocupa el primer lugar en este rubro encontrándose entre los primeros 16 países después de EUA. México, en el lugar 25 mundial y segundo entre los países de habla hispana, es el país con más nodos en la INTERNET en Latinoamérica. Curiosamente es esta región la que ha exhibido el mayor ritmo de crecimiento a nivel mundial con un 36 por ciento durante el último trimestre.

CONEXION

Existen varias alternativas y oportunidades para conectarse a la Red, todo dependerá de los recursos con que se cuenten, facilidades de acceso y sus necesidades.

-Línea telefónica conmutada. Alcanza una velocidad de hasta 14.4 Kbps

-Línea privada. Alcanza una velocidad de hasta 19.2 Kbps

-Fibra óptica. Su velocidad de transmisión es de hasta 64 Kbps

-Enlace Satelital. Tiene una velocidad hasta de 64 Kbps

-Enlace de Microondas o Radio enlace. Sus velocidades de transmisión dependerán del equipo de comunicación, pueden llegar hasta varios múltiplos de 64 Kbps.

Algunos proveedores de acceso a INTERNET en México son: Datanet, S.A. de C.V. , Mundo INTERNET, Infotec, Spin, Infocel, Pixel, CONET, UNet, Antequera Red, entre otros muchos más.

SERVICIOS

Correo Electrónico (**E-Mail**). Permite el intercambio de mensajes entre usuarios en forma personalizada. Además puede transferir hojas electrónicas, documentos, imágenes, archivos, etc.

Gopher. Permite consultas a bancos de información a través de sencillos menús de opciones. Una de sus cualidades es la búsqueda de información automática en todo INTERNET, así como la transferencia de dichos documentos y programas a su terminal.

Netscape. Avanzado sistema de multimedia que ofrece imagenes, texto y sonido de cualquier punto de INTERNET a su computadora. Es una valiosa herramienta para explorar en cualquier base de datos de INTERNET.

Foros de discusión (**UseNET**). Cuenta con 7000 títulos diferentes en los temas más variados. Posibilidad de entablar comunicación con personas con fines comunes.

FTP. Valiosa herramienta para desplazar archivos de un lugar a otro.

Telnet. Se utiliza para establecer sesiones de trabajo en cualquier computadora conectada a INTERNET y para tener acceso a muchos servicios públicos, que incluyen catálogos de bilbiotecas y otros tipos de bases de datos.

De todos estos servicios , el correo electrónico es de particular importancia para nosotros; y por ello me permitiré señalar algunas de sus características, ya que es la herramienta que permite una comunicación eficiente, económica e instantánea para otros usuarios de INTERNET y de otras redes. Con lo que disminuyen dramáticamente los costos de mensajería, fax, papel y teléfonia.

El correo es un mensaje integrado por un destinatario, un tema o título del mensaje, un téxto o contenido y en ocasiones un anexo que puede ser cualquier tipo de archivo o programa. Automáticamente el sistema incluye tu dirección de INTERNET como remitente.

Cada usuario en el sistema tiene un buzón en donde recibe el correo que otros le envían. Para enviar un correo electrónico a una persona en particular se acostumbra escribir el nombre que el usuario tiene en ésta computadora, seguido de una arroba que significa algo así como que tiene su buzón en, seguido de la dirección.

Un par de buenos lugares para enviar correo electrónico como prueba y matar con ello dos pájaros de un tiro son: bbslist@aug3.augsburg.edu y bigfun@aug3.augsburg.edu. Estas direcciones son de servidores de correo automáticos que tan pronto reciban tu mensaje te enviarán de regreso 3 útiles listas de recursos disponibles en INTERNET.

Una regla de cortesía en INTERNET, en lo referente a correo electrónico es abstenerse de escribir con mayúsculas (el equivalente a estar gritando), abstenerse de enviar publicidad masiva no solicitada, y cartas tipo cadena; además de las obvias palabras antisonantes.

DIRECCIONES

Las direcciones en INTERNET se expresan con letras minúsculas separadas por puntos, por ejemplo: mail.INTERNET.com.mx.

Las direcciones de INTERNET se leen al revés: de derecha a izquierda. Las últimas letras de la dirección, o dominio, indican que tipo de lugar es a donde pertenece esa dirección, ejemplos: com-comercial-miscrosoft.com; edu-educativa-harvard.edu; gov-gubernamental-nasa.gov; org-organización no lucrativa-amsat.org.

Fuera de Estados Unidos existen dominios con respecto al país en donde el sistema se encuentra. Cada país tiene un dominio propio: au Australia, mx México, uk Reino Unido.

Las direcciones de las computadoras en INTERNET se dan también con números. De hecho éste es el sistema origina donde se le conocen como direcciones IP. Todas las direcciones de palabras tienen su dirección IP. El resultado que se obtiene con unas u otras es el mismo. Por ejemplo: mail.INTERNET.com.mx equivale a 200.10.239.253.

ALGUNOS TEMAS DE AVICULTURA EN INTERNET

Electronic Zoo/NetVet - Birds
Poultry

* WWW Virtual Library - Poultry Science
* Housing, Husbandry, and Welfare of Poultry 1/91-1/94 (AWIC)
* Animal Models in Biomedical Research: Poultry 12/92 (AWIC)
* Department of Poultry Science (North

Carolina State University)
* Poultry Science Department (Texas A&M)
* Avian Research Center (University of Minnesota)
* Poultry Pests (University of Florida)
* Poultry Health (USDA-APHIS)
* USDA - AMS Poultry Reports
* Avian Diseases (Notes)
* Broiler Columns (University of Delaware)
* Food Technology Information (Texas A&M University)
* Poultry Science Information (Texas A&M University)
* Current Livestock, Dairy and Poultry Legislation
* ChickMap - Chicken Gene Mapping Project (Roslin Institute - UK)
* NIAH - National Institute of Animal Health (Japan)
* Chicken Cell Lines (HyperCLDB)
* U.S. Poultry Genome Mapping (Michigan State University)
* Biosecurity of Poultry Facilities (Texas A&M University)
* Avian Influenza Biosecurity (Texas A&M University)
* Using Statistics in Poultry Hypothesis Testing (Texas A&M University)
* Department of Animal Science (Iowa State University)
* Diseases of Poultry (AFIP-POLA)
* Raising Chickens (The Small Farm Resource)
* Poultry, Production and Value (Cornell University)
* Livestock, Dairy & Poultry (Cornell University)
* Egg Research and Consumer Information (US Code, Title 7, Chapter 60)
* Poultry and Poultry Products Inspection
* Egg Products Inspection (US Code, Title 21, Chapter 15)
* Chickens (Irvine Mesa Charros 4-H Club)
* Northwest Old English Game Bantam Club
* The Chicken Coop
* The Chicken Page
* Andy's Poultry Fanciers Page
* Poultry Science Department (University of Wisconsin)
* The Chicken Lady's Home Page
* Poultry Science (University of Florida)
* Kaplan's Turkey on the Web
* Talking Turkey

Pet Birds
* 1995 Association of Avian Veterinarians' Annual Conference & Expo (August 28-September2)
* Birds
* AVES: Bird Related Information
* rec.pets.birds
* Psittacosis in Pet Birds (University of Nebraska)
* Psittacine Bird Gopher
* The Pet Bird Page
* The Bird Cage Page
* Arcata Pet - Birds Images (JPG)
* Online Book of Parrots
* The Fabulous Kakapo
* African Bird Club
* Oriental Bird Club
* CAGTAG-L (African Gray Parrot Mailing List)
* Bittacus
* The Birds of My Secret Garden
* Official IRC #parrots Home Page
* Finch and Canary World
* Finch and Canary World Magazine
* Massachusetts Cage Bird Association, Inc.
* PetStation
* Flying Colors Aviary
* National Finch and Softbill Society
* The Zebby Page

REFERENCIAS

1. The INTERNET Catalog & User's Guide. Ed. Krol O'Reilly and Associates Inc. 1992.
2. Zen and the Art the INTERNET: A Beginner's Guide. Brendan P. Prentice Hall, 1992.
3. La mejor y más actualizada información sobre INTERNET está en INTERNET... lo que hay que saber es dónde buscar o por dónde comenzar a buscar. Existen listas con recopilaciones que contienen gran cantidad de información sobre INTERNET: lugares a visitar, cosas para hacer, tips, etc. clasificados por tema. En pocos renglones ofrecen la "crema y nata" de información que necesitas para convertirte en un experto. Sólo envía un correo electrónico a **bbslist@aug3.augsburg.edu** y a **bigfun@aug3.augsburg.edu**. El correo no necesita decir nada ni en el tema ni en el texto. En pocos minutos tendrás en tu buzón electrónico una gran cantidad de información al respecto.

DISINFECTANT COMPARISON: PRACTICAL LABORATORY AND FIELD TESTING

COMPARACION DE DESINFECTANTES: PRUEBAS DE LABORATORIO Y DE CAMPO

Brigetta Allen and John Hughes

Louis Rich Company, West Liberty, Iowa 527

RESUMEN

El propósito de este estudio fue desarrollar una metodología practica para evaluar la efectividad de los desinfectantes en el crecimiento bacteriano en la cama, equipo y de diversas superficies de la caseta avícola. En el estudio, se evaluó el conteo total bacteriano, sin embargo, este procedimiento puede ser adaptado para patógenos específicos, hongos o virus. Los resultados indican que la funcionalidad de los desinfectantes puede ser evaluada por éste método. Esta prueba ha sido utilizada para comparar desinfectantes de diversas marcas y se ha encontrado que es muy efectiva para la comparación de productos.

INTRODUCTION

The purpose of this study was to develop a practical means of testing disinfectant effectiveness on the bacterial growth present in the liter or on a specific material in the house being tested. Total bacterial counts are utilized, but the test procedures could be adapted for specific pathogen, fungal, or viral testing. Results indicate the performance of disinfectants only at the location tested. This test has been utilized to compare disinfectants from different manufacturers and has found this to be very useful in product comparisons.

CHOICE OF DISINFECTANTS

Disinfectant were chosen to represent the major groups of disinfectants used in poultry houses and equipment. Specific choices were based on past testing comparisons within the same group.

LAB TESTING

Two fold dilutions of each disinfectant were made. 50 ml of each dilution is added to a plastic weighboat containing 5 grams of used litter collected from a poultry house. Three replicates were performed, and the results were combined for the evaluation.

The litter/disinfectant solution ws stirred and 0.1 ml of solution was cultured on nutrient agar at 10 minutes, 1 hour, 5 hours, and 15 hours. Plates were incubated at 370 C and total plate counts were taken.

This test is practical for predicting which disinfectants are best suited for sanitizing houses, soaking drinkers, feed pans or other equipment, or for use in dip pans.

FIELD TESTING

Cultures were taken by Rodac plates of different types of substrates in a poultry house (concrete floors, dirt floors, wooden poles, painted wood surfaces, fans, drinkers, etc.). Areas cultured were marked. Recommended label dilutions of the disinfectants were made and sprayed on an area of the house. Double recommended levels were also prepared and sprayed on separate areas. Two hours after disinfection, a Rodac plate culture was taken on a disinfected area adjacent to the previously tested area.

EVALUATION OF TESTS

It is important to compare disinfectants by the recommended dilutions (from the labels), levels actually being used in the field, and optimum levels. Some disinfectants will work well in organic matter at higher levels, but the recommended dilutions are too low to be effective with organic matter present. The combination of lab and field tests help determine how a disinfectant may best be used.

Economics are also a major factor in disinfectant programs. Effectiveness should be considered in conjunction with cost. The extra cost of an effective disinfectant is easily justified when compared to a less expensive disinfectant that does not perform in a specific job. Dilution used must also be factored into cost comparisons.

DURACION DEL EFECTO PROFILACTICO DE LAS LINFOCINAS PROVENIENTES DE LINFOCITOS T ACTIVOS, CONTRA UNA INFECCION DE *Eimeria tenella* EN POLLOS DE ENGORDA

DURATION OF THE PROPHYLACTIC EFFECT OF ACTIVE T-CELL-DERIVED LYMPHOKINES AGAINST *Eimeria tenella* INFECTION IN BROILERS

García, E. Gary, Téllez, I. Guillermo, Paasch M. L.

Departamento de Producción Animal: Aves
FMVZ-UNAM. Cd. Universitaria D.F. 04510

ABSTRACT

Duration of the prophylactic effect of T-cell supernatant lymphokines from concanavalin-A (Con-A)-stimulated *Eimeria tenella*-immune broiler T-lymphocytes in the face of independent *E tenella* challenge was evaluated. For this purpose, the severity of cecal lesions (study I), and total oocyst count in the feces (study II) were analyzed. In study I 1,270 chickens were randomly assigned to 3 different experiments, and 3 treatments with 3 replicates each: a) experimental group, in which all birds were intraperitoneally (IP) inoculated at 14 days of age with 1 ml ET-ILK, and then challenged with a 1,000 oocyst/bird single dose at 3, (experiment 1), 5, (experiment 2), and 7 (experiment 3) days after ET-ILK administration; b) positive control; c) negative control. Birds in experiments 1 and 2 that received ET-ILK prophylactic treatment at 3 and 5 days prior to challenge, showed 100, and 76% protection against cecal lesions, respectively, as opposite to positive controls ($P<0.001$). Nevertheless, no significant ($P>0.05$) differences existed between experimental group and positive group challenged at 7 days after ET-ILK treatment. Experimental design of study II was similar to that of study I, only that in study II birds were challenged with 2,000 oocyst/bird in order to evaluate the total oocyst count in feces. Results were similar to those in experiment 1, since birds that received prophylactic ET-ILK treatment showed a significant ($P<0.05$) decrease in total cecal oocyst counts, as compared to the positive controls, but not at 7 days ($P<0.05$). These results demonstrate that the prophylactic administration of ET-ILK induces a reduction in the development of *E. tenella* for a maximum of 5 days, as evidenced by both a decrease in cecal lesion severity, and oocyst counts.

INTRODUCCION

Para el caso de la coccidiosis aviar, se ha observado en estudios *in vivo,* que la protección del sobrenadante de linfocinas provenientes de linfocitos T de aves inmunes contra *E. tenella* (ET-ILK) han mostrado su eficacia *in vivo*, cuando son administradas a 30 minutos, 12, 24, 36 y 48 h. antes del desafío con *E. tenella.*, lo cual no sucede si éstas son administradas 12 h. después del desafío.[7] En este estudio procedimos a evaluar las lesiones macroscópicas cecales, en aves desafiadas en forma independiente a los 3, 5 y 7 días con *E. tenella* y la disminución de la producción de ooquistes cecales, en aves desafiadas en forma independiente a los 3, 5 y 7 días con *E. tenella* posadministración del ET-ILK.

MATERIAL Y METODOS

Preparación de los parásitos. Se usó la cepa MOR-80 de *E. tenella* del Departamento de Producción Animal: Aves FMVZ-UNAM, los ooquistes fueron cosechados, esporulados y almacenados como se describe.[11]

Animales Experimentales. Se usaron 270 pollos de 14 días de edad para la evaluación de la severidad de lesiones cecales (estudio 1), así como 144 pollos para la evaluación del número de ooquistes (estudio 2). Se criaron juntos en piso hasta el día 13° de edad y a partir del día 14° de edad en adelante, las aves fueron lotificadas aleatoriamente. Las aves recibieron alimento bajo restricción alimenticia natural y agua *ad libitum*.

Inmunización de las aves para la producción de linfocinas. Se realizó como se describe[7].

Preparación de suspenciones de bazos y aislamiento de linfocitos T. La obtención de células de bazo, aislamiento de LT, producción y preparación de linfocinas, se realiza como lo describe la técnica. [7]

Administración de linfocinas. Se inoculo 1.0 ml/ave del ET-ILK por vía IP, a todos los pollos de 14 días de edad, que se encontraban en los grupos experimentales. [7]

Desafío con la cepa MOR-80. En el experimento 1 (Evaluación de la severidad de lesión cecal), se utilizó una dosis baja y única de 1,000 ooquistes/ave, la que produce severidad de lesión uno.[14] Para el experimento 2 (Evaluación de ooquistes), se utilizó una dosis única de 200 ooquistes/ave.

Diseño Experimental. Estudio 1: Se evaluó la severidad de lesión cecal macroscópica al 4° día posterior al desafío por *E. tenella* a todas las aves. El diseño experimental estuvo formado por 3 experimentos independientes (con 3 réplicas cada uno): a) Desafío con *E. tenella* a los 3 días posinoculación del ET-ILK, b) Desafío por *E. tenella* a los 5 días posinoculación del ET-ILK y c) Desafío por *E. tenella* a los 7 días posinoculación de las ET- ILK. Cada uno de ellos a su vez con 3 tratamientos: 1) Testigo positivo (no tratado-desafiado), 2) Experimental (tratado-desafiado) y 3) Testigo negativo (no tratado-no desafiado). Se asignaron aleatoriamente 15 aves para cada repetición. **Estudio 2:** Se evaluó el número de ooquistes cecales al 6° día posterior al desafío con *E. tenella* en todos los grupos. Se siguió el mismo diseño experimental que en el estudio 1.

Evaluación de la severidad de las lesiones macroscópicas y número de ooquistes cecales. La severidad de las lesiones cecales fue evaluada como lo describen Johnson y Reid.[3] El conteo de ooquistes se realizó por el método de la técnica de Long. [11]

Análisis Estadístico. Los resultados del estudio 1, fueron sometidos a un ANOVA y de ser necesario a una prueba de Scheffe, mediante la utilización del paquete estadístico SAS.[12] Para el estudio 2, se utilizó la prueba de Ji ^{2} descrita por Zar. [16]

RESULTADOS

Estudio 1: Evaluación en la disminución de la severidad de lesiones macroscópicas.

Evaluación del desafío a los 3 días posadministración del ET-ILK: Se observaron diferencias significativas entre el grupo positivo y el grupo que recibió el tratamiento profiláctico del ET-ILK ($P < 0.001$), que no presentó lesiones cecales aparentes, el testigo negativo no presenta cambios (Cuadro 1).

Evaluación del desafío a los 5 días posadministración del ET-ILK: Se observaron diferencias significativas entre el grupo positivo y el grupo que recibió el tratamiento profiláctico del ET-ILK ($P < 0.001$), sin embargo, se observó una reducción parcial del 24% en la protección del grupo que recibió las ET-ILK, el testigo negativo no presento cambios (Cuadro 1).

Evaluación del desafío a los 7 días posadministración del ET-ILK: No se encontraron diferencias significativas entre el grupo positivo y el grupo que recibieron el tratamiento profiláctico con las ET-ILK ($P > 0.05$), ya que el 100% de las aves presentó lesiones cecales, el testigo negativo no presento cambios (Cuadro 1).

Estudio 2: Evaluación de la disminución de la producción de ooquistes cecales.

Evaluación del desafío a los 3 días posadministración del ET-ILK: Las aves que recibieron el tratamiento profiláctico con las ET-ILK, mostraron una reducción significativa en el total de ooquistes cecales en comparación con el testigo positivo ($P < 0.05$) (Cuadro 2).

Evaluación del desafío a los 5 días posadministración del ET-ILK: Hubo diferencias significativas entre las aves del grupo positivo y el que recibió el tratamiento profiláctico del ET-ILK, al observarse la menor cantidad de ooquistes cecales en el grupo tratado con ET-ILK ($P < 0.05$) (Cuadro 2)

Evaluación del desafío a los 7 días posadministración del ET-ILK: No hubo diferencias significativas entre las aves del grupo positivo y el que recibió el tratamiento profiláctico del ET-ILK ($P > 0.05$), ya que presentaron la misma cantidad de ooquistes (Cuadro 2).

DISCUSION

Los resultados obtenidos en el presente estudio muestran la existencia de protección conferida por los sobrenadantes provenientes de LT aislados de aves inmunes contra *E. tenella* y que la actividad de éstos sobre sus células blanco en el huésped, es importante para el control de las *Eimerias spp* aviares.[4,5,6,7,9,10] Sin embargo el efecto profiláctico del ET-ILK , mostró ser de corta duración según el estudio, ya que sólo se observan los efectos benéficos por un tiempo máximo de 5 días posteriores a la administración del ET-ILK y disminución del número de ooquistes.

Este corto período podría deberse a la vida media fisiológica de las citocinas y su regulación dentro del organismo aviar como sigue: a) Las citocinas son consideradas proteínas solubles de distintos pesos moleculares y son sintetizadas bajo su propio código genético y no a través de otras células o por medio de proteínas extracelulares complementarias; [15] b) Cada

una tiene función específica, al adherirse a los receptores de la célula blanco; [1] c) Presentan una vida media corta, por ejemplo la IL-2 humana tiene una vida media inicial de 6 a 12 minutos y de 40 a 80 minutos en fase terminal,[2] la de ratón de 53 h. y la de pollo de 9.7 h.; [8] d) La liberación de las citocinas de su célula origen, depende de un estimulo continuo a la célula receptora, que puede darse a través de otra(s) citocina(s) o entre receptores de membrana.[1,13,15] Sin embargo el mecanismo aun no es conocido debido a que no sabemos cual es la linfocina(as) involucradas en esta protección. Es por eso que ya se están haciendo los estudios necesarios para ello y se esta probando el ET-ILK a dosis más altas de *E. tenella*.

Cuadro 1. Evaluación de la disminución de la severidad de lesión cecal al 4° dia del periodo de prepatencia de *E. tenella*, en pollitos de 14 días de edad inoculados intraperitonealmente con linfocinas obtenidas a partir de linfocitos T de aves inmunes, estimulados con concanavalina A (ET-ILK), 3 días[a], 5 días[b] y 7 días[c] antes del desafio respectivamente [f].

	Experimentos							
Tratamientos	Repetición 1		Repetición 2		Repetición 3		Combinado	
	Severidad/ Lesión[d]	Número/ Aves[e]	Severidad/ Lesión[d]	Número/ Aves[e]	severidad/ Lesion[d]	Número/ Aves[e]	Severidad/ Lesión[d]	Número/ Aves[e]
[a] No tratado-Desafiado	1	15/15 *	1	15/15 *	1	15/15 *	1	45/45 *
[a] Tratado-Desafiado	0	15/15 **	0	15/15 **	0	15/15 **	0	45/45 **
[a] No tratado-No desafiado	0	15/15 **	0	15/15 **	0	15/15 **	0	45/45 **
[b] No tratado-Desafiado	1	15/15 *	1	15/15 *	1	15/15 *	1	45/45 *
[b] Tratado-Desafiado	1	03/15 **	1	04/15 **	1	04/15 **	1	11/45 **
[b] No tratado-No desafiado	0	15/15 **	0	15/15 **	0	15/15 **	0	45/45 **
[c] No tratado-Desafiado	1	15/15 *	1	15/15 *	1	15/15 *	1	45/45 *
[c] Tratado-Desafiado	1	14/14 *	1	15/15 *	1	14/14 *	1	43/43 *
[c] No tratado-No desafiado	0	15/15 **	0	15/15 **	0	15/15 **	0	45/45 **

[d] La severidad de lesión está expresado por la escala de Johnson & Reid.

[e] Se reporta el número de aves que presentan las lesiones por cada grupo y prueba. Los valores seguidos por diferente número de asteriscos son estadísticamente significativos, por la prueba de Ji^2 ($P < 0.001$).

[f] Las aves fueron desafiadas con una dosis única de 1000 ooquistes esporulados/ave

REFERENCIAS

1. Abbas, A.K., Lichtman, A.H., and Pober, J.S.1994. Celular and Molecular Immunology. 2th. ed.Saunders press. Philadelphia, U.S.A.
2. Anderson, P.M. and Sorenson, M.A. 1994. Effects of route and formulation on clinical pharmacokinetics on interleukin-2. Clinical Pharmacokinet 27:1-8.
3. Johnson, J. and Reid. W.M.1970. Anticoccidial drugs: Lesion scoring techniques in battery and floor-pen experiments with chickens. Exp. Parasitology 28:30-36.
4. Klesius, P.H., and Giambrone, J.J.1983. Adoptive transfer of delayed hypersensivity and protective immunity to *Eimeria tenella* with chicken-derivated transfer factor. Poultry Science 63:1333-1337.
5. Kogut, M.H. and Lange,C.1987a: The role of lymphokines on the protective immunity of chicens to *Eimeria tenella*. Poultry Science 66:128.
6. Kogut, M.H., Slajchert, T., Scott, H.M., and Lange, C.1988b: Protection of chickens from infection with *Eimeria tenella* following the *in vivo* administration of immune lymphokines. Poultry Science 67:105 Supp 1.
7. Kogut, M.H. and Slajchert, T.1992c: T-lymphocytes confer protection in chickens against *Eimeria tenella* by production of lymphokines. Immunol. and Infect. Diseases 2:69-79.
8. Kromer, G., Schauenstein, K. and Wick, G.1984. Avian lymphokines: An improved method for chicken IL-2 production and assay. A Con A-crytrocyte complex induces higher T-cell proliferation and Il-2 production than does free mitogen. J. Immunol. Methods 73:23-27.
9. Lillehoj H.S., Kang, S.Y., Keller, L. and Sevoian, M.1989a: *Eimeria tenella* and E. acervulina: lymphokines secreted by an avian T cell

lymphoma and sporozoite-stimulated immune T lymphocytes protect chickens against avian coccidiosis. Experimental parasitology 69:54-64.
10. Long, P.L., y Milne, B.S.1971a: The effect of an Interferón inducer on *Eimeria maxima* in the chicken. Parasitol. 62:295-302.
11. Long, P.L., Millard, B.J., Joyner, L.P. and Norton, C.C.1976b: A guide to laboratory techniques used in the study and diagnosis of avian coccidiosis. Folia Veterinaria Latina Vol:VI:(3) 201-217.
12. Luginbuke, R.C. and Schilotzhauser, D.1987: SAS/STAT guide for personal computers. 6th, Page 555-573. SAS Institute, Cary, N.C.
13. Lydyard, P. and Grossi, C.1993. Development of the immune system. In Immunology edited by Roitt, I., Brostff, J., Male, D. 3th ed. 16.-16.22. Mosby Hong Kong .
14. Moreno, D.R., Quiróz, R.H. and Mosqueda, T.A.1980a: Patogenicidad de algunas cepas de *Eimeria* aisladas de pollos en México. Vet. Mex. 2:1-7.
15. Paul, W.E.1993: Fundamental Immunology. 3th ed. editaded by Raven press. LTD New York.
16. Zar, J.1984. Biostatistical analysis, 2th ed. Prentice-Hall Inc.Page 384-351.Englewood Clifts, N.J.

Cuadro 2. Evaluación de la disminución del número de ooquistes al 6° día del período de prepatencia de *Eimeria tenella*, en pollitos de 14 días de edad inoculados intraperitonealmente con linfocinas obtenidas a partir de linfocitos T de aves inmunes, estimulados con concanavalina A (ET-ILK), 3 días[a], 5 días[b] y 7 días[c] antes del desafío respectivamente [e].

	Experimentos			
Tratamiento	Repetición 1	Repetición 2	Repetición 3	Combinado
	Ooquistes[d]	Ooquistes[d]	Ooquistes[d]	Ooquistes[d]
[a] No tratado-Desafiado	32,000 *	28,000 *	40,000 *	33,333 *
[a] Tratado-Desafiado	4,000 ***	0 ***	4,000 ***	2,666 ***
[a] No tratado-No desafiado	0 ***	0 ***	0 ***	0 ***
[b] No tratado-Desafiado	32,000 *	32,000 *	32,000 *	32,000 *
[b] Tratado-Desafiado	8,000 **	16,000 **	20,000 **	14,666 **
[b] No tratado-No desafiado	0 ***	0 ***	0 ***	0 ***
[c] No tratado-Desafiado	36,000 *	32,000 *	44,000 *	37,333 *
[c] Tratado-Desafiado	36,000 *	32,000 *	44,000 *	37,333 *
[c] No tratado-No desafiado	0 ***	0 **	0 ***	0 ***

[d] Promedio del número de ooquistes/g/ave, por grupo y por prueba. Los valores seguidos por diferente número de asteriscos presentan diferencias estadísticamente significativas por la prueba de Scheffe ($P < 0.05$).

[e] Las aves fueron desafiadas con una dosis única de 200 ooquistes esporulados/ave

SENSITIVITY OF FIELD ISOLATES OF EIMERIA TO ANTICOCCIDIAL DRUGS FOLLOWING THE USE OF COCCIVAC IN BROILERS

SENSIBILIDAD DE LOS AISLAMIENTOS DE CAMPO DE *EIMERIA* A LAS DROGAS ANTICOCCIDIANAS DESPUES DEL USO DE COCCIVAC EN POLLOS DE ENGORDA

H.D. Chapman[A], T.E. Cherry[B], and M.A. Quiroz[C]

[A]Department of Poultry Science, University of Arkansas, Fayetteville, AR 72701
[B]Department of Agriculture, Stephen F. Austin State University, Box 13000 SFA Station, Nacogdoches, TX 75962
[C]Mallinckrodt Veterinary Inc., Route 113, P.O. Box 537, Millsboro, DE 19966

RESUMEN

Se investigó el efecto de la monensina y del zoalene sobre la mortalidad, la calificación de las lesiones, la calificación de las deyecciones sobre una charola y la ganancia de peso, en aves que recibieron aislamientos de *Eimeria* de 5 granjas comerciales en las que se habían utilizado ionóforos durante muchas parvadas y se había encontrado que la monensina era sólo parcialmente efectiva. Los aislamientos fueron obtenidos antes y después del uso de Coccivac-B durante 1 ó 2 parvadas.

En los estudios de sensibilidad, los pollos inoculados con los aislamientos obtenidos antes del uso de Coccivac-B (grupo B) mostraron mortalidad debida a coccidiosis, mientras que las aves que recibieron los aislamientos obtenidos después de 1 ó 2 parvadas no presentaron mortalidad (grupo A). El grupo A logró una ganancia de peso significativamente mayor y tuvo calificaciones tanto de lesiones como de deyecciones en charola significativamente menores a las del grupo B. Se encontraron significativamente menos lesiones por *E. tenella* en las aves que recibieron los aislamientos después del uso de Coccivac-B durante una parvada. No se encontraron lesiones en las aves que recibieron los aislamientos obtenidos después de 2 parvadas vacunadas contra la coccidiosis. Se sugiere, por lo tanto, que el uso subsecuente de una vacuna contra la coccidiosis puede dar como resultado una substitución de las cepas de campo resistentes por oocistos sensibles a las drogas. Este estudio demostró que hubo un mejoramiento en la sensibilidad de las coccidias a las drogas anticoccidianas (monensina y zoalene) después del uso de Coccivac-B después de una parvada, y un mejoramiento todavía mayor después de 2 parvadas.

INTRODUCTION

Coccivac-B is a live vaccine developed for the immunization of chickens against the 4 most economically important species of coccidia in broilers (*E. tenella, E. maxima, E. acervulina* and *E. mivati*). The use of the vaccine on hundreds of millions of birds has proven that a vaccine is an excellent alternative for coccidiosis control and an economical way to protect the birds against the pathogenic effect of these parasites.

The purpose of this study was to evaluate oocyst population changes with the use of a vaccine, and whether any change in sensitivity of coccidia to anticoccidial drugs occurred following the use of the vaccine.

EXPERIMENTAL DESIGN

Two sensitivity studies were conducted. The first one included 336 chicks allocated in 42 pens, the effect of the drugs (monensin and zoalene) upon isolates obtained from 3 commercial farms K, M, and N before the use of Coccivac-B (group B) and after use of 224 chicks allocated in 28 pens. The effect of the same drugs upon isolates obtained from 2 other commercial farms L and P before and after 2 grow outs using the vaccine examined. At the time of the second fecal collection, either monensin or a shuttle program comprising stenorol followed by monensin was being used as the coccidiostat program.

Each experiment included the following treatments:

a. Infected birds (200,000 oocyst/bird) medicated with monensin 122 ppm (COB)

b. Infected birds (200,000 oocyst/bird) medicated with zoalene 125 ppm (ZOA)

c. Unmedicated infected birds (200,000 oocyst/bird) (UMI)

d. Unmedicated uninfected birds (UMU)

Birds were weighed (by pen) on the day of infection (day 0), and 6 days later (day 6). Results for replicate pens were combined and the gain in weight calculated. On day 6 the birds were killed and 4 birds from each pen were examined for the presence of lesions in the ceca (consistent lesions were not found in other regions of the intestine). The appearance of the droppings in the pens was recorded (dropping pan scores) described by Jeffers (1974).

Results for the 5 isolates obtained for group A and group B were pooled for statistical analysis.

RESULTS

Birds given isolates obtained after 1 or 2 flocks (group A) did not show mortality although deaths due to coccidiosis were present in the birds which received isolates before use of Coccivac-B (group B).

Group A gained significantly more weight than group B for the 2 drugs treatments in both experiments. Group A also had lower lesion scores and dropping pan scores than the group B.

Significantly less lesions of *E. tenella* were found in birds which received isolates after one flock of Coccivac-B and even less in the birds which received the vaccine for a 2 flocks. Tables and figures will be presented at the conference.

CONCLUSIONS

These experiments show that there was improvement in the sensitivity of the coccidia to anticoccidial drugs (monensin and zoalene) following the use of Coccivac-B after 1 grow out and further improvement after 2 grow outs. Mathis and McDougald[1] observed improved efficacy of Zoalene and Amprolium following the use of coccidiosis vaccine in turkeys.

The ceca of birds given isolates obtained before use of Coccivac-B had extensive lesions caused by *E. tenella*. In contrast these lesions were significantly lower in birds given isolates obtained after use of vaccine for 1 flock and there were no lesions in birds given isolates obtained after 2 flocks. Therefore it suggests that the subsequent use of Coccivac-B could result in replacement of drug resistant field strains with drug sensitive oocyst present in the vaccine.

It has been suggested that alternation of immunization and anticoccidial chemotherapy may provide effective long-term control of coccidiosis in commercial poultry production[2].

REFERENCES

1. Mathis, G.F., and L.R. McDougald. In: Proc. Vth International Coccidiosis Conf., INRA, Paris. p. 482-497. 1989.
2. Jeffers, T.K. In: Proc. Georgia Coccidiosis Conf., Athens, GA. p. 339-343. 1986.

BETAINE APPLICATIONS IN POULTRY

APLICACIONES DE LA BETAINA EN AVES

Erkki Virtanen

Director of Research and Development
Finnsugar, Bioproducts
Helsinki, Finland

RESUMEN

La betaina es un compuesto conocido como betaina-glycina o trimetil-glycina, en térrminos simples es una provitamina, está presente en todos los organismos vivos en cantidades muy variables, sus funciones se relacionan con los grupos metilo para recciones de metilación. Recientemente se han presentado trabajos que muestran que la betaina tiene otras aplicaciones, entre estas se incluyen las siguientes:

Sustitución de methionina en las dietas para aves, la disminución de desordenes osmoticos y el incremento de la utilización de nutrientes durante los estados de estres. Las bases fisiológicas para estas respuestas de la betaina en las aves, no se encuentran en los libros de

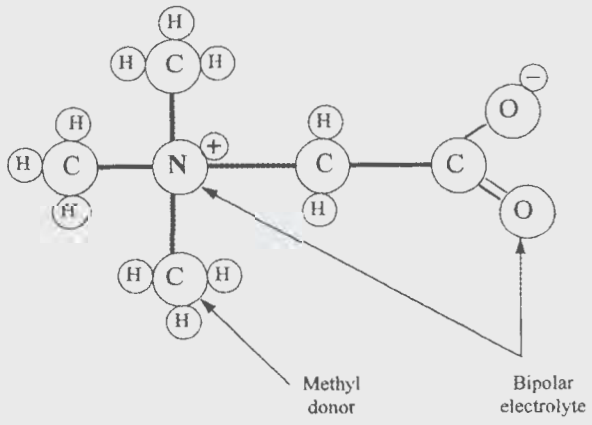
texto, sin embargo las investigaciones realizadas a la fecha nos indican que la betaina tiene grandes perspectivas. La betaina como donador de grupos metilo, puede ser usada para reemplazar parte de la colina que se usa en la formulación, la colina esta considerada como un producto que tiene una habilidad muy variable en las reacciones de metilación, por esta razón la betaina puede sustituir a la colina fácilmente. La conección fisiológica entre la betaina y la metionina es conocida desde hace mucho tiempo, así encontramos que en aves de 3 semanas con una dieta sorgo-soya, no requieren mas de 0.37% de metionina o 0.73% de aminoácidos sulfurados, siempre y cuando los donadores de grupos metilo se encuentren disponibles a alto nivel, trabajos recientes nos muestran que la betaina sustituye parte de la metionina necesaria, ya que aquella es un donador de grupos metilo importante.

The molecule of betaine is bipolar and contains three reactive methyl groups. It is the transfer of these methyl groups during enzyme-catalysed reactions that confers unique properties to betaine.

BETAINE AS A METHYL DONOR

Betaine has been long known as a methyl donor by nutritionists and, consequently used as a partial replacement for choline. Choline is required as part of acetylcholine, the neurotransmitter. To fulfill its function as a methyl donor, choline has first to be converted in the mitochondria, and thus betaine, as a direct methyl donor may be more effective. Furthermore, many compounds in practical diets, including ionophores, may inhibit choline oxidation in mitochondria, resulting in its lower availability for methylation reactions.

Figure 1. Betaine molecule Metabolically active sites are shown with arrows.



While choline is generally considered as the major source of methyl groups in practical diets, published literature demonstrates a very variable availability of choline for methylation reactions. Early work of Stekol et al (1953) reported that the extent of methyl group incorporation from choline in chicks was only a fraction of that observed with either methionine or betaine. Accordingly, choline was markedly less effective than betaine to methylate homocysteine to methionine in chicks.

Specific requirements of choline are not accurately defined, but studies of Baker et al (1983) and Lowry et al (1987) indicate a level of 400-600 ppm. In commercial poultry feeds the amount of choline from raw materials varies normally within the range of 1000-1500 ppm of which 60-70% is available (Molitoris and Baker, 1976). Hence, in practical diets the specific requirement for choline is met with background choline. Several trials have indicated that replacement of supplementary choline with betaine has no adverse effects on performance in commercial poultry operations.

BETAINE / METHIONINE INTERACTION IN BROILER.

While the physiological connection between betaine and methionine has long been known, very few practical studies regarding the methionine sparing effect of betaine have been carried out until recently. work of Pesti et al (1979) indicated that broiler chicks grown to 3 weeks of age and fed with a practical corn-soya diet did not require more than 0.37% methionine or 0.73% total sulphuric amino acids (TSAA) if methyl donors were available at high level. However, no data were available as to the efficacy of betaine versus methionine to promote growth and feed efficiency with slightly methionine-deficient diets. Until recently, the methionine-sparing effect of betaine has not been commonly acknowledged by the nutritionists in the poultry industry.

We have conduced several trials feeding the chicks with a basal corn-soya diet containing 75-80% of the NRC-recommended methionine requirement (TSAA 85-90% of NRC), supplemented with DL-methionine or betaine. The trials have been carried out in practical floor-pen conditions with built-up litter. Interestingly, under these conditions, betaine has been more efficient than methionine in promoting growth and feed efficiency when added into the basal diet, although the diets have been adequate in choline. Our dose-response trial showed 2.3 times higher efficacy of betaine to promote growth and feed efficiency compared with methionine. The betaine versus methionine response appears to be to some extent diet dependent, especially high level of peas may affect the methionine- sparing effect of betaine.

More importantly, coccidiosis challenge appears to be a major factor in the betaine/methionine

relationship. While fed efficiency in response to methionine is pronounced in completely coccidia-free conditions, even a low level of challenge has reduced methionine response and increased betaine response. Consequently, betaine has been a more efficient way than methionine to supplement slightly methionine-deficient diets in practical conditions, even with a low lovel of coccidial challenge, and mostly without critical symptoms of coccidiosis.

In a following trial we compared betaine to other methyl donors, methionine and choline. These were supplemented in equimolar amounts using all posible combinations. Results of the three methyl donors, betaine alone affected lesion score significantly. This demostraded that the responsabe was not mediated through methylation reactions, with apparently have importance in the immune responses.

It should be stressed that a major part of the dietary methionine and TSAA requirement must be met by sulphuric amino acids per se. While betaine is most efficient to promote growth, feed efficiency and carcass leaness with diets marginally (up to 25%) deficient in methionine, betaine supplementation of diets more deficient in sulphuric amino acids than those mentioned here results in poor responses in growth performance.

In our trials we found that betaine use resulted in a reduced stress-induced loss of performance when used together with an ionophore coccidiostat for coccidia challenged chicks. Further trials in the U.S. showed that betaine also had similar effects in chicks not treated with ionophores. We concluded that betaine improves nutrient absorption in a coccidia-stressed gut, while choline and methionine do not have a similar effect.

BETAINE AS AN OSMOPROTECTANT

While most organism contain betaine, few accumulate the compound in high concentrations. Plants belonging to the Chenopodiaceae family, of which sugar beet is the most familiar, are among the best known accumulators. Some microbes and marine invertebrates also contain high concentrations.

The main reason for betaine accumulation in these organisms is to protect the cells from osmotic stress in conditions of drought or in high salinity. The osmoprotectant function of betaine has been extensively described in the literature regarding osmotic regulation of plants, microbes and animals, but has so far raised little attention among nutritionists. In this function, betaine accumulates into cells and cell organelles exposed to osmotic stress, replaces inorganic ions and protects macromolecules from ionic inactivation.

A similar osmoprotective effect has been observed in animals which do not accumulate betaine through synthesis, when given betaine in the feed. Based on this evidence, and given betaine's role in the osmoreglulation of many tissues and organisms, we proposed that the compound may have a stabilizing function in cells suffering from osmotic and ionic imbalance.

THE COCCIDIOSIS CASE

Our first area of extensive study was coccidiosis in poultry. Coccidiosis in one of the major intestinal diseases, and is associated with osmotic and ionic disorders. These are caused by the disease it self, but the ionophore drugs used widely to treat the disease can themselves cause ionic and osmotic changes. We looked at the effect of betaine on parasite development and growth performance, faecal water loss and nutrient digestion of coccidia-challenged chicks.

In a preliminary trial, betaine was given with various combinations of an ionophore coccidiostat, salinomycin to chicks inoculated at 14 days of age with a mixture of three Eimeria species, E. tenella, E. maxima and E.acervulina. While betaine supplmentation resulted in an overall reduction in lesion score and improvement in feed efficiency, no clear interaction was seen between betaine and salinomycin.

RESTORING PERFORMANCE DURING COCCIDIA CHALLENGE

It seemed apparent that dietary betaine affected gut status and feed efficiency in a similar fashion. Further work was therefore carried out to look at the effect of betaine on nutrient digestibility in coccidia-inoculated chicks. Chicks were orally inoculated with a mixture of three Eimeria species at 14 days of age, and digestibility of dry matter, protein, fat, lysine and carotenoid was determined. The addition of betaine to the diet of birds resulted in a lower faecal water content and higher digestibility of these nutrients when betaine was added to the diet. Consequently, the feed conversion efficiency of betaine-supplemented chicks was significantly improved.

Although mostly effective in controlling serious coccidosis outbreaks, anticoccidial treatment does not often bring feed conversion efficiency to the level of non-challenged chicks. In these circumstances which are frequently present under commercial operations, betaine addition seems to be an effective way t recover much of the lost feed efficiency. Betaine has been tested in combination with most commercial anticoccidials. Improved feed conversion efficiency was seen in inoculated birds treated with those anticoccidials which effectively depressed feed conversion efficiency. However, no improvement was seen with anticoccidials which did not have a depressing effect on performance.

RESPONSE MAY BE MULTI-FACETED

Mechanisms of the effect are not fully known. While the methylation functions appear to have little importance, only sparse evidence so far can be found on the osmoprotectant function in the chick's gut. Our preliminary in vitro data demonstrates that betaine improves the water retention of osmotically stressed broiler gut. An interesting piece of work on the effect of betaine on water retention in turkey gut has been carried out by Dr. Ferket at North Carolina State University. Trials with turkeys suffering from "flushing" problem indicated that betaine supplementation can markedly decrease water loss in diarrhoeic animals. Although not yet demonstrated, it would appear that gut epithelial cells can accumulate betaine through active uptake, resulting in better water retention, lower potassium accumulation and alleviation of urea inhibition as in the kidney medulla.

Studies of the effect of betaine on in vitro and in vivo development of Eimeria species have been initiated at the United States Department of Agriculture. The data indicate that betaine has no direct inhibiting effect on the parasite life cycle in vitro. However, betaine markedly reduced in vivo invasion of E. tenella and E. acervulina (Augustine 1995).

RENEWED OPPORTUNITY FOR BETAINE IN ANIMAL FEEDS

While betaine as a methyl donor can stimulate methionine synthesis and thus increase its availability, its osmoprotectant function in the gut under pathogen challenge may be even more important for animal performance under practical conditions. Osmotic disturbance is associated with several kinds of stress in animals, including gut disorders and heat stress. Utilization of organic osmolytes to alleviate these problems has in the past received little attention. However, the culmination of recent data to support the stabilizing role of betaine during metabolic stress creates new opportunities for betaines in animal feeding.

REFERENCES

1. Augustine, P., 1995. The effect of betaine on invasion and development of the avian coccidia. Prince Agri Products Inc. Feed Ingredient Conference, May 11, 1995, Ocean City, ML USA
2. Baker, D.H, Halpin, K.M. Ozarnecki, G.L. and Parsons, C.M. 1983 Poultry Sci. 62: 133-137
3. Bagnasco, S. Balaban, R. Fales, H. and Burg, M. 1986 J. Biol. Cherm 261: 5872-5877
4. Bjorkoy, G. 1991 Msc thesis, University of Tromso. pp 94

THE EVALUATION OF ANTICOCCIDIAL DRUGS AND PROGRAMS

EVALUACION DE LAS DROGAS Y DE LOS PROGRAMAS ANTICOCCIDIANOS

S.H. Fitz-Coy and J.W. Kessler

ALPHARMA, Inc., One Executive Drive, Fort Lee, NJ 07024

RESUMEN

La coccidiosis de los pollos de engorda es una enfermedad dinámica causada por protozoarios que algunas veces puede ser devastadora. A lo largo de los años se han hecho esfuerzos para vigilar y reducir el impacto de la coccidiosis en los pollos comerciales, predominantemente mediante el uso de compuestos anticoccidianos. Las drogas anticoccidianas que se utilizan comúnmente por lo general se supervisan llevando un control de su eficacia antes, durante y después de su uso. Los datos que se obtienen de los métodos de supervisión tales como pruebas en batería, pruebas en corrales en piso, pruebas comerciales y estudios de campo mediante necropsias, son eficaces e informativos. Esta información se utiliza para hacer recomenda-ciones para los programas anticoccidianos.

para elaborar cuadros de incidencia de la enfermedad y de su severidad y para predecir o determinar el posible resultado de las drogas o de los programas que se van a emplear en las operaciones avícolas. Ninguno de los métodos empleados para la evaluación de las drogas anticoccidianas es 100% certero, por lo que es necesario ser cautos al interpretar los datos.

Coccidiosis in broiler chickens is a dynamic protozoan disease that may sometimes be devastating. Over the years, vigilant efforts have been made to reduce the impact of coccidiosis on commercial broiler chickens, predominately by the use of anticoccidial compounds. Commonly used anticoccidial drugs are usually monitored for efficacy prior to, during, and after usage. The data obtained by the monitoring methods such as battery trials, floor pen trials, commercial trials, and field necropsy surveys, are informative and effective. The information is used to make recommendations for anticoccidial programs, chart disease incidence and severity, anticipate, or determine possible outcome of drugs or programs to be used in poultry operations. No specific method for anticoccidial drug evaluation is fool-proof, and caution should be employed in the interperation of data.

EFECTO DEL TOLTRAZURIL COMO TRATAMIENTO POST VACUNAL DE COCCIDIOSIS AVIAR EN POLLO DE ENGORDA EN COMPARACIÓN CON AMPROLIO, Y SU CONSECUENCIA SOBRE LA INMUNIDAD

A COMPARISON OF TOLTRAZURIL VS. AMPROLIUM AS COCCIDIAL POST-VACCINATION TREATMENTS AND THEIR EFFECTS ON IMMUNITY IN BROILERS

[a]Victoria, G., [b]Pavón, E., [a]Rebollo, M., [c]Torres de C. A.,[a]Vazquez,R.

[a]Bayer de México S.A. de C.V.,
[b] Práctica privada,
[c]Laboratorio Cordobés de Diagnóstico Pecuario.

ABSTRACT

Two flocks of broilers were vaccinated with a commercial coccidiosis vaccine. After having observed a severe post-vaccine reaction, 20,000 birds in one farm were treated with amprolium at 11 and 12 days post-vaccination; 10,000 birds in the other farm were treated with toltrazuril at 10 and 11 days post-vaccination. As a control ten thousand non-vaccinated birds received coccidiostat in the feed. At 49 days 4 8-bird groups were challenged with *Eimeria tenella*, as follows: A) 8 amprolium-treated vaccinates, B) 8 toltlazuril-treated vaccinates; C) 8 non-vaccinated controls with no coccidiostat in the feed; and D) 8 non vaccinated chickens with coccidiostat in the feed. Group B lesions were consistently lower than those in other groups. Group C lesions were the most severe ones among all groups. Oocyst counts varied, and those in group B were remarkably lower as compared to all other groups. Protection conferred by the vaccine was 100% in group B, as compared to groups A and C that had 75% protection.

INTRODUCCIÒN

Anualmente se destinan millones de dolares para el control de una de las enfermedades que resulta ser más importante para la industria avícola, "La Coccidiosis Aviar", por lo que es de vital importancia evaluar nuevos métodos profilácticos. El uso de vacunaciones contra coccidiosis aviar ha sido una nueva oportunidad para ayudar al control de este problema; actualmente la mayoría de las parvadas de reproductoras incluyen dichos productos en sus programas preventivos. Recientemente se ha introducido el uso de vacunas contra coccidias en pollitas de reposición para huevo comercial y en el pollo de engorda. Un problema frecuente al que se enfrentan los usarios de estas vacunas, especialmente en el trópico, son las reacciones postvacunales. El presente estudio evaluó el efecto de dos de los tratamientos más frecuentes para este problema, y su repercusión en la inmunidad conferida al ave.

MATERIAL Y MÉTODOS

Dos granjas de pollo de engorda, ubicadas en la zona de Córdoba del estado de Veracruz, fueron vacunadas con una vacuna comercial contra coccidiosis (Coccivac-B® Sterwin), y recibieron alimento sin coccidiostato durante todo un ciclo. Una tercera granja se dejó como testigo y recibió alimento con un programa dual de coccidiostatos: (ver cuadro 1). La vacuna se aplicó uniformemente en ambas granjas y según recomendaciones del proveedor a los 3 días de edad en el alimento. Diez días después una granja fué tratada con Amprolio en el agua potable (Amprol Sol® LAB. MSD AGVET, al 20%). durante 48 hrs. en toma continua, a razón de 300 g/1000 l , otra granja fué tratada con Toltrazuril en el agua potable (Baycox® Bayer al 2.5%) a razón de 25 ppm en toma continua durante 48 hrs. La granja que no fué vacunada y recibió alimento con coccidiostato no fué tratada.

Alimento iniciador	**Coccidiostato**	**Dosis**	**Edad**
Nicarbacina Narasina	Nicarmix 25% Monteban 10%	300 g/Ton 250 g/Ton	1 a 3 semanas
Alimento crecimiento	**Coccidiostato**	**Dosis**	**Edad**
Nicarbacina Narasina	Nicarmix 25% Monteban 10%	300 g/Ton 250 gr/Ton	3 a 5 semanas
Alimento finalizador	**Coccidiostato**	**Dosis**	**Edad**
Monensina	Elancoban 20%	600 g/Ton	de 5 semanas al mercado

A los 25 días de edad, se realizaron raspados de mucosa intestinal en 5 aves tomadas completamente al azar de cada granja, siguendo el procedimiento para ave indicadora, descrito por Voeten A.C. y Braunius, W. W 1981 [4].

A los 49 días de edad, se tomaron 8 aves completamente al azar de cada granja vacunada y tratada, y 16 aves de la granja no vacunada, repartiéndose en 4 unidades de aislamiento sobre piso. Se formaron 4 grupos para su desafío con *Eimeria tenella* de probada patogenicidad (proporcionada por M.V.Z. Reynaldo Moreno F.M.V.Z., U.N.A.M.): a) 8 pollos vacunados, tratados con Amprolio, b) 8 pollos vacunados, tratados con Toltrazuril, c) 8 pollos sin vacunar, sin coccidiostato en el alimento y d) 8 pollos sin vacunar, con coccidiostato en el alimento. Para obtener el grupo de las aves sin vacunar y alimentadas sin coccidiestato (grupo c). se proporcionó alimento sin coccidiostato por 48 horas antes del desafío. De cada grupo, 4 aves fueron desafiadas con 5000 ooquistes por ave y las otras 4 con 10,000 ooquistes por ave. El inóculo, una vez preparado, fué aplicado ave por ave directamente en el pico. Nueve días después todas las aves fueron sacrificadas para evaluar lesiones intestinales por el método descrito por Johnson, J. & W.M. Reid 1970 [1] además de realizar conteos de ooquistes por gramo de mezclas de contenido cecal por grupo y por dosis de desafío.

A los 50 días de edad, se pesaron 50 aves de cada granja completamente al azar. Por razone prácticas de manejo, no fué posible medir el consumo de alimento a esta edad, y no se compararon parámetros productivos finales puesto que las parvadas terminaron su ciclo productivo con 8 días de diferencia entre si.

RESULTADOS

En la tabla 1 se observa que la calificación según la técnica de raspado intestinal [4], las aves de la granja vacunada y tratada con Amprolio resultaron positivas a coccidiosis subclínica, mientras que las otras dos granjas salieron negativas.

Tabla 1. **Raspados intestinales y evaluación por el método de ave indicadora, al día 25 de edad**

GRANJA	Ooquistes/ campo(10x) Duodeno	Calificación	Ooquistes/ campo(10x), en yeyuno	Calificación	Criterio
Vacunada, tratada con Toltrazuril	0	0	0	0	Sin problema
Vacunada, tratada con Amprolio	74	2	12	2	Coccidiosis subclínica
Sin vacunar, con nicarbazina y narazina en el alimento.	0	0	3	1	Sin problema

Letras diferentes indican diferencias estadísticas a un nivel de significación $P < 0.05$

* Este lote en particular tuvo una mortalidad de 2.25% a consecuencia de Infección de Saco Vitelino.

En la tabla2 , se observa como el número de ooquistes por gramo de contenido cecal es herrático, tiene cierta relación con la dosis de desafío, sin embargo en el grupo tratado con Toltrazuril se observa una evidente reducción en la eliminación de ooquistes comparado con los demás grupos.

En la tabla 3, se presenta la calificación de lesiones por el método descrito por Johnson, J. & W.M. Reid 1970 [1]. De los 4 grupos desafiados, los grupos no vacunados presentan el mayor grado de lesiones, de estos 2 grupos el que fué alimentado sin coccidiostato mostró el grado mas alto de lesiones. Se observa también que el grupo vacunado y tratado con Amprolio presentan un menor grado de lesiones que los dos anteriores; y el grupo tratado con Toltrazuril no mostró lesiones en absoluto.

Tabla 2
Conteo de ooquistes a los 61 días de edad. (9 días p.d.)

Grupo	5000 ooquistes/ave	10,000 ooquistes/ave
Vac. + Amprolio	769,200	1,222,800
Vac.+ Toltrazuril	2,000	69,700
Test. sin Coccidiostato	346,800	754,800
Test. con Coccidiostato	104,900	1,103,400

Tabla 3.
Calificación de lesiones a los 61 días de edad. (9 días p.d.)

Grupo	5000 ooquistes/ave	DS	10,000 ooquistes/ave	DS
Vac. + Amprolio	0.88	1.44	2.38	1.80
Vac.+ Toltrazuril	0.00	0.00	0.00	0.00
Test. sin Coccidiostato	3.13	0.75	3.50	0.71
Test. con Coccidiostato	1.83	2.02	2.00	1.00

DISCUSIÓN.

El peso del grupo vacunado y tratado con Toltrazuril mostro 142 g y 84 g más que el grupo vacunado y tratado con Amprol y el grupo no vacunado respectivamente, lo que representa de 2 a 3 diás de ganancia de peso y por lo tanto de costos al final de la parvada. Por razones prácticas de manejo, no fué posible medir el consumo de alimento a esta edad, y no se compararon parámetros productivos finales puesto que las parvadas terminaron su ciclo productivo con 4 y 8 días de diferencia entre si.

La protección conferida por la vacuna en el grupo tratado con Toltrazuril fué de un 100% para los dos niveles de desafío, el grupo tratado con Amprolio tuvo un 75% de protección para el desafío con 5000 ooquistes, y de 50% para el desafío con 10000 ooquistes. El grupo no vacunado con coccidiostato tuvo una protección de 75%, en este caso la protección fué conferida por el coccidiostato más que por inmunidad. Se tomó como base para determinar la protección el grado de lesiones obtenido por el grupo testigo (no vacunado sin coccidiostato) .

Tabla 4
Mortalidad y pesos a los 50 días.

GRANJA	Mortalidad	Pesos
Vacunada, tratada con Toltrazuril	8.7%*	a 2162 g
Vacunada, tratada con Amprolio	6.6%	b 2020 g
Sin vacunar, con nicarbazina y narazina en el alimento.	5.2%	c 2078 g

Dado que al momento del desafío no existe ningún residuo de Toltrazuril; tanto la reducción en la eliminación de ooquistes, como el grado de lesiones observados, indican que las aves tienen una buena inmunidad contra *E. tenella*. Pensamos que el efecto coccidicida intracelular que tiene el Toltrazuril permite una mejor exposición antigénica produciendo una inmunidad mas sólida en el epitelio intestinal. Sin embargo no encontramos explicación a el hecho de que los conteos de ooquistes en los raspados realizados a las

3 y ½ semanas sea negativo. Para resolver dichas interrogantes se buscará en estudios futuros hacer desafíos a diferentes intervalos después del tratamiento y usar un mayor número de dósis de desafío, así como otras especies patógenas de *Eimeria* sp.

Apartir de los resultados obtenidos, se concluye que la vacunación contra coccidiosis es una alternativa útil para el control de esta enfermedad, pero por las reacciones y problemas inherentes a ella misma, la ponen solo como una alternativa más para el programa de coccidiostatos en el alimento.

Además de una forma subjetiva, se detectó una baja en la calidad de pigmento en los gupos vacunados en comparación de los no vacunados. Por último es importante mencionar el hecho de que, durante 12 días después de la vacunación contra coccidiosis (según recomendaciones del proveedor), no es posible utilizar antibióticos como las tetraciclinas y las sulfas, puesto que pueden afectar el ciclo de las coccidias, teniendo el inconveniente de limitar los tratamientos en caso de afecciones bacterianas.

LITERATURA.

1. Johnson, J. and W.M. Reid: Anticoccidial drugs: Lesion scoring techniques in battery and floor pen experiments with chickens. Experimental Parasitology 28: 30 -36, 1970.
2. Johnson C.A., Kennedy T.J. and Moeller, M.W. Immunization of chickens against coccidiosis by termination of infections with Bay VI 9142. In McDougald,L.R., Joyner and Long P.L. Proceedings of the Georgia Coccidiosis Conference, Research in Avian Coccidiosis. Nov. 18-20, 1985.
3. Smith, N., Eckert J. and Braun R. Coccidiosis research in europe. Parasitology Today, vol 9, no 7, 1993.
4. Voeten A.C. and Braunius W.W. Subclinical coccidiosis in broilers: A comparative investigation of detection methods. Arch. Geflügelk, 45:189 -193, 1981.
5. Voeten A.C. , Braunius W.W., Orthel, F.W. and Marja A.J. van Rijen. Influence of coccidiosis on growth rate and feed conversion in broilers after experimental infections with *Eimeria acervulina* and *Eimeria maxima*. The Veterinary Quaterly, Vol 10, No. 4, October 1988.
6. Weber, G.M. Effect of prophylactic medication of chicks with lasalocid on the development and specificity of immunity against coccidia.In McDougald,L.R., Joyner and Long P.L. Proceedings of the Georgia Coccidiosis Conference, Research in Avian Coccidiosis. Nov. 18-20, 1985.

EFFECTS OF DIFFERENT TYPES OF ANTICOCCIDIAL DRUG PROGRAMS UPON THE DEVELOPMENT OF IMMUNITY TO EIMERIA SPECIES IN THE FOWL

EFECTOS DE LOS DIFERENTES TIPOS DE PROGRAMAS DE USO DE DROGAS ANTICOCCIDIANAS SOBRE EL DESARROLLO DE INMUNIDAD CONTRA LAS ESPECIES DE *Eimeria* EN LAS AVES

H.D. Chapman

Department of Poultry Science, University of Arkansas,
Fayetteville, AR 72701

RESUMEN

Se investigaron los efectos de diferentes tipos de programas de uso de drogas anticoccidianas sobre el crecimiento de los pollos de engorda desarrollados en corrales en piso y expuestos a la infección con diversas especies de *Eimeria*, al día de edad.

Las aves recibieron ya sea una sola droga (químico o ionóforo) en los alimentos de iniciación y crecimiento, o bien programas duales (en los que se administra primero un producto químico y después un ionóforo, o viceversa). No se encontraron diferencias significativas en el rendimiento a las ocho semanas de edad. Las aves se desafiaron al cumplir las cinco y siete semanas de edad con ooquistes de *E. acervulina*, *E. maxima* y *E. tenella*. Hacia las siete semanas de edad las

aves habían ya desarrollado inmunidad contra las tres especies, lo cual sugiere que ninguno de los programas de administración de las drogas evitó la adquisición de inmunidad.

INTRODUCTION

Despite the widespread use of anticoccidial drugs for the control of coccidiosis, little information is available upon the effects of chemical and ionophorous drugs when used in single drug or shuttle programs upon the performance of broilers. In this study we compare the effects of the chemical drug halofuginone (HAL; 2.72 g/ton) and the ionophore salinomycin (SAL; 60 g/ton) upon broilers reared to 8 weeks of age in floor pens and investigate the development of immunity to *Eimeria* species in birds given these programs.

METHODS

Drugs were given in the starter feed from 0-3 weeks, grower feed from 3-7 weeks followed by a withdrawal period from 7 to 8 weeks when no drugs were used. The trial comprised the following treatments: 1) HAL followed by SAL; 2) SAL followed by HAL; 3) SAL followed by SAL; 4) HAL followed by HAL; 5) No anticoccidial. Roxarsone (45.4 g/ton) and BMD (50 g/ton) were included in the diet of all birds from 0 to 3 weeks and flavomycin (2 g/ton) from 3 to 8 weeks. Treatments comprised 8 pens each containing 50 birds. In order to simulate conditions of exposure to *Eimeria* species similar to those likely to occur in the field, birds were placed on new litter (rice hulls) that had been top-dressed with old litter taken from floor-pens where an artificial infection had been used in a previous flock. Isolates of *Eimeria* species had been obtained from broiler farms in NW Arkansas. Oocysts were present in the litter of all pens by 1 week suggesting that the method employed was an effective way of introducing *Eimeria* parasites into the pens. Numbers of oocysts in the litter increased thereafter with maximum numbers present when the birds were 3 weeks of age followed by a decline. This pattern of infection resembles that seen in commercial broiler houses.

EFFECTS UPON PERFORMANCE

Results are presented in Table 1. Medicated birds (all treatments) gained more weight than the nonmedicated birds by 3 weeks of age, but no differences were apparent by 8 weeks. Birds given 2 drug programs (treatments 1, 2) ate more feed than the nonmedicated birds. No differences in feed intake (by 8 weeks) or feed conversion (3 and 8 weeks) were apparent.

Lesions of *Eimeria* species were not seen in the intestines of any of the birds that died in the trial. Failure to demonstrate improvements in body weight or feed conversion by 8 weeks may be because the level of infection was insufficient to affect the performance of the birds.

DEVELOPMENT OF IMMUNITY

A further objective was to investigate the effect of the drug programs upon the development of immunity to *Eimeria* species under conditions of exposure intended to reflect those likely to be encountered in the field. At 5 and 7 weeks of age 6 randomly selected birds from each pen (48 per treatment) were weighed, placed in clean pens on new litter and given unmedicated feed. Three days later they were weighed and 12 birds were challenged with either 1×10^5 oocysts of *E. acervulina*, 5×10^4 oocysts of *E. tenella* or *E. maxima* or not challenged (pen controls). Seven days later all birds were weighed once more and the gain in weight calculated. A separate batch of birds from the same hatch had been reared in cages and served as susceptible controls to determine the pathogenicity of the inocula.

Weight gains are expressed as a % of the respective unchallenged controls and are presented in Table 2. All 3 species used for challenge caused significant weight depression in the susceptible controls. By 5 weeks significantly reduced weight gains were seen in birds challenged with *E. acervulina* and *E. tenella*, including those birds that had received no medication, suggesting that under the conditions of this experiment, 5 weeks is insufficient time for immunity to develop to these two species. With the exception of birds given SAL/HAL, however, immunity had developed to *E. maxima* by 5 weeks. *E. maxima* is known to be more immunogenic than *E. acervulina* or *E. tenella*. By 7 weeks of age, birds had developed immunity to all 3 species suggesting that none of the drug programs used prevented the acquisition of immunity.

Table 1. Effect of Drug Programs upon Performance of Broilers

Trt. No.	Medication	Body Weight/bird (g)		Feed Intake/bird (g)		Feed Conversion	
		3 wk	8 wk	3 wk	8 wk	3 wk	8 wk
1	HAL/SAL	748[ab]	2863	997[ab]	5608	1.333	1.959
2	SAL/HAL	758[a]	2706	1012[a]	5406	1.338	1.999
3	SAL/SAL	746[ab]	2803	992[abc]	5464	1.330	1.951
4	HAL/HAL	731[b]	2705	974[bc]	5320	1.334	1.968
5	NONE	711[c]	2743	967[c]	5400	1.360	1.972

a, b, c values not followed by a common letter are significantly different

Table 2. Effect of Drug Programs Upon the Development of Immunity to *Eimeria* species

Medication	% Weight Gain					
	5 weeks			7 weeks		
	E. ace	*E. ten*	*E. max*	*E. ace*	*E. ten*	*E. max*
HAL/SAL	79[a]	84[a]	91	88	96	104
SAL/HAL	82[a]	83[a]	84[a]	105	113	128
SAL/SAL	79[a]	86[a]	87	80	115	111
HAL/HAL	80[a]	88	95	113	113	92
NONE	77[a]	75[a]	93	87	91	94

Susceptible controls gained 75%[a], 85%[a] and 50%[a] that of their unchallenged counterparts for *E. acervulina*, *E. tenella* and *E. maxima* respectively.

[a] Values followed by a superscript are significantly different from the unchallenged controls (100%)

RESURGENCE OF ZOALENE ANTICOCCIDIAL IN US BROILERS

RESURGIMIENTO DEL ANTICOCCIDIANO ZOALENE EN POLLOS DE ENGORDA EN ESTADOS UNIDOS

C. S. Roney

ALPHARMA, Inc., Fort Lee, NJ

RESUMEN

El zoalene es un anticoccidiano químico sintético que, como parte de su efectividad, incorpora a la inmunidad. Los programas de control de la coccidiosis han evolucionado desde los farmacéuticos de alta eficacia y baja inmunidad hasta los de baja eficacia y mayor inmunidad y es por ello que las viejas drogas que permiten el desarrollo de inmunidad, como es el caso del zoalene, han venido jugando un papel de importancia creciente en el desarrollo de pollos de engorda en Estados Unidos. En 1990, prácticamente ningún pollo de engorda consumía zoalene en el alimento. En 1992, 200 millones de pollos de engorda lo hicieron en las dietas de iniciación. Hacia 1993, 600 millones de pollos de engorda recibieron esta droga en la ración y esta cantidad permaneció constante en 1995. Una buena parte del zoalene utilizado ocurrió en la región oriental, donde existe un severo desafío coccidiano y se necesitaba un programa alternativo de iniciación, para la rotación de productos. Ahora se considera al zoalene como una alternativa viable, cuando se le utiliza en programas de rotación en pollos de engorda, dando así otra opción a la industria avícola, en la batalla contra la coccidiosis.

DISCUSSION

Historically, the U.S. commercial broiler industry has controlled coccidiosis on the basis of: (1) the administration of an anticoccidial in the feed, (2) flock management and (3) use of concurrent health programs for the control of other infectious and immunosuppressive diseases. While this method basically continues, there appears to be a shift from straight programs, where a single anticoccidial compound is used for the entire growout, to sequential programs where one compound may be used in the starter feed and another product in the grower and finisher feeds. There is also a tendency for longer withdrawal feeding times without an anticoccidial before slaughter, especially in broilers grown to heavier weights.

Zoalene is a synthetic anticoccidial compound introduced in 1960. It was widely and successfully used in the broiler industry for a time until it was replaced by the ionophores.

Zoalene works primarily against the first generation merozoite in the third day of infection but its exact mode of action is unknown. Unlike most synthetics, zoalene allows some cycling of the parasite, thus eliciting a degree of host immunity in the absence of clinical disease. This host immunity has allowed zoalene to fit well into programs with longer withdrawal times and as a short term alternative in rotations with standard programs.

In 1990, essentially no zoalene was used in broilers. As the industry began to search for alternatives to rotate between ionophore and other programs, zoalene was placed in a two cycle rotation program as the anticoccidial fed in the starter feed. Full levels of roxarsone and 50 grams/ton of bacitracin were recommended for use concurrently to aid in the control of *Eimeria tenella* and necrotic enteritis. Some 200 million broilers were fed zoalene in 1992 and in 1993 the number rose to 600 million and has remained steady through 1995 where several companies used this program for the fourth year. Much of the use of zoalene has been on the Eastern Shore where the coccidia challenge is heavy and an alternative starter program was needed in the rotation.

Zoalene is now considered a viable alternative when used in rotation programs in broilers. It has fit well into starter programs by controlling infection but allowing immunity to develop through cycling of the organisms. This then alleviates the burden on the anticoccidial in the grower and finisher rations. Flock performance in most cases has improved on the second cycle of zoalene, probably due to the build-up of immunogenic strains. However, to avoid failure due to overuse, zoalene should probably not be used in an operation more than 6 months consecutively.

The broiler industry in the US continues to change through genetic selection, management practices and equipment, housing design and flock size. *Eimeria* has

proven to be a very successful parasite and continues to prosper in the face of all these changes. The broiler industry must continue to make use of all available resources in the control of this costly parasite. The use of zoalene gives the industry another alternative in this continuous battle.

USE OF SEMDURAMICIN (AVIAX*) IN COMMERCIAL TRIALS IN LATIN AMERICA

USO DE LA SEMDURAMICINA (AVIAX*) EN PRUEBAS COMERCIALES EN AMERICA LATINA

Dan T. Domingo, K. B. Bafundo, and V. Guyonnet

Pfizer, Inc., Animal Health Group
235 East 42nd Street, New York, NY 10017

RESUMEN

La semduramicina (Aviax*) es un nuevo anticoccidiano ionóforo que se administra en el alimento a razón de 25 ppm para el control de las infecciones por *Eimeria* en pollos de engorda. Las pruebas clínicas han demostrado que es segura y compatible con varios medicamentos, y que proporciona excelente rendimiento de las aves en términos de ganancias de peso competitivas, mejoras en la eficiencia alimenticia, en la pigmentación y en el control de las lesiones que producen las coccidias. Los resultados conjuntos de 33 pruebas comerciales realizadas en Latinoamérica utilizando semduramicina durante la fase de crecimiento y finalización en programas duales, en los que se administra un anticoccidiano durante la iniciación y uno distinto durante la engorda, confirmaron la eficacia del producto bajo las condiciones típicas de producción comercial de pollos de engorda. Los pollos que fueron tratados con semduramicina mostraron una ventaja del 0.5% en viabilidad, produjeron 1.196 Kg más carne y tuvieron 1.1 puntos mejor conversión alimenticia en comparación con el grupo que recibió algún otro de varios anticoccidianos. Los pesos vivos en promedio de ambos grupo fueron similares.

INTRODUCTION

Semduramicin (Aviax*) is a new ionophore that was developed for the poultry industry for the control of coccidiosis in chickens. It has been used in Latin America and Japan since the beginning of 1995, and will be available in the USA in 1996. With the length of time needed and the high cost of developing new drugs, this may be the last new anticoccidial reaching the market this decade. Semduramicin will be a valuable addition to the arsenal of anticoccidial agents for the control of this economically significant disease especially with the increasing concern for the development of resistance to anticoccidials by *Eimeria* organisms.

Semduramicin exhibits its anticoccidial effect by facilitating the transfer of cations across the cellular membrane resulting in the upset of the osmotic balance of the parasites[2,12,13]. In an attempt to maintain its osmoregulatory processes, the parasite uses up its energy reserves resulting in the excessive entry of water into the cell, swelling and ultimately death. The efficacy of ionophores relies on their ability to bind to the coccidial membrane prior to entry into the intestinal cells. It is therefore very important to have the drug and the parasites present for sufficient time together in the intestinal lumen for adequate control.

Semduramicin is recommended at 25 ppm in the feed for the control of all pathogenic *Eimeria* species of broiler chickens[7,9,11]. Its good anticoccidial efficacy results in excellent bird performance, i.e., competitive weight gain, feed efficiency, pigmentation and lesion control[8,10]. Overdosage at twice or three times the recommended level is well tolerated in broilers. In addition, accidental administrations at 25 ppm to turkeys and other domestic animals do not cause any adverse effects[5]. Semduramicin is compatible with a wide variety of feed additives and water medicaments[3,4,6] (Table 1).

More than 70 floor pen trials and 60 commercial trials have been performed worldwide. Further research continues to increase our knowledge and scientific database on the product. The purpose of this paper is to review briefly the performance of semduramicin when used in Latin American commercial broiler operations.

MATERIALS AND METHODS

The data presented here are the pooled results of 33 commercial trials conducted in various locations in Latin America. Semduramicin (25 ppm) was incorporated into the grower/finisher feeds of shuttle programs and compared to the prevalent anticoccidial product used in these farms. Local scientists and experts in broiler production participated as study investigators in all studies.

For each trial, houses similar in design, equipment and management were selected. (The trials were conducted in paired houses under typical local conditions, i.e., similar housing, equipment, farm management.) Similar number of birds were used in both groups. Except for the anticoccidials, the same feeding, medication and vaccination programs were used. The length of the trials varied from 40-57 days. The flocks were observed regularly for overall performance, clinical signs of coccidiosis, adverse reactions to the products and litter quality. Performance parameters, i.e., mortality rate, feed conversion ratio, weight gain, were recorded.

RESULTS/DISCUSSION

Semduramicin was very effective in controlling coccidiosis. Except for one trial in Brazil in which coccidiosis lesions were noted in both treatment groups, clinical signs were not observed during the trials. There were no adverse reactions to any of the medications used. Litter quality was similar between the houses on semduramicin and the comparative anticoccidials.

Table 1. List of medicaments compatible with semduramicin*

Avilamycin	Nitrovin
Avoparcin	Olaquindox
Bambermycins	Oxytetracycline
Bacitracin Methylene Disalicylate	Penicillin G
Chlortetracycline	Roxarsone
Colistin	Tylosine
Danofloxacin	Virginiamycin
Furazolidone	Zinc Bacitracin
Lincomycin	

*Based on published articles[2,3,5] and data on file.

Semduramicin was fed to more than 385,000 birds during these trials. The performance results of semduramicin as compared to other anticoccidials in shuttle programs are shown in Tables 2 and 3. A 0.5% advantage in liveability was noted in birds given semduramicin as compared to the other anticoccidials. This resulted in 1.196 kg more meat produced in the semduramicin group as compared to the other group. While the average weight gain for the semduramicin group was similar to the other group, overall feed conversion with semduramicin use improved by 1.1 points.

Table 2. Summary of 33 commercial trials - liveability and total production

	Liveability (%)		Total Production	
Country	Semd.	Comp.	Semd.	Comp.
Brazil	94.9	94.4	310,32	310,87
Mexico	93.8	93.3	160,98	160,19
Colombia	91.3	91.4	148,10	147,96
Venezuela	94.3	92.5	54,980	54,095
Argentina	94.5	94.0	68,990	69,410
Costa Rica	95.4	95.1	10,665	10,300
Average/Total	93.8	93 3	754,03	752,84
Adv/(Disadv)	0.5		1,196	

Semd. = Semduramicin
Comp. = Competition

These advantages observed in the semduramicin group can be translated into economic benefits. The economic benefit of 1.0-point feed conversion will depend on the average liveweight of the birds, the average feed cost and the number of birds produced[1]. Assuming an average liveweight of 2.05 kg and $176/MT as average feed cost, feeding semduramicin resulted in a savings of $3,960.00 per million birds compared to the other anticoccidial group. Assuming an average market price of $1.25/kg, the increased meat produced with the semduramicin group translates into an additional $3,106.50 sales per million birds. The overall economical advantage of using semduramicin in these trials is therefore $7,066.50 per million birds produced.

Table 3. Summary of 33 commercial trials in Latin America--Average weight and feed conversion

	Average Weight		Feed Conversion	
Country	Semd	Comp.	Semd.	Comp.
Brazil	2.074	2.089	2.029	2.038
Mexico	2.081	2.082	1.952	1.977
Colombia	2.000	2.001	1.967	1.967
Venezuela	1.917	1.924	2.157	2.191
Argentina	2.556	2.586	2.230	2.201
Costa Rica	2.019	1.962	2.038	2.112
Average/Total	2.083	2.092	2.028	2.039
Adv/(Disadv)	(0.009		0.011	

Semd = Semduramicin
Comp. = Competition

CONCLUSION

Semduramicin is a new ionophore anticoccidial for broiler chickens. Clinical trials have shown that it is safe and effective, and can improve the profitability of broiler production.

ACKNOWLEDGEMENTS

The authors gratefully acknowledge the cooperation and effort of all trial monitors and industry cooperators who have participated in the commercial evaluation of semduramicin. Without their dedication and work, the success of this endeavor could not have been realized.

REFERENCES

1. Benoff, F., Personal communication.
2. Conway, D.P., J.K. Johnson, V. Guyonnet, P.L. Long, and C.D. Smothers. Efficacy of semduramicin and salinomycin against different stages of Eimeria tenella and E. acervulina in the chicken. Vet. Parasitology. 45:215-229. 1993.
3. Daigneault, J., and P. Gadbois. Efficacy of semduramicin plus virginiamycin against Eimeria acervulina, Eimeria maxima and Eimeria tenella. Proc. 44th West. Poult. Dis. Conf. pp. 82-83. 1995.
4. Kula, J.A., L.M. Pote, and C.L. Quarles. Efficacy of semduramicin plus roxarsone against field strains of Eimeria tenella in broiler chickens in battery cages. Poult. Sci. 73 (suppl. 1):15. 1994.
5. Kula, J.A., M.N. Romano, N.B. Logan, G.F. Mathis, and L.R. McDougald. Toleration of semduramicin in commercial turkeys. Proc. 45th N.C. Avian Dis. Conf., Des Moines, Iowa. pp. 75-76. 1994.
6. Kula J.A., C.L. Quarles, L.M. Pote, and G.W. Thrasher. Results in feeding broilers with semduramicin sodium (Aviax*) in combination with bacitracin methylene disalicylate and roxarsone. Proc. 44th West. Poult. Dis. Conf. pp. 80-82. 1995.
7. Logan, N.B., M.E. McKenzie, D.P. Conway, L.R. Chappel, and N.C. Hammet. Anticoccidial efficacy of semduramicin. 2. Evaluation against field isolates including comparisons with salinomycin, maduramicin and monensin in battery tests. Poult. Sci. 72:2058-2063. 1993.
8. McDougald, L.R., G.F. Mathis, and D.P. Conway. Effect of semduramicin, salinomycin and monensin on performance, shank pigmentation and coccidial lesions in broiler chickens in floor pens. Proc. XIX World's Poultry Congress, Amsterdam, The Netherlands, Vol. 3, pp. 571-574. 1992.
9. McKenzie, M.E., D.P. Conway, N.B. Logan, C.P. Wilkins, and L.R. Chappel. Anticoccidial efficacy of semduramicin. 1. Evaluation against field isolates by dose titration in battery tests. Poult. Sci. 72:2052-2057. 1993.
10. Quarles, C.L., G.F. Mathis, L.R. McDougald, and D.P. Conway. Efficacy of semduramicin, salinomycin and monensin against Eimeria spp. in broiler chickens in floor pens. Proc. XIX World's Poultry Congress, Amsterdam, The Netherlands, Vol. 3. pp. 590-593. 1992.
11. Ricketts, A.P., E.A. Glazer, T.T. Migaki, and J.A. Olson. Anticoccidial efficacy of semduramicin in battery studies with laboratory isolates of coccicia. Poult. Sci. 71:98-103. 1992.
12. Smith, C.K. and R.G. Strout. Eimeria tenella: Accumulation and retention of anticoccidial ionophores by extracellular sporozoites. Exp. Parasitol. 48:325-330. 1979.
13. Smith, C.K., R.B. Galloway, and S.L. White. Effect of ionophores on survival, penetration and development of Eimeria tenella sporozoites in vitro. J. Parasitol. 67:511-516. 1981.

CONSIDERATIONS AND TACTICS FOR HELMINTH CONTROL IN TURKEYS AND CHICKENS

CONSIDERACIONES Y TACTICAS PARA EL CONTROL DE LOS HELMITOS EN POLLOS Y PAVOS

T. A. Yazwinski and C. A. Tucker

Department of Animal Science, University of Arkansas, Fayetteville, AR 72701

RESUMEN

Durante los trabajos de supervisión de rutina de la salud de las parvadas, se separaron, durante la necropsia, los intestinos dé pavos de 30 días de edad procedentes de granjas en California, Minnesota y Carolina del Norte. Los tractos se envasaron individualmente, se empacaron con refrigerante y se enviaron para entrega al día siguiente a la Universidad de Arkansas, para el aislamiento y la cuantificación de los nemátodos. Los conteos promedio de *Ascaridia dissimilis* en las aves individuales fueron de 22.3, 404.2 y 464.9 para las muestras de Carolina del Norte, California y Minnesota, respectivamente. En todos los casos, las etapas del desarrollo más y menos prevalente fueron la tercera fase larvaria y las hembras adultas "robustas" respectivamente. Se efectuaron evaluaciones de campo en las granjas de California y Minnesota, investigando los tratamientos rutinarios a base de levamisol y piperazina. En Minnesota, la eficacia del levamisol fue del 98.8% y la de la piperazina fue del 0.0%. Por el contrario, los niveles de eficacia demostrados en California fueron del 16.0 y del 67.3% para el levamisol y la piperazina, respectivamente. Tomando en consideración los numerosos errores de procedimiento que suelen ocurrir en las evaluaciones de campo, ninguno de estos resultados de la eficacia pueden ser tomados como definitivos. Estamos ahora planeando realizar investigaciones con aislamientos de campo mediante estudios estructurados y controlados, a fin de establecer la eficacia antihelmíntica y las variaciones entre "cepas".

During routine monitoring of flock health, intestines were removed from posted, 30-day-old turkeys on farms in California, Minnesota and North Carolina. The tracts were secured individually, packed in coolant, and shipped overnight to the University of Arkansas for nematode isolation and quantification. Individual bird, mean *Ascaridia dissimilis* counts were 22.3, 404.2 and 464.9 for North Carolina, California and Minnesota samples, respectively. In all cases, the most and least prevalent developmental stages were third-stage larvae and "robust" adult females, respectively. Field evaluations were conducted on the California and Minnesota farms, with routine treatments of levamisole and piperazine under investigation. In Minnesota, respective levamisole and piperazine efficacies were 98.8 and 0.0%. In contrast, levels of efficacy demonstrated in California were 16.0 and 67.3% for levamisole and piperazine, respectively. Mindful of the numerous procedural mishaps which occur with field evaluations, neither set of efficacy results may be taken as definitive. Studies are planned wherein field isolates are investigated in structured, controlled studies for the establishment of anthelmintic efficacies and "strain" variations.

Studies continue at the University of Arkansas to better detail the incidence, prevalence and effective control measures for the parasitic helminths of chickens and turkeys. Discrete host populations have evidently been evolved for the most prevalent helminths, and these are: *Ascaridia dissimilis* (all turkeys), *Ascaridia galli* (young broiler and pullet chickens), *Raillietina cesticillus* (young broiler and pullet chickens), *Heterakis gallinarum* (older pullets, layers and breeding hens) and *Capillaria obsignata* (older pullets, layers and breeding hens). Piperazine salts, for many years the only non-prescription anthelmintic which targets the *Ascaridia*, has been shown in numerous Arkansas studies to confer non-efficacious rates of parasite removal (0-90%); with infection history, parasite stage and treatment personnel (field work) some factors which moderate efficacy. To date, only limited work has been done to establish efficacies for hygromix and coumaphos in the treatment of capillariasis and heterakiasis, but preliminary work suggests that a new, effective anthelmintic is required here as well. Effective, non-prescription treatment of *Raillietina cesticillus* infections is not available in the USA. Fenbendazole, currently under INAD status in the USA, has been shown efficacious (>95%) for all helminths mentioned above, with parasite recognition and parasite-specific drug dosage prerequisite for effective treatment.

AN EPIDEMIOLOGIC INVESTIGATION ON CELLULITIS

INVESTIGACION EPIZOOTIOLOGICA DE LA CELULITIS

Tim E. Carpenter

Department of Medicine and Epidemiology, School of Veterinary Medicine
University of California, Davis, CA 95616

RESUMEN

Una operación comercial de gran magnitud de pollos de engorda informó recientemente sobre un aumento significativo en la tasa de decomisos en sus aves. Se pensó que esto estaba asociado a un incremento dramático en el nivel de decomisos relacionados con la celulitis. Después de haber revisado los registros se encontró que los decomisos por celulitis se habían multiplicado por 10, aproximadamente, de menos del 0.5% a más del 4%. Las investigaciones epizootiológicas iniciales implicaron un examen detallado de la producción y de los registros del rastro, para determinar si se trataba de un problema confinado a granjas específicas, si se limitaba sólo a ciertas casetas dentro de una misma granja, o bien si la distribución era aleatoria a lo largo de toda la empresa. Adicionalmente, las investigaciones iniciales incluyeron un análisis de la ocurrencia respecto al tiempo para determinar si el problema podría caracterizarse por su presentación estacional. El resultado más significativo de estas investigaciones fue la identificación de una asociación estadísticamente significativa entre la salud de la parvada previa, el tiempo de descanso de las casetas entre su salida y la instalación de la parvada subsecuente, y la prevalencia de celulitis en la parvada nueva. Durante la discusión se presentará con más detalle la metodología utilizada para llegar a este hallazgo, así como su significancia económica.

A large commercial broiler operation recently reported a significant increase in the condemnation rate of its birds. This increase was believed to be associated with the dramatic increase in the level of cellulitis-related condemnations. Upon investigation of the records, it was found that there was an approximately ten-fold increase in cellulitis-condemnations, from less than 0.5% to in excess of 4%. Initial epidemiologic investigations involved a detailed examination of production and processing records to determine whether this problem was isolated to specific ranches, if it was limited to selected houses within a ranch, or if it was randomly distributed throughout the company. Additionally, initial investigations involved a time series analysis to determine if this problem could be characterized by its seasonal occurrence. The most significant result from these investigations was the identification of a statistically significant association between health of a previous flock, the downtime between its removal and placement of a subsequent flock, and the prevalence of cellulitis in the new flock. The methodology used to arrive at this finding as well as its economic significance will be presented in more detail.

AN EXPERIMENTAL MODEL TO REPRODUCE CELLULITIS IN BROILERS

MODELO EXPERIMENTAL PARA REPRODUCIR LA CELULITIS EN POLLOS DE ENGORDA

L. C. Johnson, R. A. Norton, F. J. Hoerr, B. McMurtrey, and S. F. Bilgili

Department of Poultry Science, Auburn University Auburn, AL 36849-5416

RESUMEN

La celulitis de los pollos de engorda es una infección bacteriana que se presenta por infección en el ombligo o por traumatismo de la piel. No fue sino hasta los últimos 2 años que se reconoció a la celulitis como una categoría separada de decomisos por el Departamento de Agricultura de Estados Unidos (USDA, por sus siglas en inglés). Esta condición es bastante costosa para la industria avícola porque las pérdidas se presentan a nivel del rastro por decomiso de canales enteras o sus partes. En esta prueba se utilizaron diferentes aislamientos de campo de *Escherichia coli* ya sea solos o en combinación para reproducir la celulitis. La bacteria se diluyó en forma seriada para lograr diluciones de 10^0 (sin diluir), 10^1, 10^2, 10^3, y 10^4 y estas diluciones se inocularon subcutáneamente entre el muslo y el abdomen. Se emplearon 720 pollos de engorda que fueron alojados en jaulas en batería y se desarrollaron ahí hasta los 21 días de edad. No existieron diferencias en la patogenicidad entre los diversos aislamientos utilizados ($P>0.05$). Pero sí hubo efectos significativos de las diluciones ($P<0.05$). Las diluciones de 10^1 y 10^2 produjeron depresión en el peso corporal y aumento de la mortalidad La incidencia de celulitis fue del 39.2 y del 27.5% en las diluciones 10^1 y 10^2, respectivamente.

INTRODUCTION

Cellulitis (infectious process or inflammatory process) is an inflammatory skin condition, brought about by bacterial invasion[2,3,4]. The underlying tissues of the skin are affected and there is often exudate associated within the site. The bacteria most often associated with this condition is *Escherichia coli*.

The incidence of cellulitis varies from 0.10% to 0.32%, among the broilers produced in the U.S.A. Since 1988, cellulitis has been recorded as a separate condemnation category by the USDA. Economic losses each year that are attributable to cellulitis are in excess of 20 million dollars.

The purpose of this study was to develop a model to reproduce cellulitis in broilers under experimental conditions.

MATERIALS AND METHODS

Seven-hundred and twenty day-old chicks were assigned to 1 of 6 treatment groups. The chicks were wing banded, weighed and placed in Petersime battery cages. Feed and water were provided *ad libitum*, and the birds were given two days to become acclimated, prior to the institution of treatment.

Six field isolates of *E. coli* were grown overnight, and the cultures were subsequently serially diluted with physiologic saline to achieve the following dilutions: 10^0, 10^1, 10^2, 10^3, and 10^4. On the third day the chicks were given a subcutaneous injecton of 0.10 ml of one of the dilutions, between the inner thigh and abdomen. A control group was also included which received 0.01 ml sterile saline. Five chicks were used for each dilution, and only birds that were given the same bacterial isolate were housed in each battery unit.

The birds were observed for 3 weeks, dead birds were weighed and necropsied. At the end of the 3 week period all remaining birds were weighed, euthanized and necropsied to observe any evidence of cellulitis.

RESULTS AND DISCUSSION

There were no significant differences ($p>0.05$) among the field isolates for body weight, the percent mortality and cellulitis incidence. This result contrasts with a study by Johnson et al.[1], in which different isolates demonstrated varying degrees of pathogenicity. Significant effects ($p<0.001$) were seen based upon dilution of the field isolates. There was a linear response to body weight and percent mortality with dilution (Table 1). Body weights, when compared to the control birds were severely depressed at the 10^1 and 10^2 dilutions, but as the bacterial load lessened, the body weights began to increase and approach that of the control birds. The same dilutions (10^1 and 10^2) increased mortality. The incidence of cellulitis was 39.2% and 27.5% for the 10^1 and the 10^2 dilutions, respectively. More dilute bacterial suspensions produced dramatically less cellulitis. Cellulitis was defined as a pale yellow plaque in the area of the

injection. A 1995 study conducted by Peighambari et al.[4], demonstrated that cellulitis could be reproduced with success. From the results in Table 1, it is clear that at a dilution of 10^1 and 10^2, cellulitis can be reproduced under experimental conditions. The ability to reproduce cellulitis using various dilutions provides the potential of utilizing this model for prevention and intervention strategies.

Table 1. Body weight, mortality and incidence of cellulitis from broiler chicks inoculated at 3 days of age with various isolates and dilutions of *E.coli*.

Factor	Body Weight (g)	Mortality (%)	Cellulitis (%)
Isolate[1]	NS[2]	NS	NS
1	358.3	36.7	11.7
2	338.9	42.5	10.0
3	300.5	47.5	13.3
4	368.4	35.0	13.3
5	332.7	43.3	12.5
6	333.2	49.2	11.7
SEM	21.6	6.86	2.95
Dilution	***	***	***
1	570.1[a]	6.7[e]	0[e]
2	70.4[e]	94.2[a]	39.2[a]
3	204.3[d]	64.2[b]	27.5[b]
4	292.0[c]	50.0[b]	4.2[c]
5	442.7[b]	21.7[c]	0.83[c]
6	452.4[b]	17.5[c]	0.83[c]
SEM	17.9	3.75	2.76

[1]Field isolates
[2]NS = Non-significant ($P > 0.05$)
***$P(<0.001)$
[abcde]Means with unlike superscripts are significantly different.

REFERENCES

1. Johnson, L. C., S. F. Bilgili, F. J. Hoerr, O. A. Oyarzabal, and M. K. Eckman. Evaluation of various inoculation routes to reproduce cellulitis in broilers using field isolates of Escherichia coli. In: Proc.17th mtg. South. Poult. Sci. Soc., pp.12. Atlanta, Georgia. 1996.
2. Morris, M. P. Cellulitis in broilers. Broiler Industry, September, pp. 32-40. 1991.
3. Morris, M. P. Broiler cellulitis update. Broiler Industry, March, pp. 36-39. 1994.
4. Peighambari, S. M., R. J. Julian, J. P. Vaillancourt, and C. L. Gyles. Escherichia coli cellulitis: experimental infections in broiler chickens. Avian Dis. 39:125-134. 1995.

EVALUACIÓN DE LOS RESULTADOS ZOOTÉCNICOS DE UNA PARVADA DE REPRODUCTORAS PESADAS DE SEGUNDO CICLO CON UNA APLICACIÓN DE VACUNA SUBUNITARIA EMULSIONADA DE *E. COLI*

EVALUATION OF PRODUCTIVE PARAMETERS OF A SECOND LAYING CYCLE BROILER BREEDER FLOCK VACCINATED WITH AN OIL EMULSION *Escherichia coli* SUBUNIT VACCINE

Merino G., R.[1] ; Quintana L., J. A.[1] ; Rojas O., L. A.[2] ; Silva C., J. M.[3] . y León P., F.[2]

[1] DPA: Aves, FMVZ, UNAM;
[2] Reproductoras del Valle de México S. A de C. V.;
[3] Productora y Comercializadora Propollo S. A. de C. V.

ABSTRACT

A field study was carried out in a broiler breeder farm using a commercial *E. coli* subunit vaccine. Productive parameters were evaluated for differences between the vaccinated flock and a non-vaccinated control group. A higher (P<.01) egg/hen production was observed in the control group. There was a higher (P<.01) percentage of hatching eggs in the vaccinated group, which also showed improved (P<.01) fertility. Increased (P<.01) hatchability

was observed in the control group. Manufacturer's recommendations in terms of numbers of doses and age at administration were not followed. Additional field trials and laboratory challenge tests are suggested in order to better evaluate the efficacy of the vaccine.

INTRODUCCIÓN

La infección causada por *Escherichia coli* es económicamente importante en la avicultura mundial, comúnmente ocurre como una septicemia aguda o aerosaculitis y poliserositis y generalmente requiere de factores ambientales adversos u otros agentes infecciosos para volverse clínicamente aparente (3, 6) . Por muchos años los serotipos más comunes de *E. coli* en las aves han sido O1, O2, O35 y O78 (1). Dentro de los factores asociados a la virulencia de *E. coli* estan las fimbrias, pero su relación con la virulencia es aún incierta, los estudios sobre los factores de adherencia, como la presencia de pili, no se han correlacionado absolutamente con la patogenicidad pos-colonización (7).

La vacunación es una de las medidas de prevención de la colibacilosis (2, 5, 8). La vacunación de las madres resulta en la protección de su progenie durante las dos primeras semanas después del nacimiento (2). Las vacunas subunitarias son cada vez más utilizadas. En el caso de *E. coli* se han detectado antígenos específicos que son compartidos por la mayoría de las cepas patógenas, como las fimbrias F11 y otras (8), que han sido aisladas a partir de aves con septicemia o colibacilosis. El análisis de un gran número de cepas mostró que el 78% de las cepas aviares expresaron la fimbria F11. (2).

El objetivo del presente estudio es determinar si la aplicación de una vacuna subunitaria de *E. coli* a gallinas reproductoras pesadas de segundo ciclo ayuda a mejorar sus resultados zootécnicos.

MATERIAL Y MÉTODOS

El estudio se realizó en una granja de reproductoras pesadas comerciales, ubicada en Amecameca, Edo. de México. La granja está compuesta por cuatro casetas, dos de la cuales fueron utilizadas como grupo testigo y las dos restantes como grupo experimental, que recibió una dosis de la vacuna. Todas las aves se sometieron a las mismas condiciones higiénico sanitarias.

Las gallinas iniciaron la pelecha a las 60.1 semanas de edad.

N° de aves pelechadas	6325
Aves muertas en pelecha	221

Se vacunó a las aves al inicio del segundo ciclo de postura, a las 68.4 semanas de edad, por vía intramuscular en la pechuga, con una dosis de 0.5 ml por ave.

N° de aves testigo	3029
N° de aves vacunadas	3075

VACUNA UTILIZADA: Vacuna subunitaria comercial compuesta de antígeno fimbrial F11 y toxina flagelar, presentación de emulsión con adyuvante agua en aceite.

Después de la vacunación se procedió a colectar los datos de producción de ambos grupos, la información recabada fue: Producción de huevo, producción de huevo incubable, mortalidad (total y porcentaje), fertilidad y nacimientos.

ANÁLISIS ESTADÍSTICO

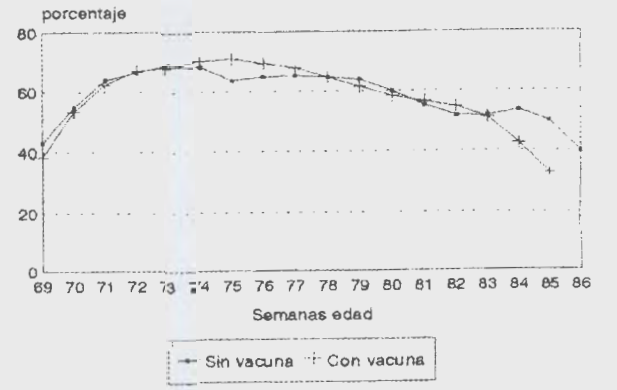
Se utilizó la prueba Ji cuadrada para buscar diferencias estadísticas significativas entre los grupos de gallinas.

RESULTADOS

En el cuadro 1 se muestran los resultados zootécnicos finales de los grupos de aves observados. No hubo diferencias significativas entre la mortalidad total de ambos grupos. Se observó un mayor porcentaje en los huevos incubables de las gallinas vacunadas y por lo tanto un menor número de huevos comerciales). La fertilidad fue mayor en los huevos provenientes de las gallinas vacunadas, pero los nacimientos fueron más en el grupo testigo ($P < .01$).

La postura tuvo un comportamiento homogéneo durante todo el ciclo en las gallinas vacunadas, con el pic a las 75 semanas de edad y teniendo un descenso marcado a partir de la semana 83. El grupo testigo presentó el pic a las 73 semanas, y descensos marcados en las semanas 75 y 82 de edad (Figura 1).

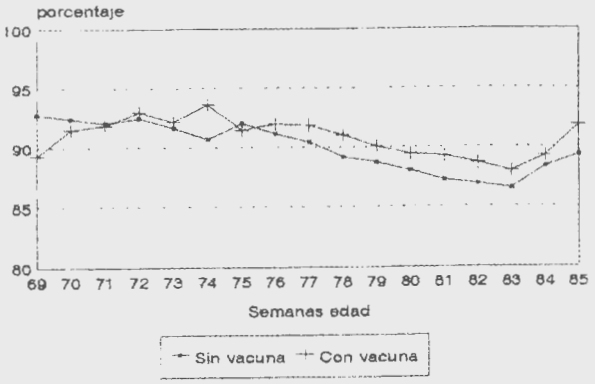
Figura 1. Porcentaje de postura



La fertilidad del huevo incubable tuvo un comportamiento estable en ambos grupos a partir de la

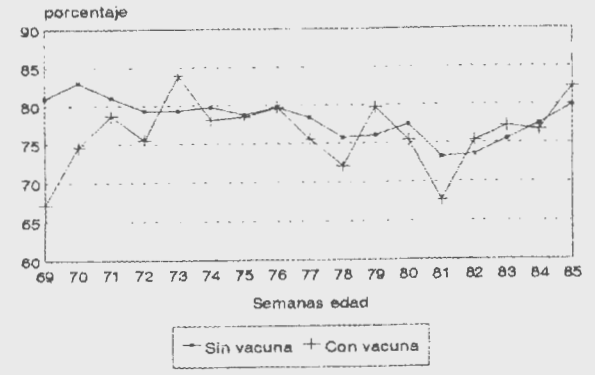
semana 75 de edad, manteniéndose ligeramente más alta para los huevos procedentes de las aves vacunadas (Figura 2).

Figura 2. Porcentaje de Fertilidad



El comportamiento de los nacimientos presentó variaciones a lo largo de todo el ciclo productivo de las reproductoras vacunadas, manteniendo mejor homogeneidad en el grupo testigo (Figura 3).

Figura 3. Porcentaje de Nacimientos



DISCUSIÓN

La vacunación contra *E. coli* a edad temprana del pollo de engorda es de poca utilidad, por lo que se busca proteger al pollo a través de la inmunidad materna adquirida (2, 5). En el presente estudio se buscaron diferencias en los parámetros productivos de gallinas de segundo ciclo vacunadas una vez contra *E. coli*, al inducirse la producción de anticuerpos, se disminuye la capacidad de adherencia e invasión de *E. coli* en las gallinas, por lo que no se esperan muertes ni descensos en la productivdad de las aves y al mismo tiempo se confiere protección al embrión a través de los anticuerpos presentes en el saco vitelino que pueden neutralizar al microorganismo en el caso que éste haya penetrado a través del cascarón, lo que traerá como consecuencia un descenso en la mortalidad embrionaria por contaminación con *E. coli* (4).

El inicio de la postura más lento del grupo vacunado puede ser consecuencia del estrés al que se sometió a las aves para la aplicación de la vacuna, una vez que arrancó la postura en forma, ésta no mostró variaciones marcadas durante el ciclo productivo. La fertilidad observada no presentó cambios marcados a través del tiempo, pero en términos generales mostró ser mejor en el grupo vacunado, lo que sugiere que puede haber alguna mejoría en éste rubro con la aplicación de la vacuna. A través de las observaciones de los nacimientos se observaron altibajos que sugieren mayor investigación al respecto.

En este estudio no se siguieron las recomendaciones del fabricante en lo que se refiere al número de dosis y edad de las aves para aplicar la vacuna, por lo que se recomienda realizar más estudios en los cuales se incluyan además análisis serológicos, microbiológicos y pruebas de desafío que den un mejor panorama del efecto que tiene la inmunización de las gallinas en sí mismas y sobre su progenie.

LITERATURA CITADA

1. Allan, B., Hurk, J., and Potter, A.: Characterization of *Escherichia coli* Isolated from Cases of Avian Colibacillosis. *Canadian Journal of Veterinary Research* **57**:146-151 (1993).
2. Frommer, A., Freidlin, P., Bock, R., Leitner, G., Chaffer, M., and Heller, E.: Experimental vaccination of young chickens with a live, non-pathogenic strain of *Escherichia coli*. *Avian Pathology* **23**:425-433 (1994).
3. Goren, E.: Colibacillosis: Etiology, Pathogenesis, Prevention and Terapy Memorias de la 16a. *Convención Nacional de la Asociación Nacional de Especialistas en ciencias Avícolas de México, A. C.* - Proceedings of the Fourtyth Western Poultry Disease Conference, Acapulco, Guerrero, México 1991:109-111.
4. Ikemori, Y., Peralta, R., Kurori, M., Yokoyama, H., and Kodama Y.: Avidity of Chicken Yolk Antibodies to Enterotoxigenic *Escherichia coli* Fimbriae. *Poultry Science* **72**:2361-2365 (1993).
5. Panigrahy, B., Gymah, J., Hall, C., and Williams, J.: Immunogenic Potency of an Oil-Emulsified *Escherichia coli* Bacterin. *Avian Diseases* **28**:475-481 (1984).
6. Rodríguez, L. M.: Colibacilosis en Pollo de Engorda. Memorias de la Primera Jornada Médico-Avícola. *Departamento de Producción Animal: Aves, Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia - Asociación Nacional de Especialistas en Ciencias Avícolas de México, A. C.* Ciudad Universitaria, D. F., México. 1990: 98-113.
7. Vidotto, M., Müller, E., de Freitas, J., Alfieri, A., Guimaràes, I., and Santos, D.: Virulence Factors of Avian *Escherichia coli*. *Avian Diseases* **34**:531 - 538 (1990).

8. Wang, H., Zhang, Z., and Gan, M.: Studies on the Immunogenicity of a Pili Vaccine Prepared from *Escherichia coli* (serotype O78) Pathogenic to Chickens. Abstract. *Acta Veterinaria et Zootechnica Sinica* **25**:174-179 (1994).

Cuadro 1. Parámetros productivos de gallinas reproductoras de segundo ciclo.

Parámetro	Grupo testigo		Grupo experimental	
	Total	%	Total	%
Producción de huevo	207,207		197,343	
Huevos incubables	185,932 a	89.73	177,92 b	90.15
Huevos comerciales	21,275 a	10.27	19,422 b	9.85
Huevos / gallina	76.23		71.97	
Mortalidad	311	10.26	333	10.82
Huevo incubado	183,366	98.61	176,096	98.97
Huevo fértil	165,057 a	90.01	160,395 b	91.08
Nacimientos	129,291a	78.33	121,386 b	75.67

a b Valores en un mismo renglón con diferente literal son estadísticamente significativos

EVALUATION OF AN EXPERIMENTAL ESCHERICHIA COLI AIRSACCULITIS MODEL IN BROILER CHICKS

EVALUACION DE UN MODELO EXPERIMENTAL DE AEROSACULITIS POR *ESCHERICHIA COLI* EN POLLOS DE ENGORDA

E. D. McGruder

Elanco Animal Health, 2001 West Main Street, Greenfield, IN 46140

RESUMEN

La aerosaculitis continúa siendo una de las principales causas de decomisos en la industria productora de pollos de engorda. Nuestro laboratorio ha desarrollado un modelo experimental para estudiar la patogenia de la aerosaculitis producida por *E. coli* en pollos de engorda. Se administró *E. coli* al día 1 intraperitonealmente a los pollos experimentales. A las 48 horas postdesafío se realizó un cultivo a partir de estas aves en busca de *E. coli* y se registró la mortalidad y las calificaciones de lesiones (del 0 al 4). Cuando se desafió a los pollos con 10^2, 10^3, 10^4, 10^5, 10^6 y 10^7 unidades formadoras de colonias (UFC) de *E. coli*, el porcentaje de mortalidad varió entre el 74 y el 95%, el rango de calificaciones de lesiones varió de 2.11 a 3.15 y el porcentaje de reaislamiento de *E. coli* varió entre el 85 y el 100%. En este estudio los testigos no desafiados resultaron negativos a *E. coli*, y no presentaron lesiones ni mortalidad. En un siguiente estudio examinamos el efecto de *E. coli* sobre el influjo de células inflamatorias hacia el peritoneo. Los pollos se desafiaron con 10^2 UFC de *E. coli* y se determinaron las cantidades de leucocitos, heterófilos y macrófagos en el peritoneo durante un período de 48 horas, mediante lavado peritoneal. El conteo total de leucocitos de incrementó 13 veces a las 24 horas y 36 veces a las 48 horas posteriores al desafío. Los heterófilos se incrementaron 185 veces a las 24 horas y 277 veces a las 48 horas postdesafío. Los macrófagos aumentaron 5 veces a las 24 y 12 veces a las 48 horas postdesafío. Estos datos reflejan la marcada respuesta inflamatoria por heterófilos que resulta de la infección intraperitoneal de los pollos de engorda con *E. coli*.

INTRODUCTION

Colibacillosis continues to be a major health threat in the broiler industry. The etiology of the disease is a gram-negative bacteria of the family *Enterobacteriaceae*, *Escherichia coli*. Specific problems in broilers that producers contend with include decreased performance, increased condemnations, airsacculitis, septicemia, and mortality. While *E. coli* has classically been identified as a secondary pathogen of a disease complex, some field isolates of the bacteria have been shown to cause disease as primary pathogens[3]. As well, the bacteria can deplete the lymphocyte population in birds which can lead to immunosuppression[7].

The purpose of the present investigation was to develop an experimental model to study the pathogenesis of *E. coli*-induced airsacculitis in broiler chicks. In this model, *E. coli* was administered to one-day-old chicks by intraperitoneal injection. The following endpoints: mortality, severity of lesions, *E. coli* recovery and the inflammatory cell influx in the peritoneum, were measured and recorded 48 hr post-challenge.

METHODOLOGY

Broiler chicks were purchased from a commercial hatchery, housed in a heated brooder battery and provided *ad libitum* access to water and an unmedicated, balanced starter ration. The infective material was a virulent poultry isolate of *E. coli*, Lilly strain 19B. The bacterium was propagated in vitro and reisolated from chicks using standard microbiological procedures. The lesion scoring system described by Piercy and West was used to evaluate the severity of airsacculitis lesions[8]. The method described by Kogut and colleagues was used to enumerate leukocyte infiltration in the peritoneum[5].

EXPERIMENTAL DESIGN

Study 1a. On the day-of-hatch, 100 chicks were randomly divided into 5 groups of 20 chicks each. On day 1, chicks were intraperitoneally injected with 0.1 ml of 4,5,6, or 7 log colony forming units (CFU) *E. coli*. Negative control chicks were not injected. Forty-eight hr post-challenge, the surviving chicks were euthanatized, and cultured for *E. coli*. Mortality and lesions scores were recorded. **Study 1b**. On the day-of-hatch, 210 chicks were randomly divided into 2 groups of 95 chicks each (principals) and 1 group of 20 chicks (controls). On day 1, chicks were intraperitoneally injected with 0.1 ml of 2 or 3 log CFU *E. coli*. Negative control chicks were not injected. Forty-eight hr post-challenge, the surviving chicks were euthanatized, and data were collected as above.

Study 2. On the day-of-hatch, 45 chicks were randomly divided into 3 groups (negative control, uninfected control, and infected control) of 5 chicks per time interval (0, 24, and 48 hr). On day 1, chicks were intraperitoneally injected with 0.1 ml of vehicle or 2 log CFU *E. coli*. Negative control chicks were not injected. At each time interval, 5 chicks from each group (except at t_0; only negative controls were sampled at this time) were euthanatized, peritoneal lavage fluid was collected, and the numbers of peritoneal leukocytes, macrophages and heterophils were determined.

RESULTS

Study 1. The effect of *E. coli* on mortality, lesions and *E. coli* recovery 48 hr after challenge in broiler chicks is shown in Table 1. When chicks were challenged with 4 to 7 log CFU *E. coli*, there were concomitant increases in mortality and the severity of lesions; however, there was no effect on the recovery of *E. coli* between groups. At the 3 highest challenge doses (5, 6 and 7 log CFU *E. coli*), all chicks had lesions; while at the 2 lowest doses (2 and 3 log CFU *E. coli*), 42% of the chicks did not have lesions. In terms of severity of lesions, 60 to 85% of the chicks that were challenged with 4 to 7 log CFU *E. coli* had lesion scores of 3 or greater; while 32 to 39% of the chicks challenged with 2 or 3 log CFU *E. coli* had lesion scores in the range above.

Study 2. The effect of *E. coli* on the influx of inflammatory cells 48 hr after challenge in chicks was determined (Table 2). The data collected from non-injected, vehicle-injected or *E. coli*-challenged chicks during the 48 hr period are shown in Table 1. *E. coli* caused a ~13-fold and 36-fold increase in total leukocytes at 24 and 48 hr, respectively, as compared to the vehicle-injected controls. There was a marked effect of *E. coli* on heterophil influx as total heterophils increased ~185-fold and 277-fold at 24 and 48 hr, respectively, as compared to the vehicle-injected controls. There was a marginal effect on macrophage influx as *E. coli* caused a ~5-fold and 12-fold increase in these phagocytes at 24 and 48 hr, respectively, as compared to the vehicle-injected controls.

DISCUSSION

Airsacculitis continues to be a major cause of condemnations in the broiler industry. To this end, several investigators have developed models to study *E. coli* infection in broilers[2,4,6,8]. However, none of these models have evaluated the effect of *E. coli* on the influx of inflammatory cells in the peritoneum. This report describes a 48 hr, experimental *E. coli* model which reproduces airsacculitis and septicemia in broiler chicks. Mortality, the severity of lesions, the presence of *E. coli* and the leukocyte infiltration in the peritoneum can be evaluated.

In the first study, the challenge dose of *E. coli* that would reproduce airsacculitis and septicemia in chicks was determined. In this model, the minimum challenge dose that could consistently result in greater than 70% mortality, mean lesion scores greater than 2.00 and greater than 80% culture recovery in chicks was desired. After titrating the bacteria from 2 to 7 log CFU, it was determined that 2 log CFU *E. coli* was the

minimum challenge dose that produced the desired results. Bacterial contamination was not a concern in this model as non-challenged birds did not succumb to death, did not have lesions, and did not have *E. coli* present in the air sac.

After the optimal challenge dose was determined, 2 log CFU *E. coli* was used to evaluate the effect of the bacteria on the influx of inflammatory cells in the peritoneum of chicks during the 48 hr period post-challenge. In non-challenged chicks, there was a normal population of approximately 50,000 cells in the peritoneum. Upon further inspection, ~95% of these residential leukocytes were determined to be macrophages. Intraperitoneal administration of *E. coli* caused a marked leukocytic infiltration in the peritoneum. The majority of the infiltrate consisted of emigrating heterophils; e.g., 61% and 70% of the leukocytes at 24 and 48 hr, respectively, were determined to be heterophils. As the presence of neutrophils is the hallmark of inflammation in mammals[1], heterophils are the hallmark of inflammation in this experimental *E. coli* model. Investigations are on-going in order to elucidate the role of the heterophil, the residential macrophage, and immunoregulatory agents in this *E. coli*-induced airsacculitis model.

REFERENCES

1. Conlan, J.W., and R.J. North. J. Exp. Med. 174:741-744. 1991.
2. Gross, W.B. Am. J. Vet. Res. 45:2074-2076. 1984.
3. Gross, W.B. Colibacillosis. In. Diseases of Poultry. pp. 138-144. 1991.
4. Harry, E.G. Res. Vet. Sci. 27:175-179. 1979.
5. Kogut, M.H., E.D. McGruder, B.M. Hargis, D.E. Corrier, and J.R. DeLoach. J. Leukocyte Biol. 57:56-62. 1995.
6. Nakamura, K., J.K.A. Cook, J.A. Frazier, and M. Narita. Avian Dis. 36:881-890. 1992.
7. Nakamura, K., T. Isolbe, and M. Narita. Res. Vet. Sci. 149:125-126. 1990.
8. Piercy, D.W.T., and B. West. J. Comp. Path. 86:203-210. 1976.

Table 1. Effect of *E. coli* on mortality, lesions and *E. coli* recovery 48 hr after challenge in broiler chicks.

log CFU	% mortality	lesion score	% *E. coli* recovery
0	0	0	0
2	74	2.11	100
3	84	2.21	95
4	75	2.8	90
5	80	3.3	90
6	75	3.15	100
7	95	3.15	100

Table 2. The effect of *E. coli* on the influx of inflammatory cells in the peritoneum of chicks during a 48 hr period.

Time	Treatment group	Mean no. leukocytes ($\times 10^3$)	Mean no. heterophils ($\times 10^3$)	Mean no. macrophages ($\times 10^3$)
t_0	Negative control	49.6	3.7	45.9
	Vehicle-injected	*ND	ND	ND
	E. coli-challenged	ND	ND	ND
t_{24}	Negative control	115	4	110
	Vehicle-injected	47.2	2.1	45.1
	E. coli-challenged	604	371	233
t_{48}	Negative control	51.5	2.7	48.8
	Vehicle-injected	43.6	4.1	39.5
	E. coli-challenged	1,567.8	1,107.3	460.5

ND=not done.

MORTALIDAD Y PRODUCCIÓN DE HUEVO EN UNA PARVADA INFECTADA POR VIA VERTICAL CON VIRUS DE LA ANEMIA INFECCIOSA DEL POLLO

INFECTIOUS ANEMIA TRANSOVARIAN TRANSMISSION: REPERCUSSION ON GROWTH & EGG PRODUCTION

Benjamín Lucio M.

Unit of Avian Medicine - Avian Disease Program
Department of Microbiology and Immunology
College of Veterinary Medicine
Cornell University, Ithaca, NY 14853

RESUMEN

En este estudio se hace una comparación de la mortalidad y la producción de huevo de dos parvadas de pollitas comerciales, destinadas a la production de huevo para plato. Una de las parvadas se infectó por via vertical con virus de la anemia infecciosa del pollo; la otra provino de reproductoras inmunes a la anemia infecciosa del pollo. Este caso es especial porque las pollitas infectadas y las inmunes fueron alojadas en la misma caseta, y su crianza en jaula desde el primer día permitió mantener registros de mortalidad y producción separados. Este estudio nos permitirá conocer mejor los efectos de la anemia imfecciosa, a largo plazo. Este brote de anemia infecciosa es consecuencia de estrictas medidas de bioseguridad en la granja de crianza de las reproductoras, y de necesidad de responder a una súbita demanda de pollita de un día. La necesidad de proteger a las madres y abuelas de infecciones tales como la salmonelosis y micoplasmosis, ha obligado a las compañías reproductoras a extremar las medidas de bioseguridad. Ocasionalmente, estas medidas son tan efectivas que las aves reproductoras no se exponen inclusive a agentes tan ubícuos como el virus de la anemia infecciosa del pollo o los adenovirus. Por lo anterior, las parvadas no desarrollan inmunidad a agentes patógenos contra los cuales no se les vacunó. Algunos de estos agentes patógenos son transmitidos a través del huevo cuando las gallinas se infectan durante la production. En el caso que nos ocupa, la compañía productora de pollitas cría sus reproductoras de reemplazo en granjas de una sola edad, bajo estrictas condiciones de bioseguridad. Normalmente, alrededor de las 18 semanas de edad estas pollas se trasladan a las granjas de producción con parvadas de múltiples edades, y su huevo no incuba hasta después de las 24 de edad. Bajo estas condiciones, los patógenos presentes en la granja infectan a las gallinas, y éstas desarrollan inmunidad antes de que los huevos sean utilizados para incubación. Durante el verano de 1995 una onda de calor provocó baja en la producción de huevo y mortalidad, sobre todo en los estados del Medio-Oeste y del Sur de los Estados Unidos. El súbito aumento en la demanda de pollita de un día, determinó que el huevo deuna parvada de madres reproductoras infectada y que todavía no había desarrollado inmunidad contra anemia infecciosa fuera incubado cuando éstas tenían sólo 21 semanas de edad. Las pollitas descendientes de la parvada infectada fueron recibidas, junto con pollitas provenientes de parvadas inmunes, en una caseta de crianza con jaulas en 8 "pirámides" de 4 pisos de altura cada una. Para efectos comparativos, se seleccionaron dos pirámides con 13,000 pollitas cada una. En una pirámide el 100% de las pollitas provino del lote infectado y en la otra el 100% de las pollitas provino de un lote inmune. Durante las primeras 3 semanas de vida la mortalidad en la parvada infectada fue del 28%, mientras que el las aves inmunes murió sólo un 3%. Las causas de mortalidad durante estas tres semanas de vida fueron onfalitis, infección del saco vitelino, anemia e inmunodepresión generalizada. A partir de la 5a. semana la mortalidad se redujo notablemente, pero todavía con una notable diferencia entre la parvada infectada y la inmune. La mortalidad de la 5a. a la 18a semana en las pollitas infectadas fue del 7%, en las pollitas inmunes fue de 1.4%. La mortalidad acumulada a las 18 semanas de edad fue de 34.9% y 4.4% de mortalidad, respectivamente. De la 7a semana en adelante el mayor parte de las pollitas murieron por enfermedad de Marek, en ambas parvadas. Al momento de escribir este trabajo no existen suficientes datos para hacer una comparación válida. Los datos de producción serán presentados durante la reunión.

SUMMARY

Mortality and egg production rates are compared between two flocks of table-egg layer flocks. The first flock was vertically infected with chicken infectious anemia virus (CIAV); the second flock came from CIAV-immune breeders. This case is unique because the infected and the immune chicks were placed in the same chicken house, and being brooded in cages since day one allowed separate mortality and egg production records. This study will provide information on the long-term effects of CIAV infection on egg production. This outbreak of chicken infectious anemia was the result from very strict biosecurity measures in the breeder growing farm, and the need to respond with a sudden demand of one-day-old chicks.

The need to protect the breeder flocks from infections such as salmonellosis and mycoplasmosis has called for strict biosecurity measures. On occasion, these biosecurity measures are so effective that the growing breeder flocks are not even exposed to agents as ubiquitous as CIAV or adenovirus. As a result, the flocks do not develop immunity to pathogens against which they are not vaccinated Some of these agents are transmitted through the egg when they infect chickens in production.

In this case, the breeder grows their replacement breeder flocks in single-age farms, under strict biosecurity. Under normal conditions, the pullets are trucked to multiple-age production farms at around 18 weeks of age, and their eggs are incubated when they are 24-weeks-old Under these conditions pathogens present in the farm infect the pullet breeder flocks, and these develop immunity before their eggs are incubated In the summer of 1995 high temperatures caused severe mortality and drops in egg production in the South and Midwest of the United States The sudden need for fertile eggs forced this breeder company to move this flock of breeder pullets to the laying farm and incubate their eggs when they were 21 weeks old.

The progeny of the infected flock was housed, along with progeny of immune flocks in a cage brooder house. The house has 8 "banks" of 4-tier cages. For comparison purposes, two 13,000-chick-banks were chosen. In one bank 100% of the chicks came from the infected flocks, in the other bank 100% of the chicks came from an immune flock. During the first 3 weeks of age mortality in the infected flock was 28%, while only 3% of the immune flock died. The causes of mortality during these 3 weeks were omphalitis, yolk sac infection, anemia and generalized immunodepression. After week 5 of age mortality was reduced, but a substantial difference in accumulated mortality was still obvious. Mortality between 5th and 18th weeks of age was 7% for the infected flock, and 1.4% in the immune one. Accumulated mortality at 18 weeks of age was 34.9 and 4.4%, respectively After week 7, mortality in both flocks is mainly due to Marek's disease.

Egg production results will be discussed at the meeting. At writing time not enough information was available for a meaningful comparison.

BIOCHEMICAL AND CELLULAR MANIFESTATIONS OF GROWTH PLATE CARTILAGE IN AVIAN TIBIAL DYSCHONDROPLASIA

MANIFESTACIONES BIOQUIMICAS Y CELULARES DE LA PLACA DEL CARTILAGO DE CRECIMIENTO EN LA DISCONDROPLASIA DE LA TIBIA

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

U. S. Department of Agriculture, Agricultural Research Service
Poultry Production and Product Safety Research
University of Arkansas, Fayetteville, AR 72701

RESUMEN

La discondroplasia de la tibia (TD, por sus siglas en inglés) es un defecto de osificación endocondrial de las placas de crecimiento de los pollos adolescentes, que causa deformación, fragilidad y posibles infecciones en la tibia. Se ha sugerido que los condrocitos de la zona de transición se diferencian y fracasan en su intento de hipertrofiarse.

sufriendo condrolisis, lo cual precede a la formación del hueso. Nosotros examinamos las características bioquímicas y celulares de las placas de crecimiento del cartílago en pollos normales y en pollos afectados por discondroplasia de la tibia para determinar la base fisiológica de esta enfermedad. Debido a que la reabsorción de la matriz de cartílago extracelular es primordial para la condrolisis y a la vascularización que acompañan a la formación del hueso, se examinó la actividad de la colagenasa como marcador de estos eventos, utilizando zimografía con substrato de gelatina. Se evaluaron las características celulares mediante el examen de la morfología y de la viabilidad de condrocitos aislados, y mediante el marcaje de la terminación 3' *in situ* de condrocitos apoptóticos utilizando transferasa terminal. Los condrocitos de los cartílagos afectados por discondroplasia de la tibia tenían una apariencia mórbida con perforaciones en las membranas y poco citoplasma. Se encontraron zonas extensas de condrocitos apoptóticos particularmente en las áreas distales de la lesión producida por la discondroplasia de la tibia. La actividad de colagenasa de los extractos procedentes de cartílagos afectados por discondroplasia de la tibia correspondientes a MW 62kDa y 55kDa fue inferior a la de los cartílagos normales. Nuestra conclusión es que los cambios en las actividades de la colagenasa son secundarios a la muerte de los condrocitos, lo cual probablemente esté mediado por algunas actividades metabólicas aberrantes de estas áreas de la placa de crecimiento.

Tibial dyschondroplasia (TD) is an endochondral ossification defect of growth plates of adolescent poultry that causes deformation, fragility, and possibly infections of tibial bones. It has been suggested that chondrocytes of transitional zone dedifferentiate and fail to hypertrophy and undergo chondrolysis, which precede bone formation. We examined the biochemical and cellular features of growth plate cartilages from normal and TD-affected poultry to find the physiological basis of this disease. Since resorption of cartilage-extracellular matrix is seminal to chondrolysis and vascularization, which accompany bone formation, the activity of collagenase, as a marker of these events, was examined using gelatin-substrate zymography. The cellular characteristics were assessed by examining morphology and viability of isolated chondrocytes, and by *in situ* 3' end labelling of 'apoptotic' chondrocytes using terminal transferase. Chondrocytes from TD-cartilages had a morbid appearance with perforated membranes and little cytoplasm. Extensive apoptotic chondrocytes were present particularly, in distal areas of TD lesion. Collagenase activities of extracts from TD-cartilages corresponding to MW 62kDa and 55kDa were lower compared to normal cartilages. We conclude that changes in collagenase activities are secondary to chondrocyte death that is probably mediated through some aberrant metabolic activities of these areas of the growth plate.

ACCION DE UN INHIBIDOR DE AROMATASA SOBRE LA DIFERENCIACION DE LA GONADA FEMENINA DE EMBRIONES DE POLLO

THE ACTION OF AN AROMATASE INHIBITOR ON THE DIFFERENTIATION OF CHICKEN EMBRYO'S FEMALE GONADS

Meza. T. H. A.1, Téllez I. G. 1, Quintana. L. J. A. 1, Avíla. G. E. 2, Sánchez. R. E.2 ,
Pedernera. A. E. 3

1D.P.A.: Aves. FMVZ/UNAM. México D.F. 04510
2 C.E.I.E.P.A. FMVZ/UNAM. México D.F.
3 Depto Embriología Facultad de Medicina/UNAM. México D.F. 04510

ABSTRACT

The actions of 1,4 6-androstatiene-3,-17-dione, an steroidal aromatase inhibitor (AI) on sexual determination, and on chicken embryo female gonad changes were evaluated. Twenty, 200, 1,000, or 2,000 1g AI were inoculated in the chorioallantoic membrane at five days of incubation. Parameters evaluated were embryo weight, per-dose male/female percentage ratios, gonad fresh and dry weights, and left ovary cell population counts. All measurements were made at 17 days of incubation. Results showed significant ($P<0.01$) differences in fresh left ovary

weight, when 20 1g were compared with the controls. In comparing the same groups, significant ($P<0.05$) differences were found regarding dry weight. As far as the male:female ratios are concerned, results showed statistically significant ($P<0.05$) differences when the 20 1g AI treatment was compared with the controls, showing a higher female percentage in the AI-treated group. No statistically significant differences were found in any of the parameters at the dose rate of 200 1g. Dose rates of 1,000 and 2,000 1g resulted in 100% embryo mortality.

INTRODUCCION

En la actualidad la avicultura ha experimentado un notable desarrollo en la producción de carne y huevo, resultado del avance ocurrido en materia de genética, nutrición, sanidad, así como mejores sistemas de manejo en la crianza y producción de aves. **(1,2,7)**. Una inquietud científica es y ha sido poder manipular la relación de machos/hembras, principalmente en el área agropecuaria, obteniendo de esta manera mayor cantidad de productos y subproductos propios de cada sexo y especie. Elbrecht y Smith (1992), inoculó durante los primeros 7 días un inhibidor de aromatasa no esteroidal ((±) 5 - **(p-cy-anophenyl)-5,6,7,8-tetrahydroimidazol [1,5-]pyridine hydrochloride),** producto que impide que se catalice la conversión de testosterona a estradiol. Esto ocasionó un nacimiento de 100% de machos. Lo que sugiere que la reversión sexual se puede llevar a cabo durante los primeros días de desarrollo embrionario de las aves, tiempo durante el cual las gónadas se encuentran en estado indiferenciado y con capacidad bipotencial **(3,4,9)**. Los estudios realizados por Elbrecht apoyan la hipótesis que el balance de los esteroides gonadales en ciertos tiempos del desarrollo embrionario intervienen en la determinación sexual. Es de interés confirmar estos resultados y ensayar otros compuestos que han demostrado ser activos inhibidores de la aromatasa **(8)**. En este estudio se evaluo el inhibidor de aromatasa esteroidal **1, 4, 6-androstatriene-3,-17-dione,** sobre la diferenciación y el desarrollo del ovario en el embrión de pollo.

MATERIAL Y METODOS

Se utilizaron 2790 huevos fértiles de gallina de la extirpe Dekalb Delta, éstos se incubaron a 37.7°C, con una humedad relativa de 60%. Al día 5 de incubación (estadío 26) **(5)**, se verificó la viabilidad de los huevos embrionados. A los huevos del grupo testigo se les inyectó 100 µl de etanol al 10%. Otros grupos de huevos fueron tratados, con IA inyectados por vía MCA a dosis de 20, 200, 1,000 y 2,000 µg/embrión. Posteriormente al día 17 de incubación (estadío 43) **(5)** los embriones fueron recolectados de la incubadora para realizar los siguientes estudios:

Determinación del peso de los embriones a los 17 días de incubación.

Determinación del sexo fenotipico de los embriones.

Pesaje de las gónadas femeninas (Peso seco y peso húmedo).

Cuantificación de poblaciones celulares en las gónadas femeninas **(6,11)**.

Los resultados fueron analizados por medio de la prueba de análisis de varianza (ANDEVA), y la prueba de comparaciones múltiples de Tukey. Para analizar cambios en el porcentaje de machos y hembras se utilizó la prueba de Chi cuadrada **(10,12)**.

RESULTADOS Y DISCUSION

Las dosis de 1,000 y 2,000 µg de IA produjeron una mortalidad de 100% en los embriones tratados. Se decidió trabajar unicamente con dosis de 20 y 200 µg de IA. En ninguno de los grupos tratados vs grupo testigo, hubo diferencias significativas en el peso del embrión a los 17 días de incubación. Hubo diferencias estadísticamente significativas ($P < 0.05$), en la relación de embriones hembras y machos, al ser comparados el grupo testigo con el grupo tratado con 20 µg de IA. Obteniendo 56.76% de hembras en el grupo tratado contra 45.10% en el grupo testigo.

El peso húmedo del ovario izquierdo en el grupo tratado (20 µg) fue superior al del grupo testigo (4.98 ± 1.40mg $n = 20$ vs 3.95 ± 0.96mg $n = 20$) ($F = 7.42.$, $P = 0.0097$). La misma diferencia se registró en peso seco (0.70 ± 0.16 $n = 20$ vs 0.60 ± 0.14 $n = 20$)) ($F = 5.18.$, $P = 0.0285$). Los resultados obtenidos del conteo de células que componen al ovario izquierdo de los embriones de pollo a los 17 días de incubación, no mostraron diferencias significativas en el número de células germinales y somáticas entre ambos grupos. Las mediciones del grupo tratado con 200 µg de IA no mostraron diferencias significativas, al ser comparados con el grupo testigo en ninguna de las mediciones efectuadas.

Se puede concluir que con el tratamiento empleado no se produjo una reversión sexual. Las dosis de 1 gramo o superiores resultaron letales, y en dosis de IA (20 µg) se estimula el crecimiento del ovario, además de que existe una prevalencia de hembras sobre machos. Nuestros resultados con éste compuesto no confirmaron los hallazgos de Elbrecht quien utilizó un inhibidor de aromatasa no esteroidal. Actualmente se complemente este estudio con una evaluación hormonal de la función ovárica en los embriones tratados con IA, así como con un estudio morfológico del ovario.

Agradecimiento: Para la realización de éste trabajo se contó con el apoyo financiero de la Facultad

de Medicina Veterinaria y Zootecnia (Programa de Apoyo a la Investigación 1995) (HAMT) y de Pilgrim´s Pride (EPA).

LITERATURA CITADA

1. Austic, R. E., Neisheim, M.C.: Producción avícola. 13ª edición. ***El Manual Moderno,*** México, D.F., 1994.
2. Ceniceros, R. M. and Téllez, Y. G.: Manual de Producción avícola;. ***Departamento de Producción Animal: Aves, Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia, Universidad Nacional Autónoma de México,*** México, D.F.: 1995.
3. Elbrecht, A. and Smith, G.R.: Aromatase enzime activity and sex determination in chicken. ***Science***., 255: 467-470 (1992).
4. Gustafson, M.L. and Donahoe, P.K.: Male sex determination: Current concepts of male sexual differentiation. ***Annual Review of Medicine***., 45: 505-524 (1994).
5. Hamburger, V. and Hamilton, H.L.: A series of normal stages in the development of the chick embryo. ***J. Morph***., 88: 49-92 (1951).
6. Méndez-Herrera, C., Hofmann, P. and Pedernera, A. E.: Effect of 17ß-Estradiol on Somatic and Germ Cell Subpopolations in the Ovary of the Newly Hatched Chick. ***General and Comparative Endocrinology***., 89: 182-188 (1993).
7. Quintana, L.J.A.: Avitecnia: Manejo de las aves domésticas más comunes 2ª edición. ***Trillas***. México, D.F. 1991.
8. Schwarzel, W.C., Kruggel, W.C. and Brodie, H.J.: Studies on the mechanism of estrogen biosynthesis. The development of inhibitors of the enzyme system in human placenta. ***Endocrinology***., 92: 866-880 (1973).
9. Scott, F.: Developmental biology., fourth edition. ***Sinauer Associates, Inc. Publishers***. Sunderland, Massachusetts. 1994.
10. Steel, R.G.C. and Torrie, H.J.: Principles and procedures of statistics a biometrical approach. Second edition. ***Mc Graw Hill Book Co***. U.S.A. 1989.
11. Velázquez, P., Gómez, Y., González, P.M. and Pedernera, E.: Steroidogenic cell subpopulations obtained from the theca of preovulatory follicles in the ovary of the domestic fowl. ***General and Comparative Endocrinology.***, 83: 243-248 (1991).
12. Zar, J.: Biostatistical analysis. Second edition. ***Prentice Hall Inc. Englood Cliffs.***, New Jersey. (1984).

BOTULISM CASE REPORTS

REPORTES DE CASOS DE BOTULISMO

Karla Pecelunas, Julie Helm, and Dennis Wages

College of Veterinary Medicine, North Carolina State University, Raleigh, NC 27606

RESUMEN

Se diagnosticó *Clostridium botulinum* tipo C mediante la prueba de inoculación de ratones, en 2 brotes de botulismo aviar. Un caso afectó a pollos de engorda de 7 semanas de edad y el otro a pollos de engorda de 15 días de edad. En ninguno de los 2 casos fue posible identificar definitivamente la fuente de origen de la toxina botulínica involucrada; sin embargo, la alta concentración de hierro en el agua de bebida y/o en el alimento fue la única anormalidad significativa notada que pudiese indicar una posible conexión entre los niveles elevados de hierro y una toxicoinfección de botulismo.

INTRODUCTION

Botulism, as it occurs in modern broiler production, can be difficult to diagnose especially when very low doses of toxin produce clinical signs and death. Even after confirmation of the disease, identification of the toxin source can often be difficult. Most cases of botulism are thought to be the result of preformed toxin ingestion. Toxico-infection, which occurs due to proliferation of *Clostridium botulinum* within the affected bird's intestines with subsequent toxin production, may also play a significant role in some botulism outbreaks. Two cases of botulism will be discussed that suggest a possible link between high levels of iron in the diet and/or in the drinking water.

CASE #1

Three houses, each containing 13,500 7-week-old roasters, experienced high mortality. Clinical signs included depression, ataxia, sternal recumbency, and increased mortality. All 3 of the houses on this farm experienced similar mortality and severity of clinical signs.

Three days prior to the onset of clinical signs, feed had been delivered to all 3 of these houses and to 1 other farm not in the immediate area. The highest incidence of morbidity (>30%) and mortality occurred 6 days post feed delivery. Necropsy revealed no visible lesions. No significant lesions were noted from histopathology. Virus isolation was negative. *C. botulinum* type C was confirmed by the mouse inoculation test. Total mortality due to botulism was estimated to be approximately 4,000 per house.

Increased mortality also correlated with outside temperatures exceeding 350C. Analysis of the feed and water for heavy metal toxicity found the iron content to be extremely high. Iron levels in the feed and water were 3.45% and 1.8 mg/L respectively. *C. botulinum* was not isolated in any of the feed or water samples submitted. *C. botulinum* was isolated from the intestines of affected birds.

The same feed was delivered to 2 of 4 houses on another farm not in the immediate area. Botulism was also confirmed in those 2 houses receiving the suspect feed. The mortality in the houses from the second farm was one-fourth less than of the first farm. The iron in the water of the second farm was within normal limits (<0.1 mg/L).

CASE #2

A farm with 4 houses, each consisting of 20,000 15-day-old broilers, experienced increased mortality in 1 of the houses. Clinical signs of the affected birds were general weakness, sternal recumbency, and neurological signs ranging from peripheral tremors, obtundedness, stuporousness, coma and death. Similar mortality and clinical signs were observed by the grower in 5 previous flocks in the affected house.

Necropsy of affected birds revealed structural abnormalities such as femoral head necrosis and growth plate abnormalities. The kidneys were swollen and congested which was consistent with dehydration. The outside temperatures during peak mortality were consistently greater than 320C during the daytime. Histopathology revealed no significant lesions. Virus isolation was negative. Microbiology was negative. Serum from the affected birds was positive for *C. botulinum* type C by the mouse inoculation test.

The point source for the botulism toxin was not definitively identified. However, the affected building had its own drilled and screened well for drinking water. The only abnormality in the water samples taken from the affected building consisted of high iron levels. The water iron levels were 1.35 ppm in the affected house and 0.60 ppm in the unaffected houses.

Recommendations to the affected building included a thorough clean-out to decrease clostridial organisms and clostridial spores. It was recommended that 5 cm of dirt be removed after litter removal. Cresilic acid was sprayed on the floor and on the lower sidewalls. Insecticides were applied inside and outside the house to decrease the darkling beetle population. Darkling beetles are a known vector for *C. botulinum*.

CONCLUSION

In conclusion, a definitive point source for botulism was not identified in either the roaster case or the broiler case. The only significant abnormality noted in the affected houses was high iron in the water and/or in the feed. Consequently, high iron in the feed and/or water may be a risk factor in toxico-infections of botulism outbreaks especially when no source of preformed toxin is identified.

CERVICAL VACCINATION REACTION IN YOUNG BROILERS - A CASE REPORT

INFORME DE UN CASO DE REACCION POSTVACUNAL EN EL CUELLO DE POLLOS DE ENGORDA JOVENES

C. R.Gustafson, G. L. Cooper, B. R. Charlton, and A. A. Bickford

California Veterinary Diagnostic Laboratory System - Turlock Branch
University of California - Davis, 1550 N. Soderquist Ave
P.O. Box 1552, Turlock, CA 95381

RESUMEN

El laboratorio de Turlock, perteneciente al Servicio de Laboratorios de Diagnósticos Veterinarios de California, E.E.U.U., recibió 3 casos, en un período de 3 meses, que indicaban que la aplicación equivocada de vacunas activas había sido la causa de presentación de signos neurológicos y de reacciones inflamatorias. Un caso recibido en el mes de junio de 1995 involucró a pollos de 7 días de edad que habían sido vacunados subcutáneamente en la incubadora con una vacuna combinada contra la enfermedad de Marek y la infección de la bolsa de Fabricio congelada, y con vacunas de la viruela aviar. Todos los pollos presentaban dificultad para sostenerse en pie, con varios grados de parálisis y rigidez de las piernas. Algunos animales mostraban deficiencias posturales en la cabeza y en el cuello. Estos signos se observaron primero en el campo a los 5 días. De 3 a 4 días después los signos clínicos se habían resuelto, o bien los pollos afectados se habían desechado. A la necropsia se habían observado áreas edematosas de color amarillento alrededor de la musculatura de las vértebras del cuello, extendiéndose hasta el subcutis. Los resultados de histopatología confirmaron una severa reacción inflamatoria piogranulomatosa en el subcutis y en los músculos del cuello. La reacción inflamatoria también se extendía hacia las meninges del canal espinal y, en algunos cortes, invadía a la médula espinal. Se están realizando actualmente estudios más profundos para determinar cuál vacuna o cuál de sus componentes es responsable de la reacción inflamatoria y de los signos neurológicos observados.

Vaccination reactions have been documented in association with oil-adjuvanted killed vaccines in chickens[2] and turkey bacterins[1], however, literature is limited as to reactions seen using parenterally administered live vaccines. Verbal communication indicates vaccine reactions using live injectable products are frequently seen in the field. The exact component or inciting factor is unclear. At the Turlock branch of CVDLS, 3 cases were submitted within a period of 3 months which indicated vaccines were the cause of the presenting signs and microscopic lesions.

One case, submitted June 1995, involved seven 7-day-old chicks from a flock of 40,000 with neurologic signs. All chicks had difficulty standing with various degrees of leg paresis and paralysis. Some birds exhibited postural deficits of the head and neck. These signs were first seen in the field at day 5. Three to 4 days later the clinical signs had either resolved or the birds affected had been culled out. Mortality was not increased. Subcutaneous vaccines were given at the hatchery, which included fowl pox and Marek's / bursal combination frozen. On gross necropsy, yellowish edematous areas were seen around the vertebral musculature of the neck and extending into the subcutis. Histopathology results confirmed a severe pyogranulomatous inflammatory reaction in the subcutis and neck muscle. The inflammatory reaction also extended into the meninges of the spinal canal and in some sections into the spinal cord. No bacteria were cultured from the livers.

Similar clinical signs and histopathology findings were seen in 2 other cases presented to CVDLS - Turlock in May and July of 1995. Chicks presented at 7-8 days of age with twisted necks and variable leg paresis and paralysis. The only lesion observed on gross necropsy was yellow edematous material in the subcutaneous tissues and musculature of the neck. Again, inflammation surrounding the spinal cord was noted on histopathology. Cultures of the brain and liver were unremarkable.

The cause of the above described pyogranulomatous myositis and meningitis is thought to be a misdirected vaccine. The direct insults, the vaccine itself or the substances included in the vaccine are believed to cause the inflammatory reaction. Which component is the inciting irritant is unknown. The vaccines given were live vaccines. Tissue irritation in chickens has been described in association with oil-

adjuvanted killed vaccines as reported at a previous WPDC conference[3] and investigated in 1990[2]. Further studies are in progress to determine which vaccine or component is responsible for the inflammatory reaction involving live vaccines.

REFERENCES

1. Ahmed, O. A. R., L. D. Olsen, and E. L. McCune. Tissue irritation induced in turkeys by fowl cholera bacterins. Avian Dis. 18:590-601. 1974.
2. Droual, R. Investigation of Problems Associated with Intramuscular Breast Injection of Oil-Adjuvanted Killed Vaccines in Chickens. Avian Dis. 34:473-478. 1990.
3. Droual, R. Problems Associated with Injection of Oil Adjuvant Killed Vaccines. Proc. 38th West. Poult. Dis. Conf. p.119. 1989

OBSERVATIONS ON A NATURALLY OCCURRING OUTBREAK OF MAREK'S DISEASE IN CHICKENS AND COTURNIX QUAIL

OBSERVACIONES DE UN BROTE DE OCURRENCIA NATURAL DE LA ENFERMEDAD DE MAREK EN POLLOS Y EN CODORNICES

Nancy L. Stedman

Poultry Medicine Department, Veterinary Medical Teaching Hospital
University of California Davis, Davis, California 95616

RESUMEN

Un brote explosivo de enfermedad de Marek en una instalación de investigación avícola nos obligó a investigar las tasas de mortalidad, las edades en que ocurría la muerte y la distribución de las lesiones en pollos, gallos salvajes[1] y codornices. El promedio de mortalidad fue del 90% en las aves leghorn comerciales no vacunadas, del 40.5% en los pollos vacunados con virus herpes de pavo (HVT, por sus siglas en inglés), del 71.4% en los gallos salvajes vacunados con el HVT, del 28.2% en los pollos vacunados con el HVT y con la cepa SB-1 del virus de la enfermedad de Marek y del 12.5% en las codornices. La mortalidad de un nacimiento dado se correlacionó positivamente con el tamaño de los nacimientos del mes anterior. No se encontraron diferencias atribuibles al sexo en la tasa de mortalidad ni en la edad de la muerte. Las estirpes que presentaron la mayor mortalidad tendieron a presentar la muerte a edades más tempranas. En comparación con lo que ocurrió en los pollos, los gallos salvajes presentaron la mortalidad a una edad más temprana y las codornices a una edad más tardía. La vacunación con el HVT incrementó la edad de la muerte sobre las aves no vacunadas, en los animales leghorn comerciales. La distribución de las lesiones macroscópicas se encontró principalmente en las vísceras de las codornices, de las aves leghorn comerciales y de los gallos salvajes y fue variable en las otras líneas de pollos. Los machos tendieron a no presentar lesiones macroscópicas y más involucramiento nervioso solamente, en comparación con las hembras, y éstas tendieron a presentar más implicación en las gónadas que los machos. El mejoramiento de la vacunación dio como resultado una mayor prevalencia de ausencia de lesiones, o bien sólo el involucramiento nervioso en las aves afectadas.

Marek's disease (MD) continues to be one of the most common diseases of both commercial and other chickens worldwide. Vaccination is an integral part of MD control, but adequate sanitation and management are also important to reduce infective virus particles in the environment since early exposure of chicks can lead to vaccination failure. Coturnix quail reared near chickens with endemic MD can also become infected[3]. The following case report describes some aspects of an ongoing MD outbreak involving chickens, junglefowl (*Gallus gallus*), and Coturnix quail (*Coturnix coturnix japonica*) at a poultry research facility.

[1]N del T: comocidos también como brankivas o sonerats (en inglés: "junglefowl").

Case history. The research facility has been in operation for approximately 35 years and houses on average 2000 chickens of various genetic lines, 20 junglefowl, and 250 Coturnix quail, most of which are reproduced and replaced annually. Some chicken lines are selected for specific major histocompatibility complex B gene haplotypes. Occasionally broiler and layer chickens are obtained as either hatching eggs or day old chicks from commercial hatcheries. Hatches at the facility occur every 2 weeks and multiple age rearing of broods up to 8 weeks of age in the same building is standard. For approximately 10 years the facility had been experiencing mild MD losses using lyophilized turkey herpesvirus (HVT) to vaccinate day-old chicks until an explosive increase in losses occurred in 1994. Vaccination was switched in October 1994 to cell associated HVT administered in ovo at 18 days embryonation, and again in July 1995 to HVT and a serotype 2 MD virus, SB-1, in ovo. In ovo vaccination was chosen since it may induce earlier immunity in the chick[4]. To evaluate vaccine efficacy, almost all deaths were necropsied beginning in January 1995. A case was considered MD positive based on antemortem clinical signs, gross lesions, histopathologic changes, or a combination thereof.

RESULTS AND DISCUSSION

Mortality rates. Losses from MD were as follows: 36 of 40 (90.0%) for unvaccinated commercial leghorns, 623 of 1538 (40.5%) for HVT vaccinated chickens, 83 of 294 (28.2%) for HVT and SB-1 vaccinated chickens, 15 of 21 (71.4%) for HVT vaccinated junglefowl, and 24 of 192 (12.5%) for unvaccinated Coturnix quail. Mortality in chickens vaccinated with HVT in ovo ranged from 7.1% in Silkies to 100% in a white leghorn line. Mortality in hatches receiving HVT and SB-1 had a range of 0% in Silkies to 60% in a white leghorn line. Variations in mortality rate may reflect the variety of B haplotype lines maintained at the facility. Specific B alleles have been shown to impact these parameters[1,2]. No gender differences in mortality rates were observed in any species. A regression analysis of the relationship between mortality rates for HVT vaccinated hatches and size of the hatches the previous month showed a very high correlation (r=0.9897) between these parameters using a second order polynomial response, suggesting an exponential relationship between the previous month's hatch size and mortality. A larger previous hatch resulting in more virus shed into the brood environment would be expected to increase MD mortality in the following month's hatches. Hatches infected close to placement would be expected to have maximal viral shedding between 3 and 5 weeks of age[2].

Age at death. Mean and median ages at death from MD were as follows: 96.6 and 93.0 days for unvaccinated commercial leghorns, 119.9 and 110.0 days for HVT vaccinated inbred commercial leghorns, 133.4 and 120.0 days for other HVT vaccinated chickens, 111.1 and 106.5 days for HVT vaccinated junglefowl, and 160.9 and 161.5 days for unvaccinated Coturnix quail. Ages at death ranged from 35 to 302 days for chickens and 64 to 231 days for Coturnix quail. No gender differences were found in the ages at death. Vaccination with HVT significantly increased the age at death ($p<0.0001$) for commercial leghorns suggesting vaccination increased the time for the disease process to reach terminal stages as well as protected from disease progression to terminal stages. Junglefowl receiving HVT died at a significantly younger age and unvaccinated quail died at a significantly older age ($p<0.0001$ for both comparisons) than HVT vaccinated chickens. Median ages for chickens but not quail were younger than mean ages, reflecting mild weighing of the mean by cases in older chickens. A negative linear correlation (r=-0.930) was found between age at death and percentage mortality for chickens and junglefowl reflecting a trend for those birds suffering the highest losses to succumb quicker to the disease. No relationship was found between the degree of tumor formation and the age at death.

Gross lesion distribution. Table 1 presents the frequency of grossly detectable changes in various organs in MD positive birds. For quail, junglefowl, and commercial leghorns either unvaccinated or HVT vaccinated, liver and spleen were most commonly affected, followed by kidney and proventriculus. For other chickens, tumor distribution was highly variable but consistent in a specific genetic line. For junglefowl and commercial leghorns vaccinated with HVT, the relative risks (RR) for males to females for developing only nerve tumors or no grossly visible tumors are 2.0 and 5.1, respectively, For HVT vaccinated chickens (including commercial leghorns), the RR for females to males for developing gonadal tumors is 7.2. No testicular involvement was seen in any male quail no junglefowl despite a high degree of visceral involvement. For the commercial leghorns hens, vaccination status affected lesion distribution as well as overall mortality. HVT and SB-1 vaccination resulted in a RR of 18 for having no gross tumors or nerve involvement only over HVT vaccination alone. This change may be a manifestation of increased vaccine induced immunity resulting in less extensive tumor development.

Management changes being implemented to improve vaccine efficacy and reduce mortality are cessation of multiple age rearing and complete cleanout after each brood prior to placement of the next hatch.

REFERENCES

1. Bacon, L.D., and R.L. Witter. Influence of B haplotype on the relative efficacy of Marek's disease vaccines of different serotypes. Avian Dis. 37:53-39, 1993.
2. Calnek, B.W., and R.L. Witter. Marek's disease. In: Diseases of poultry. 9th ed. B W. Calnek, H.J. Barnes, C.W. Beard, W.M. Reid, and H.W. Yoder, Jr. eds. Iowa State University Press, Ames. Iowa. pp. 342-385. 1991.
3. Pradham, H.K., G.C. Mohanty, and A. Mukit. Marek's disease in Japanese quails (Coturnix coturnix japonica): a study of natural cases. Avian Dis. 29:575-582. 1985.
4. Sharma, J.M., and R.L. Witter. Embryo vaccination against Marek's diseasc with serotypes 1, 2 and 3 vaccincs administered singly or in combination. Avian Dis. 27:453-463. 1983.

Table 1. Frequency of no lesions and gross lesions in selected viscera for MD positive chickens, junglefowl, and Coturnix quail. (Note: Com. Leghorn=commercial Leghorns; M=male, F=female; percentage of cases exhibiting lesion is given in parentheses following frequency.)

Species (Gender)	Vaccine	Cases	None	Nerve	Liver	Spleen	Kidney	Proventric.	Gonad
Coturnix (F)	none	42	1(2.4)	4(9.5)	27(64.3)	36(85.7)	15(35.7)	12(28.6)	2(4.8)
Coturnix (M)	none	21	1(4.8)	2(9.5)	15(71.4)	17(81.0)	6(28.6)	7(33.3)	0
Junglefowl (F)	HVT	7	0	2(28.6)	5(71.4)	4(57.1)	3(42.9)	4(57.1)	2(28.6)
Junglefowl (M)	HVT	7	1(14.3)	3(42.9)	3(42.9)	3(42.9)	2(28.6)	4(57.1)	0
Chickens (F)	HVT	255	19(7.5)	141(55.3)	89(34.9)	84(32.9)	61(23.9)	59(23.1)	58(22.7)
Chickens (M)	HVT	234	10(4.3)	155(66.2)	78(33.3)	72(30.8)	61(26.1)	52(22.2)	11(4.7)
Com. Leghorn (M)	none	36	1(2.8)	10(27.8)	27(75.0)	27(75.0)	22(61.1)	22(61.1)	4(11.1)
Com. Leghorn (F)	HVT	36	1(2.8)	3(8.3)	26(72.2)	27(75.0)	13(36.1)	17(47.2)	20(55.5)
Com. Leghorn (M)	HVT	14	2(14.3)	1(7.1)	11(78.6)	11(78.6)	6(42.9)	7(50.0)	1(7.1)
Com. Legorn (F)	HVT/SB-1	6	1(16.7)	4(66.7)	1(16.7)	2(33.3)	1(16.7)	0	1(16.7)

HYDROPERICARDIUM-HEPATITIS SYNDROME : POTENCY OF AN INACTIVATED VACCINE PRODUCED ON CELL CULTURES

SINDROME DE HEPATITIS E HIDROPERICARDIO: POTENCIA DE UNA VACUNA INACTIVADA PRODUCIDA EN CULTIVOS CELULARES

F.X. Le Gros, J.F. Bouquet, and D. Gaudry

Rhône Mérieux, 29 Avenue Tony Garnier, 69007 Lyon FRANCE

RESUMEN

Se produjo una vacuna inactivada oleosa contra el síndrome de hidropericardio y hepatitis, en una línea celular de hepatocitos de pollo, empleando un aislamiento del adenovirus tipo 4. Se demostró que la vacuna fue efectiva en 60 aves libres de patógenos específicos (SPF, por sus siglas en inglés) e indujo seroconversión, según se demostró mediante la prueba de seroneutralización. El nivel observado de anticuerpos estuvo relacionado directamente con la dosis. Se encontró protección completa contra el desafío con una cepa de Paquistán y con una cepa mexicana.

INTRODUCTION

Hydropericardium-hepatitis syndrome (HHS) is now a well known condition of broilers first observed in 1987 in Pakistan. The disease was then also identified in various regions of the world like Iraq, India and Latin America[1,2,5]. Autogenous vaccines produced from

inactivated liver homogenate of diseased birds are presently used to protect the birds against HHS.

Research teams, as in New Zealand and Mexico, have identified an adenovirus type 8 (American classification) as a primary agent in this condition[3,6]. In our investigations, we constantly found an adenovirus type 4 in various liver samples originating from Pakistan, Peru, Chile and Mexico: these isolates were neutralized by an antiserum against strain KR5, prototype of type 4 fowl adenovirus[4]. Furthermore 2 of them could reproduce mortality by intramuscular (IM) injection, with a LD50 of 1 log10 in day-old birds and 6 log10 in 5-week-old chickens.

High infectious titers were obtained with these viruses in primary chicken embryo liver cells cultures (CELIC). This is the reason why we decided to check for the industrial feasibility of the production of an inactivated vaccine in chemically-induced CELIC cell line. This technology would be a considerable improvement in the biosafety of HHS vaccine compared to autogenous vaccines. This paper is reporting results about the safety and efficacy of such a vaccine in animal facility trials.

MATERIALS AND METHODS

The vaccines were produced from a Pakistanese isolate cultured on a chemically induced CELIC cell line. The virus was inactivated by betapropiolactone after homogenization and filtration so that no living cell could be found present in the antigen. This aqueous phase was then emulsified in mineral oil. Two different batches were used (25B050 and 55A011). SPF birds were used, and kept in isolation units throughout the trials.

Challenge strains consisted in the vaccine homologous strain present in a field liver homogenate (Pak0/9103-13) and a Mexican isolate (Mex2/9106-10). Challenge was conducted by IM inoculation of 8 log10 CCID50 per bird.

Serology used a beta SN test in CELIC. Sera were diluted in a 1:4 ratio and the Pakistanese isolate used as antigen at the concentration of 100 CCID50 per test. Reading was performed 5 days after inoculation of the cells.

First trial: 2 groups of 20 fourteen-days-old SPF birds were vaccinated subcutaneously (SC) with 0.5 and 0.1 ml of batch 25B050, respectively. An additional group was kept as unvaccinated control. Blood samples were taken 3 weeks later for SN test. At that time, the groups were divided in 2 subgroups of 10 birds for challenge with either the Pakistanese or Mexican strain. The birds were observed for 2 weeks after challenge. Deaths were reported. At the end of the trial after sacrifice of the surviving birds by intracardiac injection of barbituric, a post-mortem examination was carried out for hepatitis lesions.

Second trial: 2 groups of 10 ten-day-old SPF birds were vaccinated (SC) with 0.2 and 0.1 ml of batch 55A011, respectively. An additional group was kept as unvaccinated control. Blood sampling and challenge were then carried out as in trial 1, using the Pakistanese isolate only.

RESULTS

Safety. No local or general reactions were observed in any of the vaccinated birds of both trials. More specifically, no lesions were observed at post-mortem examination at the vaccine injection site.

Potency. The following mean titers in SN test were obtained 3 weeks after vaccination: first trial : 0.5 ml dose = 2.5 log10 ; 0.1 ml dose = 1.87 log10 ; controls < 0.6 log10 second trial: 0.2 ml dose = 2.14 log10 ; 0.1 ml dose = 1.90 log10 ; controls < 0.6 log10.

After challenge, full protection was achieved at 0.5 ml dose with both challenges and likewise with 0.1 and 0.2 ml dose in the second trial. In the first trial, 90 and 80% protection were observed respectively at 0.1 ml dose, against Pakistanese and Mexican challenges. Details are given in Table 1. There were no hepatitis lesions in any of the surviving birds.

DISCUSSION

Isolation of an adenovirus type 4 in 4 different outbreaks of HHS and 4 different countries is a good indication of a link between this agent and the syndrome. Furthermore, the pathogenicity of the isolate is confirmed by the experimental reproduction of hepatitis leading to death with low LD50.

The industrial feasibility of an inactivated adenovirus vaccine grown in liver cells is also proven. Such a vaccine could be used from 10 days of age with a 0.1ml dose. The use of one strain only offers a good cross protection against another isolate obtained from a geographically very distinct outbreak.

Up to now, potency has been demonstrated against a defined challenge, which was not reproducing all the HHS clinical aspects seen in the field. Therefore, further trials, have to be conducted in the field for a more complete evaluation of potency against HHS.

REFERENCES

1. Akhtar, S. Hydropericardium syndrome in broiler chickens in Pakistan. World Poult. Sci. J. 50, July 1994.
2. Cowen, B.S. Inclusion body hepatitis-anemia and hydropericardium syndromes: etiology and control, Proc. 40th WPDC Conf. p.55. 1991.

3. Erny, K.M., D.A. Barr, and K.J. Fahey. Molecular characterization of highly virulent fowl adenovirus associated with outbreaks of inclusion body hepatitis. Avian Path. 20(4):597-606.1991.
4. Mac Ferran, B., et al. Avian Adenovirus, a review. Avian Path. 6:189-217. 1977.
5. Shane, S.M. Hydropericardium-hepatitis syndrome: the current world situation. Avimex 7th symposium, Mexico, July 1995.
6. Soto, P.E. et al. Prevencion y control de la HCI/SHP en Mexico. Avimex 7th symposium, Mexico, July 1995.

Table 1 - Challenge results

	Number of healthy birds/no challenged	
	Pakistanese isolate	Mexican isolate
Trial 1		
0.5ml dose	10/10	10/10
0.1ml dose	9/10	8/10
controls	0/8	2/10
Trial 2		
0.2ml dose	10/10	-
0.1ml dose	10/10	-
controls	2/10	-

LIVE PASTEURELLA MULTOCIDA VACCINATION: VACCINATION TECHNIQUE AND TROUBLESHOOTING

VACUNACION CON *PASTEURELLA MULTOCIDA* VIVA: TECNICA Y SOLUCION DE PROBLEMAS

Linnea J. Newman

Schering-Plough Animal Health, 1095 Morris Avenue, Union, NJ 07083

RESUMEN

El uso de vacunas elaboradas a base de *Pasteurella multocida* viva está ampliamente difundido en Estados Unidos y en Canadá, para el control del cólera aviar (infección por *P. multocida*) entre las reproductoras pesadas de reemplazo. Estas vacunas proporcionan una excelente protección cruzada contra la mayoría de los aislamientos de campo, pero es esencial que la administración de las mismas sea adecuada y que se realice una supervisión de los resultados de la vacunación, para que pueda tenerse éxito con los programas en los que se utilizan estas vacunas vivas, dado que son frágiles y se pueden dañar fácilmente durante su administración. Además, los microorganismos vivos de la vacuna son capaces de producir reacciones adversas cuando se administran en forma inadecuada o cuando se presenta estrés en las parvadas. La revisión del prendimiento de la vacuna 7 días después de la vacunación es un paso crítico del procedimiento de aplicación. El porcentaje y la calidad de los prendimientos determinará el nivel de protección de la parvada y puede proporcionar información de importancia para corregir problemas en caso de reacciones adversas.

Pasteurella multocida infections are common in broiler breeders throughout the U.S.A., Canada and Latin America. Many vaccination programs involve the use of killed oil-emulsion vaccines made from one or more serotypes of *P. multocida*. These vaccines are safe to use in broiler breeders or layers, though the oil emulsion may be irritating and may leave a lesion at the injection site. Unfortunately, killed *P. multocida* bacterins are serotype-specific; they only protect against the serotypes used in the vaccine. Long-term use of *P. multocida* bacterins on the same farm may result in effective control of the serotypes present in the bacterin, but may allow other serotypes of *P. multocida* to arise in sufficient numbers to cause clinical fowl cholera in the vaccinated flocks.

Many United States and Canadian producers have turned to live *P. multocida* vaccines to control fowl

cholera outbreaks in the face of changing serotypes. The live vaccines are all *P. multocida* 3 X 4 serotype, but each has a different level of attenuation and, therefore, reactivity. The 3 live *P. multocida* strains are: CU strain (the original mild field isolate); PM-1 strain (a milder-reacting temperature-sensitive mutant of CU strain); and M-9 strain (the mildest reacting strain, derived from a slow-growing mutant of CU strain). **All three strains provide a level of cross-protection against nearly all field strains of *P. multocida* .**

Live *P. multocida* vaccination programs involve the use of wing-web puncture application of the live vaccine at 10 weeks of age, followed by revaccination **6 to 8 weeks** later. Two vaccinations are **essential** to ensure efficacy of the vaccine.

Proper handling of the vaccine and proper vaccination technique are absolutely **critical** to the success of the vaccination program. The live vaccines are very fragile, especially after dilution. Vaccines should be kept cool (keep the vaccine in a cooler on ice right up until it is diluted for use). Only dilute as much vaccine as will be used in 30 to 45 minutes under field conditions. The vaccine diluent contains glycerin to help the vaccine adhere to the 2-prong wing web stabber, and the M-9 strain diluent contains a special stabilizer to help maintain vaccine viability after dilution. Make certain that the correct diluent is used with the live *P. multocida* vaccines!

The vaccines should be applied to the center of the wing web. Avoid vaccination into the muscle of the wing, as intramuscular vaccination can result in adverse reactions. Be aware of the feathering in this area: avoid excessive vaccine loss on feathers. Bird handling should be designed to allow the vaccinator to easily view and reach the wing web for accurate vaccination. When pox vaccine is also applied via wing-web stab method, use different wings for pox and *P. multocida*. Keep the choice of wing (right or left) consistent for the purpose of checking takes later.

Checking vaccination "takes" is an essential step of the vaccination program. A "take" is a pea- or bean-sized lump in the wing web skin at the site of inoculation which can be seen and felt **7 days** post-vaccination. It is very important to check at least 100 birds chosen from random areas of the house at 7 days post-vaccination. A good vaccination will yield **95 - 100%** good takes. The takes should be recorded, with care taken to note "good take", "hit - no take" (blue dye under the skin, but no lump), "missed bird", "muscle hit", and "large take".

Birds hit with vaccine, but with no take, indicate a problem with vaccine handling or dilution. Missed birds indicate vaccination accuracy problems. Muscle hits or excessively large takes may indicate potential adverse reaction. Muscle hits require review of vaccination technique. Excessive takes may require review of the vaccination program. **Note: no serological test can be used to determine the level of protection from a live vaccination program. Checking takes is the only way to measure protection. Poor percentage takes, or poor quality takes yield poor protection!**

Adverse reactions to live *P. multocida* vaccination may occur, and these appear either as low-grade clinical fowl cholera (swollen wattles, some mortality) or as lameness, especially in males. Some possible problems and their solutions:

+ Intramuscular injection - correct vaccination technique problems
+ Initial vaccination age too late - initial vaccination must be 10 to 11 weeks
+ Males are more sensitive to live *P. multocida* than females - use milder vaccine strain, especially in the heavy meat breeds.
+ Birds are stressed at vaccination (coccidiosis, severe feed restriction) - use a milder vaccine.

Troubleshooting *P. multocida* problems begins with checking takes!

DELIVERY OF VACCINES BY ENCAPSULATION IN MICROSPHERES

ADMINISTRACION DE VACUNAS MEDIANTE ENCAPSULAMIENTO EN MICROESFERAS

Alberto Back and K.V. Nagaraja

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

RESUMEN

Se investigó el uso del "Poly" (DL lactide co glucólido) como matriz de microesferas, que es un nuevo sistema de administración de inmunógenos de vacunas avícolas con liberación controlada. Se sabe que los antígenos encapsulados en microesferas se van liberando durante un tiempo prolongado. Una sola dosis de vacuna encapsulada tiene el potencial de estimular la producción de una inmunidad sólida, mientras que se requerirían dosis múltiples de la misma vacuna para lograr resultados similares con la tecnología convencional.

La tasa de liberación del antígeno se puede controlar durante varias semanas o meses y está relacionada principalmente con el tamaño de las microesferas y con la composición del polímero. Nosotros examinamos la influencia de varios factores sobre la preparación de las microesferas. Nuestros resultados indicaron que, al aumentar la viscosidad del polímero, la concentración del mismo y el diámetro del tubo de homogenización, se incrementaba también el tamaño de las microesferas. El aumento de la proporción de la fase orgánica respecto a la fase acuosa y la concentración del surfactante, disminuyó el tamaño de las microesferas. Logramos producir microesferas con un rango de tamaños desde menos de 0.6 1m hasta 48 1m de diámetro, que pueden ser utilizadas con fines vacunales.

Microencapsulation involves the coating of an immunogen in a protective wall material that is usually polymeric in nature. Recent scientific advances have resulted in vaccines such as subunit vaccines, or vaccines containing synthetic peptides and proteins expressed through recombinant technology, but they are not successfully utilized so far[1].

In an attempt to improve the efficacy of the currently used vaccines we investigated the use of microencapsulation of immunogens into Poly (DL lactide-co-glycolide) based matrix. Through this polymer we can achieve controlled-release of the immunogen that can last for weeks or months[2,3].

Poly is a totally biodegradable, non toxic, non immunogenic polymer[4,5]. The antigen encapsulated with the polymer is protected from low stomach pH and proteases when given orally, which is very important for gut immune-stimulation and oral vaccination. It has been demonstrated that secretory antibodies (IgA) as well as circulating antibodies (IgG) can be stimulated by the administration of an antigen encapsulated into Poly microspheres[6,7,8]. Microspheres smaller than 5 Tm are taken up by the macrophages. Microspheres larger than 5 Tm in size delays the antigen release[6]. Mixtures of microspheres, of sizes, 1-10 Tm and 20 to 50 Tm stimulate both the primary and secondary immune response with a single injection[8]. The possibility of a single dose of microencapsulated vaccine in Poly to serve both as primer and as a booster has great value in the poultry industry. The size of the microspheres influences the duration of the immune stimulation. We investigated several factors on the preparation of microspheres. Our results indicated that increasing the viscosity of the polymer form 0.2 to 1.07 increased the average size of the microspheres from 3.6 Tm to 14.4 Tm. Increasing the polymer concentration from 1.25% to 25%, increased the average size of microspheres from 2.9 Tm to 12.0 Tm. Increasing the homogenizing tube diameter from 2.7 cm to 7.6 cm increased the average size of microspheres from 9.6 Tm to 15.6 Tm. Increasing the ratio of organic phase to aqueous phase from 1:100 to 1:2 increased the average size from 7.8 Tm to 14.8 Tm. Increasing the surfactant concentration from 0.1% to 10% decreased the average size of the microspheres from 9.4 Tm to 2.8 Tm. Increasing the methylene chloride concentration from 9.25 ml to 5 ml for 100 mg of polymer the average size of microspheres decreased from 41.5 Tm to 6.1 Tm. In all these experiments we used Poly 50:50 with a viscosity of 0.57. The homogenizing time was 3 minutes at 10,000 rpm and the surfactant was 1% polyvinyl alcohol. We were able to produce microspheres of sizes varying from 0.6 Tm to 48 Tm, which are suitable for delivery of vaccines. Further investigations on the entrapment efficiency of the antigen for microspheres of different sizes are in progress.

REFERENCES

1. Eldrige, H. J., J.K. Staas, J.A. Meulbrock, R.T. Tice, and R.M. Gilley. Biodegradable and biocompatible Poly (DL-lactide-co-glycolide) microspheres as an adjuvant for Staphylococcal enterotoxin B toxoid which enhences the level of toxin-neutralizing antibodies. Infect. Immun. 59:2978-2986. 1991.
2. Lewis, H.D. Controled release of bioactive agents from lactide/glycolide polymers. In: Biodegradable Polymers as Drug Delivery System. Ed. by M. Chasin and R. Langer. Marcel Dekker, New York 1990.
3. Miller, A.R., J.M. Brady, and E.C. Cutright. Degradation rates of oral resorbable implants (polylactates and polyglycolates): Rate modification with changes in PLA/PGA copolymer ratio. J. Biomed. Mater. Res. 11: 711-719. 1977.
4. Moris, W., C.M. Steinhoff, and K.P. Russell. Potential of polymer microencapsulation technology for vaccine innovation. Vaccine 12: 5-12. 1994.
5. Cohen, S., T. Yoshioka, M. Lucarelli, H.L. Hwang, and R. Langer. Controlled delivery systems for proteins based on Poly (Lactic/Glycolic Acid) microspheres. Pharmaceutical Res. 8:713-720. 1991.
6. Eldridge, J.H., R.M. Gilley, J.K. Staas, Z. Moldoveanu, J.A. Meulbroek, and T.R. Tice. Biodegradable microspheres: Vaccine delivery system for oral immunization. Current Topics Microb. Immunol. 146:59-65.1989.
7. Reid, R.H., E.C. Boedeker, C.E. McQueen, D. Davis, L.Y. Tseng, J. Sau K. Kodak, R. Nellore, P. Dalal, and H.R. Bhagat. Preclinical evaluation of microencapsulated CFA/II oral vaccine against enterotoxigenic E. coli. Vaccine 11: 159-167. 1993.
8. Eldridge, J.H., J.K. Staas, J.R. Meulbroek, J.R. McGhee, T.R. Tice, and M.R. Gilley. Biodegradable microspheres as a vaccine delivery system. Mol. Immunol. 28: 287-294. 1991.
9. Jeffery, H., S.S. Davis, and D.T. O'Hagan. The preparation and characterisation of Poly (lactide-co-glycolide) microparticles I: Oil-in-water emulsion solvent evaporation. Intern. J. Pharm. 77:169-175. 1991.

THE USE OF A LIVE ATTENUATED REOVIRUS VACCINE IN MATERNAL IMMUNE CHICKENS

USO DE UNA VACUNA ELABORADA CON REOVIRUS ACTIVO ATENUADO EN POLLOS CON INMUNIDAD MATERNA

G. Franz and R. Hein

Intervet, Inc.
405 State Street, Millsboro, DE 19966

RESUMEN

Una de las características asociadas al uso de las vacunas de reovirus altamente atenuados en pollos jóvenes sin anticuerpos maternos, es la producción de niveles mínimos de anticuerpos. El propósito de este estudio fue evaluar el efecto de una vacuna de reovirus altamente atenuado en pollos de engorda jóvenes con anticuerpos maternos. Se utilizaron pollos de engorda positivos a anticuerpos maternos contra reovirus que fueron colocados en unidades de aislamiento al día de edad y que fueron vacunados subcutáneamente al 1o., 10o. ó 25o. días de edad, con una vacuna de reovirus activo y altamente atenuado (cepa S1133). Los anticuerpos contra el reovirus aviar se midieron a varios intervalos hasta los 45 días de edad utilizando el ensayo de inmunoabsorción ligado a enzimas de Idexx y la prueba de virus neutralización en fibroblastos de embrión de pollo. Los anticuerpos maternos contra reovirus declinaron substancialmente y ya no fue posible detectar niveles significativos de anticuerpos neutralizantes a los 15 días de edad. En los pollos vacunados al día de edad, en presencia de anticuerpos maternos, se observó una baja respuesta inmune a las 4 a 5 semanas postvacunación, mientras que los pollos vacunados a los 10 ó a los 25 días de edad mostraron una respuesta inmune hacia las 3 a 4 semanas postvacunación.

Este estudio apoya a los informes previos que indican que una vacuna de reovirus altamente atenuada y aplicada subcutáneamente es capaz de inducir una respuesta inmune aún en presencia de anticuerpos maternos.

A characteristic associated with the use of highly attenuated reovirus vaccines in young chickens without maternally derived antibodies (MDA) is the production of minimal levels of antibody. The purpose of this study was to investigate the effect of a highly attenuated reovirus vaccine in young broiler chickens with MDA to avian reovirus. Broiler chickens with MDA to reovirus were placed in isolators at 1 day of age and vaccinated subcutaneously at 1, 10, or 25 days of age with a highly attenuated live reovirus vaccine (S1133). Antibodies to avian reovirus were measured at various intervals up to 45 days of age using the enzyme-linked immunosorbent assay by Idexx and by virus neutralization on chicken embryo fibroblasts. MDA to avian reovirus declined substantially and no significant neutralizing antibody levels could be detected at 15 days of age. In broilers vaccinated at 1 day of age in the presence of MDA, a low immune response was observed 4 to 5 weeks post vaccination, while the chickens vaccinated at 10 and 25 days of age showed an immune response by 3 to 4 weeks post vaccination. This study supports previous reports that a highly attenuated reovirus vaccine applied subcutaneously is capable of inducing an immune response even in the presence of MDA.

ACQUISITION OF MATERNALLY DERIVED SYSTEMIC ANTIBODY IN LATE STAGE EMBRYOS FROM COMMERCIAL LEGHORN AND BROILER FLOCKS

ADQUISICION DE ANTICUERPOS MATERNOS SISTEMICOS EN EMBRIONES DE POLLO, DURANTE LAS ULTIMAS FASES DE SU DESARROLLO, PROCEDENTES DE PARVADAS COMERCIALES LEGHORN Y DE ENGORDA

Stephen K. Muir

Staff Veterinarian, Biologics Research and Development
Solvay Animal Health, Inc., Charles City, IA

RESUMEN

Es de esperarse que las aves comerciales sean positivas a anticuerpos maternos, al momento de su nacimiento, contra una amplia variedad de agentes patógenos, debido a la exposición natural o vacunal del pie de cría. Los anticuerpos maternos son responsables de la protección de los pollos jóvenes contra enfermedades sistémicas específicas hasta que su propio aparato inmunocompetente madure y sea funcional. Cuando los niveles de anticuerpos maternos son elevados, estos a menudo interfieren con la vacunación de los pollos jóvenes; sin embargo, existe una gran variabilidad en el título de anticuerpos entre los pollos que nacen de una misma parvada de reproductoras. La magnitud y la tasa de disminución de los niveles de anticuerpos maternos en los pollos se utilizan para predecir el tiempo de susceptibilidad a la vacunación. En este estudio se analizó la adquisición temporal de anticuerpos durante las últimas etapas del desarrollo embrionario, en la progenie de una parvada leghorn comercial y de una parvada comercial de reproductoras pesadas.

Se obtuvieron muestras de sangre a partir de los embriones de 15, 17 y 20 días de desarrollo, y de los pollos de 1, 3 y 8 días de edad, en 2 parvadas comerciales. Se analizaron estos sueros con la técnica de ELISA para determinar los títulos de anticuerpos contra la enfermedad de Newcastle, la bronquitis infecciosa, la infección de la bolsa de Fabricio y la reovirosis. Se detectaron títulos séricos contra el virus de la infección de la bolsa de Fabricio desde los 15 días de incubación. No se pudieron detectar títulos de anticuerpos contra el virus de la enfermedad de Newcastle, el virus de la bronquitis infecciosa, ni el reovirus en un alto porcentaje de los embriones hasta el 20o. día de incubación.

Los títulos medios geométricos continuaron incrementándose y alcanzaron su máximo nivel a los 3 días postnacimiento. Estos resultados sugieren que los anticuerpos derivados de las madres no se adquieren sino hasta la últimas etapas del desarrollo embrionario, lo cual corresponde con la absorción e internación del saco vitelino.

Commercial poultry are expected to be antibody positive at birth for a wide variety of disease agents due to vaccinal or natural exposure of parent stock. Maternally derived antibody is responsible for protection of the young chick against specific systemic diseases until its immune system functionally matures. High levels of maternally derived antibody often interfere with vaccination of young chicks. However, there is a considerable amount of variability in the antibody titer among chicks from a common flock at hatch. The magnitude and rate of decay of maternal antibody in chicks is used to predict timing of susceptibility to vaccination. This study looked at the temporal acquisition of antibody in later stages of embryonic development from a commercial leghorn and a commercial broiler flock.

Blood samples were collected from 15-, 17-, and 20-day-old embryos and 1-, 3- and 8-day-old chicks from 2 commercial flocks. Serum was analyzed for ELISA titers for NDV, IBV, IBDV, and reo. Serum titers to IBDV were detected as early as 15 days of incubation. Titers to NDV, IBV, and reo were not detectable in a high percentage of embryos until day 20 of incubation. Geometric mean titers continued to increase and peaked at 3 days post hatch. The results suggest that maternally-derived antibody is not acquired until late in embryonation corresponding to the absorption and internalization of the yolk sac.

EFFECT OF RECOMBINANT INTERFERON ON VIRAL IMMUNOSUPPRESSION IN CHICKENS

EFECTO DEL INTERFERON RECOMBINANTE SOBRE LA INMUNOSUPRESION VIRAL EN POLLOS

J. M. Sharma[A], K. Karaca[A], S. Erickson[A], B. Winslow[B], D. E. Junker[B], and J. K. McMillen[B]

[A]Veterinary PathoBiology, College of Veterinary Medicine
University of Minnesota, St. Paul, MN
[B]Syntro Corp., Lenexa, KS

RESUMEN

Se construyó un recombinante mediante la inserción del gene del interferón (IFN) del pollo en un virus vector de la viruela aviar (FPV). Este recombinante (rFPV-IFN) expresó niveles significativos de IFN *in vitro*. Nosotros examinamos el efecto protector de este recombinante sobre el impacto negativo del FPV y sobre la infección de la bolsa de Fabricio (IBF) en pollos libres de patógenos específicos. Ambos virus causaron pérdida del peso corporal en los pollos pero la presencia del rFPV-IFN disminuyó esta pérdida de peso.

Immunosuppression in commercial chickens flocks causes recurring economic loss to the industry. Loss occurs because immunosuppressed flocks perform poorly and experience increased incidence of opportunistic infections. Immunosuppression can occur due to environmental and management stress. In addition, a number of infectious agents, particularly viruses, can cause profound immunosuppression. Chickens are routinely vaccinated against some of the important immunosuppressive viruses. Vaccines, however, are not always protective because either vaccine administration may be improper or chickens may get exposed to variant strains against which the vaccines may be ineffective. Because a number of factors may be involved simultaneously, it is often difficult to manage immunosuppression in commercial settings.

We have recently examined the possible use of cytokines in reversing the negative impact of immunosuppression. Cytokines are biologically active proteins that regulate a number of biological functions. Cytokines play a special role in modulating immune response. Treatment with extraneous cytokines has been shown to enhance immune competence in animal model systems. There is widespread current interest in characterizing and cloning avian cytokines and

understanding their possible immunomodulatory role. Genes that code for several chicken cytokines and at least one turkey cytokine have been cloned and expressed. Of particular interest to us was the cloning of chicken type 1 IFN. Interferon is an antiviral cytokine that plays an important role in immunity. More importantly, IFN has been used in mammals as a therapeutic agent against certain types of infections and cancers.

In the present study, we inserted type 1 chicken IFN gene into fowl pox virus (FPV) vector. The resulting FPV-IFN recombinant expressed significant levels of IFN as the virus replicated in susceptible cells. We hypothesized that infection of chickens with rFPV-IFN will result in production of IFN in vivo and IFN-induced up regulation of the immune system will reduce the negative impact of viral immunosuppression. Our specific objective was to examine the beneficial effect of rFPV-IFN on reduced body weight gain and reduced antibody response caused by IBDV and FPV.

Results revealed several new and interesting findings: a) Although IFN is known to be anti-viral, under our experimental conditions, the presence of IFN in chickens did not prevent infection with FPV or IBDV. Chickens simultaneously inoculated with rFPV-IFN and a vaccine strain of IBDV were protected against virulent strains of FPV and IBDV. This result indicated that despite the presence of IFN, the viruses replicated in chickens and induced protective immunity; b) Infection at hatch with FPV, and to some extent also with IBDV, resulted in reduced body weight gain at 2 and 4 weeks of age. Presence of IFN prevented this loss in body weight gain; and c) FPV and IBDV reduced primary antibody levels against several antigens in chickens. IFN restored antibody response in some chickens, although the beneficial effect of IFN was not consistent and needs further study.

This study provides the first evidence that a recombinant virus containing a cytokine gene insert may be useful in reducing the negative impact of immunosuppressive viruses in poultry.

EVALUACIÓN DE DOS VACUNAS EMULSIONADAS EXPERIMENTALES, INACTIVADAS CON FORMALINA Y BROMOETILENIMINA BINARIA (BEB), PARA LA PREVENCIÓN DE LA INFLUENZA AVIAR (IA)

EVALUATION OF ONE FORMALIN-KILLED, AND ONE BINARY BROMOETHYLENIMINE-KILLED EXPERIMENTAL, OIL EMULSION VACCINES FOR THE PREVENTION OF AVIAN INFLUENZA

Nahum Puebla O., Eduardo Lucio D. y Andrés Morales G.

Investigación Aplicada S.A. de C.V

ABSTRACT

Serological responses to two oil emulsion vaccines containing the same amount of avian influenza (AI) antigen were compared. Virus in vaccine 1 was killed with 0.1% formalin. Vaccine 2 was inactivated with 0.001 M binary bromoethylenimine (BEB). Twenty seven 3-week-old broilers were divided into two 10-bird vaccinated groups, and one 7-bird non-vaccinated control group (group C). Ch/CPA238/94/H5N2 AI virus (AIV) strain was used for the preparation of both vaccines. Original virus titer was $10^{10.5}$ chicken embryo infectious doses (CEID) 50%/ml. Group A was given vaccine 1. Group B received vaccine 2. Both groups were vaccinated a 3 weeks of age. All birds were sampled for serology prior to and at 2, 3, 4, and 5 weeks after vaccination. Antibody titer was determined by the hemagglutination inhibition (HI) test using the technique described by CPA. Geometric mean (GM) and standard deviation (SD) were estimated. Birds in non-vaccinated control group seroconverted to AIV starting at 2 weeks of age which means a low pathogenicity field challenge. This finding indicates that antibody titers obtained in both vaccinated groups were affected by the live field virus, since antibody levels were higher than those reported as normal after killed virus vaccination. Titers obtained with the BEB-inactivated vaccine were higher than those of birds given the formalin-killed vaccine.

INTRODUCCIÓN

Durante los ùltimos tres años, la avicultura nacional ha sido fuertemente afectada por la Influenza Aviar, enfermedad muy conocida en los Estados Unidos, así como en otros países y casi totalmente estudiada (3). En sus inicios, se identificò el subtipo del virus. Después de observar que realmente el problema continuaba sin ningún control, se decidió tratar de controlar mediante el uso de una vacuna emulsionada, que, según la opiniòn de algunos investigadores, esta alternativa era menos costosa que una erradicación . A pesar de que se estableció un proceso de elaboración de la vacuna emulsionada, este permitía elegir que tipo de inactivante viral se podía utilizar en el proceso y de esta forma, hubo laboratorios que en su proceso de inactivacion del virus utilizaron o utilizan la β-propiolactona y la Formalina. Sin embargo, al llevar a cabo algunos seguimientos serològicos de parvadas que eran vacunadas con este tipo de vacunas, encontramos que las respuestas serològicas medidas por medio de la prueba de HI, eran muy heterogéneas.

Estos resultados tan irregulares, para el caso de las vacunas inactivadas con formalina, se deben a que es probable que la formalina cause mayor daño a la estructura antigènica del virus, lo que se traduce en que en una misma muestra de determinado numero de sueros se encontren títulos, a la 2ª, 3ª ò 4ª semana posvacunacion , en $\log_2$ de 0, 1, 3, 4, 5.

Era obvio que esto desconcertaba a los usuarios que esperaban observar respuestas mas homogéneas, aunque no se supiera con certeza la correlación existente entre títulos y protección. Por otro lado, existen evidencias de que aves vacunadas que no desarrollaron anticuerpos tuvieron de un 90 a 100 % de protección a las 2 ò 4 semanas postvacunaciòn y desafiadas con una cepa altamente patógena (2,4,7). A pesar de estos hallazgos y a que de las pruebas de desafío resultan ser muy costosas y arriesgadas, se sigue utilizando la prueba de HI como una forma evaluatoria de la respuesta posvacunal. Por otro lado, la utilización de la β-propiolactona, que aunque actúa a nivel de la nucleoproteina y deja intacta la estructura antigenica del virus y que ha demostrado tener un comportamiento muy adecuado en el proceso de inactivacion, pero, que si no se utiliza a la concentración recomendada puede reducir la capacidad hemaglutinante del virus y además, resulta muy peligrosa en su manipulación en el laboratorio por ser un producto altamente carcinogenico, según se puede observar en la etiqueta del producto (6,8) . En este sentido, se han buscado otro tipo de inactivantes que permitieran obtener respuestas serològicas de HI màs homogéneas y que, además, no fuera peligrosa su manipulación. Dentro de esta clase de inactivantes se encuentra la Bromo Etilenimina Binaria (BEB), que ha demostrado ser un excelente inactivante para el virus de IA y que se ha comportado mejor que la Formalina y que la β-propiolactona, en cuanto a su capacidad de dejar intacta la actividad hemaglutinante del virus de IA (6).

OBJETIVO

1.- Evaluar el comportamiento serològico generado por dos vacunas experimentales inactivadas con Formalina y Bromo Etilenimina Binaria (BEB), emulsionadas y aplicadas en pollos de engorda explotados en condiciones comerciales.

MATERIAL Y MÉTODO

Aves: Se utilizaron pollos de engorda comercial de la estirpe Arbor Acres, de 3 semanas de edad.

Alojamiento: Las aves se alojaron en una caseta de ambiente natural, localizada en una zona de alta explotación avícola.

Agua: Proveniente de la red municipal, potable, administrada Ad libitum.

Cama: Se utilizó paja, de 5 cm de espesor.

Equipo: Crianza y desarrollo: Se utilizaron comederos y bebederos de iniciación a la proporción conocida.

Cepa vacunal: Se usó la cepa Ch/CPA238/94/H5N2, del virus de Influenza Aviar, para la elaboración de las vacunas comerciales. el título original del virus fue de $10^{10.5}$ DIEp50/ml.

Elaboración de las vacunas: Se inocularon embriones de pollo SPF, vía cavidad alantoidea, de 9 días de edad con 0.1 ml que contenía $10^{3.0}$ DICT50% del virus de Influenza Aviar. A las 72 hr se sacrificaron los embriones y se cosechó el fluido amnio alantoideo (FAA). Se centrifugó a 2000 rpm durante 20 minutos a 4°C y el FAA claro se dividió en dos fracciones. Una fracción se inactivò con formol al 0.1 % y la otra se inactivò con bromoetilenimina binaria (BEB) al 0.001 M.

Después de la inactivaciòn, los FAA se ocuparon para la elaboración de dos vacunas emulsionadas en aceite, en una proporción de 70/30 (O/W), con un título final de $10^{8.5}$ DIEp50/dosis de vacuna (0.5 ml). La prueba de inactivaciòn se llevò a cabo mediante la inoculaciòn directa de la vacuna en embriones de pollo SPF. Las pruebas de pureza bacteriológica se llevaron a cabo de acuerdo al 9 CFR.

Diseño Experimental: Se utilizaron 27 pollos de engorda mixtos provenientes de la misma incubadora, de la estirpe Arbor Acres, de 3 semanas de edad. Las aves se dividieron en tres grupos; dos grupos vacunados, de 10 aves cada uno, identificados como A y B, y un grupo control no vacunado, de 7 aves, identificado con la letra C. Los tres grupos fueron colocados en una corraleta por grupo. Las aves fueron

alimentadas con alimento comercial de alto nivel nutricional y se vacunaron de acuerdo al siguiente esquema:

	No aves	Vacuna	Inactivante	Vacunación	Vía
Grupo A	10	Influenza Aviar	Formalina	21 días	Subcutánea
Grupo B	10	Influenza Aviar	BEB	21 días	Subcutánea
Grupo C	6	------	------	------	------

Todas las aves fueron muestreadas para análisis serològico al momento de ser vacunadas. Posteriormente, se muestrearon a la 2a, 3a, 4a y 5a semana de edad.

Análisis serològico: Se empleò la prueba de HI , utilizando 4 UHA.

Procedimiento de muestreo y análisis serològico: Todas las aves fueron muestreadas para análisis serologico al momento de ser vacunadas. Posteriormente, se muestrearon a la 2a, 3a, 4a y 5a semana postvacunaciòn. El tìtulo de anticuerpos contra el virus de la Influenza Aviar fue medido mediante la prueba de HI, descrita por CPA, utilizando 4 UHA.

RESULTADOS

El grupo control no vacunado, empezó a seroconvertir hacia el virus de IA probablemente poco tiempo despuès de haber hecho el primer muestreo. Esto nos indica que hubo un desafío de campo, por una cepa de baja patogenicidad. Se intentó el aislamiento mediante hisopos cloacales y traquéales, pero el aislamiento fue negativo. Los títulos de anticuerpos alcanzados por los grupos vacunados, se encuentran muy por encima de los reportados en la literatura (2,4). Esto pudo haber sido influenciado por el desafío de campo. El grupo B, que recibió la vacuna 2 (inactivada con BEB), presentó mejores títulos durante todas las etapas del muestreo, después de la vacunación, comparado con el grupo A, que recibió la vacuna 1 (inactiva con formalina).

Cuadro 1.
Grupo A, Titulos de Anticuerpos HI-IA.

Suero	A/Vacunar	semana			
		2a.	3a.	4a.	5a.
1	5<10	1:8	1:10	1:40	1:40
2	"	1:32	1:20	1:40	1:40
3	"	1:64	1:80	1:40	1:80
4	"	1:64	1:80	1:80	1:160
5	"	1:128	1:160	1:160	1:160
6	"	1:256	1:160	1:160	1:320
7	"	1:256	1:320	1:320	1:1280
8	"	1:256	1:640	1:640	1:1280
9	"	1:256	1:640	1:640	
10	"	1:256			
MG		103.9	117.5	137.1	190.2
DE		107.99	247.84	246.12	538.35

Los resultados del grupo A, mostraron una mayor dispersión, comparados con el grupo B. Los resultados de HI de los grupos A, B y C, se presentan en el cuadro 1, 2 y 3 respectivamente.

Cuadro 2
Grupo B. Titulos de Anticuerpos HI-IA.

Suero	A/Vacunar	semana			
		2a.	3a.	4a.	5a.
1	5<10	1:16	1:40	1:80	1:80
2	"	1:32	1:160	1:80	1:80
3	"	1:32	1:160	1:160	1:320
4	"	1:64	1:160	1:160	1:320
5	"	1:128	1:160	1:320	1:640
6	"	1:256	1:320	1:320	1:640
7	"	1:256	1:320	1:320	1:640
8	"	1:256	1:640	1:640	
9	"	1:256			
10	"	1:256			
MG		103.9	190.2	207.5	289.8
DE		110.34	184.46	185.16	257.78

Cuadro 3.
Grupo C. Titulos de Anticuerpos HI-IA.

Suero	A/Vacunar.	semana			
		2a.	3a.	4a.	5a.
1	5<10	1:0	1:10	1:40	1:160
2	"	1:0	1:20	1:40	1:160
3	"	1:16	1:40	1:40	1:160
4	"	1:64	1:80	1:80	1:160
5	"	1:64	1:80	1:80	1:160
6	"	1:64	1:80	1:80	1:320
7	"	1:128			
MG		28.5	40	56.5	179.6
DE		46.18	32.5	21.9	65.31

DISCUSIÓN

Vale la pena señalar que estas aves estuvieron sometidas a condiciones de campo y por lo tanto, la existencia de un desafío de un virus vivo, como se evidencia por la seropositividad de los controles *sin* vacunar, propicio que los títulos de HI para ambos grupos vacunados, hallan resultado ser muy altos con respecto a los reportados en la literatura (2,4,7). Estos hallazgos resultan de interés debido a que los dos grupos vacunados estuvieron sometidos a las mismas condiciones de campo. Se puede observar que los títulos de HI desarrollados en el grupo vacunado con la vacuna inactivada con BEB, mostraron ser màs homogéneos durante todos los muestreos y la desviación estándar de

todas las muestras fueron màs bajas que el grupo vacunado con la vacuna inactivada con formalina, esto puede coincidir con lo reportado por King, en donde la BEB tuvo mejor comportamiento que la formalina por su capacidad de dejar intacta la actividad hemoaglutinante del virus de IA, lo que se traduce, probablemente, en la generación mas homogénea de anticuerpos. Por otro lado, la incapacidad de poder llevar a cabo el aislamiento del virus de campo, detectado serologicamente, en el grupo control sin vacunar, se debió a que es muy probable que las aves se hallan infectado en algun momento después de que se hizo el primer muestreo serològico y cuando nos percatamos de la seropositividad de este grupo, en el siguiente muestreo, ya habían pasado por lo menos 15 días, esto se ha documentado ampliamente y se ha encontrado que el aislamiento del virus de IA postdesafio o postinfeccion por medio de hisopos traquéales y cloacales se ha hecho en un periodo de 13 a 15 días, por lo tanto en posteriores intentos fue imposible recuperar el virus (1). Así mismo, el aislamiento resulto ser también negativo en los grupos vacunados, esto es debido a que es mas escasa la eliminación del virus en aves vacunadas (5). La información aquí vertida tiene relevancia, sin embargo, es importante llevar a cabo un ensayo en unidades de aislamiento, en forma controlada, para poder conocer con certeza, el nivel de anticuerpos que es capaz de inducir o generar una vacuna inactivada con BEB en ausencia de algún virus vivo.

BIBLIOGRAFÍA CITADA

1. **Alexander, D.J., Parsons, G. and Manvell, R.J.**: Experimental assessment of the pathogenicity of eight Avian Influenza A viruses of H5 subtype for chickens, turkeys, ducks and quail. *Avian Path.* 15: 647-662, 1986.
2. **Brugh, M., Beard, C.W., Stone, H.D.**: Immunization of chickens and turkeys against Avian Influenza with monovalent and polyvalent oil emulsion vaccines. *Am. J. Vet. Res. 40*: 165-169, 1979.
3. **Easterday, B.C. and Hinshaw, V.S.**: Influenza. In: Diseases of Poultry. 532-551. *Ed. by: Calnek, B.W.* 9th edition. Iowa State University Press, Ames, Iowa, USA. (1991).
4. **Garcia, G.**: Vacunas contra Influenza Aviar. En: Bioseguridad para el control y la prevencion de la Influenza aviar. *ANECA,* 27-35. Mèxico, D.F., 1995.
5. **Karunakaran, D., Newman, J.A., Halvorson, D.A. and Abraham, A.**: Evaluation of inactivated Influenza vaccines in market turkeys. Avian Diseases 31: 498-503, 1987.
6. **King, D.J.**: Evaluation of different methods of inactivation of Newcastle virus and Avian Influenza virus in egg fluids and serum. *Avian Diseases 35*: 505-514, 1991.
7. **Stone, H.D.**: Efficacy of Avian Influenza oil-emulsion vaccines in chickens of various ages. *Avian Diseases 31*: 483-490, 1987.
8. **Wood, J.M., Kawaoka, Y., Newberry, L.A., Bordell, E. and Webster, R.G.**: Atandarization of inactivated H5N2 Influenza vaccine and efficacy against lethal A/Chicken/Pennsilvania/ 1370/83 infection. *Avian Diseases 29*: 867-872, 1985.

MEDICIÓN DE LOS ANTICUERPOS CONTRA LA IBF EN REPRODUCTORAS PESADAS VACUNADAS CONTRA IBF Y *ACEMANNAN* COMO INMUNOESTIMULANTE Y LA PROTECCIÓN DE LA DESCENDENCIA CONTRA *Salmonella enteritidis.*

INFECTIOUS BURSAL DISEASE ANTIBODY TITERS IN IBD-VACCINATED, ACEMANNAN-IMMUNOSTIMULATED BROILER BREEDERS, AND *Salmonella enteritidis* PROTECTION OF THE PROGENY

Balcázar, Q.J.[1], Quintana, L.J.A.[1], Casaubon, H.M.T.[1], Le Lorier, A.[2] y Téllez, I.G.[1], Paasch M. L.[1]

[1]Depto. De Producción Animal: Aves. Fac. Med. Vet. y Zoot., UNAM., 04150 México, D.F.
[2]Solvay Animal Health.

ABSTRACT

The effects of acemannan on active post-vaccine immune response against infectious bursal disease (IBD) virus in broiler breeders and on progeny passive immunity facing early *S. enteritidis* challenge were evaluated. Two 18-week-old, 2,200 broiler breeder groups were used. One group was vaccinated against IBD, and the other group received also 0.2 ml acemannan. Antibody production was evaluated every 4 weeks for 32 weeks. At 40 and 50 weeks, the following variables were evaluated in the progeny 2 days after challenge with *S. enteritidis*: organ invasion, and cecal infiltration with immune cells. Breeder results showed that after 50 weeks acemannan stimulated higher antibody levels as compared to the controls. Progeny results indicated that acemannan induced enhanced lymphocyte chemotaxis towards the ceca when birds were challenged with *S. enteritidis* in comparison with the controls, so preventing liver/spleen and cecal tonsil invasion. Cell-based immune response was thus improved in the progeny of acemannan-treated hens.

INTRODUCCIÓN

Recientemente se detectó que un polisacárido que contiene manosa (*mannans*), posee una significativa actividad inmunoestimulante cuando es administrado en animales (7). Este extracto obtenido de la planta cactácea *Aloe vera*, cuyo nombre común es "sábila", tiene la capacidad de incrementar la fagocitosis en los macrófagos de los pollos *in vitro* (3).

Se demostró que el efecto del ahora llamado *Acemannan* [R] utilizado como adyuvante en la vacunación de pollos de engorda, depende del antígeno que se emplee. La respuesta inmune es favorable contra la enfermedad de Newcastle, la Infección de la bolsa de Fabricio y para la enfermedad de Marek (1).

MATERIALES Y MÉTODOS

Se diseño un experimento consistente en dos estudios: uno, se vacunaron contra la IBF dos grupos de 2,200 gallinas de 18 semanas. Un grupo se vacunó utilizando como adyuvante *acemannan* (Solvay Animal, Health Inc.) con una dosis de 0.2 ml y el otro sin adyuvante (grupo testigo). Se evaluó la producción de anticuerpos contra la IBF cada 4 semanas, durante 32 semanas por medio de la prueba virus suero neutralización (VSN). El estudio dos se realizó cuando las reproductoras tuvieron 40 y 50 semanas de edad, se evaluaron las siguientes variables en la progenie (20 pollos) habiendo sido desafiadas al cuarto día de edad con *S. enteritidis* con una dosis de 10^6 UFC: invasión a órganos (hígado, bazo y tonsilas cecales) e infiltración de células del sistema inmune en los ciegos con una escala de 0 a 3, donde 0= sin cambios, 1= leve, 2= moderado y 3= severo.

Análisis Estadístico. Para evaluar el comportamiento de los niveles de anticuerpos se ajusto el modelo de regresión lineal múltiple, el denominado raíz cuadratica. La diferencia entre los grupos se determino utilizando la técnica de variables binarias de Gujarati (2).

Se realizaron análisis de Ji-cuadrada para determinar las diferencias en la invasión de órganos por *S. enteritidis.*

Las diferencias entre las lesiones se analizaron por medio de las pruebas Kruskal Wallis y Willcoxon con el paquete estadístico S.A.S. (8).

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

En la gráfica 1 están representados los títulos de VSN contra IBF de los dos grupos. El análisis estadístico indicó

Cuadro 1. Promedios de cambios histológicos observados en la progenie desafiada contra *S. enteritidis*.

GRUPO	Inmunoestimulante	A.A.P.	I.H.	I. F.L.M.	I. D.L.M.	L.SUB
1	*Acemannan* 0.2 ml. (40 sem)	1.2	1.4 **a**	0.4	1.1 **a**	1.9 **a**
2	Testigo (40 sem.)	1.2	0.75 **b**	0.33	0.1 **b**	0.83 **b**
1	*Acemannan* 0.2 ml. (50 sem.)	1.2	0.35 **b**	0.65	0.30	0.65
2	Testigo (50 sem.)	0.9	0.90 **a**	0.52	0.57	1.09

A.A.P.= Atrofia y ausencia de pliegues. I.H.= Infiltración de hetérofilos.
I.F.L.M.= Infiltración focal de linfocitos en mucosa.
I.D.L.M.= Infiltración difusa de linfocitos en mucosa.
L.SUB.= Infiltración de linfocitos en submucosa.
a, b. Diferente literal significa diferencia estadística significativa ($p<0.05$).

que el grupo de *acemannan* mostró diferencia significativa ($P<0.05$), tanto en el efecto de pendiente como en el de raíz cuadrada, ésto nos indica que las aves vacunadas con *acemannan* lograron estimular y mantener mejores niveles de anticuerpos que las aves que fueron vacunadas sin adyuvante.

En efecto Chinnan A.D. reportó que el *acemannan* induce un mayor título de anticuerpos cuando es empleado como adyuvante en la vacunación contra el virus de la IBF, debido a su acción inmunoestimulante y a su poder para activar los linfocitos T, linfocitos B, macrófagos y la medula ósea (1).

En el estudio dos, no se observaron ningún signo clínico de Salmonelosis en ninguno de los grupos. A los dos días pos inoculación de la progenie obtenida a las 40 semanas no se aisló *S. enteritidis* del grupo de *acemannan* tanto de los cultivos primarios de hígado-bazo como de tonsilas cecales. Mientras que, el grupo testigo solo se recupero 2 cultivos de la mezcla hígado-bazo de un total de 20 aves, sin haber diferencia estadística significativa.

Los resultados del estudio histológico de los ciegos se muestra en el cuadro 1, donde se aprecia que el grupo con *acemannan* tuvo mayor infiltración de mononúcleares (linfocitos B, T, macrófagos) en lamina propia y mucosa en relación con el grupo testigo.

La infiltración de heterófilos y linfocitos se vio más marcada con *acemannan*, lo cual tiene su importancia debido a que estas células constituyen el primer mecanismo de defensa celular (6). Por lo tanto pudiera pensarse que la quimiotaxis se vio favorecida por el *acemannan*. Es importante señalar que la protección de la progenie en los primeros días de vida esta dada básicamente por la inmunidad conferida por la madre (5).

Cuando la progenie se obtuvo a las 50 semanas, se dejó evolucionar la infección por 4 días. El grupo de acemannan presentó un porcentaje de invasión significativamente menor ($p<0.05$) que en el testigo, a partir de bazo e hígado del 63.6 % contra 100 % respectivamente.

Esta diferencia también se ve reflejada en los aislamientos a partir de ciegos. Se obtuvieron significativamente ($p<0.05$) menos porcentaje de aislamientos en el grupo de *acemannan* (55 %) en relación con el testigo (90 %).

La infiltración de heterófilos fue mayor en el grupo testigo (cuadro 1). Ésto puede deberse a que habiendo sido más eficaz la quimiotaxis y por lo tanto haberse desencadenando más rápido el proceso inflamatorio la infiltración de heterófilos en el grupo con *acemannan* ya va en descenso debido a una disminución en la cantidad de antígeno o bien la bacteria ya emigró a otros órganos.

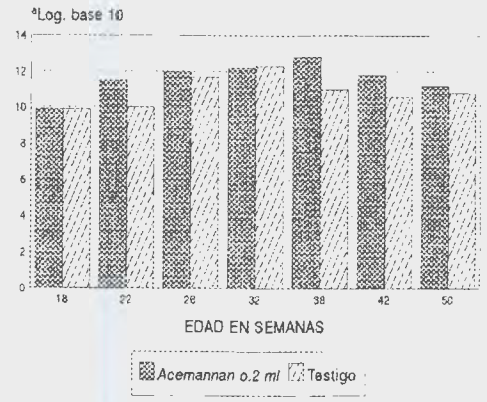
Por lo que se pudiera pensar que en el presente trabajo el grupo de *acemannan* indujo mayor quimiotaxis de linfocitos hacia el ciego al ser desafiadas las aves con *S. enteritidis*, en comparación con el grupo testigo, lo cual evitó la invasión al hígado, bazo y tonsilas cecales. Por lo tanto, la respuesta inmune de base celular fue superior con *acemannan*, ante un desafío con *S. enteritidis*.

LITERATURA CITADA

1. Chinnan, A.D., Baig, M.A., Tizard, I.R. and Kemp, M.C.: Antigen dependent adjuvant activity of a polydispersed beta-(1,4)-liked acetylated mannan (*acemannan*). *Vaccine, 10*:551-557 (1992).

2. Gujarati, D.: Use of dummy variables in testing for equality between sets of coefficients in linear regressions: A generalization. *The American Statistician, 24*:18-21 (1970).
3. Karaka, K., Sharma, M. and Nordgren, R.: Nitric oxide production by chicken macrophages activated by *acemannan*, a complex carbohydrate extracted from *Aloe vera*. *Vet. Immunol. Immunop.*, (1994).
4. Lee, G.M., Jackson, D.F. and Cooper, G.N.: Infection and immune responses in chickens exposed to *Salmonella typhimurium*. *Avian Dis., 27*: 577-583 (1983).
5. North, M.O. y Bell, D.D.: Manual de producción avícola. Ed. *El Manual Moderno*. México, 1993.
6. Roitt, I.: Immunology. 9 th ed. Ed. *Mosby*, Hon Kong, 1993.
7. Tizard, I.R., Carpente, R.H., McAnalley, B.H. and Kemp, M.C.: The biological activities of mannans and related complex carbohydrates. *Mol. Biother., 1*:260-296 (1989).
8. Zar, J.: Biostatistical analysis. 2 nd ed. Ed. *Prentice Hall Inc*, Englood Cliffs, N.J., (1984).

GRÁFICA 1.TÍTULOS DE ANTICUERPOS EN VSN CONTRA LA IBF EN GALLINAS REPRODUCTORAS VACUNADAS A LAS 18 SEM. CON *ACEMANNAN*



ALGUNAS PROPIEDADES *In vitro* DEL SOBRENADANTE DE CELULAS T DE AVES INMUNES CONTRA *Eimeria tenella* A TRAVES DE CITOMETRIA DE FLUJO

SOME IN VITRO TRAITS OF *Eimeria tenella*-IMMUNE POULTRY T CELL SUPERNATANT, DETERMINED BY FLOW CYTOMETRY

García E. Gary,[1,2] Téllez, I. Guillermo,[1] Ortíz, N. Vianney,[2] Isibasi, A. Armando[2], Paasch M. L.[1]

[1] Departamento de Producción Animal:Aves FMVZ-UNAM. Cd. Universitaria D.F. 04510
[2] Unidad de Investigación Médica en Inmunoquímica CMN Siglo XXI México D.F.

ABSTRACT

In this study the presence of *Eimeria tenella*-immune poultry T lymphocyte-derived lymphokine supernatant cytokines (ET-ILK) was indirectly determined. These cytokines increase I chain molecules, major histocompatibility complex-I (MHC) J-chain microglobulin, and CMH-II molecule in chicken T-lymphocytes, by flow cytometry. Results show a significant ($P<0.05$) increase of these molecules as 0, 10, or 20% ET-ILK is added to T-cells.

INTRODUCCION

Se ha observado que las linfocinas provenientes de los LT de aves estimuladas con concanavalina-A (Con-A), activan a los macrófagos (4), incrementan la expresión del complejo mayor de histocompatibilidad tipo II (CMH-II) de monocitos (9) y presentan actividad antiviral (4,5,15,20). Hasta ahora los sobrenadantes de linfocitos T estimulados con 7.5 µg/ml de Con-A, provenientes de aves inmunes contra *E. tenella* (ET-ILK), que confieren protección a pollitos de 14 días de edad, disminuyendo la severidad de las lesión cecal, reducción del número de oocistos en heces e inhibición del desarrollo de *E. tenella* en estudios *in vitro e in vivo* (11), aun no se conoce que moléculas se encuentra en el ET-ILK. Por lo que se dio inicio al estudio del contenido del ET-ILK, utilizando ensayos sobre el incremento de moléculas del complejo mayor de histocompatibilidad con anticuerpos monoclonales (AcM) (Donados por el Dr. Jim Kauffam del Instituto Basel en Basilea Suiza) y citometría de flujo.

MATERIAL Y METODOS

Preparación de parásitos para la inmunización: Se usó la cepa MOR-80 de *E. tenella*, donada por el Dr. Reynaldo Moreno de la FMVZ-UNAM, los ooquistes fueron cosechados, esporulados y mantenidos como se describe (12).

Animales para inmunización con *E. tenella*, para la obtención de linfocinas: Se utilizaron pollos comerciales clínicamente sanos "Avian Farm" de 4 semanas de edad, criados en jaulas en baterías con calefacción, con agua y alimento (19% P.C. y 3,100 Kcal) sin anticoccidiano, administrados en forma *ad libitum*. . Las aves fueron expuestas por *E.* tenella, durante 14 días, con una dosis de 1000 ooquistes/día/ave, que induce una inmunidad sólida en la protección de pollos (8). Pasados 10 días de la última dosis de inmunización, las aves fueron sacrificadas para la obtención de los bazos (11).

Preparación del ET-ILK: La obtención de células de bazo, aislamiento de linfocitos T, producción y preparación de linfocinas, se realizaron como lo describe la técnica (11).

Preparación de LT para el ensayo del CMH: La obtención de LT se realizó como se describe en la técnica (11).

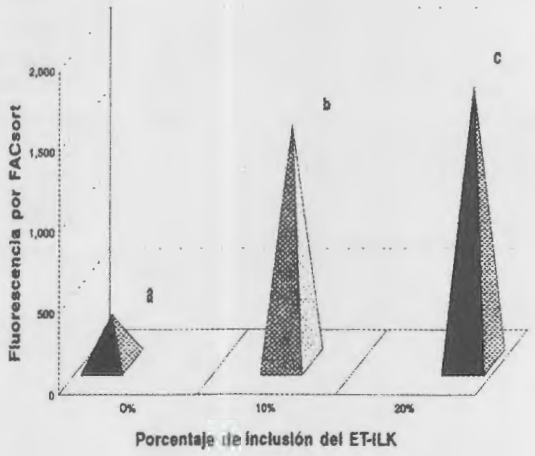
Ensayo para el incremento del CMH de pollo: Se utilizaron linfoblastos de pollo, que fueron incubados por 24 h, 37°C y 5% CO_2 en cajas de medio de cultivo (Nunc F96) con 10% y 20% de los ET-ILK, cada uno por triplicado. Al término del período de incubación, se cuantificó la expresión del CMH-I y CMH-II como sigue: Se incubaron en una placa de cultivo celular (Nunc) 3 x 10^4 células/ml, más 100 µl de sobrenadantes ricos en anticuerpos monoclonales por 30 minutos a 4°C. Se utilizaron AcM de ratón IgG, anti-moléculas α (F21-2), anti-$ß_2$m (F21-21) (19) y anti-βCMH-II de pollo (10) con base en el siguiente diseño experimental para evaluar el incremento de moléculas de expresión de la cadena α del CMH-I (Experimento 1), $ß_2$ microglobulina ($ß_{2\ m}$) del CMH-I (Experimento 2) y del CMH-II (Experimento 3), posterior a la incubación, las células se lavaron dos veces con PBS (amortiguador de fosfatos-salino suplementado al 2% con suero fetal bovino y 0.1% de Azida) para seguidamente adicionar 100µl de IgG de cabra anti-IgG de ratón (Gibco) marcado con isotiocinato de Fluoresceina. durante 30 minutos a 4°C. Al termino de la incubación se procedió a lavar dos veces con PBS y se resuspendieron las células en 500µl de yoduro de propidio al 0.1%. La lectura se realizó por la medición de la intensidad de fluorescencia por citometría de flujo (FACsort) del software LYSIS II (Becton Dickinson).

Análisis estadístico: Se utilizó un análisis de varianza para determinar si hubo diferencias estadísticas en cada uno de los experimento del CMH; para determinar cuáles fueron diferentes se usó la prueba de Scheffe del paquete estadístico SAS (13).

RESULTADOS

Expresión de la molécula-α del CMH-I. (Experimento 1): Se observaron diferencias estadísticas significativas ($P < 0.05$) entre los LT de pollo que recibieron 10 y 20% respectivamente del ET-ILK, en relación al testigo basal, al observar un incremento de la expresión de moléculas de clase-I de los LT de pollo. También hubo diferencias significativas ($P < 0.05$) en el incremento de la expresión de moléculas del CMH-I entre la administración de 10% del ET-ILK, con respecto al adicionar el 20% (Figura 1).

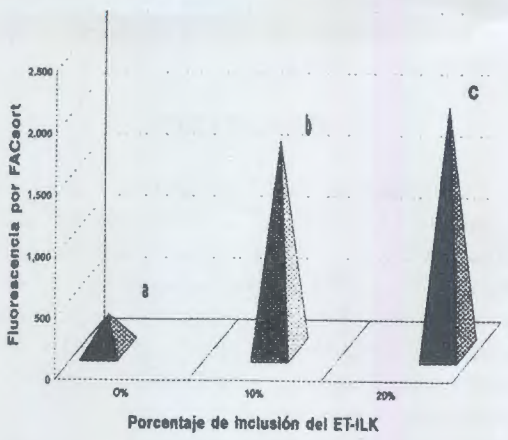
Figura 1. INCREMENTO EN LA EXPRESION DE MOLECULAS DEL C.M.H. I DE LINFOCITOS T POR EL ET-ILK



($P < 0.05$)

Expresión de moléculas $ß_2$ m del CMH-I. (Experimento 2): Se observaron diferencias significativas ($P < 0.05$) entre los LT de pollo que recibieron 10 y 20% del ET-ILK, en relación al testigo basal, al observar un incremento de la expresión de moléculas de la $ß_2$ m de los LT de pollo. También se encontraron diferencias significativas en el incremento de la expresión de la molécula $ß_2$ m, al incrementar la cantidad de ET-ILK de 10 a 20% ($P < 0.05$) (Figura 2).

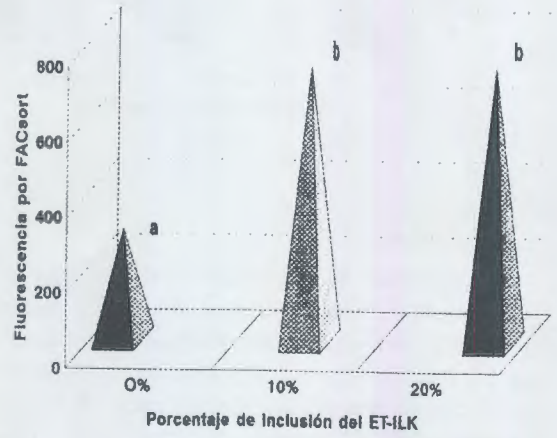
Figura 2. INCREMENTO EN LA EXPRESION DE MOLECULAS β_2m DEL C.M.H. I DE LINFOCITOS T POR EL ET-ILK



(P < 0.05)

Expresión de moléculas del CMH-II. (Experimento 3): Se encontraron diferencias significativas entre los LT de pollo que recibieron 10 y 20% del sobrenadante del ET-ILK, con respecto al testigo basal ($P < 0.05$), Sin embargo no hubo diferencias significativas en el incremento de la expresión de las moléculas de clase II entre los LT que recibieron 10 y 20% del sobrenadante ET-ILK ($P > 0.05$) (Figura 3).

Figura 3. INCREMENTO EN LA EXPRESION DE MOLECULAS DEL C.M.H. II DE LINFOCITOS T POR EL ET-ILK



(P < 0.05)

DISCUSION

En el ensayo de la expresión del CMH, los resultados evidencian la presencia de citocinas que incrementan las moléculas del CMH-I y CMH-II, debidas posiblemente al Interferón γ (IFNγ) y al Factor de Necrosis de Tumores (TNF). Se conoce que los LT de las aves producen *in vitro* el Interferón (IFN) a través de la estimulación con mitógenos como la Con-A (6,14,17) y Fitohemoaglutinina (PHA) (18) y por mezcla de aloantígenos (4,5,15) de igual manera que en los mamíferos (2,3) entonces podría pensarse que tal vez estas funciones, se deban al IFNγ, más que el TNF, ya que este último aun no es reportado que provenga de LT aviares. En el caso de los murinos y humanos, es conocido que el incremento en la expresión de moléculas del CMH es debido a el IFNγ y/o por el TNF (1,7,16).

Otros hallazgos importantes es que los LT de humanos y murinos carecen de CMH-II, sin embargo los LT de pollo en este estudio muestran lo contrario, ya que observamos su presencia (Figura 3) y el incremento de esta por el ET-ILK, aunque no existe un incremento significativo al adicionar mas sobrenadante, debido tal vez a que esta molécula no sea muy importante para el LT, sin embargo es necesario realizar estudios avanzados sobre las linfocinas, sus funciones y el CMH de las aves, para así poder confirmar los resultados de este estudio.

Actualmente en nuestros laboratorios se están buscando los mecanismos que desencadena el ET-ILK en el pollo contra *E. tenella.*

REFERENCIAS

1. Abbas, A.K., Lichtman, A.H., and Pober, J.S.: Celular and Molecular Immunology. 2th, ed.Saunders press. Philadelphia, U.S.A, 1994.
2. Cantrell, D.A. and Smith, K.A.: Transient expresion of IL-2 receptors: consequenses for T-cell growth. J. Exp. Med. 158:1895-1898 (1983).
3. Coligan, J.E., Kruisbeek, A.M., Margulies, D.H., Shevack, E.M., Strober, W.: Current Protocols in Immunology. Vol. 1 Greene Publishing Associates and Wiley Intersciencie. 1992.
4. Dijkmans, R., Creemers, J. and Billiau, A.: Chicken macrofage activation by Interferón: do birds lack the molecular homologue of mammalian Interferón-gamma?. Vet. Immunol. and Immunopathol. 26:319-332 (1990).
5. Efrat, S., Pilo, S. and Kaempfer, R.: Kinetics of induction and molecular size of mRNAs encoding human interleukin-2 and gamma-Interferón. Nature 297:236 (1982).
6. Fredicksen , T.L. and Sharma, J.M.: Purification of avian T cell growth factor and immune Interferón using gel filtration high resolution chromatografhy. In Avian Immunology, edited by Weber W.Y. and Ewert D.L. Alan R. Liss New York. 1987.
7. Hutchinson, Y.: Transplantation and Rejection. In IMMUNOLOGY edited by Roitt, I., Brostff, J., Male, D. 3th ed. 16.-22. Mosby Mandarin offset Hong Kong 1993.

8. Joyner, L.P. and Norton, C.C.: The immunity arising from continuous low-level infection with *Eimeria tenella*. Parasitol. 67:333-340 (1979).
9. Kaspers, B., Lillehoj, H.S., Jenjins, M.C. and Pharr, G.T.: Chicken Interferón-mediated induction of mayor histocompatibility complex class II antigens on peripheral blood monocytes. Vet. Immun. and Immunopathol. 44:71-84 (1994).
10. Kauffman, J. Skjoedt, K., Salomonsen, J., Simonsen, M., Pasquier, L., Parisot, R. and Riegert, P.: CMH.like molecules in some nonmmamalian vertebrates can be detected by cross-reactive xenoantsera. J. Immunol. 144:2258-2272 1990.
11. Kogut, M.H. and Slajchert, T.: T-lymphocytes confer protection in chickens against *Eimeria tenella* by production of lymphokines. Immunol. and Infect. Diseases 2:69-79 (1992c).
12. Long, P.L., Millard, B.J., Joyner, L.P. and Norton, C.C.: A guide to laboratory techniques used in the study and diagnosis of avian coccidiosis. Folia Veterinaria Latina Vol:VI:(3) 201-217. (1976b).
13. Luginbuke, R.C. and Schilotzhauser, D.: SAS/STAT guide for personal computers. 6th, 555-573. SAS Institute, Cary, N.C. 1987.
14. Myers, T.J., Lillehoj, H.S. and Fettere, R.H.: Partial purification and characterization of chicken interleukine-2. Vet. Immun.Immunopatholo. 34:97-114 (1992).
15. Prowse, S.J. and Pallister, J.: Interferón release as a measuare od the T-cell reponse to coccidial antigens in chickens. Avian . Pathol. 16:439-442 (1989).
16. Paul, W.E.: Fundamental Immunology. 3th ed. editaded by Raven press. LTD New York 1993.
17. Sambhara, S.R. and Belden, E.L.: Bovine interleukine-2: Production and caracterization. Vet. Immun. Immunopathol. 18:165-172 (1988).
18. Schnetzler, M., Oommen, A., Nowak, J.S. and Franklin, R.M.: Characterization of chicken T cell growth factor. Eur. J. Immnunol. 13:560-566 (1983).
19. Solomonsen, J., Skjodt, J., Crone, M. and Simonsen, M.: The Chicken erythocyte-specific CMH antigen characterization and purification of the B-G antigen by monoclonal antibodies. Immunogenetics 25:373-382 (1987).
20. Weiler, H. and Bulow, V.: Develpment of optimal conditions for lymphokine production by chicken lymphocytes. Vet. Immunol. and Immunopathol. 14:257-267 (1987).
21. Zar, J.: Biostatistical analysis, 2th ed. Prentice-Hall Inc. 384-351.Englewood Clifts, N.J. 1984.

THE ROLE OF SEROLOGICAL PROFILING TECHNOLOGY IN POULTRY BREEDERS

EL PAPEL DE LA TECNOLOGIA DE LOS PERFILES SEROLOGICOS EN AVES REPRODUCTORAS

Elie K. Barbour[A], Mazen Kahoul[A], Shady Hamadeh[A], Christo Hilan[B], and Rabih Talhouk[C]

[A]Department of Animal Science, Faculty of Agriculture and Food Sciences, American University of Beirut, P.O Box 11-0236, Beirut, Lebanon
[B]Fanar Labs, Food & Agriculture Organization, World Health Organization, Fanar, Lebanon
[C]Biology Department, Faculty of Arts & Sciences,
American University of Beirut

RESUMEN

Se aplicó la tecnología de los perfiles serológicos utilizando las siguientes pruebas: aglutinación rápida en placa, precipitación en gel de agar, inhibición de la hemaglutinación y ensayo de inmunoabsorción ligado a enzimas, a lo largo del período previo a la postura en reproductoras pesadas desarrolladas en 2 casetas de 3 pisos cada una. La evaluación de los perfiles serológicos de 6 vacunas fue capaz de determinar los éxitos y fracasos de las mismas para inducir respuestas inmunes en la parvada. Por otra parte, el contar con estos perfiles fue de utilidad para detectar la exposición al adenovirus tipo 1 y al virus de síndrome de la baja de postura. Esta exposición estuvo asociada a pancreatitis y enteritis, seguidas de pérdida severa de peso y elevación persistente en la mortalidad. Realizamos también el análisis estadístico de la variación en los perfiles serológicos de la misma parvada de reproductoras, entre los diferentes pisos de las casetas.

INTRODUCTION

Serological profiling is the pattern of immune responses compiled from individual serum samples collected at different ages of the flock and analyzed for the presence of antibodies specific to test antigens. The objective of serological profiling is to evaluate the immune responses to administered vaccines and/or to obtain evidence of flock exposure to field strains[1,2,3].

The present study reports on the application of serological profiling to evaluate the immune responses to 6 vaccines and to help in diagnosing exposures to field strains in a chicken meat breeder flock. This study also includes statistical analysis of the variations in serological profiles of the same breeder flock among the different floors of the poultry houses.

MATERIALS AND METHODS

Breeders and Vaccination. The meat breeders were imported from Holland by air at day-old. The flock was distributed in 2 closed system buildings, each having 3 floors. The management of the breeder flock was according to Hybro manual, 1993. The flock was vaccinated against 6 diseases namely, Marek's, infectious bursal disease virus (IBDV), infectious bronchitis (IB), Newcastle disease virus (NDV), infectious laryngotracheitis (ILT), and reovirus infections.

Serological Profiling. The test used in this profiling included: rapid plate agglutination (RPA) test, agar gel precipitin test (AGPT), hemagglutination inhibition (HI) test, and enzyme-linked immunosobant assays (ELISA).

Twenty individual serum samples were collected from each 5000 breeders at 4,8,12,16 and 20 weeks of age. Sera were frozen at -200C. The RPA was used to detect the profile at different ages of the percent of serum samples positive for *Mycoplasma gallisepticum* (MG) and *Mycoplasma synoviae* (MS). The AGPT was used to detect the profile of the percent of sera positive for ILT, Mareks, reovirus, and adenovirus-type 1. The HI test was used to profile the titers of NDV and egg drop syndrome (EDS) virus. The ELISA was used to profile titers of IB and IBDV.

Autopsy and Lesions. The percent mortality was calculated in the flock. An average of 20 breeders was autopsied each week and examined for gross lesions in an attempt to support the serological data.

Experimental design and statistics. The experimental design in this experiment was the Complete Randomized Design. The percentages of positive serum samples collected at different ages of the breeder flock to antigens of reovirus, ILT, Marek's, adenovirus-type 1, MG, and MS, and the floor effect for the presence of antibodies specific to antigens of different diseases, were compared using the chi-square method. The significant difference between the percentages was with probability less than 0.05. Averages of antibody titers to NDV, EDS, IBDV, and IB were analyzed by the one way variance (ANOVA). The significant difference between the means of antibody titers specific to one disease and compared at different ages was determined by Duncan's multiple range test with probability less than 0.05.

RESULTS AND DICUSSION

The serological profiling for evaluation of 6 vaccines in inducing humoral immune responses resulted in showing significant titers to IB and IBDV following vaccination; however, antibody responses to the other 4 vaccines were almost absent, except for the sudden appearance of antibodies to those vaccines at an age greater or equal to 16 weeks, which could be due to field exposure. The serological profiling for detection of exposures to field strains revealed antibody formation specific to adenovirus-type 1 and EDS virus. The exposure to the 2 adenoviruses was associated with a significant ($p< 0.05$) percentage of dead birds showing common signs and lesions, including: weight loss, enteritis, and pancreatitis. Results of exposures to adenoviruses were confirmed in Holland (Euribrid BV Labs., Boxmeer, Netherlands).

Profiles of antibodies to the different antigens showed some variability in the same flock, among the different floors. The main difference in the profiles due to floor effect was at an age of 2 to 4 months; which could be due to a difference in vaccine 'takes' in the different floors, a difference in the ventillation, that could lead to a difference in the density of live vaccine strains and field strains, leading to a difference in infectivity and immune responses of birds reared among the floors.

Obtaining a similar profile to the different antigens in the different floors could be targetted in the future as a model to predict a similarity or a difference in the management, and environment of floors or pens containing the same flock.

REFERENCES

1. King, D.J. Serological profiles of commercial broiler breeders and their progeny. 1. infectious bronchitis virus. Avian Dis 30: 719-723.1987.
2. Snyder, D.B., W.W. Marquardt, E.T. Mallinson, E. Russek-Cohen, P.K. Savage, and D.C. Allen. Rapid serological profiling by Enzyme-linked immunosorbent assay. IV. Association of infectious bursal disease serology with broiler flock performance. Avian Dis 30: 139-148. 1986.

3. Neighbor, N.K., J.K. Skeeles, J.N. Beasley, and D.L. Kreider. Use of an enzyme-linked immunosorbent assay to measure antibody levels in the breeder hens, eggs, and progeny following natural infection or immunization with a commercial Bordetella avium bacterin. Avian Dis. 35: 315-320. 1992.

HYPOGLYCEMIA - SPIKING MORTALITY SYNDROME OF CHICKENS: RECENT EXPERIMENTAL FINDINGS

HIPOGLUCEMIA Y SINDROME DE MORTALIDAD AGUDA EN POLLOS: HALLAZGOS EXPERIMENTALES RECIENTES

A. E. Castro[A], J. F. Davis[B], J. C. de la Torre[C], T. Doman[A], B. C. Cowen[A], P. A. Dunn[A]

[A]Penn State University, Animal Diagnostic Laboratory
Orchard Road, University Park, PA 16802
[B]Georgia Poultry Laboratory, P.O. Box 20, Oakwood, GA 30566
[C]Department of Neuropharmacology, Scripps Research Institute
10666 North Torrey Pines Rd., LaJolle, CA 92037

RESUMEN

El síndrome de mortalidad aguda o síndrome de mortalidad en pico (SMS, por sus siglas en inglés) de los pollos de engorda, se ha caracterizado por hipoglucemia, temblores, deficiencias neurológicas, depresión, disminución del tamaño corporal y del peso y aumento en la incidencia de raquitismo, aerosaculitis y tenosinovitis. Las investigaciones realizadas respecto a este síndrome han descubierto partículas que parecen virus y se asemejan a los arenavirus en las heces. Mediante inmunohistoquímica (IHC, por sus siglas en inglés) con anticuerpos antiarenavirus, se han detectado epítopes reactores en las vellosidades intestinales, en las células acinares y de los islotes pancreáticos y en los hepatocitos. La reproducción del síndrome de la mortalidad en pico fue posible en pollos de 12 a 14 días de edad, utilizando homogeneizados de materia fecal filtrada, de encéfalo y de intestino, así como de embriones de pollo SPF homogeneizados inoculados en el saco vitelino con partículas con bandas de renografina. Los pollos con síndrome de mortalidad en pico no crecen y muestran hipoglucemia con niveles reducidos de IGF-1 (factor del crecimiento similar a la insulina-1, por sus siglas en inglés) y en los niveles pancreáticos de glucagón.

El síndrome de mortalidad aguda en pollos es causado por la inoculación oral de un agente filtrable (0.22 um) que causa una enteritis leve con mala absorción. Asimismo, los pavipollos inoculados con homogeneizados filtrados (0.45 um) de intestino y páncreas de pollo, resultaron positivos a epítopes de arenavirus mediante inmunohistoquímica en las células epiteliales de las criptas. En Georgia, un programa de iluminación controlada parece prevenir los signos clínicos de este síndrome en el campo y en pollos inoculados experimentalmente, lo cual puede estar relacionado con un incremento en los niveles de melatonina inducidos por el programa de iluminación. Mediante microscopía electrónica inmune, los anticuerpos producidos contra los homogeneizados antiSMS han causado la formación de grumos de partículas similares a virus.

A spiking mortality syndrome (SMS) with hypoglycemia has been described to be associated with arenavirus-like particles (AVLPs) [2,3,5,6,7]. SMS has been reproduced in several experimental trials in day-old broiler chicks using filtered (0.45 um) homogenates of frozen intestines, brains and discontinuous renograffin® gradient banded preparations containing the AVLPs[8,13]. The affected chicks at 12-14 days post-inoculation had markedly decreased levels of glucagon and exhibited hypoglycemia-mean plasma blood glucose < 89mg/dl[10]. In certain SMS birds, the glucose level was < 20mg/dl[5]. Additionally, an insulin-like growth factor-1 (IGF-1) was markedly reduced in affected birds[11]. The SMS has also been reproduced in broiler chicks using filtered material serially passaged in SPF chicken embryos which exhibited 100% mortality at the third passage[9]. The filterable etiologic agent was named the "Oakwood Agent"[9,12].

The clinical signs of SMS include: hypoglycemia, enteritis, tumors, neurologic deficits, weight depression (runting/stunting) and an increased incidence of rickets, airsacculitis and tenosynovitis. The findings of AVLPs

in feces and intestines of SMS birds by electron microscopy (EM) has led to investigation of tissues from affected birds using immunohistochemistry (IHC) methods such as those described for other arenaviruses (Pichinde)[1]. These specific IHC findings in SMS birds are summarized as to the presence of arenaviral antigens in tissues of inoculated hypoglycemic chicks with an antibody to a New World arenavirus as occurring in the cells of the crypts of Lieberkuhn infiltrating macrophages and fibroblasts in intestinal villi. Purkinje cells of the cerebella, hepatocytes, pancreatic islet cells and in surrounding acinar cells[12,13]. The positive IHC staining reaction has also been shown to occur in hepatocytes of the liver of a Canadian field broiler with SMS[12].

Recent findings in field and experimental birds suggest that exposure to controlled amounts of light and darkness can ameliorate the hypoglycemia, mortality and weight depression seen with SMS in chicks[12,13]. The modified lighting program which prevented SMS in chicks under both experimental and field conditions was based on the age (in days) of the birds and amount of daily light provided (range 14-24 hours) at each age[12,13]. The success of this therapy in birds to prevent SMS is theorized to occur based on the deficits of melatonin (part of the cellular immune response) which is released in response to darkness. The shift from continuous lighting to controlled lighting will assist in providing adequate levels of melatonin: therefore, birds can respond successfully with an adequate immunologic response to infectious pathogens. Experiments to determine the effect of this controlled lighting program in SPF chicks challenged with other known pathogenic and vaccine viruses are underway.

The known arenaviruses can produce persistent infections[1]. Their mode of replication (arenaviruses contain an ambisense RNA) can often occur without production of overt lesions or in vivo or in vitro cytopathic effects of infected cells[1,14]. Arenavirus replication and the routes and processes of infection are more complicated than other RNA viruses[1]. In general, arenaviruses replicate without significantly disturbing the host-cell macromolecular synthesis[1]. The findings of AVLPs by negative staining EM in feces of SMS birds led to the investigation of lesions and changes known to be produced by arenaviruses (i.e., tremors, paresis, ataxia)[14] . To date, the only methods of diagnosing SMS in chicks is by clinical signs in birds, IHC and EM. We have yet been unable to locate by examination of a limited number of thin sections of tissues from SMS-affected birds, the presence of budding particles containing ribosomes that are typical of known arenaviruses. Also, immune electron microscopy (IEM) negative staining with antiserum produced in SPF chicks against AVLPs isolated from SMS broilers has caused aggregation of particles from SMS birds. Nonetheless, these aggregated particles lack the definition required to provide a morphologic classification of an arenavirus. Although certain particles bear similarity to Bunyaviruses (90-120 nm) and surface projections of 5-10 nm, the AVLPs have a particle size range between 50-300 nm and, oftentimes, visible projections 10-15 nm in length. The AVLPS have a pleomorphic morphology which is typical for known arenaviruses[1]. This encouraging finding by IEM has led to the inoculation of SPF chickens with AVLPs to obtain additional antiserum for IEM testing with various preparations containing AVLPs.

Since SMS or acute transmissible enteritis (ATE) - proposed by veterinarians at North Carolina State University - has been described in turkey poults, tissues of poults inoculated with AVLPs (Oakwood Agent) examined by IHC were positive in the cytoplasm of epithelial cells of the crypts and villi of the small intestine while tissues from uninfected controls were negative with the New World arenavirus antiserum. The significance of this finding is yet unknown and under investigation.

Finally, the SMS seen in broilers appears to be a multi-faceted disease entity wherein many variables require investigation. The consistent finding of AVLPs requires further investigation as to their role in SMS - do they precipitate the disease (etiologic agent) if the conditions of stress and lighting are present? Further, are the AVLPs true arenaviral particles or another new emerging viral entity? Why are certain hormonal levels decreased (IGF-1: glucagon) in such SMS chicks and why the neurologic deficits - are these permanent or transitory? These are but a few of the many questions requiring further investigation of SMS in chickens. A beginning positive direction has been achieved in these SMS studies which requires further vigorous pursuit by the poultry research community.

REFERENCES

1. Bishop, D.H.L. Arenaviridae and their replication, Chapter 43:1231-1243. In: Virology, 2nd ed. edited by B.N. Fields et al. Vol 1, Raven Press Ltd. New York, 1990.
2. Castro, A.E., J.F. Davis, J. de la Torre, W.L. Steffens, J.T. Doman, and E.C. Player. Morphologic characteristics of "Arenavirus-like" particles associated with enteritis and hypoglycemia in Georgia chickens: A potential etiology. In: Proceedings of the 66th NE Conf Avian Dis. p. 27. 1994.
3. Castro, A.E., J.F. Davis, J.T. Doman, J.C. de la Torre, and W.C. Stoffregen. Arenavirus-like agent

in broilers: An emerging viral disease? Proc. 44th West. Poult. Dis. Conf. pp. 63-65. 1995.
4. Connolly, B.M., A.B. Jensen, C.J. Peters, S.J. Geyer, J.F. Barth, and R.A. McPherson. Pathogenesis of Pichinde virus infection in Strain 13 guinea pigs: an immunocytochemical virologic and clinical chemistry study. Am. J. Trop Med Hyg. 49(1): 10-24, 1993.
5. Davis, J.F., M.A. Goodwin, E.C. Player, D. Fuchs, A.E. Castro, and J.T. Doman. Arenavirus-like particles associated with hypoglycaemia and enteritis in broiler chickens (letter). Vet Rec. 133:484. 1993.
6. Davis, J.F., A.E. Castro, J.C. de la Torre, M.A. Goodwin, E.C. Player, J.T. Doman, M.Teng, and D. Fuchs. Arenavirus-like particles associated with enteritis and "spiking mortality syndrome" in Georgia chickens. Proc. 43rd West. Poult. Dis. Conf. pp. 2-4. 1994.
7. Davis, J.F., A.E. Castro, J.T. Doman, R. Vasilatos-Younken, J.C. de la Torre, and M. Teng. Experimental reproduction of hypoglycaemia and spiking mortality syndrome in broiler breeder chicks (letter). Vet Rec. 136:107-108. 1995.
8. Davis, J.F., J.C. de la Torre, A.E. Castro, H.J. Barnes, J.T. Doman, R. Vasilatos-Younken, R.M. Shope, T.L. Noble, and M. Teng. Experimental studies with Arenavirus-like particles extracted from chicken intestines. Proc. 44th West. Poult. Dis. Conf. pp. 66-67. 1995.
9. Davis, J.F., J.C. de la Torre, M. Teng, A.E. Castro, J.T. Doman, T.L. Noble, and S. Yuen. Spiking mortality syndrome in chickens (letter). Vet Rec. 136:204. 1995.
10. Davis, J.F. and R. Vasilatos-Younken. Markedly Reduced Pancreatic Glucagon Levels in Broiler Chickens with Spiking Mortality Syndrome. Avian Dis. 39:417-419. 1995.
11. Davis, J.F., A.E. Castro, J.C. de la Torre, C.G. Scanes, S.V. Redecki. R. Vasillatos-Younken, J.T. Doman, and M. Teng. Hypoglycemia, Enteritis, and Spiking Mortality in Georgia Broiler Chickens: Experimental Reproduction in Broiler Breeder Chicks. Avian Dis. 39:162-174. 1995.
12. Davis, J.F. Remedy for Spiking Mortality Syndrome. Broiler Industry. Vol. 58, 9:32-40. 1995.
13. Davis, J.F., A.E. Castro, J.C. de la Torre, H.J. Barnes, J.T. Doman, M. Metz, H. Lu, S. Yuen, P.A. Dunn, and M.N. Teng. Experimental Reproduction of Severe Hypoglycemia and Spiking Mortality Syndrome Using Field and Embryo-Passaged Preparations. Avian Dis. Accepted for publication. 1996.
14. McCormick, J.B. Arenaviruses. Chapter 44:1245-1267. In: Virology, 2nd ed. edited by B.N. Fields et al Vol. 1, Raven Press, Ltd. New York, 1990.

CONFIRMATION OF LISTERIA MONOCYTOGENES 4B IN EXPERIMENTALLY INFECTED CHICKENS BY IMMUNOHISTOCHEMISTRY

CONFIRMACION MEDIANTE INMUNOHISTOQUIMICA DE *Lysteria monocytogenes* 4B EN POLLOS INFECTADOS EXPERIMENTALMENTE

Andre F. Ziegler[A], Daniel Weinstock[B], and Patricia S. Wakenell[C]

[A]University of Pennsylvania, New Bolton Center, Laboratory of Avian Medicine and Pathology
382 West Street Road, Kennett Square, PA 19348
[B]Animal Diagnostic Laboratory, Department of Veterinary Science,
Pennsylvania State University, University Park PA 16802
[C]University of California, Department of Population Health and Reproduction, Med Sci Building 1A, Davis, CA 95616

RESUMEN

En este estudio se intentó evaluar la sensibilidad y la especificidad de la inmunohistoquímica para el diagnóstico de la infección tisular con *Listeria monocytogenes* en grupos experimentales. Después de 2 experimentos réplica en los que se evaluó el efecto de múltiples vías de inoculación de un aislamiento de campo de *L. monocytogenes* serotipo 4B sobre la morbilidad, la mortalidad y la duración del aislamiento de la bacteria a

partir de órganos específicos de los pollos, se utilizó la inmunohistoquímica para confirmar los resultados del cultivo. Se utilizaron pollos libres de patógenos específicos que fueron distribuidos entre los siguientes grupos experimentales: uno no inoculado, otro inoculado intracerebralmente ya sea con un diluente o con el microorganismo, otro inoculado por la vía oral, otro subcutáneamente y el último por la ruta intratraqueal. Posteriormente se practicó la eutanasia de los pollos, se analizaron las lesiones macroscópicas y se cosecharon los tejidos para su examen microscópico y para cultivo a varios intervalos postinoculación.

Se observaron signos clínicos y lesiones microscópicas sólo en el grupo inoculado con el microorganismo por la vía intracerebral. Entre las lesiones histopatológicas se encontraron abscesos multifocales en el encéfalo, el corazón, el hígado y el bazo. Los aislamientos procedentes de las vísceras fueron más frecuentes en las muestras obtenidas durante los primeros días postinoculación y no se extendieron a todo lo largo del período de estudio. La inmunohistoquímica se efectuó utilizando cortes de tejidos fijados en formalina y embebidos en parafina, a partir de las diversas vísceras que habían resultado positivas o negativas al aislamiento de *Listeria monocytogenes* mediante aislamiento.

Se utilizó un estuche de tinción de estreptavidina-biotina inmunoperoxidasa y un antisuero policlónico de conejo contra *L. monocytogenes* como anticuerpo primario, disponibles ambos comercialmente. Los resultados positivos se caracterizaron por la presencia de focos puntiformes teñidos de color rojo obscuro. Los controles negativos no demostraron tinción.

La sensibilidad general de la técnica en todos los grupos de inoculación fue cercana al 88% y la especificidad fue del 96% aproximadamente. Se demostró también que la evaluación de la mucosa de la cloaca y de la tráquea es difícil y poco confiable debido a la rapidez relativa con que estos tejidos se deterioraron *post mortem*.

This study sought to evaluate immunohistochemistry sensitivity and specificity for diagnosis of tissue infection with *Listeria monocytogenes* in experimental groups. Following 2 replicate experiments evaluating the effect of multiple inoculation routes of a field isolate of *L. monocytogenes* serotype 4B on chick morbidity, mortality and length of organ-specific bacterial isolation, immunohistochemistry was utilized to confirm culture results. Specific pathogen free chicks were allocated into the following experimental groups: uninoculated, intracerebrally inoculated with either diluent or with the organism, orally inoculated, subcutaneously inoculated and intratracheally inoculated. Chicks were subsequently euthanized, examined for gross lesions and tissues were harvested for microscopic examination and culturing at various post-inoculation (PI) intervals.

Clinical signs and microscopic lesions were observed only in the group intracerebrally inoculated with the organism. Histopathological lesions included multifocal abscesses in the brain, heart, liver and spleen. Isolations from visceral organs were more frequent in early PI samples and did not extend throughout the study period. Immuno-histochemistry was performed on formalin fixed paraffin embedded tissue sections from visceral organs which were demonstrated to be either positive or negative for *Listeria monocytogenes* by bacterial isolation. A commercially available streptavidin-biotin immunoperoxidase staining kit (Biogenex; San Ramon, CA) using 3-amino-9-ethyl-carbazole as the chromogen was used with a commercially available rabbit polyclonal (Difco; Detroit, MI) antiserum against *L. monocytogenes* as the primary antibody. Positive results were characterized by deep red staining punctate foci. Negative controls showed no staining.

Overall sensitivity of the technique throughout the inoculation groups approached approximately 88%, specificity approximately 96%. Evaluation of cloacal and tracheal mucosa proved to be difficult and unreliable due to the relative rapidity with which these tissues deteriorated postmortem.

SEROLOGICAL SURVEILLANCE ON ORNITHOBACTERIUM RHINOTRACHAELE "ORT" IN POULTRY FLOCKS USING SELF-MADE ELISA

ENCUESTA SEROLOGICA DE *Ornithobacterium rhinotracheale* EN PARVADAS, MEDIANTE UNA PRUEBA DE ELISA NO COMERCIAL

H. M. Hafez and R. Sting

State Veterinary Laboratory Stuttgart
Azenbergstr. 16, 70174 Stuttgart, Germany

RESUMEN

La presente investigación describe un método de preparación de una prueba indirecta de ELISA para la detección de anticuerpos contra *Ornithobacterium rhinotrachaele* en parvadas comerciales, así como el resultado de una encuesta serológica realizada en reproductoras pesadas, pollos de engorda y pavos productores de carne. Los resultados obtenidos muestran que la preparación del antígeno de ELISA utilizando la extracción SDS dio los mejores resultados. La encuesta serológica indicó que se detectaron anticuerpos contra *O. rhinotrachaele* en el 79% de las parvadas de reproductoras pesadas, en el 26% de las parvadas de pollos de asar y en el 55% de las parvadas de pavos productores de carne.

Respiratory disease conditions are continuing to cause heavy economic losses in the poultry industry. Since 1991 *Ornithobacterium rhinotrachaele* (ORT) has been isolated from poultry suffering from respiratory diseases in different countries[1,2,3,4,5,6].

The present investigation describes a method of preparation of an indirect ELISA for detection of antibodies against ORT in poultry flocks. Preliminary investigation was carried out using the following methods for the extraction of the ELISA-antigen:

1. Heat extraction at 1000C/1 hr
2. Extraction with 2% sodium deoxycholate
3. Extraction using 2% sodium dodecyl sulfate (SDS)
4. Extraction using 2% Triton X 100

The results obtained showed that method no. 3, **SDS-extraction,** gave the most suitable results. Concerning the specificity of our ELISA, testing of antisera against different avian pathogens revealed clear negative results. A cross reaction with different ORT-serotypes (A, B and C) could be detected using this method. For that reason we carried out serological surveillance using this SDS-antigen extraction with the Stuttgart turkey ORT-isolate (GGD 1260/91)[4,8]. According to Van Empel[7] this strain belongs to the serotype B.

A total of 3153 serum samples from 27 broiler, 24 broiler breeder flocks and 143 turkey meat flocks reared in Germany were examined for the presence of antibodies to ORT using indirect self-made ELISA test. Most of the flocks showed and/or had recovered from outbreaks of respiratory diseases. Tests were conducted between December 1994 and December 1995.

The results of the serological survey showed that antibodies to ORT were detected in 79% of broiler breeder, in 26% of broiler and in 55% of meat turkey flocks. The role of this bacterium in respiratory disease complexes in poultry as well as its interaction with other micro-organisms are discussed.

REFERENCES

1. Charlton, B.R., S.E. Channing-Santiago, A.A. Bickford, C.J. Cardona, R.P. Chin, G.L. Cooper, R. Droual, J.S. Jeffrey, C. U. Meteyer, H.L. Shivaprasad, and R.L. Walker. Preliminary characterization of a pleomorphic gram-negative rod associated with avian respiratory disease. J. Vet. Diagn. Invest. 5:47-51. 1993.
2. DuPreez, J.H. Personal communication. 1992.
3. Hafez, H.M. Respiratory disease condition in meat turkey caused by Ornithobacterium rhinotracheale: Clinical signs, diagnostic and therapy. Proc. 43rd West. Poult. Dis. Conf. p. 113-114. 1994.
4. Hafez, H.M., W. Kruse, J. Emele, and R. Sting. Eine Atemwegsinfektion bei Mastputen durch Pasteurella-ähnliche Erreger: Klinik, Diagnostik und Therapie. Proc. International Conf. Poult. Dis. Potsdam, Germany. p. 105-112. 1993.
5. Hafez, H.M., Current status on the role of Ornithobacterium rhinotracheale (ORT) in

respiratory disease complexes in poultry. Arch. Geflk. in press. 1996.
6. Van Empel, P. Ornithobacterium rhinotracheale: Isolation, identification and experimental infection results. Paper given at Poultry Veterinarian study group of the EU held in Amsterdam 11th November. 1994.
7. Van Empel, P. Personal communication. 1995.
8. Vandamme, P., P. Segers, M. Vancanneyt, K. Van Hover, R. Mutters, J. Hommez, F. Dewhirst, B. Paster, K. Kersters, E. Falsen, L. Devrieze, M. Bisgarrd, K. H. Hinz, and W. Mannhein. Description of Ornithobacterium rhinotracheale gen. nov., sp. nov. isolated from the avian respiratory tract. International Journal of Systematic Bacteriology. 44:24-37. 1994.

USO DE UNA VACUNA COMERCIAL EN EL CONTROL DE HEPATITIS CON CUERPOS DE INCLUSION EN REPRODUCTORAS Y SU PROGENIE

THE USE OF A COMMERCIAL VACCINE FOR THE CONTROL OF INCLUSION BODY HEPATITIS IN BROILER BREEDERS AND THEIR PROGENY

Borrego E, J.L.[1], Soto, P.E.[1], Gay, G.M.[2], Vazquez A,D[2] y ME Aranda[2].

1) LABORATORIO AVIMEX, S.A. DE C.V., México.
2) DIAGNOSTICOS CLINICOS VETERINARIOS, S.A. DE C.V., México.

ABSTRACT

Two vaccination programs were evaluated in broiler breeders using one killed inclusion body hepatitis/hydropericardium syndrome (IBH/HS) commercial vaccine. A higher immune response (100 vs. 75%) was obtained with two vaccine applications: at 18 and 23 weeks of age. Progeny from vaccinated breeders had maternal antibody levels as determined by the agar gel immunodiffusion test (AGID) up to day 14 of age, and 100% protection against challenge. Maternal immunity did not affect the serological response of broilers that received the killed IBH/HS oil emulsion commercial vaccine at 8 days of age. One hundred percent protection against challenge was observed during the experimental period. Dual vaccination programs for breeders and their offspring can contribute to better control IBH/HS in regions where the disease is endemic.

INTRODUCCION

La Hepatitis con Cuerpos de Inclusión (HCI) fué descrita por primera vez por Hemboldt y Frazier en 1963 en USA y ha sido reportada en otros paises como Canadá, Reino Unido, Italia, Japón, Australia, Nueva Zelanda, Pakistán, Chile, Perú y México. Se ha reportado a partir de los años 80's mortalidad hasta de 70% en brotes de campo, denominandosele también sindrome del hidropericardio (SHP).

En México la HCI fué descrita por Antillón y Lucio en 1974, a partir de 1989 se observó mayor severidad y frecuencia en los brotes en varios estados de la república mexicana. En 1995 Gay y col. presentan hallazgos en los cuales se determinó la existencia de un adenovirus grupo 1 capaz de reproducir el cuadro de HCI/SHP, además informó de técnicas diagnósticas complementarias y de el desarrollo de una vacuna inactivada para la prevención de este padecimiento. Esta vacuna actualmente se comercializa en México, donde se han ganado nutritivas experiencias en el campo, por lo que es nuestro deseo documentar algunas de ellas.

OBJETIVO

Los objetivos planteados para este trabajo de campo y laboratorio fueron los siguientes:

1. Evaluar serologicamente dos programas de vacunación de reproductoras pesadas y su progenie, utilizando una vacuna comercial contra la HCI/SHP (Prueba 1).
2. Evaluar la duración de la protección que la inmunidad materna confiere a la progenie de reproductoras vacunadas con una vacuna comercial contra la HCI/SHP (Prueba 2).
3. Evaluar la respuesta serológica y la protección de pollo de engorda vacunado con una vacuna comercial contra la HCI/SHP en aves con anticuerpos maternos (Prueba 3).

MATERIAL Y METODOS

Prueba 1.

Dos lotes de reproductoras pesadas comerciales de 18 semanas de edad serologicamente negativas a adenovirus grupo 1, medido a través de la prueba de inmunodifusión en gel de agar (IDA), fueron vacunados por vía subcutánea en la región media y posterior del cuello con 1.0 ml de una vacuna inactivada emulsionada comercial contra la HCI/SHP.

A uno de los lotes identificado como grupo A se le administró una sola dosis de vacuna a las 18 semanas de vida, mientras que al grupo B se le administró una segunda dosis a las 23 semanas, es decir, 5 semanas después de la primera vacunación.

A las 25, 30 y 35 semanas de edad se sangraron 100 aves por grupo, utilizando como grupo control a los machos no vacunados para practicar la prueba de IDA-Adenovirus 1.

A la progenie de estas aves, utilizando 100 sueros por muestreo, se les practicó también la prueba de IDA-Adenovirus 1 al 1, 7, 14, 21, 28, 35, 42 y 49 días de edad.

Prueba 2.

Se realizaron desafíos de la progenie proveniente del lote de reproductoras vacunadas del grupo A de 35 semanas de edad, con una cepa altamente virulenta de HCI/SHP a los 1, 7, 14, 21, 28, 35, 42 y 49 días con la finalidad de conocer la duración de la protección conferida por la inmunidad materna.

Prueba 3.

Al grupo de pollos procedente de las reproductoras del grupo A se les administró en granja a los 8 días de edad una dosis de 0.5 ml por vía subcutánea de la vacuna de HCI/SHP, practicando desafíos en grupos de 25 aves contra la cepa altamente virulenta de HCI/SHP a las 21, 31 y 47 días de edad, realizando pruebas de IDA-Adenovirus 1 a los 1, 7, 14, 21, 28, 35, 42 y 49 días para conocer su respuesta serológica.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Prueba 1

En el cuadro 1 se observa que el grupo A de reproductoras vacunado exclusivamente a las 18 semanas mostró un porcentaje de positividad en la prueba de IDA de 85%, reduciendose hasta el 75% a las 35 semanas, mientras que el grupo B vacunado a las 18 y 23 semanas de edad muestra 100% de positividad desde las 25 hasta las 35 semanas. Lo anterior sugiere que la revacunación refuerza la respuesta serológica de las aves.

En el cuadro 2 se aprecia la respuesta serológica (anticuerpos maternos) de la progenie provenientes de las reproductoras sometidas a ambos calendarios de vacunación notando que las aves del grupo B, con dos aplicaciones de vacuna, mostraron una respuesta serológica superior hasta el día 14 de edad, detectando niveles muy bajos de positividad en ambos grupos a partir del día 21. Lo anterior indica que la revacunación de las reproductoras induce mejores niveles de anticuerpos maternos en la progenie, aunque esta no es detectada por medio de la prueba IDA mas allá del día 14 de edad independientemente del calendario utilizado.

Prueba 2

En el cuadro 3 se muestra que la progenie del grupo A presentó 100% de protección al desafío hasta el día 14 de edad, mientras que los grupos control presentaron 0% de protección como era esperado. Esto nos indica que a pesar de que la seropositividad medida por la prueba de IDA fué relativamente baja a esa edad (32%), los niveles de anticuerpos maternos fueron suficientes para proteger a las aves.

CUADRO No. 1

DA) resultante de la vacunación de reproductoras con una vacuna emulsionada contra la HCI/SHP* (1 ó 2 aplicaciones). Promedio de 100 sueros

Grupo	Edad de Vacunación en reproductoras	% de Seropositividad(IDA)		
		Semanas de Edad		
		25	30	35
A.	18 sem	85%	80%	75%
B.	18 sem + 23 sem	100%	100%	100%
C.	Centinelas (machos)	0%	0%	0%

* Vacuna comercial de Laboratorio Avi-mex, S.A. de C.V.

CUADRO No. 2

n progenie de reproductoras vacunadas con 1 ó 2 aplicaciones de vacuna emulsionada contra la HCI/SHP*. Promedio de 100 sueros

Grupo	Edad de Vac. en reproductoras	Días de edad progenie					
		1	7	14	21	28	> 35
A.	18 sem	75%	52%	32%	12%	1%	0%
B.	18 sem + 23 sem	95%	85%	54%	13%	1%	0%
C.	Control	0%	0%	0%	0%	0%	0%

* Vacuna comercial de Laboratorio Avi-Mex, S.A. de C.V.

Prueba 3

El cuadro 4 muestra que la progenie del grupo A vacunada con 0.5 ml al día 8 de edad presentó buena respuesta serológica a la vacunación, mostrando 77% de positividad hasta los 49 días de edad, 96% de protección al día 21 y 100% de protección a los 31 y 47 días como se muestra en el cuadro 5.

Lo anterior demuestra que la vacunación con 0.5 ml de la vacuna comercial contra la HCI/SHP en progenie con anticuerpos maternos induce una buena respuesta serológica y protección al desafío, cuando menos hasta la edad de mercado del pollo.

CUADRO No. 3

Desafío de la progenie con Ac. M. ante una cepa altamente virulenta deHCI/SHP		
Edad	% de Protección en 25 aves	
	con Ac. M.	Control
1	100%	0%
7	100%	0%
14	100%	0%

CONCLUSIONES

1. La vacuna inactivada emulsionada contra la HCI/SHP induce respuesta serológica en las reproductoras y en su progenie, detectada por medio de la prueba de IDA.
2. La revacunación de las reproductoras induce mayor respuesta serológica en estas, y un mejor nivel de anticuerpos maternos en la progenie que una sola aplicación.
3. La inmunidad materna confiere 100% de protección de la progenie cuando menos hasta el día 14 de edad.
4. La inmunidad materna contra HCI/SHP no interfiere con la respuesta serológica ni con la protección al desafío del pollo de engorda vacunado.

RECOMENDACION PRACTICA

-Se recomienda utilizar programas duales de vacunación en reproductoras y progenie para el control de la HCI/SHP en regiones enzooticas de esta enfermedad.

CUADRO No. 4

Seropositividad (IDA) inducida por una vacuna emulsionada contra la HCI/SHP* en pollitos con anticuerpos maternos (Ac.M.). Promedio de 100 sueros								
Prueba	1 día	7 días	14 días	21 días	28 días	35 días	42 días	49 días
IDA	75%	52%	75%	78%	78%	77%	77%	77%

* Vacuna comercial de Laboratorio Avi-Mex, S.A. de C.V.

BIBLIOGRAFIA RECOMENDADA

1. Borrego, E.J.L. y col: Reporte de campo de un brote de HCI en reproductoras pesadas a edad temprana. XX Conv. Aneca, México, pp 1-4, 1995.
2. Gay, G.M. y col: Valoración comparativa de una vacuna emulsionada experimental contra la HCI, XX Conv. Aneca, México, pp 118-124, 1995.
3. Gay, G.M. y col: Aislamiento e identificación de un adenovirus aviar del grupo 1 serotipo 8, y reproducción de la HCI de alta virulencia, 7° Curso Avimex, México, pp 30-33, 1995.
4. Gay, G.M. y col: Implementación de las pruebas de precipitación en Agar, inmunofluorescencia e inhibición de focos fluorescentes para el diagnóstico de la HCI. 7° Curso Avimex, México, pp 34-37, 1995.
5. Gay, G.M. y col: Desarrollo y valoración comparativa de una vacuna inactivada experimental contra la HCI/SHP. 7° Curso Avimex, México, pp 38-45, 1995.
6. Goodwin, M.A.: Virus causantes de Inmunosupresión en pollos. 6° Curso Avimex, México, pp 15-38, 1994.
7. Shane, M.S.: Situación actual del SHP y hepatitis en el mundo. 7° Curso Avimex, México, pp 7-17, 1995.
8. Soto, P.E. y col: Prevención y control de la HCI/SHP en México. 7° Curso Avimex, México, pp 47-59, 1995.

CUADRO No. 5

Protección de la progenie con Ac. M. vacunada a los 8 días de edad con una vacuna emulsionada* ante el desafío con una cepa altamente virulenta de HCI/SHP		
Edad	% de Protección en 25 aves	
	Vacunadas	Control
21	96%	8%
31	100%	12%
47	100%	16%

* Vacuna comercial de Laboratorio Avi-Mex, S.A. de C.V.

PROTECCION CONFERIDA POR UNA VACUNA COMERCIAL DE HCI EN POLLOS DESAFIADOS CON DIFERENTES ADENOVIRUS DEL GRUPO 1

PROTECTION CONFERRED BY AN INCLUSION BODY HEPATITIS COMMERCIAL VACCINE IN BIRDS CHALLENGED WITH SEVERAL GROUP 1 ADENOVIRUSES

Gay G.M.* Soto P.E.** Suarez M.A.** Aranda M.M.E.* y Vazquez A.D.*

* Diagnosticos Clinicos Veterinarios S.A. De C.V. México.
** Laboratorio Avi-Mex S.A. De C.V. México.

ABSTRACT

The efficacy of a killed, oil emulsion vaccine commercially used in Mexico was evaluated for the prevention and control of inclusion body hepatitis/hydropericardium syndrome (IBH/HS). Ten-day-old, group-1-adenovirus-antibody-free broiler groups were vaccinated. At 21 days post-vaccination, vaccinated and control groups were challenged with 8 different group 1 adenoviruses. The adenoviruses had been isolated in specific pathogen free (SPF) chicken embryos, from the livers of broilers submitted from different states of the Mexican Republic. Immune sera were produced in 4-week-old SPF chickens with each isolate to prove the purity of inocula. Results after challenge indicated that in all cases the vaccine protected 100% of the birds, as evaluated by the mortality produced by the different type 1 adenoviruses in non-vaccinated control groups (range 5 - 95%). The vaccine used in this study conferred 100% protection against 8 group 1 adenovirus isolates, regardless of their virulence degrees.

INTRODUCCION

La forma clásica de la hepatitis con cuerpos de inclusión (HCI), fué descrita por primera vez en México en 1974 (3). La HCI/SHP cobra gran importancia en nuestro país a partir de 1990, debido al incremento en su frecuencia, difusión y severidad que ha llegado a producir hasta el 60% de mortalidad en múltiples brotes (2,14,17). Y, no es sino hasta 1994 que la enfermedad es reconocida como existente en el territorio Nacional por las autoridades de la SARH (Diario Oficial de la Federación, 21 de Septiembre de 1994).

En general es aceptado a nivel mundial que los adenovirus del grupo 1 se asocian con la presentación de HCI/SHP y que dentro de este grupo existen 12 serotipos designados FAV1 al 12 y que los aislamientos pueden variar en cuanto a virulencia y antigenicidad, características no consideradas como específicas de serotipo (1,4,5,18).

En México los estudios de serotipificación han sido muy limitados, en 1992 se reportan los serotipos 1 y 4 involucrados en brotes severos de HCI/SHP (13).

En 1994, laboratorio AVI-MEX S.A. de C.V., logra la elaboración de una vacuna inactivada y emulsionada contra la HCI/SHP, con capacidad de producir protecciones iguales o mayores al 90% en pollos SPF y pollos de engorda desafiados con una cepa de adenovirus del grupo 1 que produce mortalidades iguales o mayores al 80% (8). Asimismo, realiza estudios en diversas granjas de pollo de engorda en la República Mexicana que reportan la eficacia de la vacuna en el control y prevención de la HCI/SHP (20).

Para la prevención de la HCI/SHP, se han empleado en México autovacunas elaboradas con hígados de pollos afectados, así como diversos productos biológicos que reflejan gran variabilidad de resultados tanto serológicos como de protección (6,10,11,12,14). En un estudio realizado con diversas autovacunas y productos biológicos de este tipo se demostró que estos producen protecciones nulas o mínimas al desafío que fueron desde el 0% hasta el 45% como máximo (9).

De acuerdo a los resultados reportados en los diversos estudios experimentales y de campo, en relación a la eficacia de dicha vacuna emulsionada comercial en la prevención de la HCI/SHP, el objetivo de esta investigación, fué valorar la efectividad de la vacuna en condiciones controladas de laboratorio, en pruebas de potencia frente a diversos aislamientos de adenovirus del grupo 1, aislados de pollos en diferentes estados de la República.

MATERIAL Y METODOS

1) Aislamientos virales e identificación

Se obtuvieron muestras de hígados de pollo de engorda procedentes de diferentes granjas en la República

Mexicana (Nuevo León, Edo de México, Jalisco, Guanajuato, Aguascalientes) que presentaron brotes de HCI/SHP. Como control positivo, se utilizó la cepa DCV94-HCI de adenovirus del grupo 1 productora de mortalidades en pollos de engorda iguales o superiores al 80% (8).

Para la preparación de inóculos se utilizaron exclusivamente hígados que resultaron positivos en pruebas de inmunofluorescencia frente a un conjugado específico a adenovirus del grupo 1 (7).

Con los hígados seleccionados de cada caso se prepararon macerados en proporción 1:10 en PBS pH 7.2 adicionado con 1000 UI/ml de penicilina g sódica y 200 microgramos /ml de sulfato de estreptomicina. Finalmente los sobrenadantes clarificados por centrifugación de cada uno de los casos se pasaron a través de una membrana Millipore 0.22 micrómetros, se fraccionaron y congelaron a -70°C hasta su uso.

Para el aislamiento viral de cada inóculo se emplearon embriones de pollo SPF de 7 días de edad. La dosis aplicada por embrión fué de 0.2 ml y la vía de inoculación fué en saco vitelino.

A las 72 hrs postinoculación se refrigeraron los embriones y se colectaron los hígados para estudios de inmunofluorescencia directa frente a un conjugado específico a adenovirus del grupo 1 (7) y para la preparación de inóculos que se emplearon para las pruebas de potencia. Su elaboración se hizo en la misma forma descrita para los inóculos originales.

2) Pureza de inóculos

Parte de cada uno de los inóculos originales y de los utilizados para la prueba de potencia, se sembraron en medios bacteriológicos (TSA, ICC, GS, CN, MSA y McConkey) que se incubaron a 37°C durante 8 días. También se sembraron por duplicado en un medio micológico (Saboreaud) para su incubación a 37°C y a temperatura ambiente durante 8 días.

Con los mismos inóculos, previamente neutralizados con un antisuero específico a adenovirus del grupo 1 (7), se infectaron además embriones de pollo SPF por vía cavidad alantoidea y membrana corioalantoidea para determinar la posible presencia de otros virus patógenos para las aves comunes en nuestro país, como el de la enfermedad de Newcastle (ENC), bronquitis infecciosa (BI), infección de la bolsa de Fabricio (IBF), influenza aviar (IA), laringotraqueítis aviar (LT) y viruela aviar (VA).

Finalmente con parte de los inóculos elaborados con los embriones de pollo, inactivados y emulsionados con aceites minerales, se inmunizaron pollos SPF de 4 semanas de edad, cada pollo recibió 2 aplicaciones de 0.5 ml por vía intramuscular en la pechuga, con un intervalo entre aplicaciones de 7 días. A los 21 días después de la segunda aplicación se sangraron los pollos y el suero se clarificó por centrifugación a 5000 RPM durante 20 minutos, se fraccionó en frascos con 3 ml cada uno y se conservó hasta su uso a -20° C. Los sueros de estas aves se trabajaron por diversas técnicas serológicas para determinar la posible presencia de anticuerpos contra agentes etiológicos como ENC, BI, IA y para 2 de los virus que más se relacionan con presentaciones severas de HCI/SHP, IBF y anemia infecciosa (AI).

3) Pruebas de potencia

Para la prueba de potencia se emplearon 20 pollitos de engorda de 10 días de edad por cada inóculo y 20 de la misma edad para los grupos controles no vacunados. Un grupo más con el mismo número de aves se empleó para su desafío con la cepa DCV-94-HCI (8). Se confirmó por pruebas de IDA e IFF que todos los pollitos empleados en la prueba de potencia eran serológicamente negativos a adenovirus del grupo 1 (7).

La dosis de vacuna para cada pollito de los grupos vacunados fué de 0.5 ml y la vía de aplicación fué subcutánea en la porción media y posterior del cuello.

A los 21 días postvacunación cada grupo se desafió con 0.2 ml del inóculo correspondiente. La vía de aplicación fué intramuscular en la pechuga.

Todos los pollos inoculados y controles se mantuvieron en observación durante 10 días. Con la mortalidad que se presentó en cada grupo control se realizaron necropsias y se colectaron los hígados para pruebas de IDA e IF para la detección de Antígenos específicos a adenovirus del grupo 1 (7).

RESULTADOS

1) Aislamientos virales e identificación

Los hígados de los embriones de pollo inoculados resultaron positivos en la prueba de IF frente al conjudado específico a adenovirus del grupo 1.

2) Pureza de los inóculos

Las pruebas bacteriológicas y micológicas de los inóculos originales y de los empleados en las pruebas de potencia se consideraron satisfactorios. ya que no se determinó la presencia de bacterias, hongos y levaduras.

Asimismo, en ninguno de los inóculos empleados en este estudio se demostró la presencia de virus de ENC, BI, IBF, IA, LT y VA. Las pruebas serológicas realizadas con los antisueros de las aves SPF inmunizadas con cada uno de los inóculos no revelaron la presencia de anticuerpos de ENC, BI, IBF, IA ni de la AI.

3) Prueba de potencia

Los resultados de las prueba de potencia y de patología e inmudiagnóstico complementarias se resumen en los cuadro 1.

DISCUSION

Los resultados obtenidos en las pruebas IF e IDA confirman que en todos los aislamientos realizados se logró determinar la presencia de adenovirus del grupo 1. Las pruebas de pureza de los inóculos sugieren que no existen

al menos otros agentes bacterianos, micoticos ni virales patógenos comunes para las aves en nuestro país. Estos hallazgos sugieren como en el caso de otros países - Nueva Zelanda y Australia - (5) que la causa primaria de la HCI/SHP en México pueden ser principalmente los adenovirus del grupo 1 detectados.

En el caso de los resultados patológicos y de mortalidad obtenidos en los grupos controles utilizados en las pruebas de potencia, indican que en México existen cepas de adenovirus del grupo 1, que pueden clasificarse como de baja, mediana y alta virulencia, lo que también es en general aceptado mundialmente (4,5,18).

Los resultados en las pruebas de potencia indican que la vacuna comercial probada confiere 100% de protección contra las 8 diferentes cepas de adenovirus del grupo 1 aisladas de diferentes granjas que sufrieron brotes de HCI/SHP en diferentes regiones del país.

CONCLUSION ES

1)Los 8 adenovirus del grupo 1, aislados de pollos en diferentes estados de la República Méxicana mostraron diferentes grados de virulencia.

2)Se comprobó la eficacia de la vacuna comercial contra la HCI/SHP que fué capaz de conferir 100% de protección frente a los 8 adenovirus del grupo 1 aislados, independientemente del grado de virulencia de cada uno de estos adenovirus.

3)Realizaremos estudios de serotipificación que confirmen si esta vacuna es capaz de conferir protección cruzada contra diversos serotipos de adenovirus del grupo 1.

LITERATURA CITADA

1. Adar B.M. McFerran J.B. and Calvert V.M.: Development of a microtitre fluorescent antibody test for serological detection of adenovirus infection in birds. Avian Pathol. 9: 291:300. (1993)
2. Altamirano L. y col. Hepatitis con cuerpos de inclusión y su relación con altas mortalidades en el pollo de engorda en México. Memorias de la XV Covención Aneca. (1990)
3. Antillón R.A. y Lucio M.B.: Inclusion Body Hepatitis in México. Avian Dis. 19: 195-197. (1975)
4. Calnek B.W. Barnes H.J. Beard C.W. Reid W.M. and Yoder H.W.: Diseases of Poultry. Ninth Edition. Iowa State University Press, Ames, Iowa, U.S.A. (1991).
5. Christensen M.H. and Saifuddin.: A primary epidemic of inclusion body hepatitis in broilers. Avian Disease. (1989).
6. Fernández D.M.: Hepatitis con cuerpos de inclusión en el Perú. Trabajo indedito. Perú. (1989).
7. Gay G.M. Aranda M.M.E. y Vázquez A.D.: Implementación de las pruebas de precipitación en agar, inmunofluorescencia e inhibición de focos fluorescentes para el diagnóstico de la hepatitis con cuerpos de inclusión. Memorias del Septimo Curso de Actualización AVI-MEX. (1995).
8. Gay G.M. Soto P.E. y Vazquez A.D.: Aislamiento, identificación de adenovirus aviar del grupo 1 serotipo 8 y reproducción de la hepatitis con cuerpos de inclusión de alta virulencia. Memorias del Septimo Curso de Actualización AVI-MEX. (1995)
9. Gay G.M. y Soto P.E.: Valoración comparativa de una vacuna emulsionada experimental contra la hepatitis con cuerpos de inclusión. Memorias de la XX Convención Nacional Aneca. (1995)
10. Hidalgo H.: Hepatitis con cuerpos de inclusión. Una modalidad de control o prevensión. Trabajo inedito. Chile. (1990).
11. Jaffery M.S.: A. Treatise on Angra Disease. Pakistán Veterinary Medical Association. Pakistán. (1988).
12. Lucio D.E. y col.: Comparación de la respuesta serológica y protección al desafío entre autovacunas producidas con molienda de hígado y una vacuna elaborada en embrión de pollo SPF contra el síndrome del hidropericario. XIX Convención Anual ANECA. México. (1994).
13. Morales A. and Lucio E.: Algunas características de los agentes presentes en el síndrome de hidropericardio en México. Memorias de la XVII Convención Nacional ANECA, México. (1992
14. Ponce H.A., Gier R. y Lucio D.E.: Resultados de campo de una vacuna comercial de NC y HCl. Memorias de la XVIII Convención Nacional ANECA. (1993)
15. Retana R.A.: Generalidades del virus "Asociado" a Hepatitis con Cuerpos de Inclusión en las aves. Memorias, Seminario sobre Hepatitis con Cuerpos de Inclusión Fac. Med. Vet. Zoot. División de Estudio de Postgrado Coordinación de Educación Continua. UNAM. (1990).
16. Sarfati M.D. y col.: Encuesta epizootiológica sobre Hepatitis con Cuerpos de Inclusión en México. Memorias de la XVI Convención Anual ANECA. México (1991).
17. Señas C.R., Retana R.A. y Rosas G.: Evaluación del factor de transferencia en la inmunoprofilaxis contra el síndrome hepático e hidropericardio en pollo de engorda. Memeorias de la XVIII Convención Nacional ANECA. (1993).
18. Shene M.S.: Infecciones Adenoviricas importantes en pollos de engorda. Tercer Concurso de Actualización AVI-MEX. (1991).
19. Soto P.E. y col.: Reporte de la detección de pesticidas órganoclorados en materias primas y alimentos terminados de aves con problemas de muy alta mortalidad en la República Mexicana. Memorias de la XV Convención Anual ANECA. (1994).
20. Soto P.E. y col.: Prevención y control de la HCI/SHP

en México. Memorias del Septimo Curso de Actualización AVI-MEX. (1995).

CUADRO Nº1

RESULTADOS DE LA PRUEBA DE POTENCIA EN POLLOS DE ENGORDA DESAFIADOS CON DIFERENTES ADENOVIRUS DEL GRUPO 1, AISLADOS DE POLLOS EN DIFERENTES ESTADOS DE LA REPUBLICA MEXICANA

ESTADO	MORTALIDAD		PROTECCION	PATOLOGIA *		INMUNODIAGNOSTICO	
	GRUPO CONTROL	GRUPO VACUNADO		H.P.	CIIN	IF-A1	IDA-A1
NUEVO LEON	55%	0%	100%	+	+	+	+
EDO. DE MEXICO	20%	0%	100%	+	+	+	+
JALISCO	25%	0%	100%	+	+	+	+
GUANAJUATO	10%	0%	100%	-	-	+	-
EDO. DE MEXICO	05%	0%	100%	-	+	+	+
MICHOACAN	10%	0%	100%	+	-	+	-
JALISCO	15%	0%	100%	+	+	+	+
AGUASCALIENTES	40%	0%	100%	+	-	+	+
CEPA DCV94-HCI	95%	0%	100%	+	+	+	+

H.P. = PRESENCIA DE HIDROPERICARDIO.
CIIN. = DETECCION DE CUERPOS DE INCLUSION INTRANUCLEARES EN HIGADO.
IF-A1 = INMUNOFLUORESCENCIA ESPECIFICA A ADENOVIRUS DEL GRUPO 1.
IDA-A1 = INMUNODIFUSION EN AGAR ESPECIFICA A ADENOVIRUS DEL GRUPO 1.
*TODOS LOS POLLOS DE LOS GRUPOS VACUNADOS RESULTARON NEGATIVOS A LOS ESTUDIOS PATOLOGICOS Y DE INMUNODIAGNOSTICO.

NOTA.-LOS RESULTADOS PATOLOGICOS Y DE INMUNODIAGNOSTICO SE CONSIDERARON POSITIVOS CUANDO POR LO MENOS UN POLLO DEL GRUPO PRESENTO LESIONES O RESULTO POSITIVO A UNA DE LAS PRUEBAS INDICADAS.

USE OF A DNA PROBE TO DIAGNOSE ADENOVIRUS INCLUSION BODY HEPATITIS IN BROILER CHICKS

USO DE UNA SONDA DE ADN PARA DIAGNOSTICAR LA HEPATITIS CON CUERPOS DE INCLUSION EN POLLOS DE ENGORDA

Mark A. Goodwin[A,B], Kenneth S. Latimer[B], Reynaldo S. Resurreccion[A], Paul G. Miller[A], and Raymond P. Campagnoli[B]

[A]Georgia Poultry Laboratory, P.O. Box 20, Oakwood, Georgia 30566
[B]Department of Veterinary Pathology, College of Veterinary Medicine
The University of Georgia, Athens, Georgia 30602

RESUMEN

Utilizamos exitosamente a la hibridación *in situ* del ADN (DISH, por sus siglas en inglés) de adenovirus, en un intento de diagnosticar con rapidez a la hepatitis con cuerpos de inclusión en cortes y sus réplicas de hígados fijados en formalina y embebidos en parafina, procedentes de pollos de campo, así como para diagnosticar esta enfermedad en pollos infectados experimentalmente con un adenovirus aislado de hígados de pollo. Los hallazgos de nuestros

trabajos de hibridación *in situ* del ADN fueròn confirmados posteriormente mediante microscopía electrónica de transmisión y mediante el aislamiento del virus.

Although we can use the transmission electron microscope (TEM) and virus isolation (VI) to detect and identify adenovirus in avian specimens[1,2,3], TEM and VI are laborious, expensive, and time-consuming. A DNA *in situ* hybridization (DISH) test to locate adenovirus nucleic acid recently has been developed (K. S. Latimer *et al.*, observation not published) for experimental use.

We successfully used adenovirus DISH in a diagnostic setting to rapidly diagnose inclusion body hepatitis (IBH) in replicate sections of formalin-fixed paraffin-embedded livers from chicks in the field, and to diagnose IBH in chicks experimentally infected with adenovirus isolated from chick livers (Figure 1)[1]. Our DISH findings were later confirmed by TEM and VI. We encourage others to use DISH for the rapid diagnosis of adenovirus infections and IBH in chickens.

(A full-length manuscript has been submitted for review for publication in *Avian Diseases*.)

ACKNOWLEDGEMENTS

We thank Ms. Debrah W. Fuchs, Mr. E. C. Player, Ms. Glenda Stover, and Ms. Gwen Waters for their technical assistance.

REFERENCES

1. Doane, F. W., and N. Anderson. Electron microscopy in diagnostic virology- a practical guide and atlas. Cambridge University Press, Cambridge, Mass. pp. 69-74. 1987.
2. Goodwin, M. A., D. L. Hill, M. A. Dekich, and M. R. Putnam. Multisystemic adenovirus infection in broiler chicks with hypoglycemia and spiking mortality. Avian Dis. 37:625-627. 1993.
3. McFerran, J.B. Adenoviruses. In: A laboratory manual for the isolation and identification of avian pathogens. Kendall/Hunt, Dubuque, Iowa. pp. 77-81. 1989.

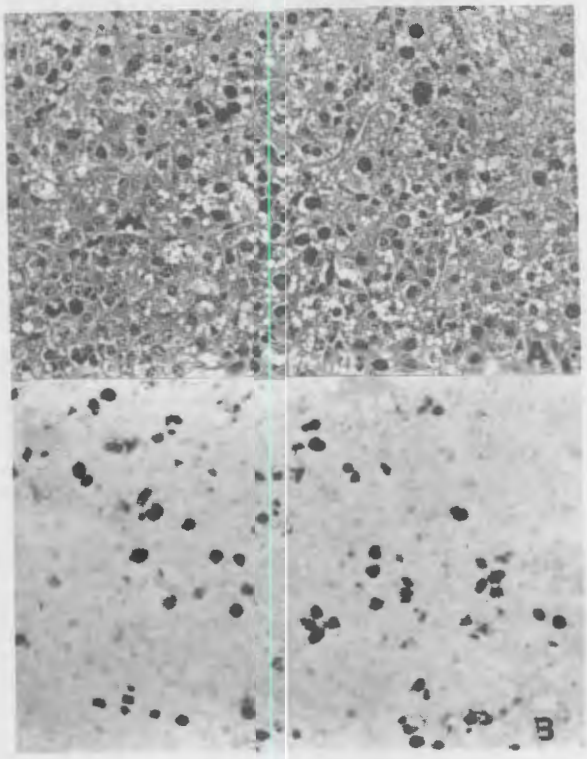


Figure 1. Numerous large basophilic (dark grey-black) intranuclear inclusions strongly suggestive of adenovirus were seen in sections of chick liver (A). Presence of adenovirus DNA was rapidly confirmed by DNA *in situ* hybridization. Adenovirus nucleic acid is located by blue-black (dark) deposits of dye (B). Hematoxylin and eosin (A), chromogen indicator (NBT) with fast green counterstain (B).

EVALUACION DE LA PROTECCION AL DESAFIO CONFERIDA POR INMUNOGLOBULINAS CONTRA EL SINDROME DEL HIDROPERICARDIO EN POLLO DE ENGORDA

PROTECTION AGAINST CHALLENGE CONFERRED BY HYDROPERICARDIUM SYNDROME IMMUNOGLOBULINS IN BROILERS

Morales, G.J.A., Valle, V.M.V. y Lucio, D.E.

Investigación Aplicada, S:A. de C.V.
7 Norte 416 Tehuacán, Pue. México, 75700

ABSTRACT

The efficacy of protection against challenge conferred by immunoglobulins (Ig's) from hyperimmunized birds with the agents causing hydropericardium syndrome (HPS) in broilers was evaluated. In the first of two experiments Ig's were given at two different dose levels 24 hours after challenge with the agents causing HPS. In experiment 2 Ig's were administered 24 hours before challenge to birds previously inoculated with a pathogenic infectious bursal disease virus (IBDV) strain. A comparison with an oil-emulsion HPS vaccine was also carried out under the same HPS/IBDV challenge conditions. Results of experiment 1 showed 40% and 80% decrease in mortality with 0.5 ml and 1.0 ml Ig's, respectively, as compared to the controls. On the other hand, experiment 2 showed 100% protection with Ig's, while vaccinates had 90% protection. It was concluded that Ig's can be used as an alternative in the prevention and control of HPS.

INTRODUCCION

Desde su aparición en México en 1990 (4), el SHP se ha intentado controlar con el uso de vacunas a partir de macerados de hígados y con vacunas elaboradas en embrión de pollo o en cultivos celulares pero las respuestas de protección no han mostrado resultados consistentes en campo al igual que en otros paises (2,5,9).

Por ello, es necesario evaluar otro tipo de alternativas, que ayuden a controlar de una manera más consistente el problema del SHP. Desde hace algunos años se ha estado investigando el empleo de inmunoglobulinas, (inmunidad pasiva) como terapia en algunas enfermedades como las ocasionadas por E.coli en aves y en pavos y cólera porcino en cerdos obteniendo buenos resultados. También existen reportes del empleo de inmunoglobulinas obtenidas a partir de yema de huevo como tratamiento en algunas enfermedades en niños, infecciones diarreicas en cerdos y en otras especies (8,10,11,19).

El objetivo del presente trabajo fué la evaluación de la eficacia de las inmunoglobulinas obtenidas a partir de aves hiperinmunizadas contra el SHP como preventivo y tratamiento de esta enfermedad, en aves sanas e inmunodeprimidas.

MATERIALES Y METODOS

Obtención de inmunoglobulinas. Se colocaron 10 pollos de engorda de 2 semanas de edad en una unidad de aislamiento tipo Horsfall-Bauer con aire fitrado a presión negativa. A cada pollo se le aplicó 0.5 ml. por vía I.M. de un inóculo que contenía los agentes causales del SHP el cual ya ha sido descrito (12,13). El título del virus fué de $10^{7.0}$ $DICT_{50}$/ml.

A las 6 semanas de edad los pollos recibieron una segunda aplicación con la misma dosis del inóculo. Dos semanas después se obtuvo el suero de las aves y se determinó el título mediante la prueba de micro neutralización ya descrita anteriormente (17). El título de IgG obtenido fué de 1:1280.

Experimento 1. Se utilizaron 30 pollos de engorda de 2 semanas de edad divididos en 3 grupos de 10 aves cada uno mantenidos en unidades tipo Horsfall-Bauer. Todos los animales fueron desafiados con 200,000 DICT por vía I.M. de un inóculo conteniendo los agentes causales del SHP denominada IAP-95. Después de 24 hrs. del desafío el grupo A recibió 0.5 ml. de Igs, y el grupo B recibió 1.0 ml. de Igs aplicados por vía I.M.

El grupo C no recibió tratamiento. Se registró la mortalidad durante 10 días después del desafío.

Experimento 2. Se emplearon 30 pollos de engorda de 3 semanas de edad divididos en 3 grupos de 10 aves mantenidos en unidades de aislamiento. Todos los animales fueron desafiados con 10,000 DIE vía oral

de la cepa 73688 de la infección de la bolsa de Fabricio. El grupo A recibió además una dosis de vacuna contra SHP (IASA) vía subcutánea. El grupo B, 13 días después del desafío de IBF, recibió 0.5 ml. de Igs por vía I.M.. El grupo C permaneció como control no tratado. A los 14 días posdesafío de IBF, todos los grupos fueron desafiados contra SHP de la misma manera que en el experimento 1.

RESULTADOS

EXPERIMENTO 1

Los resultados se muestran en la tabla 1. Se observó una disminución de la mortalidad del 40% cuando se aplicaron 0.5 ml. de Igs y del 60% cuando se aplicó 1.0 ml. comparado con los controles no tratados que mostraron un 80% de mortalidad durante todo el período de prueba. Las aves sobrevivientes no mostraron lesiones de hidropericardio a la necropsia.

TABLA 1. Porcentaje de mortalidad y protección con el empleo de inmunoglobulinas contra el SHP después de 10 días posdesafío con la cepa IAP-95.

GRUPO	IgG (ml)	MORTALIDAD (%)	PROTECCION (%)
A	0.5 *	40.0	60.0
B	1 0	20.0	80.0
C	-	80.0	-

* Aplicación de las Igs 24 hrs. después del desafío.

EXPERIMENTO 2

La tabla 2 muestra los resultados comparativos de mortalidad y protección entre el uso de una vacuna emulsionada y el empleo de las Igs. Como se puede apreciar se obtuvo un 100 % de protección al desafío contra el SHP en las aves que recibieron las Igs a una dosis de 0.5 ml. 24 hrs. antes de la inoculación del virus de desafío contra un 90% de protección otorgada por la vacuna emulsionada.

No se observaron lesiones del SHP en las aves sobrevivientes de los grupos A y B .

TABLA 2 Resultados comparativos de mortalidad, protección y serología entre aves vacunadas y aves tratadas con Igs vs SHP después del desafío con la cepa IAP-95.

GRUPO	MORTALIDAD (%)	PROTECCION (%)	TIT / MNT
A	10.0	90.0	844 *
B	0.0	100.0	0.0
C	80.0	-	< 20

* Media Geométrica, antes del desafío (25 pv)

DISCUSION

Los fracasos en la protección contra el SHP se pueden deber a diversas causas entre las que se pueden mencionar el o los agente(s) presentes en el SHP, el origen de la vacuna (macerados, embrión, etc), la cantidad de antígeno en las mismas, la inmunogenicidad de el o los antígenos empleados en las vacunas, la presencia de agentes inmunosupresores y la patogenicidad del virus de campo.

La hepatitis con cuerpos de inclusión ha sido descrita en la literatura como un problema secundario a la presentación de un problema de inmunodepresión (7). El síndrome del hidropericardio es causado por la presencia de adenovirus del grupo 1 quedando todavía por definirse si éstos actuán sólos o en combinación con otros virus (1,6,18). En los reportes iniciales de este problema en nuestro país generalmente ha existido alguna causa de inmunodepresión asociada a los brotes, ya sea de etiología viral o tóxica (4,15,16). Los resultados del presente trabajo mostraron una mejor protección empleando la alternativa de las IGS en aves inmunodeprimidas en comparación con la vacuna cuando estas fueron administradas antes del desafío.

Otra ventaja a considerarse para el empleo de las IGS es la posibilidad de emplearlas únicamente cuando se requieren y no tener un costo fijo de vacunación por la fracción del SHP con la vacuna. Los resultados del presente trabajo mostraron una excelente protección cuando las IGS fueron administradas antes del desafío. Sin embargo, fué necesario administrar dos veces la dosis (1 ml) en aves que ya estaban en período de incubación del SHP para alcanzar un 80% de protección.

Los reportes de campo reportados acerca de la difusión de la enfermedad muestran un inicio de mortalidad súbito en la caseta afectada con una duración media de 2.5 semanas de mortalidad y con un pico de mortalidad después de los 7 días de iniciado el brote (3,4). Por otra parte se reportó un tiempo de incubación de 9.5 a 14.5 días en un trabajo de difusión lateral en pollos criados bajo diferentes densidades de población (3). Finalmente, el tiempo de incubación observado a nivel de laboratorio es de 3-4 días (14). Si consideramos que en aves con 24 hrs. en período de incubación se llegó a obtener un 80% de protección y de acuerdo a el período de incubación a nivel de campo de 9.5 a 14.5 días, se tendría una expectativa de 8.5 a 13.5 días para evitar la mortalidad en dicha oarvada. Estas expectativas deberán evaluarse bajo condiciones de campo. También falta determinar el tiempo en que las IGS pueden proteger a las aves contra la mortalidad causada por el SHP.

BIBLIOGRAFIA

1. Afzal, M. Muneer, R., Stern, G. Studies on the aetiology of hydropericardium syndrome (Angara disease) in broilers. Vet. Rec. 128:591.1991.
2. Akhtar, S. y Azfal, M. Síndrome de hidropericardio en pollos de engorda en Pakistan: etiología, diagnostico y control. Memorias de la XX Convención Anual ANECA, Acapulco, Gro. pp 405.415.1995.
3. Akthar, S. Lateral spread of the aetiologic agent(s) of hydropericardium syndrome in broiler chickens. Vet-Rec. 136: 118-120.1995
4. Altamirano, R.R., Ramírez, H., Retana, A. y Zurita J. Hepatitis por cuerpos de inclusión y su relación con altas mortalidades en el pollo de engorda en México. Memorias XV convención Anual ANECA, Cancún, Q.R., México. pp 279-287.1990.
5. Chishti, M.A., Akzal, M. and Cheema, A.H. Preliminary studies on the development of vaccine against the hydropericardium syndrome of poultry. Rev. sci. tech off. int. epiz. 8(3): 797-801.1989.
6. Christensen, N.H., et. al A. primary epidemic of inclusion body hepatitis in broilers. Avian Dis 33: 622-630.1989.
7. Fadly, A.M., R.W. Winterfield, and H.J. Olander. Role of the bursa of Fabricius in the pathogenicity of Inclusión body Hepatitis and infectious bursal disease viruses. Avian Dis 20: 467-472.1976.
8. Farrelly, C.O., Branton, D. and C.A. Wanke. Oral ingestion of egg yolk immunoglobulin from hens immunized with an enterotoxigenic **Escherichia coli** strain prevents diarrhea in rabbits challenged with the same strain. Infect. Immun. 60: 2593-2597.1992.
9. Gay, G.M., Soto, P.E., Vázquez, A.D., Aranda M.E. Desarrollo y valoración comparativa de una vacuna inactivada contra la hepatitis con cuerpos de inclusión o Síndrome de hidropericardio (SHP). Tecnologia Avipecuaria año 8 Nº 96 Enero 1996. pp 29-30.
10. Heller, E.D., Leitner, G., Drabkin, N and Melamed. D. Passive immunization of chicks against **Escherichia coli.** Avian Path. 19: 345-354.1990.
11. Kuhlmann, R., Wiedermann, U., Schmidt., P.R.Wanke, Linckh, E., and Losch, U. Chicken antibodies for prophylaxis and therapy of infectious intestinal diseases. I. Immunization and antibody determination. J. vet. Med. B35:610-616.1988.
12. Morales, G.A., Lucio, D.E. Algunas características de los agentes presentes en el síndrome de hidropericardio en México. Memorias de la XVII Convención Anual ANECA. Puerto Vallarta, Jal. pp 198-201.1992.
13. Morales, G.A., Valle, V.V. y Lucio, D.E. Identificación de los agentes etiológicos del síndrome del hidropericardio. Memorias de la XX Convención Anual ANECA. Acapulco, Gro. pp 225-227.1995.
14. Morales, G.A., Datos no publicados.
15. Pozos, H.A., González, R.A., Lucio, D.E. Resultados de campo de la eficiencia de una vacuna divalente emulsionada en vehículo oleoso contra la enfermedad de Newcastle y el Síndrome del hidropericardio y otra monovalente en vehículo acuoso contra el Síndrome del hidropericardio elaborados en embrión de pollo. Memorias de la XVII Convención Anual ANECA Cancún, Q.R., México pp 212-220.1993.
16. Sarfati, D., Ramírez, E., Altamirano, R. Lucio, D.E. Encuesta epizootiológica sobre Hepatitis con corpúsculos de Inclusión en México. Memorias de la XVI Convención Anual ANECA, Acapulco, Gro., México pp 250-252.1991.
17. Valle, V M.V., Morales, G.A., Lucio D.E., y Chapa, B.J. Desarrollo de una prueba de microvirus sucro neutralización en hepatocitos de embrión de pollo para evaluar en las aves la respuesta serológica contra el Síndrome del Hidroper cardio. Memorias de la XIX Convención Anual ANECA. Puerto Vallarta, Jal. pp 359-362.1994
18. Valle, V., V., Morales, G. A. and Lucio, D.E. Inclusion Body Hepatitis outbreaks in Mexico with high mortality. Proc. 44th Western Poultry Disease Conference, Sacramento, Cal. USA. pp 7-8.1995.
19. Yokoyama, H., Peralta., Díaz, R., Sendo, S., Ikemori, Y., and Kodama, Y. Passive protective effect of chicken egg yolk Immunoglobulins against experimental enterotoxigenic **Escherichia coli** Infection in Neonatal Piglets. Inf. Immun. 60: 998-1007 1992.

REPORTE DE CASOS DE HEPATITIS CON CUERPOS DE INCLUSION EN AVES DE POSTURA COMERCIAL

INCLUSION BODY HEPATITIS IN COMMERCIAL LAYERS: CASE REPORTS

Aguirre, E.J., Santos, R.C., Enrigue, V.J., Simental, B.J.

Agropecuaria Sanfandila, S.A. de C.V.
Carret. Lagos-SLP km. 12.5, Ap. Postal 22, CP. 47400,
Lagos de Moreno, Jal., México

ABSTRACT

Clinical description and post-mortem and histopathological changes of several inclusion-body-hepatitis-(IBH)-associated conditions in commercial laying Dekalb hens at different ages, with varying mortality rates (0.433-8.179%), and with production levels (2.423-11.93%) under those of unaffected flocks are discussed. Circumstances and contemporary factors associated to these cases are presented, together with an analysis of the control measures implemented. Finally, an evaluation of the production and economic impact of these outbreaks is discussed.

INTRODUCCION

La Hepatitis con Cuerpos de Inclusión (HCI) ha sido considerada en nuestro pais como un problema importante en pollo de engorda a partir de los años de 1989. Sin embargo, no se cuenta con reportes documentados disponibles acerca de casos clínicos provocados por virus de HCI en estirpes ligeras. En este trabajo se informa de cinco brotes asociados con HCI ocurridos a partir de marzo a diciembre de 1995 en granjas de gallinas productoras de huevo para plato localizadas en los municipios de León, Gto., y Lagos de Moreno, Jal., en los que se tuvieron diferentes niveles de impacto en mortalidad y producción.

MATERIAL Y METODOS

Tres de los brotes asociados con HCI ocurrieron en aves de 2o ciclo seguidas del proceso de pelecha, mientras que los otros 2 se presentaron en aves de primer ciclo. En los 5 casos se colectaron muestras para realizar pruebas bacteriológicas, serológicas, histopatológicas y de aislamiento viral tendientes a identificar los agentes involucrados en dichos problemas. Para obtener un adecuado nivel de detalle se reunió información acerca de la proporción de aves que murieron con lesiones sugestivas de HCI, asi como de los antecedentes y la evolución productiva a nivel de caseta y granja de tales explotaciones. Dicha información fue comparada con la obtenida en granjas similares en con el fin de establecer los efectos productivos y económicos de dichos brotes.

RESULTADOS

Los brotes ocurrieron en los 5 casos al inicio del ciclo productivo, y tuvieron una duración de 2 a 3 semanas; Los signos clínicos observados se caracterizaron por la presentación de aves deprimidas, con anorexia marcada en la fase aguda del brote, plumas erizadas, palidéz de crestas y barbillas y muerte. Las principales lesiones encontradas al inicio de los brotes fueron hepatomegalia con cambio en la consistencia del órgano (friable); ruptura hepática con hemorragia interna severa; cierto nivel de nefrosis en el 30 %; y presentación de hidropericardio en el 40 % de las aves.

No se encontraron evidencias de edema pulmonar o hidrotorax en esta etapa. Tanto en aves de pelecha como las de 1er. ciclo, la mayoria de la mortalidad provenía de aves en buen estado de carnes. A partir de la 2a semana la mortalidad presentó mayor diversidad en las lesiones encontradas: se observaron aves con hepatomegalia marcada, asi como ascitis, presencia abundante de fibrina perihepatica e hidrotorax en algunas aves que al parecer lograron sobrevivir la fase aguda. En ellas también fue mas evidente aumento del volúmen en riñón. En otras aves se presentaron como lesiones asociadas esplegnomegalia de moderada a severa, enteritis catarral, hemorrágica o necrótica; y en ciertos casos peritonitis.

En las pruebas de Laboratorio se obtuvieron los resultados siguientes: Bacteriologia.- En el 45 % de las muestras colectadas en la fase aguda para aislamiento bacteriano no fue posible encontrar ningún gérmen asociado; en algunos casos se aisló E. coli, de hígado, vesícula biliar, peritoneo y médula osea, asi como de muestras de cuello y pechuga con evidencia de abseso y

granuloma, o de aves con peritonitis; también fue posible aislar Pasteurella haemolytica y Staph. aureus en senos nasales o *tráquea* del 15 % de las muestras. Histopatología.- En los cortes obtenidos de muestras de todas las granjas se encontraron diversos grados de lesión en hígado asi como variaciones relacionadas con la evolución del brote. En la fase temprana del brote se apreciaron cambios relacionados con un proceso agudo

CUADRO # 1. MORTALIDAD Y PARAMETROS PRODUCTIVOS EN GRANJAS DE POSTURA COMERCIAL AFECTADAS POR PROBLEMAS ASOCIADOS A HEPATITIS CON CUERPOS DE INCLUSION.

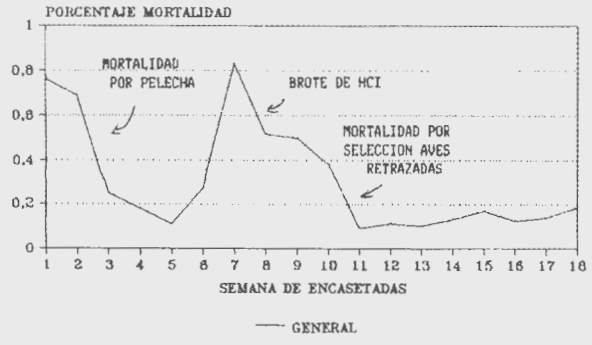
	GRANJAS DE 2o CICLO			GRANJAS 1er CICLO	
GRANJA	STA ANA	ERMITA	S PEDRO	18 MARZO	LA LUZ
EDAD	34/0	36/0	27/0	32/0	38/0
POBLACION	150,110	100.165	79,721	180,900	60,325
% MORT.	9.901	7.037	13.779	2.333	3.796
DIF/PTTO	4.301	3.637	8.179	0.433	1.196
KG. HUEVO X A.E.	7.659	8.660	5.522	3.021	5.355
DIF/PTTO	0.626	0.215	0.748	0.169	0.507
XCENTAJE	92.444	97.577	88.070	94.704	91.351
No. HVOS X A.E.	122.82	129.01	90.129	54.175	91.213
DIF/PTTO	15.30	13.56	20.191	8.321	14.227
	88.923	90.488	81.698	86.686	86.507
C. ALIM.	2.109	2.229	2.416	2.281	2.232
DIF/PTTO	0.089	0.158	0.334	0.201	0.265

DIF/PTTO = Muestra las diferencias encontradas en los distintos parámetros a comparar en cada una de las granjas con relación a otras sin problemas de HCI o a los presupuestos estimados para dichas operaciones.
XCENTAJE = Expresa la proporción porcentual alcanzada por las granjas problema a la edad de corte (enero '96) para la evaluación de impacto en mortalidad y parámetros productivos, con relación a otras granjas sin problemas de HCI o a los presupuestos estimados.

tales como: edema, hemorragias, degeneración turbia de hepatocitos, infiltración linfoide perivascular, necrosis multifocal perivascular y en parénquima, y una cantidad de entre leve a moderada multifocal de cuerpos de inclusión. A partir de la 2a semana de iniciado el brote se encontró con mayor frecuencia fibrosis de moderada a severa, degeneración grasa, infiltración linfoide y por heterófilos perivascular y en parénquima. Otros órganos como corazón mostraron edema, degeneración turbia y hemorragias multifocales. En riñón fue posible detectar cambios degenerativos en glomérulos y túbulos. Virologia.- En 2 de los casos enviados al Laboratorio del Dr. Pedro Villegas en Athens, GA, se logró el aislamiento viral y serotipificación primaria de las muestras obtenidas, las que correspondieron a un Adenovirus del grupo I serotipo 8.

FIGURA # 1

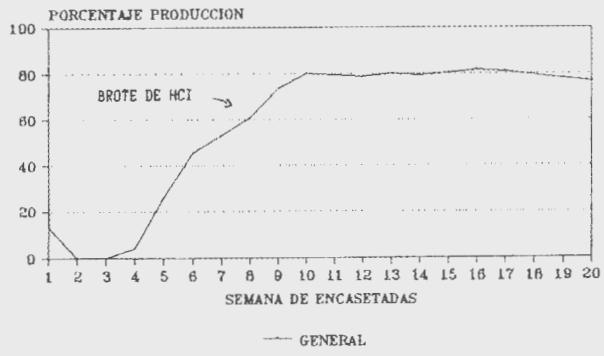
PORCENTAJE DE MORTALIDAD SEMANAL EN GRANJA LA ERMITA. POSTURA COMERCIAL LOTE DE 2o CICLO. DEKALB DELTA



ABRIL A AGOSTO DE 1995

FIGURA # 2

PORCENTAJE DE PRODUCCION SEMANAL EN GRANJA LA ERMITA. POSTURA COMERCIAL LOTE DE 2o CICLO. DEKALB DELTA



ABRIL A AGOSTO DE 1995

Con relación al impacto productivo de los brotes, en el cuadro # 1 se muestran los porcentajes de mortalidad y parámetros productivos que se presentaron en las 5 granjas afectadas, señalando las diferencias comparativas entre éstas y los presupuestos históricos y granjas sanas.

En términos generales, se señala que el mayor nivel de daño ocurrió en las granjas de 2o ciclo.

En la figura # 1 se muestra como ejemplo la curva de mortalidad en una de las granjas en las que se presentó el problema en una forma mas clara (Granja La Ermita).

En la figura # 2 se ilustra la curva del porcentaje de produccion en dicha granja, en la cual se aprecia el retraso en la producción a partir de la 6a semana y el bajo nivel obtenido en el pico.

DISCUSION Y CONCLUSIONES

Las evidencias clínicas, los análisis de información previa y los seguimientos productivos realizados en las granjas afectadas permitieron determinar que en todos los casos los brotes relacionados con HCI se presentaron factores estresantes de naturaleza infecciosa, de manejo o nutricional asociados.

Tal fue el caso en las 3 granjas de 2o ciclo, en las cuales se considera que la pelecha fue el principal agente de estres, mientras que en las de 1er. ciclo se encontraron asociados a los brotes problemas relacionados con la aplicación de productos emulsionados con cierto nivel de contaminación del equipo que derivó en abscesos, granulomas y problemas septicémicos, aunados al manejo propio del traslado de las aves a la granja de producción.

Se señala que además de lo referido en estos casos se realizaron colectas de muestras de hígados en la mortalidad de aves en crianza en varias edades, y en casi todas (incluyendo aves de 1 dia de edad) se encontraron evidencias de infección por adenovirus (cuerpos por inclusión). En estos casos no se intentó aislamiento viral por lo que se desconoce si eran o no serotipo 8.

En algunas de estas parvadas se presentaron brotes considerados como típicos con baja mortalidad, en los cuales se asociaron con problemas de inmunosupresión por Infeccion de la Bolsa de Fabricio, y como secuela de la vacunación contra Viruela en una parvada que había sido identificada como positiva a infección por Adenovirus se incrementaron los hallazgos de aves con HCI.

Se ha intentado controlar la difusión del problema con medidas de bioseguridad y se han utilizado autovacunas y vacuna comercial; se considera que los resultados sí han permitido reducir el impacto de estos problemas, pero se considera que su efectividad depende de la condición de salud e inmunológica previa de la parvada.

EVALUACION DE LA PROTECCION AL DESAFIO CONFERIDA POR INMUNOGLOBULINAS ESPECIFICAS CONTRA EL VIRUS DE LA INFECCION DE LA BOLSA DE FABRICIO (IBF)

CHALLENGE PROTECTION WITH SPECIFIC INFECTIOUS BURSAL DISEASE VIRUS STRANS

Lucio D. E., Morales G. A., Toscano C. A., Chapa B. J.

Investigación Aplicada, S.A. de C.V.
7 Norte No. 416 Tehuacán, Pue.

INTRODUCCION

La infección de la bolsa de Fabricio (IBF) es una enfermedad viral que causa inmunodepresión cuando infecta aves menores de 3 semanas de edad, aunque llega a causar secuelas de inmunosupresión cuando las aves se infectan hasta las 4 semanas de edad (2,3,6). La IBF fué inicialmente reportada en los Estados Unidos en los años sesentas (1). Desde su aparición se han realizado enormes esfuerzos para su control. Dentro de las primeras alternativas empleadas estuvieron cepas de virus vivo que después demostraron ser altamente patogénicas (5,6,7,10,15). De hecho la aparición de la IBF en México se piensa que pudo haberse facilitado mediante la introducción ilegal de estas cepas a nuestro país. Posteriormente se desarrollaron cepas denominadas "suaves" que causaban lesiones leves en la bolsa de Fabricio(BF) (5). El descubrimiento de que los anticuerpos específicos contra el virus de la IBF protegían a las aves de las lesiones en la BF e inmunodepresión revolucionó el concepto de la vacunación contra la enfermedad y rápidamente se extendió el empleo de vacunas a virus muerto emulsionadas en las madres para que éstas transmitieran altos niveles de anticuerpos a su progenie (6,11). Esta práctica tuvo como consecuencia el que los laboratorios productores de vacunas buscaran desarrollar cepas a virus vivo más agresivas para que tuvieran la capacidad de rebasar niveles más altos de anticuerpos maternos y así reforzar la protección inicial provista por los anticuerpos maternos (5,6,7). A estas cepas se les denominó como cepas "intermedias". Sin embargo estudios posteriores nuevamente mostraron que varias de estas cepas eran prácticamente idénticas a las cepas empleadas como cepas de desafío (8). Hoy en día se continúan los esfuerzos por desarrollar mejores alternativas lo que nos demuestra que la IBF es todavía un problema sin resolverse plenamente. A esto hay que añadir que las condiciones de explotación de pollo de engorda en nuestro país son muy diferentes a las que se emplean en otros países como en los Estados Unidos en donde se usan las llamadas "camas calientes" (se crían los pollos en la misma cama que la parvada anterior) con hasta varios años de antigüedad a diferencia de nuestro país en donde se lava y desinfecta entre cada parvada.

Dentro de la problemática que ha enfrentado el concepto de protección de las aves a través de la transferencia de anticuerpos maternos están entre otras el recibir pollito de reproductoras de diferentes edades y por ende con distintos niveles de anticuerpos, el contar con vacunas inactivadas con la cantidad y calidad de antígeno necesarios para generar protección en la progenie , el hecho de la variación observada en la capacidad para transmitir anticuerpos en la yema aún en la misma ave de una postura a otra, y todos los factores que inciden en impedir la absorción del saco vitelino apropiada como la infección del saco vitelino, la onfalitis y los problemas de temperatura y manejo asociados.

El presente trabajo tuvo como objetivo el evaluar la capacidad de la protección conferida por la aplicación parenteral de inmunoglobulinas específicas contra el serotipo I del virus de la IBF aplicadas al día de edad en aves libres de patógenos específicos (LPE).

MATERIAL Y MÉTODOS

Experimento 1.

Pollos.- Se emplearon 40 pollitos LPE (ALPES, Tehuacán, Pue.) de un día de edad. Los pollos provenían de parvadas libres de anticuerpos contra la IBF así como los demás antígenos virales y bacterianos especificados por ALPES.

Inmunoglobulinas.- Se emplearon inmunoglobulinas de pollo purificadas y específicas contra el serotipo 1 del virus de la IBF.

Alojamiento.- Los pollos se alojaron inmediatamente después de haber nacido en unidades

de aislamiento tipo Horsfall-Bauer con aire filtrado a presión negativa.

Incubación.- Se inocularon 30 pollitos con 0.5 ml de inmunoglobulinas por vía intramuscular a los 3 días de edad.

Desafío.- Se empleó la cepa 73688 como cepa de desafío. El desafío se efectuó empleando 10^4 DIFEPO/ 50% por vía oral.

Diseño experimental.- Se desafiaron 5 pollitos de 3 días no tratados con IGS. Posteriormente se desafiaron 5 pollitos tratados a las 72 horas postaplicación de las IGS y se continuaron los desafíos en grupos de 5 pollitos tratados cada 72 hrs. Otro grupo de 5 pollitos se sangró antes de la aplicación de las IGS y a las 72 horas postaplicación para verificar el nivel de anticuerpos con la prueba de microvirus suero neutralización según metodología descrita (6). Todas las aves fueron sacrificadas a los 24 días de edad para tomar muestras de BF para su evaluación histopatológica.

Experimento 2.

Pollo.- Se emplearon 24 pollitos LPE (ALPES, Tehuacán, Pue.) de 1 día de edad. Los pollos provenían de parvadas libres de anticuerpos contra la IBF así como los demás antígenos virales y bacterianos especificados por ALPES.

Inmunoglobulinas.- Se emplearon inmunoglobulinas de pollo purificadas, concentradas, liofilizadas y específicas contra el serotipo 1 del virus de la IBF.

Alojamiento.- Los pollos se alojaron inmediatamente después de haber nacido en unidades de aislamiento tipo Horfall-Bauer con aire filtrado a presión negativa.

Inoculación.- Se mezclaron 10 ml de IGS concentradas en un frasco de diluente de vacuna para la enfermedad de Marek de 200 ml. Posteriormente se aplicaron 0.2 ml. en un grupo de 12 pollitos LPE dejando 16 pollitos sin tratamiento.

Desafío.- Se empleo la cepa 73688 como cepa de desafío. El desafío se efectuó empleando 10^4 DIFEPO/50% por vía oral.

Diseño experimental.- Se desafiaron todas las aves a las 72 hrs postaplicación de las IGS. A los 6, 10, 13, 17, 20 y 25 días postaplicación de las IGS, se sacrificaron 2 aves tratadas y 2 controles no tratados para tomar muestras de BF para su evaluación histopatológica. También se tomaron muestras de sangre para medir los anticuerpos contra la IBF por medio de la prueba de microvirus suero neutralización.

Experimento 3.

Pollos.- Se emplearon 40 pollos LPE (ALPES, Tehuacán, Pue.) de 1 día de edad. Los pollos provenían de parvadas libres de anticuerpos contra la IBF así como los demás antígenos virales y bacterianos especificados por ALPES.

Inmunoglobulinas.- Se emplearon inmunoglobulinas de pollo purificadas, concentradas y liofilizadas específicas contra el serotipo 1 del virus de la IBF.

Alojamiento.- Los pollos se alojaron inmediatamente después de haber nacido en unidades de aislamiento tipo Horsfall-Bauer con aire filtrado a presión negativa.

Inoculación.- Se reconstituyó 1 frasco de IGS liofilizado en un frasco de diluente de vacuna para la enfermedad de Marek de 200 ml. Posteriormente se aplicaron 0.2 ml. en un grupo de 20 pollitos LPE dejando 20 pollitos sin tratamiento.

Desafío.- Se empleó la cepa 73688 como cepa de desafío. El desafío se efectuó empleando 10^4 DIFEPO/50% por vía oral.

Diseño experimental.- Se desafiaron todas las aves a las 72 hrs. postaplicación de las IGS. A los 6, 10, 13, 17, 20 y 25 días postaplicación de las IGS se sacrificaron 2 aves tratadas y 2 controles no tratados para tomar muestras de BF para calcular el índice bursal, para realizar la evaluación histopatológica. También se tomaron muestras de sangre para medir los anticuerpos contra la IBF por medio de la prueba de microvirus suero neutralización.

RESULTADOS

Experimento 1

Los resultados histopatológicos se muestran en el cuadro 1. Se obtuvo un 100% de protección a los 6 días postaplicación, un 80% a los 9 días y un 40% a los 12 días postaplicación de las IGS.

Cuadro 1.
Resultados histopatológicos y porcentajes de protección observados en aves LPE mediante la aplicación de IGS específicas contra la IBF al desafío.

Días postaplicación	Lesión observada	% de protección
3	Sin cambios	100
6	Sin cambios	100
9	Fase aguda 1/5	80
12	Fase aguda 1/5 Fase intemedia 2/5	40
Gpo control	Fase crónica 5/5	0

Los resultados serológicos indicaron una media geométrica de 970 en el sangrado a las 72 hrs. postaplicación de las IGS.

Experimento 2

Los resultados histopatológicos se muestran en el cuadro 2. Se obtuvo un 100% de protección a los 6 días postaplicación de las IGS, un 50% a los 10 y 13 días postaplicación y 0% de protección de los 17 días en adelante.

Los resultados serológicos (ver cuadro 2) indicaron la presencia de niveles de anticuerpos más altos a los 6 y 10 días postaplicación de las IGS que el grupo control no tratado, mientras que para los 13 días los títulos fueron iguales en ambos grupos. A los 17, 10 y 25 días postaplicación, los niveles de anticuerpos fueron iguales o más altos para el grupo control que para el grupo tratado.

Cuadro 2.

Resultados serológicos e histopatológicos y procentaje de protección observados en aves LPE mediante la aplicación de IGS específicas contra la IBF al desafío.

Días postaplicación	Lesiones observadas		% de protección		Media geométrica de los títulos con MNT-IBF	
	Tratado	Control	Tratado	Control	Tratado	Control
6	Sin cambios	Fase aguda 2/2	100	0	320	113
10	Fase aguda 1/2	Fase intermedia 2/2	50	0	1280	160
13	Fase aguda 1/2	Fase intermedia 2/2	50	0	160	160
17	Fase aguda 2/2	Fase crónica 2/2	0	0	905	3620
20	Fase aguda 1/2 Fase crónica 1/2	Fase crónica 2/2	0	0	2560	2560
25	Fase crónica 2/2	Fase crónica 6/6	0	0	6450	7240

Experimento 3.

Los resultados histopatológicos se muestran en el cuadro 3. Se obtuvo un 100% de protección a los 6 días postaplicación, un 50% a los 10 y 13 días postaplicación y un 0% de los 17 días en adelante. El promedio del índice bursal fué siempre más alto para las aves tratadas que para las aves control no tratadas.

Los resultados serológicos indicaron niveles de anticuerpos más altos para el grupo tratado hasta los 13 días postaplicación en comparación con el grupo control no tratado y niveles iguales o más altos a partir de los 17 días en adelante.

Cuadro 3.

Resultados serológicos, histopatológicos, índice bursal y porcentaje de protección observados en aves LPE mediante la aplicación de IGS específicas contra la IBF al desafío.

Días postaplicación	Lesiones observadas		% de protección		Indice Bursal		Media geométrica de los títulos con MNT-IBF	
	Tratado	Control	Tratado	Control	Tratado	Control	Tratado	Control
6	Sin cambios	Fase aguda 2/2	100	0	0.81	0.69	240	120
10	Fase aguda 1/2	Fase intermedia 2/2	50	0	0.24	0.28	1600	160
13	Fase aguda 1/2	Fase intermedia 2/2	50	0	0.35	0.15	360	160
17	Fase aguda 2/2	Fase crónica 2/2	0	0	0.35	0.18	960	3840
20	Fase aguda 1/2 Fase intermedia 1/2	Fase crónica 2/2	0	0	0.36	0.31	2880	2560
25	Fase crónica 2/2	Fase crónica 2/2	0	0	0.17	0.13	3413	3840

DISCUSIÓN

Los resultados obtenidos coinciden con lo encontrado por Lucio et al en la protección otorgada por la administración de inmunoglobulinas contra la presentación de lesiones en la BF que duró de 1 a 2 semanas (6). Es interesante hacer notar que en dicho trabajo a pesar de encontrar lesiones en la BF, dichas aves estuvieron protegidas contra la inmunodepresión aunque este efecto no fué medido en el presente trabajo.

Nuestros resultados coincidieron también con otros autores en que mientras existió protección en la BF por los niveles de anticuerpos, se impidió una respuesta activa desde el punto de vista serológico mientras que al momento que empezaron a presentarse lesiones, se mostró una seroconversión hacia la IBF (7,11).

Uno de los problemas encontrados con el empleo de las cepas vacunales intermedias contra la IBF en campo es la posibilidad de que éstas causen lesiones en la BF e inmunodepresión en aves suceptibles, tal como ha sido alertado por diversos autores (6,7,10,15).

Esta problemática puede ser causada por una diversidad de factores dentro de los cuales están el hecho de que normalmente se reciben pollitos de distintas procedencias con niveles de anticuerpos distintos en las granjas de pollo de engorda lo cual dificulta el establecimiento de un calendario de vacunación. Otra problemática es lograr la uniformidad, calidad y cantidad de anticuerpos necesarios para que al ser transferidos a la progenie éstos los protejan durante las primeras semanas de vida y finalmente están todos los factores que influyen en una adecuada absorción del saco vitelino que incluye factores infecciosos y de manejo. Una posible aplicación del empleo de IGS al día de edad es en la estandarización de un nivel mínimo de anticuerpos que proteja al 100% de las aves durante los primeros días contra una inmunodepresión causada ya sea por una cepa de campo o por una cepa vacunal intermedia. De hecho existe una alternativa que contempla el empleo de un complejo de virus e inmunoglobulinas para que el virus se libere aproximadamente al día 10 y evitar una infección temprana (14). Sin embargo, a esta edad las aves son suceptibles a la inmunodepresión por lo que lo ideal sería la multiplicación a una edad posterior.

Por último, el dotar de un colchón de anticuerpos al 100% de los pollitos permitiría hacer una mejor selección del tipo de cepas vacunales necesarias para cada situación particular dejando las cepas intermedias para casos donde se tengan desafíos fuertes como el caso de explotaciones en los Estados Unidos o en Europa con el surgimiento de cepas de alta patogenicidad (12,13) y empleando cepas menos agresivas para explotaciones como las de nuestro país en donde se limpia y desinfecta entre cada parvada.

CONCLUSIONES

1.- Se demostró la absorción de IGS administradas por vía parenteral en pollitos LPE de 1 día de edad.

2.- Se comprobó la capacidad protectiva del empleo de IGS específicas administradas por vía parenteral contra las lesiones en la BF hasta por un período de 6 días en aves LPE.

BIBLIOGRAFIA

1. Cosgrove, A.S., An apparently new disease of chickens avian nephrosis. Av. Dis. 6: 385-389. 1962.
2. Dohms, S.E., K.P. Lee, J.K. Rosenberger, A.L. Metz. Plasma cell quantitation in the gland of Harder during infectious bursal disease virus infection of 3 week old broiler chickens. Av. Dis. 32: 624-631. 1988.
3. Dohms, J.E., Jaeger, J. The effect of infectious bursal disease virus infection on local and systemic antibody responses following infection of 3-week-old broiler chickens. Av. Dis. 32: 632-640. 1988.
4. Hitcher, S.B. Persistence of perental infectious bursal disease antibody and its effect onf susceptibility of young chickens. Av. Dis. 15: 894-900. 1971.
5. Lasher, H.N., S.M. Shane. Infectious bursal disease. World´s Poult. Sci. Jour. 50: 1-34. 1994.
6. Lucio, B., S. B. Hitchner. Inmunosuppression and active response induced by infectious bursal disease virus in chickens with passive antibodies. Av. Dis. 24: 189-196. 1980.
7. Lucio, B., S.B. Hitcher. Response of susceptible versus inmune chicks to killed, live-modified, and wild infectious bursal disease virus vaccines. Av. Dis. 24: 1037-1049. 1980.
8. Mazariegos, L.P., P.D. Lukert, J. Brown. Pathogenicity and inmunosuppresive properties of infectious bursal disease "intermediate" strains. Av. Dis. 34: 203-208. 1990.
9. Muskett, J.C., I.G. Hopkins, K.R. Edwards, D.H. Thornton Comparison of two infectious bursal diease vaccine strains: efficacy and potencial hazards in suceptible and maternally inmune birds. Vet. Rec. 4: 332-334. 1979.
10. Naqui, S.A., D.L. Millor, L.C. Grumbles. An evaluation of three Commercially availablle infectious bursal disease vaccines. Av. Dis. 24: 233-2400. 1980.
11. Naqui, S.A., B. Marquez, N. Sahin. Maternal antibody and its effect on infectious bursal disease inmunization. Av. Dis. 27: 623-631. 1983.
12. Van den Berg, T.P., M. Gonze, G. Meulemans. Acute infectious bursal disease in poultry :

isolation and characterisation of a highly virulent strain. Av. Pathol. 20: 133-143. 1991.
13. Van den Berg, T.P., G. Meulemans. Acute infectious bursal disease in poultry: protection afforded by maternally derived antibodies and interference with live vaccination. Av. Pathol. 20: 409-421. 1991.
14. Whitfill, C.E., C.A. Ricks, T.L. Fredericksen, J.K. Tyczkowskia, D. Rowe, L. Owen, J. Hutchins, E. Haddad, P. Andrews, T.K. Skeels, J. Beasley, L: Newberry, J.A. Thoma, P: Wakenell, N. Ismail, J.Hardisty, A. Novel Infectious bursal disease (IBD) vaccine for day old chickens effective in presence or absence of maternal antibodies. Proc. ANECA XVI Convención Anual. Acapulco Guerrero, p. 286-187. 1991.
15. Winterfield, R.W., H.L. Tacker. Inmune response and pathogenicity of different strains of infectious bursal disease virus applied as vaccines. Av. Dis. 22: 721-731. 1978.

EFFECT OF LIVE INTERMEDIATE INFECTIOUS BURSAL DISEASE VACCINES IN COMMERCIAL PULLETS

EFECTO DE LAS VACUNAS A VIRUS ACTIVO INTERMEDIO CONTRA LA INFECCION DE LA BOLSA DE FABRICIO EN POLLONAS COMERCIALES

R. Hein and G. Franz

Intervet Inc.
405 State Street, Millsboro, DE 19966

RESUMEN

Las pollonas de reemplazo para postura comercial comúnmente se vacunan contra la infección de la bolsa de Fabricio (IBF) utilizando vacunas elaboradas con virus activo de tipo intermedio entre las 2 y 4 semanas de edad. Dichas vacunas debieran inducir una respuesta inmune adecuada en presencia de niveles "protectivos" moderados de anticuerpos maternos.

En este trabajo se presenta la respuesta inmune y los efectos macro y microscópicos sobre las bolsas de Fabricio de las 4 vacunas intermedias más comúnmente utilizadas en forma comercial (vacunas A, B, C y D) en pollas de reemplazo para postura de 2 a 5 semanas de edad con anticuerpos maternos, así como en pollos libres de patógenos específicos (SPF, por sus siglas en inglés) de 5 semanas de edad.

En los pollos SPF todas las vacunas produjeron niveles de anticuerpos similarmente altos (tanto por la prueba de ELISA como por la de virus neutralización) con lesiones similares en la bolsa. No obstante, en las pollas de 2 semanas de edad con inmunidad materna, sólo la vacuna D indujo un nivel significativo de anticuerpos y no tuvo efecto sobre la bolsa de Fabricio. A las 5 semanas de edad, en presencia de niveles muy bajos de anticuerpos maternos, sólo las vacunas A y D produjeron anticuerpos con un ligero efecto sobre la bolsa de Fabricio. Independientemente del hecho de que todas las vacunas hayan reaccionado de manera similar en los pollos SPF sin inmunidad materna, sólo la vacuna D resultó ser segura y efectiva cuando se aplicó a pollos jóvenes con inmunidad materna.

Commercial layer pullets are commonly vaccinated against infectious bursal disease (IBD) with "intermediate" type live infectious bursal disease virus (IBDV) vaccines between 2 and 4 weeks of age. These IBDV vaccines should induce in the presence of "protective" moderate maternal antibodies an adequate immune response.

In this paper the immune response and its macroscopical and microscopical effect on the bursa of Fabricius of 4 of the most common commercial "intermediate" IBDV vaccines (vaccine A, B, C, and D) in 2- and 5-week-old maternal antibody (MA) positive layer chickens as well as in 5-week-old SPF chickens are presented.

In the SPF chickens all vaccines A, B, C, and D produced similar high antibodies (as measured by the ELISA and the virus neutralization test) with similar bursal lesions. However, in the 2-week-old MA immune chickens only vaccine D induced a significant antibody level with no effect on the bursa of Fabricius. At 5 weeks of age in presence of very low MA only two vaccines A and D produced antibodies with a slight effect on the bursa of Fabricius. Despite all vaccines reacted similar in non maternal immune SPF chickens, only one vaccine

(D) could be safely and effectively used in young maternal immune chickens.

EVALUACION DE DAÑO, REGENERACION Y PROTECCION DE LA BOLSA DE FABRICIO CAUSADO POR LA APLICACION DE VACUNAS A VIRUS VIVO CONTRA LA INFECCION DE LA BOLSA DE FABRICIO

EVALUATION OF BURSAL DAMAGE, REGENERATION, AND PROTECTION BY THE ADMINISTRATION OF INFECTIOUS BURSAL DISEASE LIVE VIRUS VACCINES

Toscano C. A.; Chapa B. J.; Lucio D. E.

Investigación Aplicada, S.A. de C.V.
Tehuacán, Puebla, MEXICO 75700

ABSTRACT

The degree of bursal damage and regeneration after the application of infectious bursal disease (IBD) intermediate, live virus vaccines was evaluated in specific pathogen free (SPF) birds. Protection against pathogenic challenge was also studied. Evaluation was done by the following assays: bursal size (BS), bursal index (BI), histopathology (HP), and immunoperoxidase (IP), as well as by IBD and Newcastle disease (ND) antibody levels (AbL) by the micro-virus-serum-neutralization (MVSN) test, and the hemagglutination inhibition (HI) test, respectively. Five groups (A, B, C, D, and E) were formed, which were vaccinated with a ND live virus vaccine. Groups A, B, and C were orally given different commercial IBD vaccines. Group D remained as a negative control, and Group E was used as a positive control. During the first 3 days post-vaccination (PV), no differences were found between vaccinated groups and the negative control group. At 7 and 14 days PV vaccine strains caused mild, moderate, and moderate-to-severe bursal damage in groups B, C, and A, respectively, as evaluated by HP and IP. IBD AbL's were increased in all three groups, being highest in group A.

At 5, 10, and 15 days post-challenge (PC), bursal damage was observed as evaluated by BS and BI, and IBD AbL's were considerably increased, but bursae started to show gradual regeneration as assessed by HP and IP. It is concluded that no close correlation exists between BS, BI, or AbL's, and HP/IP in challenged birds previously vaccinated with a live virus.

INTRODUCCION

A través de los años, se han distribuido comercialmente un gran número de vacunas diferentes contra la IBF (10). Las primeras de ellas eran sumamente virulentas y capaces de producir la enfermedad e inmunosupresión. En la actualidad se cuenta con una amplia variedad de vacunas con diferentes grados de patogenicidad y de capacidad para causar inmunosupresión. Por tal razón, las vacunas se han dividido en virulentas, intermedias o suaves (10).

En los últimos años las cepas intermedias han sido las más populares (10).Dichas cepas varían en cuanto a antigenicidad, virulencia y por consiguiente, provocan en mayor o menor grado, inmunodepresión por inducir atrofia de la BF que es donde se replica el virus, así como la producción N-Acs depende de la antigenicidad del producto y de la capacidad de respuesta del sistema inmune (5,7,11,12,13).

De acuerdo con lo anterior, se evaluaron las propiedades de 3 vacunas a virus vivo, comerciales (cepas intermedias) en condiciones de laboratorio, con el objeto de:

* Observar el daño y regeneración que provocan a la BF por sí mismas.

* Comparar la respuesta inmune humoral contra IBF producida por cada vacuna.

* Cuantificar las lesiones bursales microscópicamente, PV y PD, por medio de pruebas histológicas así como comprobar la presencia del virus por pruebas histoquímicas.

* Correlacionar las lesiones bursales, IB y el TB con la respuesta inmune humoral hacia la IBF.

* Evaluar el efecto de inmunosupresión a través de la respuesta inmune inducida con la vacunación contra la (ENC).

MATERIAL Y METODOS

Se emplearon 147 aves LPE, de dos semanas de edad, formándose cinco grupos. Previo a la vacunación se sangraron todas las aves para confirmar la ausencia de Acs contra la IBF y contra la ENC, por medio de las pruebas de MVSN y HI respectivamente.

Grupo A, B, C: Se emplearon 30 aves por grupo, cada uno vacunado con una vacuna comercial diferente a virus vivo, cepas intermedias, por vía oral. Se monitorearon a los 3, 7 y 14 días PV, sangrándose 10 aves de cada grupo para determinar el N-Acs por la técnica de MVSN, y se obtuvieron 5 BF de cada uno, para determinar el TB, IB, lesiones a la HP e IP. A los 14 días PV se desafiaron los tres grupos, por vía ocular, con una cepa patógena (73688) de la IBF, conteniendo un título de $10^4 DIE_{50}$ /ml.

A los 5, 10 y 15 días PD se sangraron 10 aves de cada grupo, para determinar el N-Acs y se obtuvieron 5 BF de cada uno, para determinar el TB, IB y lesiones a la HP e IP.

Grupo D: Se emplearon 30 aves no vacunadas (control negativo), las cuáles fueron muestreadas igual que los grupos A,B,C, para determinar el N-Acs, así como el TB, IB y lesiones al HP e IP.

Grupo E: A los 14 días PV de los grupos A,B,C; se desafiaron 27 aves LPE de este grupo (control positivo), con la misma cepa, por la misma vía y a la misma dosis que los grupos vacunados.

A los 5, 10 y 15 días PD se sangraron 9 aves para determinar el N-Acs y se obtuvieron 9 BF para determinar el TB, IB y lesiones a la HP e IP.

Tres días previo a la vacunación de IBF, se vacunaron los grupos A, B, C y D, con una vacuna a virus vivo contra la ENC; al igual que el grupo E se vacunó 3 días previos al desafío. Esto con la finalidad de ver la respuesta a la vacunación hacia la ENC en las aves.

Cada grupo se colocó en diferentes unidades de aislamiento con aire filtrado a presión negativa, tipo Horsfall-Bauer, provistas de agua y alimento.

Microvirus Suero Neutralización (MVSN): A las muestras de suero se les corrió la prueba de MVSN en forma individual, utilizándose el método Beta (suero diluido - virus constante), con técnicas descritas (1).

Inhibición de la Hemoaglutinación (HI): A las muestras de suero se les corrió la prueba de HI en forma individual, utilizándose el método Beta (suero diluido - virus constante), con técnicas descritas (1,14).

Tamaño de la Bolsa (TB): Se determinó para cada ave, midiendo el TB (ancho) con un vernier y reportándose en milímetros.

Indice Bursal (IB): Se determinó para cada ave, mediante la siguiente fórmula:(8).

$$IB = \frac{\text{Radio Bursal: peso de la bolsa / peso corporal del ave}}{\text{Media del Radio Bursal del grupo control negativo}}$$

Histopatología (HP): Las muestras de BF se fijaron en una solución de formol amortiguado al 10% durante 8 hrs. Se procesaron e incluyeron en parafina y se realizaron cortes delgados para la tinción de hematoxilina y eosina de acuerdo a métodos histológicos convencionales (9).

Para la evaluación del grado de daño o lesión en la BF se utilizó la clasificación siguiente: (4).

0 = Sin lesiones.

1 = Pocas células linfoides necróticas y/o deplesión en escasos folículos.

2 = Numerosas células linfoides necróticas y/o deplesión en abundantes folículos.

3 = Pérdida linfocitaria difusa generalizada y fibroplasia.

4 = Folículos linfoides atrofiados y quísticos.

Inmunoperoxidasa (IP): La prueba se realizó por el método indirecto Avidina-Biotina-Peroxidasa con anticuerpos monoclonales contra el virus de IBF los cuales reaccionan con la proteína viral 2 (vp2) presente en la cepa estandar del serotipo 1 y los 6 subtipos del virus de IBF (2). Como anticuerpo secundario se utilizó un anticuerpo (IgG) biotinilado elaborado en cabra, contra IgG de ratón, y el sistema estreptoavidina-peroxidasa, de acuerdo a las especificaciones del producto (Zymed Lab.).

Para evaluar el grado de tinción o cantidad de sitios teñidos positivamente se utilizó la clasificación siguiente: (4).

0 = Tinción negativa.

1 = Pocas células positivas ligeramente teñidas.

2= Moderada cantidad de células positivas diseminadas.

3 = Numerosas células teñidas intensamente.

RESULTADOS

A los 3 días PV no se observaron diferencias entre los tres grupos vacunados en comparación con el control negativo por medio de las pruebas del TB, IB y títulos de Acs (ver tabla 1 y 2), pero sí se observaron lesiones y reacción positiva de grado 2, en algunas bolsas del grupo A, por medio de las pruebas de HP e IP. El grupo B permaneció sin lesiones, ni reacción positiva. El grupo C presentó algunas BF con reacción positiva en grado 1 (ver tabla 3).

A los 7 días PV las BF del grupo A tendieron a ser de menor tamaño e IB menor en relación con el control negativo. Las del grupo B y C tendieron a ser similares o ligeramente más pequeñas respectivamente (ver tabla 1). En la prueba de MVSN para IBF, los grupos B y C no presentaron títulos y el grupo A sí los presentó. Para la prueba de HI de ENC el grupo A fue el que presentó títulos más bajos (ver tabla 2). Así mismo se siguieron

presentando lesiones y reacción positiva por las pruebas de HP e IP respectivamente. El grupo A presentó reacción positiva en algunas BF en grado 3. Los grupos B y C presentaron lesión y reacción positiva en algunas BF en grado 2.

A los 14 días PV las bolsas de los grupos A y B tendieron a ser de menor tamaño e IB menor. Las del grupo C se observaron más grandes que las de los otros dos grupos y más pequeñas que el control negativo (ver tabla 1). En la prueba de MVSN para IBF, el grupo A presentó títulos más altos, pero en HI de ENC presentó títulos más bajos. Los grupos B y C presentaron títulos similares (ver tabla 2). En las pruebas de HP e IP, el grupo A presentó lesiones y reacción positiva en grado 3 en algunas BF. El grupo B por HP presenta algunas BF en grado 3 y por IP en grado 2. El grupo C presentó todas las BF tanto por HP como por IP en grado 1 (ver tabla 3).

A los 5, 10 y 15 días PD las BF de los tres grupos vacunados se observaron de menor tamaño e IB menor en comparación con el control negativo, pero de mayor tamaño e IB mayor en comparación con el control positivo (ver tabla 1).

Tabla 1. Media del tamaño de la bolsa (mm) y media del índice bursal.

	DIAS POST-VACUNACION						DIAS POST-DESAFIO					
	3		7		14		5		10		15	
GRUPO	TB	IB	TB	IB	TB	IB	TB	IB	TB	IB	TB	IB
A	13.6	1.20	10.7	.74	12.6	.50	16.1	.82	14.2	.49	12.2	.47
B	12.2	1.14	13.0	1.20	12.8	.58	14.7	.50	15.2	.69	11.5	.38
C	12.6	1.02	12.5	.84	14.2	.69	15.4	.68	13.7	.56	15.0	.70
D	12.4	1.00	13.1	1.00	17.2	1.00	20.3	1.00	20.0	1.00	18.5	1.00
E							13.7	.48	10.6	.22	10.2	.21

TB: Tamaño de la bolsa de Fabricio.
IB: Indice Bursal

Los niveles de Acs de la IBF, tendieron a incrementarse sucesivamente en los dos primeros muestreos, pero a los 15 días PD bajaron en los grupos A y C, mientras que en el grupo B se siguieron incrementando.

Los títulos de Acs de ENC estuvieron bajos en los tres grupos durante los tres muestreos en comparación con el control negativo. La excepción fue en el grupo B a los 5 días PD, ya que presentó títulos mayores que el control negativo (ver tabla 2).

Tabla 2. Medias geométricas de niveles de anticuerpos contra IBF y ENC.

	DIAS POST-VACUNACION						DIAS POST-DESAFIO					
	3		7		14		5		10		15	
GRUPO	MNT IBF	HI ENC	MNT IBF	HI ENC	MNT IBF	HI ENC	MNT IBF	HI ENC	MNT IBF	HI ENC	MNT IBF	HI ENC
A	40	10	80	49.2	905	29.6	4159	28.3	7241	16.7	5973	24.6
B	40	10	40	105.6	242.5	56.6	485	52.8	557.2	28.3	1881	28.3
C	40	10	40	74.6	278.6	34.8	2079	30.3	3152	21.4	2229	30.3
D	40	10	40	80	40	56.6	40	45.9	40	32.5	40	42.9
E							1016	27.7	1652	38.5	6967	235.2

MNT: Microvirus Suero Neutralización.
HI: Inhibición de la Hemoaglutinación.

Por medio de la HP se observó una regeneración del tejido en los diferentes muestreos y la cantidad de sitios de tinción positiva por IP disminuyeron gradualmente (ver tabla 3).

Tabla 3. Grados de lesión histológica y tinción histoquímica positiva.

		DIAS POST-VACUNACION						DIAS POST-DESAFIO					
		3		7		14		5		10		15	
GRUPO **		HP	IP	HP	IP	HP	IP	HP	IP	HP	IP	HP	IP
A	0	3*	2					2	1		1	1	
	1		1	2		3	3	2	4	2	3	1	5
	2	2	2	3	4	1	1	1		2	1	2	
	3				1	1	1			1		1	
	4												
B	0	5	5	3	2	1				3		1	
	1			2	1		3	1	5	1	5	1	5
	2				2	2	2	3				3	
	3					3		1		1			
	4												
C	0	5	2	1	1			1	1	2		2	
	1		3			5	5	2	4	1	3	1	4
	2			4	4			1		1	2	1	1
	3							1		1		1	
	4												
D	0	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5
	1												
	2												
	3												
	4												
E	0												
	1												1
	2												4
	3								5		5	4	
	4							5		5		1	

* Número de aves.
** Clasificación de lesiones y grado de tinción.

DISCUSION

La tendencia actual en el control de la IBF es el empleo de cepas intermedias para reforzar la protección inicial conferida por la inmunidad materna. Sin embargo se ha demostrado que puede existir una importante variabilidad en la patogenicidad de las llamadas cepas intermedias (5,10).

De acuerdo con los resultados obtenidos a los 7 y 14 días PV, la cepa vacunal del grupo C por sí misma provocó un daño ligero en la BF, la cepa del grupo B provocó un daño moderado y la del grupo A provocó un daño moderado tendiendo a severo, ya que en algunas BF, tanto por HP como con IP presentaron lesiones y tinción positiva en grado 3; aunque ninguna cepa de los tres grupos presentó lesiones o reacción positiva en grado 4 en comparación con el grupo control positivo. Esto coincide con lo observado por otros autores (5,6,7,10). Mazariegos determinó que de las 7 diferentes cepas vacunales intermedias que analizó, 2 eran altamente patogénicas, 3 eran medianamente patógenas y 2 eran de baja patogenicidad. Por otra parte, se pudo observar que no hay una relación estrecha entre las pruebas del TB, IB y N-Acs con las pruebas histológicas e histoquímicas después del desafío, ya que las BF se observan de menor tamaño, el IB menor y los títulos de Acs se incrementan. Se pudiera pensar que este incremento fuera la causa de un IB y TB menor debido al virus de desafío; pero las pruebas de HP e IP demuestran una tendencia a la regeneración del tejido linfoide de la BF.

El presente trabajo fué realizado en aves LPE, por lo cual se muestra la capacidad que tienen algunas de las cepas intermedias ampliamente empleadas en nuestro país para causar lesiones en la BF, aunque se conoce que dichas lesiones son atenuadas con la presencia de anticuerpos maternos (7,8,10).

Para el establecimiento de un programa de vacunación contra la IBF es necesario tomar en cuenta las condiciones de explotación de las aves, el nivel de anticuerpos maternos de las aves, los programas de limpieza y desinfección, el grado de desafío para la IBF entre otras a parte de las características intrínsecas de la cepa vacunal empleada (10).

No hay que dejar de resaltar que en México las prácticas comunes para la explotación de pollo de engorde incluyen la limpieza y desinfección entre cada parvada a diferencia de otros países como Estados Unidos que emplean cama caliente, cuyo grado de desafío es mayor y que por ende requieren de medidas de control diferentes a las de nuestro país.

Se pudo comprobar el efecto de lesión en la BF y de disminución de anticuerpos contra la ENC producido por las vacunas intermedias en aves susceptibles, lo cual concuerda con lo reportado por otros autores (5,6,7,10).

CONCLUSIONES

1.- De las tres cepas vacunales analizadas la del grupo C provocó un daño ligero en la BF, la del grupo B un daño moderado y la del grupo A un daño moderado tendiendo a severo de acuerdo a los grados de lesión y reacción positiva que presentaron las BF en los diferentes muestreos PV, por medio de las pruebas histológicas e histoquímicas empleadas.

2.- Después del desafío, se observó una regeneración del tejido y por IP disminuyeron gradualmente la cantidad de sitios de tinción positiva en las aves vacunadas.

3.- La regeneración de las BF de los grupos vacunados se observo por medio de las pruebas histológicas e histoquímicas durante los 5, 10 y 15 días PD. se sugiere se tomen en consideración estas pruebas durante este período en las pruebas de potencia-desafío para constatación contra la IBF, para valorar la efectividad de las vacunas, ya que actualmente soló se toman los parámetros macroscópicos, durante 5 días PD.

4.- Se observó una disminución en la media geométrica en la prueba de HI-ENC en 2 de los grupos de aves vacunadas con cepas comerciales intermedias contra la IBF.

BIBLIOGRAFIA

1. A Laboratory Manual For The Isolation and Identification of Avian Pathogens. Third Edition The American Association of Avian Pathologists. p. 192-197.
2. Bourne, J.A.: Handbook of Inmunoperoxidase Staining Methodos ed. Dako Corp., Santa Barbara, Calif., USA, (1993).
3. Butcher, G.; Miles, R.: Infección de la Bolsa de Fabricio., Universidad de Florida., USA, p. 8-10 (1993).
4. Cruz-Coy, J.S., Giambrone, J.J., and Hoerr, F.J.: Inmunohistochemical detection of Infectious Bursal Disease virus in formalin-fixed, paraffin-embedded chicken tissues using monoclonal antibody, Avian Dis., 37: 577-583 (1993).
5. Denis, H., Thorton and Pattison, M.: Comparison of vaccines against Infectious Bursal Disease. J. Comp. Path., 85: 597-610 (1975).
6. L.A. Mazariegos, P.D. Lukert, and John Brown.: Pathogenicity and Inmunosuppressive Properties of Infectious Bursal Disease "Intermediate" Strains. Department of Medical Microbiology, College of Veterinary Medicine. University of Georgia, Athens, Georgia 30602. Avian Dis., 34: 203-208, (1990).
7. Lucio, B., and Hitchner, S.B.: Inmunosuppresion and active responce induced by Infectious Bursal Disease virus in chicken with passive antibodies. Avian Dis., 24: 189-196 (1980).
8. Lucio, B., and Hitchner, S.B.: Infectious Bursal Disease emulsifield vaccine: efect upon neutralizing-antibody levels in the dam and subsequent protection of the progeny, Avian Dis., 23: 577-583, (1993).
9. Luna, L.G.: Manual of Histological Staining Methods of the Armed Forces Institute of Pathology, 3rd Ed. Blakiston Div., McGraw-Hill, New York, 1968.
10. Lukert, P.D.: Control de la Enfermedad Infecciosa de la Bolsa de Fabricio. Departamento de Microbiología Veterinaria. Universidad de Georgia.
11. Manakly, E.M., and Bekheit, A.B.: The pathology of broilers experimentally infected with infectious bursal disease and vaccine against Newcastle. Egytian J. Of Comp. Path. and Clinical Pathology 5: 55-64, (1992).
12. Rosenberger, J.: Reconizing and diagnosing inmunosuppresion disorders in broilers. Poult. Dig. 58: 12-14, (1992).
13. Sanchez, B.C.A., Causaubon, H.M.T.: Evaluación de dos cepas vacunales del virus de la Infección de la Bolsa de Fabricio, en pollos de engorda comerciales; XX Convención ANECA. p. 298-300, (1995).
14. Villegas, Pedro.: Técnicas en Virología, Histopatologia y Mycoplasmas Aviares. Agosto 24, Septiembre 2: p. 39-43 (1982).

THE PRODUCTION AND USE OF AN INACTIVATED INFECTIOUS BURSAL DISEASE (IBD) VACCINE USING AN AVIAN CELL LINE AS A SUBSTRATE

PRODUCCION Y USO DE UNA VACUNA INACTIVADA CONTRA LA INFECCION DE LA BOLSA DE FABRICIO, UTILIZANDO COMO SUBSTRATO UNA LINEA CELULAR DE ORIGEN AVIAR

Bruce Stewart-Brown

Solvay Animal Health, Inc., Mendota Heights, MN

RESUMEN

Las vacunas elaboradas con el virus inactivado de la infección de la bolsa de Fabricio se han utilizado ampliamente para hiperinmunizar a las gallinas reproductoras, con el objeto de inmunizar pasivamente a su progenie. En Estados Unidos, estas vacunas inactivadas contienen frecuentemente virus estándar y variantes. Las compañías fabricantes de vacunas utilizan diversos substratos para el crecimiento de los virus que incorporan a estos productos inactivados. A principios de 1995, los substratos utilizados para propagar al virus de la infección de la bolsa de Fabricio para la manufactura de vacunas inactivadas, son fibroblastos de embrión de pollo, embriones de pollo o bolsas de Fabricio de pollos jóvenes. Se desarrolló una vacuna inactivada con el virus de la infección de la bolsa de Fabricio utilizando como substrato una línea celular para su propagación. Esto se hizo con la intención de trabajar con un substrato limpio y predecible que diese como resultado un antígeno que pudiese simular la respuesta a las vacunas elaboradas con virus propagados en bolsas de Fabricio. Los estudios de desafío realizados con dosis completa y con dosis reducida, la respuesta serológica de las gallinas, el análisis VP2 de los fluidos después de la propagación del virus, y los resultados preliminares de campo demuestran que este método de propagación del virus tiene potencial para ser utilizado en la elaboración de vacunas inactivadas contra la infección de la bolsa de Fabricio.

Inactivated infectious bursal disease virus (IBDV) vaccines have been widely used to hyperimmunize breeder hens in order to passively immunize progeny. In the United States, these inactivated vaccines frequently contain standard and variant viruses. Vaccine companies use a number of different substrates when growing the various viruses incorporated into these inactivated products. As of the beginning of 1995, substrates used to propagate IBDV for inactivated vaccines are either chick embryo fibroblasts, chick embryo, or the bursa of a young chicken.

An inactivated IBD vaccine was developed using a cell line as a substrate for the propagation of IBDV. The intent was to work with a clean, predictable substrate that would result in an antigen that would mimic the response of the bursa-propagated virus vaccines.

Challenge studies (full and reduced dose), resulting serologic response of hens, VP2 analysis of fluids following virus propagation, and preliminary field results have shown this propagation method to have potential for inactivated IBD vaccines.

EVALUATION OF THE EFFICACY OF VACCINES AGAINST *HIGHLY VIRULENT INFECTIOUS BURSAL DISEASE VIRUS*

EVALUACION DE LA EFICACIA DE LAS VACUNAS CONTRA EL VIRUS ALTAMENTE VIRULENTO DE LA INFECCION DE LA BOLSA DE FABRICIO

Y. Samberg and M. Meroz

Poultry Diseases Laboratories. Veterinary Services. Israel

RESUMEN

Desde 1989, un virus muy virulento de la infección de la bolsa de Fabricio (VIBF) ha venido infectando a parvadas previamente vacunadas en Israel. Estas infecciones han causado mortalidades excepcionalmente altas en pollos (hasta del 30%) y mortalidades todavía mayores (hasta del 60%) en pollas de 24 a 42 días de edad. Se evaluó la eficacia de las vacunas activas e inactivadas disponibles actualmente en Israel. Se utilizaron grupos de pollos comerciales positivos a anticuerpos maternos contra el VIBF, que fueron vacunados con vacunas activas e inactivadas, de emulsión oleosa, al día de edad y a los 14 días de edad, en diferentes combinaciones. Se utilizaron grupos de pollos sin vacunar como testigos.

La aplicación de 2 vacunaciones por aspersión a virus vivo a las edades de 1 y 14 días, con una dosis alta de $10^{5.0}$ DIE_{50} por ave y una aplicación por aspersión (1 día) seguida de aplicación de vacuna inactivada, brindaron protección completa según se determinó mediante la mortalidad y la proporción entre el peso de la bolsa de Fabricio y el peso corporal. Los resultados obtenidos con 2 vacunas inactivadas disponibles comercialmente en Israel fueron similares.

Since 1989, a highly virulent infectious bursal disease virus (IBDV) has been infecting previously vaccinated flocks in Israel. These IBDV infections have caused exceptionally high mortality in broilers (up to 30%) and even higher mortality (up to 60%) in pullets aged 24 to 42 days. The efficacy of live and inactivated vaccines currently available in Israel was evaluated. Groups of commercial chicks, with maternally derived IBDV antibodies, were vaccinated with live vaccines and inactivated oil emulsions at 1 day of age and at 14 days of age in different combinations. A group of unvaccinated chicks served as controls. The live vaccine was based upon the Winterfield strain and the inactivated vaccines were bursal-derived, prepared from bursae from virulent field IBDV cases. At 30 days of age, groups were challenged by ocular and cloacal routes with a virulent IBDV isolate. All birds in each group were bled at the time of vaccination and challenge. The antibody status of individual chicks was determined by ELISA and the mean antibody titer was calculated for each group of chicks. Protection was evaluated by daily mortality following challenge and by the determination of bursa-body-weight ratios as compared to unchallenged vaccinated and unvaccinated control groups.

Two spray applications with live vaccine, at ages 1 and 14 days, with the recommended dose of $10^{3.5}$ EID_{50} per bird did not provide protection as measured by both mortality and bursa-body-weight-ratios. Two eyedrop applications with live vaccine, at ages 1 and 14 days, with a high dose ($10^{5.3}$ EID_{50} per bird), provided partial protection as measured by mortality with surviving birds protected as determined by bursa-body-weight ratios. Two spray application with live vaccine, at ages 1 and 14 days with a high dose ($10^{5.0}$ EID_{50} per bird) and one spray application (1 day) followed by vaccination with inactivated vaccine provided full protection as determined by both mortality and bursa-body-weight ratios. Results with either of two commercial inactivated vaccines available in Israel were similar.

(Full length article will be published in *Avian Pathology*.)

PROTECTION AGAINST VERY VIRULENT INFECTIOUS BURSAL DISEASE (IBD) CHALLENGE IN ENGLAND BY IN OVO VACCINATION WITH A VIRUS-ANTIBODY COMPLEX IBD VACCINE

PROTECCION CONTRA EL DESAFIO MUY VIRULENTO CON LA INFECCION DE LA BOLSA DE FABRICIO EN INGLATERRA MEDIANTE LA VACUNACION *IN OVO* CON UNA VACUNA ELABORADA CON UN COMPLEJO VIRUS-ANTICUERPO

C. E. Whitfill[A], A. P. Avakian[A], R. P. Gildersleeve[A], E. E. Haddad[A], C. A. Ricks[A], N. Chettle[B], and P. R. Lehrbach[C]

[A]EMBREX, Inc., P.O. Box 13989-3989, Research Triangle Park, NC, 27709
[B]Central Veterinary Laboratory, Weybridge, England
[C]Cyanamid Websters, Castle Hill NSW, Australia

RESUMEN

Evaluamos la seguridad y la eficacia de vacunas contra la infección de la bolsa de Fabricio elaboradas con un complejo virus-anticuerpo (IBDV-Ab, por sus siglas en inglés) administrada *in ovo*. Las vacunas IBDV-Ab se formulan mezclando un antisuero hiperinmune específico, en la proporción adecuada con un virus infectante para formar un complejo virus-anticuerpo. En el experimento 1 se utilizó la cepa 2512 del virus de la infección de la bolsa de Fabricio y en el experimento 2 se empleó una cepa del virus "intermedio plus" similar a la 2512 en lo referente a su capacidad de invasión. En el experimento 1 se utilizaron pollos de engorda que fueron vacunados con 100 dosis infectantes 50% para el embrión (DIE_{50}) del complejo IBDV-Ab, o bien 100 DIE_{50} del virus de la infección de la bolsa de Fabricio solo, o, finalmente, solución salina. Los anticuerpos maternos menguaron hacia el 28o. día, logrando la primera medición de la inmunidad activa a los 42 días. Las aves vacunadas con el complejo IBDV-Ab tuvieron un título medio geométrico de anticuerpos superior al de las aves vacunadas con el virus solo (2211 *vs.* 1149). Las aves de los 2 grupos vacunados con el virus de la infección de la bolsa de Fabricio estuvieron protegidas clínicamente contra los desafíos con la cepa DV86 administrados a los 14, 21 y 28 días. En el experimento 2 se utilizaron pollos de engorda que fueron vacunados ya sea con 1,000 DIE_{50} del complejo IBDV-Ab, 100 DIE_{50} del complejo IBDV-Ab, 1,000 DIE_{50} del virus de la infección de la bolsa de Fabricio solo, o solución salina. Las aves fueron desafiadas con la cepa DV86 comenzando a los 18 días de edad y, de ahí en adelante, cada 3 días hasta que cumplieron los 39 días de edad. Las aves que habían recibido las vacunas IBDV-Ab tuvieron un mayor porcentaje de bolsas protegidas (94 y 100%) y una tasa de seroconversión del 100%, en comparación con las aves que recibieron el virus de la infección de la bolsa de Fabricio solo (80% protegidos y 60% con seroconversión). Estos datos indicaron que la formación de un complejo entre los anticuerpos y el virus de la infección de la bolsa de Fabricio antes de su administración *in ovo* dio como resultado vacunas más eficaces.

INTRODUCTION

Infectious bursal disease (IBD) causes a highly contagious acute infection of chickens. Infectious bursal disease virus (IBDV) has a tropism for lymphoid tissue, with immature B cells in the bursa of Fabricius (bursa) being the primary target. Once a disease well controlled by vaccination[4], pathogenic shifts in Europe and the U.S.A. during the 1980s resulted in significant outbreaks worldwide. A very virulent (vv) IBDV emerged in Europe in the late 1980s[2,5] and spread to the Middle East, Africa, and East Asia[4]. Despite extensive vaccination of breeders and progeny, IBD outbreaks causing significant economic loss still occur. It is apparent that new vaccination strategies need to be employed to help combat this costly disease.

This paper describes the *in ovo* use of several experimental IBD vaccines. These vaccines are formulated by mixing specific hyperimmune antiserum in the appropriate ratio with an infectious virus to form a virus-antibody complex that can be administered by inoculation[6].

MATERIALS AND METHODS

The formulation of IBDV-antibody (Ab) vaccines used in Expt. 1 was as previously reported[6] using 100 EID_{50} 2512 strain of IBDV and 24 units of bursal disease antiserum. The formulation of IBDV-Ab vaccines used in Expt. 2 was similar to that previously described[6], except that an intermediate plus virus similar to 2512 strain in invasiveness was used. In addition to IBDV-Ab vaccines, the same IBDV strain and virus titer used in the IBDV-Ab vaccines was administered without being complexed with antibody (IBDV alone). All vaccinations were given *in ovo* through the air cell at a depth of 2.5 cm on day 18 of embryonation. The IBDV challenge was 100 CID_{50} DV86[2]. Gross bursal lesion of acute infection (edema and hemorrhage) seen 3 days post challenge indicated a bursa susceptible to the challenge virus. Antibody titers to IBDV were determined by a commercial ELISA (Expt. 1) or quantitative agar gel diffusion (AGD) (Expt. 2).

RESULTS AND DISCUSSION

In Expt. 1, broilers were vaccinated with either IBDV-Ab vaccine, IBDV alone, or saline and antibody titers to IBDV were measured weekly. Maternal antibodies waned by day 28 and active humoral immunity could be measured beginning on day 42. At 42 days, birds vaccinated with IBDV-Ab vaccine had a geometric mean titer greater than birds vaccinated with IBDV alone (2211 vs. 1149). This suggests that the IBDV-Ab vaccine induced a stronger or accelerated humoral immune response. Protective immunity was assessed by challenging 20 birds from each group on days 14, 21, and 28. All birds were clinically protected (no mortality/morbidity) following the day 14 and 28 challenges. The unvaccinated control group challenged on day 21 had 20% mortality and 10% morbidity (30% affected), while both IBDV vaccinated groups exhibited 100% clinical protection. Thus, the IBDV-Ab vaccines were effective in the face of maternal immunity and a highly virulent IBDV challenge.

In Expt. 2, broilers were vaccinated with either 1000 EID_{50} IBDV plus 300 units Ab, 100 EID_{50} IBDV plus 30 units Ab, 1000 EID_{50} IBDV alone, or saline. Starting on day 18 of age and every 3 days thereafter until day 39 of age, 10 birds from each group were challenged with DV86 and their bursae examined for gross lesions 3 days post challenge. All birds given 1000 EID_{50} IBDV-Ab vaccine and 94.0% given 100 EID_{50} IBDV-Ab vaccine had protected bursae from the series of DV86 challenges. In comparison, 80% of the birds vaccinated with 1000 EID_{50} IBDV were protected from the challenges. On days 27 and 30 of age, 80% and 40%, respectively, of bursae from birds given 1000 EID_{50} IBDV alone were susceptible to the DV86 challenge. This indicates that a window of susceptibility to the challenge virus occurred as maternal immunity waned. This window of susceptibility was either absent (1000 EID_{50} IBDV-Ab) or greatly reduced (100 EID_{50} IBDV-Ab) when using the IBDV-Ab vaccines. Birds were tested weekly for antibodies to IBDV by AGD test. On days 35 and 42, 100% of the birds given either IBDV-Ab vaccine had seroconverted. In contrast, on days 35 and 42, 66%, and 60%, respectively, of the birds given 1000 EID_{50} IBDV alone had seroconverted. These data suggested enhanced immunity as evidenced by a greater percentage of birds in the IBDV-Ab vaccine groups seroconverting, greater number of bursae protected, and the reduction or elimination of a window of susceptibility when compared to the IBDV alone vaccinated birds.

In conclusion, *in ovo* administered IBDV-Ab vaccines were shown to be more efficacious than administration of IBDV alone. The complexing of virus with the correct ratio of antibody allows for safe *in ovo* administration because viral replication in the bursa of SPF birds was previously shown to be delayed by 8-10 days[3,6] and by 17 days or more in broilers[1]. These data suggest that complexing virus with antibody has an immune enhancing effect as evidenced by higher antibody titers and seroconversion rates and greater numbers of bursae protected from challenge. The virus-antibody complex vaccine technology provides the potential for development of safe and efficacious vaccines for *in ovo* delivery.

REFERENCES

1. Avakian, A. P., C. E. Whitfill, E. E., Haddad, C. A. Ricks, and J. Thoma. Efficacy of a novel infectious bursal disease (IBD) vaccine administered *in ovo* to broiler chickens. Poultry Sci. 72 (suppl.1):49. 1993.
2. Chettle, N., J. C. Stuart, and P. J. Wyeth. Outbreak of virulent infectious bursal disease in East Anglia. Veterinary Rec. 125:271-272. 1989.
3. Haddad, E. E., C. E. Whitfill, C. A. Ricks, A. P. Avakian, K. Skeeles, P. Andrews, and J. Thoma. Efficacy of novel infectious bursal disease vaccine administered in ovo to SPF chickens. Poultry Sci. 72 (suppl. 1):49. 1993.
4. Lasher, H N. and S. M. Shane Infectious bursal disease. World's Poultry *Science* J. 50:153-166. 1994.
5. van den Berg, T. P., M. Gonze and G. Meulemans. Acute infectious bursal disease in poultry: isolation and characterization of a highly virulent strain. Avian Pathol. 20:133-143. 1991.
6. Whitfill, C. E., E. E. Haddad, C. A. Ricks, J. K. Skeeles, L. A. Newberry, J. N. Beasley, P. Andrews,

J. A. Thoma, and P. S. Wakenell. Determination of optimum formulation of a novel infectious bursal disease virus (IBDV) vaccine constructed by mixing bursal disease antibody with IBDV. Avian Dis. 39:687-699. 1995.

LA HEMOAGLUTINACION PASIVA EN EL DIAGNOSTICO DE LA INFECCIÓN DE LA BOLSA DE FABRICIO

A PASSIVE HEMAGGLUTINATION ASSAY FOR THE DIAGNOSIS OF INFECTIOUS BURSAL DISEASE

Lizarraga R.E. y Retana R.A.

Depto. De Microbiología e Inmunología, Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia.
Universidad Nacional Autónoma de México.
Ciudad Universitaria, México D.F. 04510

ABSTRACT

One study was carried out to develop a passive hemagglutination (PH) test, for the diagnosis of infectious bursal disease (IBD). The test was compared with both serum-virus neutralization (SVN), and enzyme-linked immunosorbant assay (ELISA). Sixty seven 3-4 week old Arbor Acres broilers were used. Goat red blood cells were treated with tanic acid and glutaraldehyde in order to sensitize red blood cells with IBD virus. All sera were evaluated by all 3 tests. One hundred percent sensitivity, and 100% specificity were found in all PH, SVN, and ELISA tests, so that it can be concluded that PH is an efficient test.

La Infección de la Bolsa de Fabricio (IBF), es una enfermedad aguda y altamente contagiosa de las aves, que causa inmunodepresión, es producida por un Birnavirus de la familia *Birnaviridae*, el cual es desnudo, de forma icosaédrica, el genoma es RNA de doble cadena y segmentado (1,7).

La determinación de anticuerpos contra la IBF se confirma mediante pruebas serológicas en el laboratorio, dentro de éstas, las más utilizadas son: Precipitación en agar, Virus-Suero-Neutralización, y la prueba de ELISA

En la actualidad se buscan alternativas en el laboratorio para el diagnóstico de las enfermedades, por lo que se ha tenido la necesidad de desarrollar pruebas que ofrezcan a la avicultura un mayor número de ventajas, como son rapidez, confiabilidad y de bajo costo.

Una prueba que puede ser alternativa para cuantificar los niveles de anticuerpos contra la IBF, se llama Hemoaglutinación Pasiva (HP) que consiste en combinar químicamente un antígeno con un eritrocito de manera que los anticuerpos específicos aglutinen a los eritrocitos sensibilizados. Las técnicas de hemoaglutinación han llegado a ser métodos mucho más eficientes para el descubrimiento de pequeñas cantidades de anticuerpos, desde que se demostró que los eritrocitos podían adsorber diversos polisacáridos, como es el caso de los eritrocitos tratados con ácido tánico que pueden recubrirse con antígenos proteicos. Estos eritrocitos pueden aglutinarse con los anticuerpos específicos para el antígeno que ha sido adsorbido (3).

La sensibilidad de la técnica de HP es muy alta, bastan valores de 0.02 a 0.04 μg de proteína de anticuerpo para dar una aglutinación mínima que se puede descubrir en 0.006 μg de nitrógeno que corresponden a más o menos 50 moléculas de anticuerpo por glóbulo rojo (3).

El objetivo es evaluar la prueba de hemoaglutinación pasiva en la determinación de anticuerpos contra la IBF, comparativamente con VSN y ELISA.

MATERIAL Y MÉTODOS

Se utilizaron 67 sueros de pollo de engorda sospechosos a IBF de la estirpe Arbor Acres y de 3 a 4 semanas de edad.

Todos los sueros fueron analizados mediante las siguientes técnicas:

Virus-Suero-Neutralización: Se realizó la técnica descrita por Cunningham, diluciones decrecientes de suero, virus constante (2).

Técnica de la prueba de ELISA: En ésta se utilizaron [1]kits comerciales y la técnica se realizó según Marquardt (4).

Técnica de la prueba de Hemoaglutinación Pasiva: se realizó la técnica descrita por Serrano (8).

Para poder realizar esta prueba se empleó una suspensión de glóbulos rojos. La sangre fue obtenida de un carnero puncionando la vena yugular en condiciones asépticas y recibida directamente en un matráz que contenía solución de Alsever. Para un volumen de sangre de carnero (100 ml); se empleó un volumen de la solución de Alsever (100 ml). Se dejó reposar durante 24 horas en refrigeración.

Los eritrocitos se lavaron con PBS pH 7.2 tres veces consecutivas.

Se tanizaron los glóbulos rojos depositando 1 ml del paquete de eritrocitos en 39 ml de PBS pH 7.2 para obtener una suspensión al 2.5%. Se añadió un volumen igual (40 ml) de ácido tánico 1:20,000, mezclando e incubando en baño de María a 37°C por 10 minutos, y se centrifugaron por 5 minutos a 2500 r.p.m. Se decantó el sobrenadante y se lavaron con PBS pH 7.2, se centrifugaron a 2500 r.p.m. por 10 minutos y se resuspendieron los eritrocitos en PBS pH 6.4 para hacer una suspensión al 2.5%.

Después se procedió a fijar los glóbulos rojos con glutaraldehído al 1%. A un volumen de 3 ml de la suspensión de glóbulos rojos se le añadieron 25 ml de la solución de glutaraldehído al 1%.

La adsorción del antígeno a los eritrocitos tanizados y fijados se realizó con un volumen de 50 ml mezclándose con un volumen igual de la solución de antígeno (Virus de IBF cepa Lukert) en PBS pH 7.2 y se centrifugaron a 1500 r.p.m. durante 5 minutos; se desechó el sobrenadante y se resuspendieron en PBS pH 7.2, para su uso.

Para la prueba de hemoaglutinación pasiva en microplaca a cada pozo de la placa de microaglutinación se le añadió una gota (40 µl) de PBS pH 7.2. Se depositó una gota (10 µl) del suero problema haciendo una dilución 1:5 en la primera hilera vertical, y haciendo diluciones hasta 1:640. A cada pozo se le agregó la suspensión de eritrocitos de carnero tratados y por último se agitó la placa hasta obtener una suspensión homogénea de los eritrocitos. Se colocó en refrigeración durante 24 horas y se realizó posteriormente la lectura.

Método estadístico: Las pruebas realizadas se analizaron mediante el método descrito por Méndez (5).

[1] KIRKEGAARD AND PERRY LABORATORIES (PROFLOK MR)

RESULTADOS Y DISCUSIÓN.

SUEROS	HP	VSN	ELISA
POSITIVOS	58	57	57
NEGATIVOS	9	10	10
TOTAL	67	67	67

La prueba de HP se utilizó para la detección de anticuerpos contra IBF, de la cual se puede decir que es una prueba sencilla, y que la disponibilidad de los reactivos y equipo hacen que su montaje sea más fácil que otras pruebas, como es el caso de VSN y ELISA.
En este caso los eritrocitos sensibilizados permanecieron aptos para la prueba por más de 5 meses, sin que perdieran sus propiedades de aglutinación y ésta fuera bien definida.

Los títulos obtenidos en los sueros de ave empleando la técnica de HP variaron desde 1:5 hasta 1:80. El título fue considerado como la máxima dilución que presento el 100% de aglutinación.

Por los resultados obtenidos en la HP se podría afirmar que fue adecuada para la identificación de anticuerpos en los sueros de aves sospechosas a IBF. Se encontró que su especificidad llegó al 100%. Estos resultados llegaron a tener cierta similitud con los obtenidos por Serrano (8) quien obtuvo una sensibilidad del 85% trabajando con el virus de Bronquitis infecciosa.
Por otra parte, los títulos obtenidos mediante la prueba de VSN fueron mayores a los obtenidos por la prueba de HP y los resultados de la prueba de ELISA son mencionados como positivos y negativos, esto es porque en la prueba de ELISA se manejó una dilución que fue 1:50.

Nicholas y col (6) hacen notar que para poder comparar estas pruebas se tendría que realizar la prueba de ELISA con diluciones seriadas lo cual haría la prueba de ELISA más complicada y eliminaría sus ventajas, y por tratarse de pruebas diferentes no se pueden comparar con respecto a su título.

A diferencia de los 57 sueros positivos que se encontraron en las pruebas de VSN y ELISA, en la prueba de HP resultaron 58 sueros positivos.

Aunque se esperaba que en este trabajo los parámetros de sensibilidad fueran más bajos de los encontrados para la prueba de ELISA con respecto a la prueba de VSN. Los parámetros de sensibilidad y especificidad fueron iguales para HP, VSN y ELISA. Esto concuerda con los resultados de Marquardt y col. (4) y de Nicholas y col. (6), los cuales encontraron sensibilidad similar.

LITERATURA CITADA.

1. Calnek, W.B. and Barnes, H.J.: Infectious Bursal Diseases In: Diseases of Poultry. 9th ed. Edited by P.D. Lukert 648-663 *Iowa State University Press*, Ames, Iowa. 1991.

2. Cunninham, Ch. H.: Virología Práctica. 3ª ed. *Acribia*. Zaragoza, España. 1971.
3. Kabat, E.A. and Mayers. M.M.: Experimental Immunochemistry. 2nd ed. *Charles C. Thomas*. Springfield, Ili. 1971.
4. Marquardt, W.W. and Johnson, R.B.: An Indirect enzyme-linked immunoabsorbent assay (ELISA) for measuring antibodies in chickens infected with infectious bursal disease virus. *Avian Dis.*, 24: 375-385 (1980).
5. Méndez, I., Namihira, D., Moreno, L. y Sosa, C.: El Protocolo de la Investigación, Lineamientos Para su Elaboración y Análisis. *Trillas*, México D.F. 1990.
6. Nicholas, R.A.J., Reed, N.E., Wood, G.W., Hebert, C.N., Muskett, J.C. and Thornton, D.H: Detection of antibodies against infectiousbursal disease virus: a comparacion of three serological methods. *Res. vet Sci.*, 38: 189-192. (1985).
7. Rosales, A.G., Villegas, P., Lukert, P.D., Fletcher; O.J., Mohamed, and Brown, J.: Isolation, identificatión and phathogenicity of two field strains of infectious bursal disease virus. *Avian Dis.*, 33: 33-41 (1989).
8. Serrano, V.J.E. : Evaluación de las pruebas de hemoaglutinación pasiva e inmunodifusión para el diagnóstico de la Bronquitis infecciosa. Tesis de licenciatura. *Fac. de Med. Vet. y Zoot.* Universidad Nacional Autónoma de México. México D.F., 1991.

INFECTIOUS BURSAL DISEASE VIRUS INDUCED PROVENTRICULITIS IN MATERNALLY IMMUNE BROILER CHICKENS

EL VIRUS DE LA INFECCION DE LA BOLSA DE FABRICIO INDUJO PROVENTRICULITIS EN POLLOS DE ENGORDA CON INMUNIDAD MATERNA

M. K. Wilson, L. A. Newberry, J. K. Skeeles, J. N. Beasley, G. R. Bayyari, W. E. Huff, R. W. McNew, R. G. Hein, C. E. Whitfill, and E. Haddad

Department of Poultry Science and USDA, ARS, University of Arkansas, Fayetteville

RESUMEN

Un estudio preliminar en el que se utilizaron pollos leghorn blancos libres de patógenos específicos (SPF) indicó una severa proventriculitis después de la infección con una cepa de desafío del virus de la infección de la bolsa de Fabricio (VIBF) proporcionada por el Departamento de Agricultura de Estados Unidos (USDA, por sus siglas en inglés). Esta proventriculitis estuvo caracterizada por una prominencia de las glándulas sobre la superficie serosa y un achatamiento de las papilas sobre la superficie mucosa con una cierta hemorragia franca que se notó a los 4 días posteriores a la infección. Histológicamente, las lesiones estuvieron presentes en la mucosa y en la submucosa del epitelio del proventrículo con la presencia de hemorragia, linfocitos necrosados, heterólifos y deplesión linfoide de los folículos en la submucosa.

Presentaremos datos de un estudio diseñado para demostrar que el VIBF indujo proventriculitis en pollos de engorda con inmunidad materna infectados a varias edades.

Básicamente, los pollos fueron desafiados a los 7, 14, 21 y 28 días de edad con la cepa de desafío del VIBF del USDA. Se realizó la necropsia de pollos a los 4 y a los 11 días postinfección, habiendo pesado a las aves, obtenido muestras de sangre, pesado y calificado visualmente a los tejidos y obtenido muestras de tejidos que fueron conservadas para su evaluación histopatológica.

Empleando los datos obtenidos en las fechas en que se realizaron las necropsias, y después de haberlos analizado estadísticamente, considerando la calificación de las lesiones macroscópicas, los resultados de la prueba de inmunoabsorción ligada a enzimas con captura de antígeno (AC ELISA, por sus siglas en inglés), los títulos de anticuerpos y la calificación histopatológica, intentamos encontrar la conexión entre la infección por el VIBF y su inducción de proventriculitis a varias edades. Ya antes se

había detectado al VIBF en homogeneizados de proventrículo mediante la técnica de AC ELISA. Siete días más tarde se observó un incremento en el tamaño del proventrículo. En este momento, las calificaciones de las lesiones macroscópicas en las papilas indicaron también cambios que se podían observar a causa del aplanamiento de las papilas sobre la superficie de la mucosa del proventrículo. Se observó evidencia de cambios en el proventrículo a partir de los 11 días postinfección de los pollos de 7 días de edad con inmunidad materna, así como a los 11 días postinfección en los pollos de 21 días de edad. Aun cuando no se detectó al VIBF en las bolsas de Fabricio de los pollos de 7 días de edad, sí fue posible detectarlo a los 14 días de edad mediante la AC ELISA. Los cambios visuales de la bolsa de Fabricio indicados por la atrofia no aparecieron sino hasta que los pollos con inmunidad materna cumplieron los 21 días de edad. Los títulos de anticuerpos estaban incrementándose al momento en que aparecieron las lesiones bursales.

A preliminary study using SPF white leghorn chickens indicated severe proventriculitis following infection with the USDA challenge strain of IBDV. This proventriculitis was characterized by a prominence of the glands on the serosal surface and a flattening of the papillae on the mucosal surface with some frank hemorrhage noted 4 days post infection. Histologically, lesions were present in the mucosa and submucosa of the epithelium of the proventriculus with the presence of hemorrhage, necrotic lymphocytes, heterophils, and depleted lymphoid follicles in the submucosa.

Data will be presented from a study designed to demonstrate IBDV induced proventriculitis in maternally immune broiler chickens infected at various ages.

Basically, chickens were challenged at 7, 14, 21, and 28 days of age with the USDA challenge strain of IBDV. Birds were then posted at both 4 and 11 days postinfection at which time birds were weighed, blood samples taken, tissues visually scored and weighed, and tissue samples were kept for histopathological evaluation.

Using statistically analyzed data obtained on the post dates, visual gross pathological scoring, antigen capture (AC) ELISA, antibody titers, and histopathological scoring, we tried to find the connection between IBDV infection and its induction of proventriculitis at various ages. Early on IBDV was detected in proventricular homogenates via AC ELISA. This was followed 7 days later by an increase in size of the proventriculus. Gross lesion scores of the papillae at this time also indicated changes that could be seen in the flattening of the papillae on the mucosal surface of the proventriculus. Evidence of changes in the proventriculus existed from 11 days postinfection of 7 day old maternally immune broilers through 11 days postinfection of 21 day old birds. IBDV, while not detected in the bursa of 7-day-old birds, was detected at 14 days of age by AC ELISA. Visual changes in the bursa indicated by atrophy did not appear until the maternally immune birds were 21 days of age. Antibody titers were increasing at the time bursal lesions appeared.

EVALUACION DE LA VIRULENCIA DE TRES AISLAMIENTOS DE CAMPO DEL VIRUS DE LA INFECCION DE LA BOLSA DE FABRICIO EN MEXICO

EVALUATION OF THE VIRULENCE OF THREE FIELD INFECTIOUS BURSAL DISEASE VIRUS ISOLATES IN MEXICO

Banda, C.A[1]., Valladares, C. J.C[2].

[1] Departamento de Producción Animal: Aves FMVZ. UNAM.
[2] Productores de Alimentos Pecuarios de Nuevo León S.A.

ABSTRACT

Three infectious bursal disease viruses (IBDV) were isolated from samples obtained from poultry farms in Mexico. Isolates were designed as H, P, and G. Antigenic properties were determined by the AC ELISA technique using B-29, R-63, BK-9, B-69, and 57 monoclonal antibodies (Mab's). Virulence was evaluated in inoculated birds based on clinical signs, mortality, bursal weight, bursal index, bursa:shank ratio, microscopic lesions, virus persistence in tissues, IBDV serology, and measurement of the immune responses to *Brucella abortus* and to sheep red

blood cells. Viruses P and G showed epitopes recognized by B-29, R-63, and B-69 Mab's, which are present in classic IBDV strains. Virus H was not recognized by any of the Mab's used. All 3 isolates induced subclinical IBD in inoculated birds, with severe bursal atrophy and lymphoid depletion, persistency of IBDV in the bursa for up to 14 days post-inoculation, and seroconversion. Nevertheless, no immunodepression was detected by the response to the 2 antigens used. No virulence differences were observed among the 3 IBDV isolates.

INTRODUCCION

La infección de la bolsa de Fabricio (IBF) es una enfermedad viral, aguda, altamente contagiosa, que afecta a aves jóvenes, caracterizada por afectar al sistema inmunocompetente, en especial a la bolsa de Fabricio, lo que ocasiona un estado de inmunodepresión. (8)

La virulencia y los efectos immunodepresores del virus de la Infección de la bolsa de Fabricio VIBF son variados dependiendo de la cepa del virus. (8), inclusive se aprecian variaciones en las cepas utilizadas como vacunas ya que Winterfield y Thacker (11) observaron en ocho cepas una amplia variación en la patogenicidad en términos de daño bursal, morbilidad y mortalidad.

En México se realizó una investigación, mediante la técnica ELISA de captura (AC-ELISA), utilizando anticuerpos monoclonales, se encontraron cepas con patrones antigénicos sugestivos a la variante Delaware y RS/593 (6), sin embargo la importancia patológica en condiciones de campo no se han reportado.

El presente trabajo tiene por objeto caracterizar las propiedades antigénicas, la virulencia y efectos inmunodepresores de tres aislamientos de campo del VIBF.

MATERIAL Y METODOS

Se aislaron tres virus de tres granjas ubicadas en Huasca, Hgo (virus H)., Perote, Ver. (virus P) e Iguala, Gro. (virus G); mediante la inoculación de macerados de bolsa de Fabricio, tonsilas cecales y bazo en embriones de pollo libres de patógenos (LPE).

Se descartó la presencia de virus de Enfermedad de Newcastle e Influenza Aviar por hemoaglutinación y de reovirus y adenovirus por virus sero-neutralización, utilizando antisuero de reovirus para la cepa S1133 y de Adenovirus grupo I, serotipo 1 (CELO) y serotipo 4.

Para determinar las características antigénicas de los cinco aislamientos de VIBF se realizó la técnica de ELISA de captura (AC-ELISA) utilizando cinco Mab específicos para epítopes del VIBF denominados B-29, R-63, BK-9, B-69, y 57 (6,9).

Para evaluar la virulencia de los tres aislamientos, se desafiaron pollos de engorda Arbor Acres por Arbor Acres que fueron divididos en cinco grupos. El desafío se efectuó por vía oral a los 17 días de edad en tres diferentes grupos, el título fué de$10^{2.8}$, $10^{3.0}$ y $10^{3.2}$ DLEP 50%/ml. para los virus H, P y G respectivamente, otro grupo se inoculó con la cepa 73688 con un título de$10^{2.8}$ DIEP50%/ml. Se dejó un grupo sin inocular como testigo.

Se realizaron cinco muestreos a los 0, 3, 7, 14, y 21 días. Se midieron pesos corporales, peso y diámetro de bolsas, se calculó el índice bursal (IB) (3), rango tarso bursal (RTB) (7), se realizó estudio histopátológico (4) y detección del VIBF por inmunofluorescencia indirecta (2) de bolsa de Fabricio, timo, tonsilas cecales, bazo y riñón. A los seis días despúes del desafío se inmunizó a aves de los cinco grupos con *Brucella abortus* (antígeno T-independiente) y eritrocitos de ovino (antígeno T-independiente), posteriormente se sangraron a los siete y catorce días posinoculación, para detectar un posible estado de inmunodepresión, los sueros se procesaron por microhemoaglutinación y microaglutinación (10).

El grado de la lesión bursal se evaluó de acuerdo a la escala propuesta por Muskett *et al.*, 1972

RESULTADOS

La cepa 73688 y los aislamientos P, G, mostraron poseer los epítopes reconocidos los Mab B-29, R63 y B69, detectados por AC-ELISA sin embargo, el aislamiento H no fue reconocido por ninguno de los Mab utilizados.

No se observaron signos de enfermedad en las aves de los cuatro grupos inoculados, así como en las del grupo testigo, sólamente se observó desuniformidad que fue muy evidente clínicamente en el grupo inoculado con el virus H. Tampoco se observó diferencia en la mortalidad.

No se observaron diferencias estadísticas de los pesos corporales a los 21 días. sin embargo, el grupo testigo tuvo el mayor peso corporal (1689 g) y el menor fue el grupo inoculado con el virus H (1550 g), este mismo grupo presentó la menor uniformidad de pesos.

No se observaron alteraciones en el desarrollo de la BF en las aves del grupo testigo. La cepa 73688 indujo atrofia determinada por el IB y RTB severa, evidente desde el tercer día. Los virus H, P y G indujeron atrofia, que se evidenció a los siete días. En los 14 y 21 días la atrofia bursal fue semejante para los cuatro grupos inoculados que disminuyó hasta un tercio en comparación con el grupo testigo.

El antígeno del VIBF fue detectado por inmunofluorescencia indirecta en BF, timo, bazo, tonsilas cecales y riñón de los 3 a los 14 días, pero la

mayor cantidad de antígeno se presentó en la BF. La cantidad de células inmunofluorescentes fue escasa o moderada.

Las lesiones bursales son semejantes a lo reportado por varios autores (1,5), incluyeron necrosis de linfocitos, deplesión linfoide de moderada a severa, atrofia de pliegues, hiperplasia de células reticulares, del epitelio que recubre los pliegues y del epitelio corticomedular, se observó tambien la formación de quistes epiteliales e intrafoliculares y fibroplasia del espacio interfolicular, el proceso de fibroplasia fue mínimo y se presentó rápidamente repoblación linfoide, el proceso inflamatorio persistió hasta el día 21 y fue de leve a moderado. La velocidad con que se desarrolló la severidad de la lesión bursal fue variable, la cepa 73688 indujo más rápidamente deplesión linfoide severa, seguida del virus G. No se observaron lesiones en bazo, timo, tonsilas cecales y riñón en ninguno de los cinco grupos.

Por los resultados de la respuesta inmune hacia *B. abortus* y eritrocitos de ovino no fue posible detectar claramente el estado de inmunodepresión sin embargo, en el caso de la respuesta a *B. abortus* y eritrocitos de ovino las aves inoculadas con la cepa 73688 tuvieron los títulos más bajos a los 7 y únicamente a los 14 días postinmunización para *B. abortus* . Por su parte, el aislamiento H obtuvo los niveles más bajos de anticuerpos contra eritrocitos de ovino de los cuatro grupos desafiados con VIBF en los muestreos de los siete y catorce días, además de que para *B. abortus* presentó la menor cantidad de anticuerpos de entre los tres grupos que recibieron aislamientos de campo.

DISCUSION

Bajo las condiciones de este trabajo, los aislamientos de campo P y G presentaron características antigénicas semejantes a las que se presentan en las cepas clásicas de VIBF, falta caracterizar las características del aislamiento H, que fueron de baja virulencia sin diferencia entre las tres ya que se presentó la forma subclínica de IBF con atrofia evidente macroscópica, deplesión linfoide severa, inducción de la respuesta inmune hacia VIBF, sin embargo no fue posible determinar totalmente un estado de inmunodepresión por los métodos utilizados aunque no se debe desechar un leve efecto inmunodepresor por el virus H. Resta caracterizar la virulencia en aves de un día con ausencia y presencia de anticuerpos maternos.

REFERENCIAS

1. Cheville, N.F.: Studies on the pathogenesis of Gumboro disease in the bursa of Fabricius, spleen, and thymus of the chicken. **Am. J. Pathol.** 51: 527-551. 1967.
2. Kawamura, A.: Fluorescent Antibody Techniques and Their Applications. 2a de**. University of Tokyo Press**. Tokyo, Japon 1977.
3. Lucio, B., Hitchner, S.B.: Infectious Bursal Disease emulsified vaccine: effect upon neutralizing antibody levels in the dam. **Avian Dis.** 23: 466- 478. 1979.
4. Luna, G.L.: Manual of Histologic Staining Methods of the Armed Forces Instute of Pathology. 3a ed. **Mc Graw-Hill Co.** NY. USA 1968.
5. Paasch, M. L.: Secuencia en la presentación de lesiones histopatológicas en bolsa de Fabricio de aves afectadas con infección de bolsa de Fabricio. **1er Seminario sobre la Prevención y Control de la Infección de la Bolsa de Fabricio. (IBF)** (Memorias) México 1983. 1- 4
6. Pérez, M.V.M.; Ibarra, C.J.; Pérez M. A. Mengel-Whereat, S.A.; Savage P.K.; Snyder D.B.; Pérez B. R.: Detección de cepas variantes del virus de la Infección de la Bolsa de Fabricio en tejidos infectados utilizando anticuerpos monoclonales y ELISA. **XX Convención Nacional de la Asociación Nacional de Especialistas en Ciencias Avícolas (Memorias)** Acapulco, Gro., 1995, 235 - 237, ANECA México, D.F. 1995.
7. Rountre, J.L.: The technique for quantification of thymus, bursa and bone marrow and other changes. **Program Consultant Avian Health and Management**. Lichtfield, ME. USA.
8. Saif, Y.M.: Immunosuppression induced by infectious bursal disease virus. **Vet. Immunol. and immnunopathol.** 30: 45-50 1991
9. Snyder, D.B., Lana, D.P., Savage, P.K., Yancey, F.S., Mengel, S.A., Marquardt, W.W.: Differentiation of Infectious Bursal Disease Viruses directly from infected tissues with neutralizing monoclonal antibodies: Evidence of a major antigenic shift in recent field isolates. **Avian Dis.** 32: 535 -539 1988.
10. Toivanen, P., Toivanen, A., Good, R.A.: Ontogeny of bursal function in chicken. I Embriyonic stem cell for humoral immunity. **J. of Immunol.** 109: 1058-1070 1972
11. Winterfield, R.W.; Thacker, H.L.: Immune response and pathogenicity of differents strains of infectious bursal disease applied as vaccines. **Avian Dis.** 22:721-731 1978

CURRENT SITUATION ON CONTROL OF AVIAN MYCOPLASMOSIS

SITUACION ACTUAL DEL CONTROL DE LA MICOPLASMOSIS AVIAR

Richard Yamamoto

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

RESUMEN

Aun cuando muchos investigadores han estudiado a los micoplasmas que afectan a las aves desde principios de la década de 1950, las enfermedades que causan estos agentes continúan siendo de gran preocupación para la industria avícola. El objetivo de los científicos que trabajaron en un principio con el apoyo general de la industria era erradicar a estos agentes de todos los segmentos de la avicultura; sin embargo, pese al éxito que se obtuvo en aquellas épocas en la eliminación de *M. gallisepticum, M. Synoviae, M. meleagridis* y, más recientemente *M. iowae,* de las parvadas de progenitoras, dichos microorganismos siguen estando presentes, en diversos grados, en el ambiente de la producción comercial. No ha sido posible lograr la erradicación total del germen de todos los segmentos de la industria debido a ciertos factores económicos y de manejo y a posibles cambios en su virulencia.

Es así como el control de las infecciones por *M. gallisepticum* ha evolucionado desde la erradicación total hasta la aplicación de vacunaciones en algunos segmentos de la industria. Aun cuando los avicultores continuarán exigiendo progenie libre de *M. gallisepticum* a los progenitores, las vacunas de *M. gallisepticum* (cepa F) y/o las bacterinas se utilizan comúnmente en las ponedoras comerciales en muchos países e incluso en las reproductoras pesadas de algunos otros.

Los estudios iniciados hace unos 30 años sobre la respuesta inmune y sobre la protección que brindan las bacterinas y vacunas de *M. gallisepticum* han culminado en el desarrollo de vacunas nuevas menos virulentas que también resultan promisorias en el control de la enfermedad entre las ponedoras comerciales. Aun cuando se requieren más estudios, estos productos pueden ser útiles en reproductoras pesadas y en pavos comerciales en aquellas áreas en donde es enzoótica la infección por *M. gallisepticum.* Sin embargo, la terapia a base de antibióticos es, en la actualidad, el método de elección para el tratamiento de las infecciones por *M. gallisepticum* en los pollos y pavos productores de carne, donde la despoblación no es posible.

La antibióticoterapia parece ser el método actual de elección para el control de *M. sinoviae, M. meleagridis* y *M. iowae* entre los pollos y pavos comerciales. Los estudios con inmunógenos contra estos agentes han sido limitados aun cuando ha existido durante muchos años una bacterina contra *M. sinoviae.* Un estudio más profundo en esta área puede conducir al logro de un método más efectivo para el control de dichos gérmenes. Esto es particularmente cierto para *M. sinoviae* puesto que tiene el potencial de causar severa sinovitis y aerosaculitis en pollos de engorda y en pavos.

While avian mycoplasmas have been studied by many investigators since the early 1950s, the diseases caused by these agents are still of major concern to the poultry industry. The objective of early workers with general concurrence of the industry was to eradicate these agents from all segments of the industry. However, despite early successes in eliminating *M. gallisepticum* (MG), *M. synoviae* (MS), *M. meleagridis* (MM) and more recently, *M. iowae* (MI) from primary breeding stocks, these agents still persist to a varying degree in the commercial production environment. Total eradication from all segments of the industry has not been realized due to certain economic and management factors, and possible changing virulence of the agents.

Thus, the control of MG infections has evolved from one of total eradication to that of control by vaccination in some segments of the poultry industry. Whereas the industry will still demand MG-free progeny from primary breeders, MG vaccines (F strain) and/or bacterins are commonly used in commercial layers in many countries and even in broiler breeders in some countries.

Studies initiated some 30 years ago on the immune response and protection elicited by MG bacterins and vaccines have culminated in the development of newer, less virulent vaccines that also show promise in the control of the disease in commercial layers. While further studies are needed, these products may be useful in broiler breeders and commercial turkeys in areas

where MG infection is endemic. Currently, however, antibiotic therapy is the method of choice for treatment of MG infections in broilers and meat turkeys where depopulation is not feasible.

Antibiotic therapy seems to be the current method of choice for the control of MS, MM or MI in commercial chickens and/or turkeys. Studies with immunogens against these agents have been limited although a MS bacterin has been available for many years. A more thorough study in this area may lead to a more effective method to control these agents. This is particularly true for MS since this agent has the potential to cause severe synovitis and airsacculitis in broilers and turkeys.

(Full-length paper has been accepted for publication in the Proceedings of the XX World's Poultry Congress, 1996, New Delhi, India.)

TRANSMISSIBILITY AND SAFETY OF LIVE MYCOPLASMA GALLISEPTICUM VACCINES

TRANSMISIBILIDAD Y SEGURIDAD DE LAS VACUNAS ELABORADAS CON *Mycoplasma gallisepticum* VIVO

David H. Ley[A], Judith M. McLaren[A], Andrea M. Miles[B], and H. John Barnes[A]

[A]Department of Food Animal and Equine Medicine, College of Veterinary Medicine
North Carolina State University, 4700 Hillsborough Street, NC 27606
[B]University of Delaware, Department of Animal and Food Science
040 Townsend Hall, Newark, DE 19717

RESUMEN

Se administraron vacunas vivas elaboradas con la cepa 6/85 ó con la cepa ts-11 de *Mycoplasma gallisepticum* (MG) a pollas de reemplazo para producción de huevo comestible. Las aves vacunadas y las no vacunadas se alojaron juntas durante 15 semanas en un corral de cadenas. Los corrales adyacentes contenían grupos centinela (pollas, reproductoras pesadas, pavas reproductoras o pavos productores de carne). Se supervisó y se llevó un control de la infectividad y la transmisibilidad de estas cepas vacunales mediante cultivo traqueal y serología. Ante los muestreos realizados después de la inoculación, fue posible recuperar a la cepa ts-11 del 60 al 90% de los animales vacunados y del 0 al 40% de las pollas no vacunadas que estaban revueltas con las vacunadas, pero no a partir de ninguna de las aves centinelas. La cepa 6/85 se recuperó del 0 al 20% de los vacunados, pero no de las pollas revueltas con ellas ni de las aves centinelas. Se detectaron respuestas serológicas positivas a MG mediante el ensayo de inmunoabsorción ligado a enzimas y mediante aglutinación del suero en placa en algunas de las aves vacunadas con la cepa ts-11 y en las pollas no vacunadas mezcladas con ellas, pero no en ninguna de las aves de la prueba realizada con la vacuna 6/85. No se observaron signos clínicos, morbilidad ni mortalidad que sugiriese la infección con MG patógena en ninguna de las aves durante ninguna de las pruebas. No se observaron lesiones macroscópicas a la necropsia. El análisis del polimorfismo del ADN amplificado fue capaz de distinguir a cada una ce las cepas vacunales (6/85 ó ts-11), gracias a los patrones distintos de sus bandas de ADN.

Layer pullets were administered *Mycoplasma gallisepticum* (MG) strain 6/85 or strain ts-11 live vaccines. Vaccinates and unvaccinated (commingled) pullets were housed together for 15 weeks in a chainlink enclosure. Adjoining pens contained sentinel groups (pullets, broiler breeders, turkey breeders, or meat turkeys). Infectivity and transmissibility of these vaccine strains were monitored by tracheal culture and serology. At post-inoculation samplings, strain ts-11 was recovered from 60 to 90% of vaccinates and 0 to 40% of commingled pullets but not from any of the sentinel birds. Strain 6/85 was recovered from 0 to 20% of vaccinates, but not from commingled pullets or sentinel birds. Positive MG serologic responses were detected by enzyme-linked immunosorbent assay and serum plate agglutination in some ts-11 vaccinates and commingled pullets but not in any birds from the 6/85 vaccine trial. There were no clinical signs, morbidity, or mortality suggestive of pathogenic MG infection observed in any bird during either trial. No gross lesions were observed at necropsy. Random amplified polymorphic DNA analysis was capable of distinguishing each of the

vaccinal strains 6/85 and ts-11 from each other by their distinct DNA banding patterns.
(Full-length manuscript will be submitted to *Avian Diseases*.)

(Resources to support this research were provided by the State of North Carolina and grants from Intervet America Inc. and Select Laboratories Inc.)

EXPERIMENTAL USE OF LIVE MYCOPLASMA GALLISEPTICUM VACCINES IN TURKEYS

USO EXPERIMENTAL DE LAS VACUNAS VIVAS DE *Mycoplasma gallisepticum* EN PAVOS

R. P. Chin

California Veterinary Diagnostic Laboratory System, Fresno Branch
University of California, Davis, 2789 S. Orange Ave., Fresno, CA 93725

RESUMEN

Se utilizaron pavos de una semana de edad que fueron vacunados con una de las dos vacunas contra *Mycoplasma gallisepticum* (MG), 6/85 y ts-11. No hubo signos clínicos, adversos después de la vacunación. Las aves fueron desafiadas 2 semanas después de la vacunación con la cepa R de MG directamente en los senos infraorbitarios. En ambos grupos 20% de las aves desarrollaron una sinusitis muy leve 7 días después del desafío. Hubo una ligera a leve aerosaculitis en las aves de los 3 grupos a los 10 días después del desafío.

DISCUSSION

There are currently 3 live *Mycoplasma gallisepticum* (MG) vaccines, the F-strain, 6/85 and ts-11, commercially available for use in chickens, but none are currently approved for use in turkeys. This preliminary study looked at the virulence and immunogenicity of the 6/85 and ts-11 MG vaccines in turkeys.

Thirty 1-week-old turkeys were randomly divided into 3 groups of 10 birds each. One group was vaccinated intraocularly with the ts-11 vaccine, the second group was vaccinated intraocularly with the 6/85 vaccine and the third group was not vaccinated and left as a control group. There were no adverse clinical signs nor reaction following vaccination.

Two weeks post-vaccination, all birds were challenged with a 2 day culture of the MG R-strain containing 5×10^6 colony-forming-units/ml.

At 7 days post-challenge, 20% (2/10) of the birds in all three groups showed clinical signs of sinusitis. Ten days post-challenge, 3 randomly chosen birds per group were necropsied. Results will be discussed.

At 10 days post-challenge, 1 bird from the control group, and 3 birds each from the 2 vaccine groups were randomly chosen for necropsied. The bird from the control group had mild airsacculitis. From the ts-11 vaccine group, 2/3 birds had mild airsacculitis. From the 6/85 vaccine group, 2/3 birds had slight airsacculitis. None of the birds examined had sinusitis. The birds will be examined at 21 days post-challenge and results will be reported.

IMMUNOLOGICAL CHARACTERIZATION OF MYCOPLASMA GALLISEPTICUM INFECTIONS IN SPECIFIC PATHOGEN FREE CHICKENS

CARACTERIZACION INMUNOLOGICA DE LAS INFECCIONES POR *Mycoplasma gallisepticum* EN POLLOS LIBRES DE PATOGENOS ESPECIFICOS

Sudhir K. Reddy[A], Pratik Singh[B], Amer Silim[C], and John A. Newman[B]

[A]Rhone Merieux, Inc. 115 Transtech Drive, Athens, GA 30601
[B]College of Veterinary Medicine, University of Minnesota, St. Paul, MN 55108
[C]Faculte de Medecine Veterinaire, Universite de Montreal, Canada J2S 7C6

RESUMEN

El objetivo de este estudio fue caracterizar los cambios inmunológicos debidos a la infección por *M. gallisepticum*. Se utilizaron pollos libres de patógenos específicos que fueron infectados experimentalmente con cepas virulentas o vacunales de *M. gallisepticum*. Se midieron las respuestas de anticuerpos utilizando pruebas serológicas y también se evaluaron las respuestas de inmunidad celular mediante citometría de flujo y mediante ensayos de proliferación de antígenos específicos (APA, por sus siglas en inglés) utilizando leucocitos de la sangre periférica (PBL, por sus siglas en inglés). Además, se midieron los marcadores de la activación de las células inmunitarias tales como el interferón (IFN) y el óxido nítrico, en los cultivos estimulados del ensayo APA, para confirmar la especificidad de la linfoproliferación en una respuesta anamnésica con antígenos homólogos de *M. gallisepticum*.

Se observaron respuestas de anticuerpos al *M. gallisepticum* homólogo en todos los grupos infectados, pero de manera más interesante, sólo se observó proliferación del antígeno específico en el caso del grupo de pollos infectados con la cepa virulenta PG31. Esta linfoproliferación significativa *in vitro* se detectó desde la 1a. semana postinfección (PI). En forma consistente con la proliferación del antígeno específico, los cultivos de leucocitos de la sangre periférica de los pollos infectados también contenían niveles significativamente elevados de interferón y de óxido nítrico. Los análisis de citometría de flujo revelaron un incremento en las proporciones de linfocitos T después de la infección. A la 1a. semana PI se notaron incrementos relativos en las proporciones de las subpoblaciones positivas CD4 y CD8 de linfocitos T. Sin embargo, a las 2 semanas PI sólo los linfocitos T CD8-positivos permanecieron elevados, cuando se compararon los perfiles de los linfocitos de los pollos infectados y los no infectados. Los resultados de nuestro estudio indican un posible papel de la inmunidad mediada por células en cuando menos ciertas formas de infección por *M. gallisepticum* virulento.

The objective of the study was to characterize the immunological changes due to *Mycoplasma gallisepticum* (MG) infections. Specific pathogen free chickens were experimentally infected with both virulent and vaccine strains of MG. The antibody responses were measured by serological tests, and the cellular immune responses were assessed by flow cytometry and antigen-specific proliferation assays (APA) using peripheral blood leucocytes (PBL). Furthermore, immune cell activation markers such as interferon (IFN) and nitric oxide (NO) in the stimulated cultures of APA were also measured to confirm the specificity of lymphoproliferation in a recall response to homologous MG antigens.

Antibody responses to the homologous MG were observed in all infected groups but more interestingly, antigen-specific proliferation was only observed in the case of the virulent strain, PG31-infected group of chickens. This significant lymphoproliferation in vitro was detected as early as one week post infection (PI). Consistent with the antigen-specific proliferation the PBL cultures of infected chickens also contained significantly elevated IFN and NO levels. Flow cytometric analysis revealed an increase in the proportions of T lymphocytes following infection. One week PI, relative increases were noted in the proportions of both CD4 and CD8-positive subpopulations of T cells. However at 2 weeks PI, only the CD8-positive T lymphocytes remained elevated when lymphocyte profiles of infected and uninfected chickens were compared. The results of our study indicate a possible role of cell-mediated immunity in at least certain virulent forms of MG infections.

EVALUACION DE LA EFICACIA DEL EMBONATO DE ESPIRAMICINA CONTRA UNA CEPA DE CAMPO DE *Mycoplasma gallisepticum* POR MEDIO DE LA PRUEBA DE REACCION DE POLIMERASA EN CADENA (PCR)

EVALUATION OF THE EFFICACY OF SPIRAMYCIN EMBONATE AGAINST A *Mycoplasma gallisepticum* FIELD STRAIN BY THE POLYMERASE CHAIN REACTION

Barrón F. Lilia*, López L. Fabiola*, Soto M. **

* Investigación Aplicada S.A. de C.V.
** Rhone Poulenc S.A. de C.V.

ABSTRACT

The efficacy of spiramycin embonate was evaluated by determining reduction of the amount of *M. gallisepticum* organisms in tracheal epithelium. Twenty 3-day-old specific pathogen free (SPF) chickens were inoculated with 2 doses of a 9.45 x 10^5/0.03 ml inoculum by the intranasal route (1 drop per nostril). Birds were assigned to two groups (A and B) and they were separately placed in Horsfall Bauer-type isolation units. At 11 days post-inoculation tracheal swabs were analyzed using the polymerase chain reaction (PCR) test, in order to assure that all birds were infected. Group A was fed 200 g spiramycin embonate/ton of feed for 7 days. Group B served as a positive control (+). After the 7-day treatment period, swabs from Group A were obtained to evaluate any reductions in the amount of *M. gallisepticum* organisms, considering that the PCR test detects a minimum of 1 x 10^3 bacteria per sample. All treated animals were negative. This group remained untreated for 10 days prior to the initiation of the 2nd treatment phase. Swabs were obtained once again to determine whether *M. gallisepticum* population was increased during this time period. Birds resulted negative again. The second treatment phase lasted 7 days. At the end of this period all animals (A and B) were swabbed. Treated birds remained negative. Group B (+ Control) birds were positive. Based on these results it was concluded that spiramycin embonate controlled *M. gallisepticum* population at levels <1 x 10^3 colony forming units (CFU)/sample.

INTRODUCCIÓN

El principal problema al que se enfrenta el médico de campo para realizar la elección de un tratamiento antimicoplásmico, es la dificultad y tardanza en la evaluación de los tratamientos. La mayoría de las ocasiones se evalúan parámetros productivos sin poder comparar con un grupo control negativo y teniendo el inconveniente de que existen múltiples variables que afectan los parámetros productivos y sobre los cuales no se tiene control preciso como la presencia de micotoxinas.

El embonato de espiramicina, es un macrólido que ha sido utilizado en el tratamiento de las aves con micoplasmosis y la valoración de su eficacia se ha hecho a través de la comparación de parámetros productivos de parvadas tratadas con este producto y otras que recibieron tratamientos diferentes o ninguno.

Este es el primer estudio que se realiza en México en relación a la "cuantificación" de microorganismos que son eliminados de la tráquea por efecto de la medicación con embonato de espiramicina en el alimento, ya que no se tienen antecedentes de estudios mediante métodos convencionales que nos indiquen hasta que nivel se puede disminuir la población de *M. gallisepticum*.

Actualmente se cuenta con una herramienta diagnóstica altamente, específica y sensible, la prueba de reacción de polimerasa en cadena (PCR) (2,3,6,7) que permite en 36 hrs determinar la presencia de micoplasmas en las aves. Aunque la prueba no es cuantitativa, en base al conocimiento mínimo de ufc* del inóculo contra la positividad de la prueba con 1000 ufc/muestra, nos permite tener una idea numérica de la cantidad de microorganismos presentes en las tráqueas de las aves, por muestra.

El presente estudio se realizó administrando 200 g. de embonato de espiramicina por tonelada de alimento, suministrado a aves ALPES (libres de patógenos específicos) y valorado mediante la aplicación de la técnica de PCR.

Objetivo .- Evaluar la eficacia del embonato de espiramicina en el alimento, contra una cepa de campo de *M. gallisepticum* a través de determinación semicuantitativa de la población (Mg) bacteriana en tráquea, por medio del uso de la prueba de reacción de polimerasa en cadena (PCR).

MATERIAL Y MÉTODO

1o. Preparación del inóculo.

Se realizó un cultivo de 24 hrs de incubación de *M. gallisepticum*, (cepa de campo) para obtención del inóculo. A partir de este cultivo se ajustó una dosis con $9.45x10^5$ ufc/0.03 ml. (1,4,5,7).

2o. Preparación del alimento medicado.

Se prepararon 10 kg. de alimento de iniciación con embonato de espiramicina a la dosis recomendada para pollo de engorda (200 ppm). La mezcla se realizó en una mezcladora de pantalón con capacidad para 10 kg.

* unidades formadoras de colonias.

Se formaron 2 grupos de 10 aves cada uno, los cuales se identificaron como A, los animales que recibieron tratamiento y B los que permanecieron como controles positivos. Cada grupo de aves se colocó en una unidad de aislamiento tipo Horsfall Bauer. Se tomaron hisopos traqueáles a las 20 aves a los 3 días de edad, para verificar por medio de la prueba de PCR (muestras en pool) que estuvieran libres de *M. gallisepticum.*

Al día 5 de edad se inocularon las aves con $9.45x10^5$ ufc/0.03 ml. vía intranasal, una gota en cada orificio con una cepa de campo de *M. gallisepticum.* Se esperó un período de 10 días para verificar que el tracto respiratorio estuviese colonizado, tomándose hisopos de tráquea y realizando la prueba de PCR.

A los doce días post-infección se inició el tratamiento en los animales del grupo A, proporcionándoles 16 gr. de alimento medicado por ave. Esta primera fase del tratamiento duró 7 días. Al término de este se tomaron hisopos traqueáles en forma individual a las aves de este grupo.

En base al calendario de medicación establecido para el producto, se tuvo un período de descanso de 10 días, durante el cual todas las aves consumieron alimento sin medicar. Al término de este lapso se volvieron a muestrear las aves del grupo A en forma individual.

Al día 29 de edad de las aves, se inició la 2a. fase del tratamiento, proporcionándoles a las aves 37gr. de alimento medicado por ave. Este tratamiento de refuerzo duró 7 días.

Al término de este período se muestrearon todas las aves (A y B), corriendose la prueba de PCR en forma individual.

RESULTADOS.

Valoración de la disminución de la población de *Mycoplasma gallisepticum* en tráquea, por medio de la prueba de PCR.

	Grupo A Tratados	Grupo B No tratados
3 días de edad (sin inocular).	negativo	negativo
10 días post inoculación *	100 % (+)	100 % (+)
después de 7 días de tratamiento (1ª fase)	100 % (-)	
después de 10 días descanso (sin tratamiento)	100 % (-)	
después de 7 días de tratamiento (2ª fase)	100 % (-)	100 % (+)

* $9.45x10^5$ ufc/0.03 ml, 2 dosis

Las aves se valoraron como negativas en la prueba de PCR, considerándose que la población de Mg se encontraba por debajo de 1000 ufc/muestra.

DISCUSIÓN

No se encontraron datos de número de ufc de Mg, en infecciones de campo que causen signología y transmisión vertical, sin embargo trabajos de Glisson, Levisohn y Lin (5,6,7) realizados para evaluar la transmisión vertical y control de Mg en gallinas Leghorn y pollo de engorda indican que inóculos con 10^6ufc/ml. o más en cultivos de 24 hrs causan infección del huevo y de los embriones.

Glisson (4) demostró la reducción de la infección por Mg a nivel traqueal, utilizando tratamientos con Clortetraciclina y Tylosina en el alimento antes de la inoculación experimental en pollo de engorda con $4.6x10^{12}$ ufc/ml., hasta niveles de $10^{1.4}$ y $10^{2.2}$ ufc respectivamente, durante 10 semanas de tratamiento, período en el cual se presentó un decremento lineal de la población de micoplasma en tráquea. En el presente trabajo se obtuvieron resultados similares que muestran que la población de Mg estaba por abajo de 10^3UFC.

Las pruebas realizadas por diferentes autores para el control de la infección y transmisión de M.g. (1,4,5,7) mediante tratamientos con antimicoplasmicos y vacunas no eliminan el microorganismo, solo controlan la población.

CONCLUSIONES

1.- La prueba de PCR detecta niveles mínimos de hasta 1000 ufc/muestra, por lo que podíamos concluir que la población en las traqueas de los animales tratados fué inferior a este número, durante el periodo muestreado y que dicha prueba puede ser empleada para valorar la efectividad de tratamientos antimicoplásmicos.

2.- El embonato de espiramicina usado a razón de 200 ppm en el alimento durante 7 días, redujo la población de micoplasma a nivel de tráquea a menos de 1000 ufc/muestra.

3.- Una vez obtenida esta información a nivel experimental en el laboratorio, se hace necesario adecuarlo a un estudio a mayor escala, en condiciones de campo.

BIBLIOGRAFIA

1. Cummings S Thimoty, S.H. Kleven and John Brown. Effect of Medicated Feed on Traqueal Infection and Population of *Mycoplasma gallisepticum* in Chickens. Avian Dis:30:581-584. 1986.
2. Dohms J.E., L.L. Hnatow, P. Whetzel, R. Morgan and C. L. Keeler, Jr.. Identification of the putative cytadhesin gene of *M. gallisepticum* and its use as DNA probe. Avian Dis 37:380-388. 1993.
3. Flock Check *Mycoplasma gallisepticum* DNA Probe Technical Manual.
4. Glisson R. John, I Hsin Hing Cheng, John Brown and R. Greg Stewart. The effect of Oxitetracicline on the severity of airsaculitis in chicken infected with *M. gallisepticum*. Avian Dis 33:750-752. 1989.
5. Glisson R. John and Stanley H. Kleven *Micoplasma gallisepticum* vacunation: Effects on Egg Transmition and Egg Production. Avian Dis: 28:406-415. 1984.
6. Levishon S. and M. J. Dykstra.A Quantitative study of Single and Mixed Infection of the Chicken Trachea by *M. gallisepticum*, Avian Dis 31:1-12. 1987.
7. Lin M. y and S.H. Kleven Egg Transmition of Two Strains of *M. gallisepticum* in chickens. Avian Dis. 26: 487-495. 1982.
8. Nacimiento R. Elmiro, Richard Yamamoto, Kevin R. Herrick and Robert C Tait. Polymerase chain reaction for detection of *M. gallisepticum*. Avian Dis 35:62-69. 1991.
9. Nacimiento R. Elmiro, Richard Yamamoto, y Mazhar I Khan. *M. gallisepticum* F. vaccine strain-specific Polymerase chain reaction. Avian Dis. 37:203-211. 1993.

ORNITHOBACTERIUM RHINOTRACHEALE INFECTION IN TURKEYS: A PATHOGENICITY STUDY IN 6- AND 32-WEEK-OLD TURKEYS

ESTUDIO DE LA PATOGENICIDAD DE LA INFECCION POR *Ornithobacterium rhinotracheale* EN PAVOS

M. De Rosa[A], R. Droual[A], R. P. Chin[A], H. L. Shivaprasad[A], and R. Walker[B]

California Veterinary Diagnostic Laboratory System
[A]Fresno Branch, 2789 S. Orange Ave., Fresno, CA 93725
[B]Davis Branch, P.O. Box 1770, Davis, CA 95617

RESUMEN

La patogenicidad de *Ornithobacterium rhinotracheale* fue estudiada en pavos de 6 y 32 semanas de edad que fueron inoculados intratraqueal, intrasacos aéreos, intramuscular e intravenoso con 10^8 UFP de la bacteria. Pericarditis moderada y aerosaculitis fueron observadas sólo en los grupos inoculados intratraqueal e intrasacos aéreos. En otro estudio pavos de 32 semanas de edad fueron inoculados de forma similar. No se encontraron lesiones en ningún grupo.

SUMMARY

Ornithobacterium rhinotracheale is a newly described bacterium that affects birds/avian species[2]. Turkeys and chickens are the most commonly involved. Previously, several cases of *O. rhinotracheale* infection in turkeys and chickens were diagnosed at the California Veterinary Diagnostic Laboratory System (CVDLS) - Fresno Branch. Clinical signs and gross lesions were similar to those previously described[1]. The most significant findings were high mortality and severe pneumonia. Currently, the mechanisms involved in the invasion, colonization and pathogenicity of *O.*

rhinotracheale are not understood. The purpose of this study was to investigate the pathogenicity of *O. rhinotracheale* in 6- and 32-week-old turkeys.

Forty 6-week-old commercial turkeys were randomly divided into 6 groups and inoculated intranasally, intratracheally, intra-air sac, intramuscularly and intravenously with 10^8 colony-forming-units (CFU) of *O. rhinotracheale*. At necropsy, the intratracheal and intra-air sac groups showed moderate airsacculitis and mild pericarditis. Histologically, mild to moderate infiltration of heterophils and mononuclear inflammatory cells were observed in the air sacs. *O. rhinotracheale* was isolated only from the trachea, air sacs and lung of these groups. No significant gross or histopathologic lesions were found in the other groups.

In a second experiment, twenty 32-week-old turkeys were divided into 4 groups and inoculated intratracheally, intra-air sac and intravenously with 10^8 CFU of *O. rhinotracheale*. No significant lesions were found at necropsy or by histopathology. *O. rhinotracheale* was recovered from the trachea of one bird inoculated intratracheally.

Based on these results, we believe that other factors such as viruses, bacteria, age, and/or stress are involved in the pathogenicity of this bacterium.

(Full manuscript to be submitted to *Avian Diseases*.)

REFERENCES

1. Hinz, K.H., C. Blume, and M. Ryll. Acute exudative pneumonia and airsacculitis associated with Ornithobacterium rhinotracheale in turkeys. Veterinary Record. (10):233-234. 1994.
2. Vandamme, P., P. Segers, M. Vancanneyt, K. Van Houer, R. Mullers, J. Hommez, F. Deuhirst, B. Paster, K. Kersters, E. Falsen, L. Devrieze, M. Gisgand, K.H. Hinz, and W. Mannheim. Description of Ornithobacterium rhinotracheale gen. nov., sp. nov isolated from the avian respiratory tract. Internat. J. System. Bacteriol. 44:24-37. 1994.

DISTRIBUTION OF ARTHRITIS AND OSTEOMYELITIS IN TURKEYS WITH GREEN LIVER DISCOLORATION

DISTRIBUCION DE LA ARTRITIS Y LA OSTEOMIELITIS EN PAVOS CON HIGADOS DE COLOR VERDOSO

A. Mutalib[A], T. Brown[B], and W. Maslin[A]

College of Veterinary Medicine
[A]Box 9825, Mississippi State University, Miss. State, MS 39762
[B]University of Georgia, 953 College Station Road, Athens, GA 30602

RESUMEN

Se estudió la distribución de la artritis y de la osteomielitis en los pavos con hígados verdosos (GL, por sus siglas en inglés) en un rastro, y en parvadas procedentes de 7 granjas comerciales. La ocurrencia general de hígados verdosos, de artritis y de osteomielitis en los 25,320 pavos machos inspeccionados, fue de 264 (1.04%), 123 (0.49%) y 107 (0.42%) respectivamente, y en las 16,690 hembras revisadas, la incidencia fue de 24 (0.14%), 0% y 13 (0.08%) respectivamente. La prevalencia de hígados verdosos, de osteomielitis y de artritis varió entre las granjas estudiadas. Se detectó artritis y/u osteomielitis en 168 (58.3%) de 288 pavos con hígados verdosos. De los 168 pavos con osteomielitis y/o artritis, 48 (28.6%) presentaron sólo artritis, 45 (26.8%) mostraron sólo osteomielitis y 75 (44.6%) presentaron ambas lesiones. La artritis y la osteomielitis se detectaron en sitios únicos y múltiples y fueron uni y bilaterales. La distribución de la osteomielitis en los 120 animales que resultaron positivos a esta lesión con y sin artritis fue de 77 (64.2%) en el extremo proximal de la tibia; 29 (24.2%) en el extremo proximal del húmero; 28 (23.3%) en el extremo proximal del fémur; 13 (10.8%) en la caja torácica y 4 (3.3%) en el extremo distal del fémur. La distribución de la artritis en los 123 pavos que resultaron positivos a esta lesión con y sin osteomielitis fue de 77 (62.6%) en el hombro, 45 (36.6%) en la articulación femorotibiana y 25 (20.3%) en las articulaciones de la cadera. Los hallazgos de este estudio sugieren que la artritis y la osteomielitis son 2 lesiones

distintas y que se pueden desarrollar independientemente en una misma ave.

Distribution of arthritis and osteomyelitis (OM) was studied in turkeys with green livers (GL) collected in a processing plant and originated from 7 commercial farms. Overall occurrence of GL, arthritis, and OM in the 25,320 inspected toms was 264 (1.04%), 123 (0.49%) and 107 (0.42%) respectively, and in the 16,690 inspected hens was 24 (0.14%), 0%, and 13 (0.08%) respectively. Prevalence of GL, OM, and arthritis varied among the studied farms. Arthritis and/or OM were detected in 168 (58.3%) of 288 turkeys with green livers. Of the 168 turkeys with OM and/or arthritis, 48 (28.6%) had only arthritis, 45 (26.8%) had OM only, and 75 (44.6%) had both lesions. Arthritis and OM were detected in single and multiple sites and were unilateral and bilateral. Distribution of OM in the 120 OM-positive turkeys with and without arthritis was 77 (64.2%) in proximal tibia; 29 (24.2%) in proximal humerus; 28 (23.3%) in proximal femur; 13 (10.8%) in rib cage; and 4 (3.3%) in distal femur. Distribution of arthritis in the 123 arthritis-positive turkeys with and without OM was 77 (62.6%) in shoulder; 45 (36.6%) in stifle; and 25 (20.3%) in hip joints. Findings in this study suggest that arthritis and osteomyelitis are two distinct lesions and that they may develop independently in the same bird.

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

SUSCEPTIBILITY OF CLOSTRIDIUM PERFRINGENS OF TURKEY ORIGIN TO VIRGINIAMYCIN AND BACITRACIN--A REVISIT

REVISION DE LA SUSCEPTIBILIDAD DE *Clostridium perfringens* DE PAVOS A LA VIRGINIAMICINA Y A LA BACITRACINA

Timothy S. Cummings[A] and Y. M. Saif[B]

[A]Pfizer Animal Health, White Sulphur Springs, WV 24986
[B]OARCD, Ohio State University, Wooster, OH 44691

RESUMEN

Se determinaron los valores de concentración mínima inhibitoria (CMI) de 11 aislamientos de campo de *Clostridium perfringens* obtenido a partir de pavos procesados, contra la virginiamicina y la bacitracina, para compararlos con los resultados de CMI de *C. perfringens* de la misma operación, obtenidos 2 años atrás. En el complejo se ha venido utilizando la virginiamicina en los alimentos que se administran después de los medicados con coccidiostato, durante 4 años ininterrumpidos, y se inició el uso de la bacitracina el año pasado, después de que se publicó la aprobación gubernamental para el uso de su combinación con cobán. Los valores de CMI fueron esencialmente los mismos para la virginiamicina, pero hubo un incremento notable en los valores de CMI de la bacitracina. Estos resultados sugieren que no se había desarrollado resistencia contra la virginiamicina, según se detectó por los valores de CMI, aun después del uso prolongado de esta droga a niveles altos, mientras que puede haberse desarrollado un cierto grado de resistencia de *C. perfringens* contra la bacitracina después de un año de uso.

INTRODUCTION

MIC is the acronym for minimum inhibitory concentration. The MIC for a particular antibiotic can be simply defined as the lowest concentration of that antibiotic which will effectively inhibit the growth of a specific bacterial organism. Comparing the MICs of a variety of antibiotics allows us to compare them with each other at the same time.

Rotation and shuttling of various coccidiostats and growth promotants are common practices of the poultry industry to improve performance. Although a "bump" in performance can be realized following such practices, many changes are often made on the premise of preventing or delaying the development of resistance by the GI organism to the feed additive without substantiating this concept with laboratory data. Although resistance by certain microflora populations to growth enhancing antibiotics can be real, there is some

evidence that the growth promotant antibiotics can vary in their ability to induce resistance.

Approximately 2 years ago, a similar study was undertaken at the same turkey complex in order to measure MIC values of virginiamycin and bacitracin against *Clostridium perfringens*. *C. perfringens* was used as the indicator organism because of its relative importance to the poultry industry. Bambermycin, the other approved growth enhancer for use in turkeys, was not utilized in the study because of the natural resistance of the *Clostridium* genus to this particular antibiotic. The company had been using virginiamycin in their post-coccidial rations for over 2 years prior to initiation of the study which precluded usage of bacitracin at the complex since no combination clearance existed with monensin at the time. The results were used in helping to determine whether resistance had developed to virginiamycin as well as provide base line data from which to compare future sensitivity values.

Since that time, the company has continued using virginiamycin in the post-coccidiostat feeds and started using the BMD/coban combination clearance shortly following its approval. This translates into continued virginiamycin usage for over 4 years at the complex and over one year's use of bacitracin in the earlier feeds. Thus, the purpose of the current trial was to compare recent *C. perfringens* MIC values against virginiamycin and bacitracin with those of the previous study in an effort to determine whether resistance was occurring as measured by in-vitro tests.

PROTOCOL

Intestinal samples from normal, processed turkeys were collected by tying off the entire GI tract from 10 birds per flock immediately following inspection. The samples were placed on ice and overnighted to the reference laboratory where a composite sample was made for each flock. The composite samples were heat and alcohol treated to selectively enrich the samples for clostridia and then cultured onto CDC anacrobic blood agar. Isolates were then identified by standard methods and the MIC assays were run using the microtiter plate, dilution technique.

The sources of virginiamycin and bacitracin used for MIC determinations were Pfizer Animal Health and Sigma, Inc., respectively. Approximately 22 composite samples were collected representing 22 different farms from which 11 *C. perfringens* isolations were made. The MIC values for bacitracin were originally reported as units per ml (IU/ml) and were subsequently converted into micrograms/ml (ug/ml) for a direct, accurate comparison with virginiamycin which is typically reported in ug/ml. An ATCC reference strain of *C. perfringens* was also incorporated into the study to serve as a control.

RESULTS

Results are shown in Table 1.

Table 1.

MICs for C. perfringens (ug/ml)

Previous study values (1993)			Current study values (1995)		
Isolate no.	Bacitracin	Virginiamycin	Isolate no.	Bacitracin	Virginamycin
ATCC	0.09	0.13	ATCC	3.1	1.0
1	0.50	0.15	1	190.5	1.0
2	0.09	0.13	2	3.1	1.0
3	0.16	0.13	3	3.1	1.0
4	>1.49	0.25	4	1.4	8.0
5	0.09	0.13	5	<0.70	4.0
6	0.19	0.13	6	3.1	1.0
7	0.19	0.33	7	95.2	8.0
8	0.25	0.13	8	95.2	1.0
9	0.16	0.33	9	95.2	2.0
10	0.19	0.13	10	381.0	1.0
11	0.19	0.17	11	1.4	8.0
12	0.16	0.25			
13	0.09	0.13	avg.	79.0	3.4
14	0.16	0.13			
15	0.19	0.06			
avg.	0.26	0.17			

DISCUSSION

As mentioned previously, the poultry industry has concerns about the possible development of bacterial resistance to growth enhancing antibiotics. The disquiet is not necessarily based on scientific data, but rather on the belief that long-term use of growth promotant antibiotics will eventually result in resistance becoming an issue. Although resistance has been clearly demonstrated for therapeutic antibiotics, the fact remains that there is very limited information with regard to bacterial resistance to growth promotant antibiotics in the field. This is not to say that resistance will not develop to growth promotants, but we need to understand that differences do occur between approved products, and the time period for the development of resistance to the different growth enhancers may vary. In other words, we need to base our rotation/shuttle decisions more on fact rather than habit or theories which "sound good."

The interpretation of MIC values and correlation to resistance requires additional information to make it meaningful for practical application. We need to understand that disk diffusion sensitivity tests are qualitative, but MIC assays are quantitative. Published MIC value ranges indicative of susceptibility for various bacteria are abundant in human and veterinary medicine, but they are relatively absent with regard to growth promotant antibiotics in poultry production. Thus, a single MIC value actually tells us very little about the

susceptibility of a given bacterium. We also need to realize there are differences between strains of bacteria within a species. In addition, we need information about the concentration of the antibiotic at the site of infection, but we will assume that adequate levels of the growth promotant antibiotics are present since they are not systemically absorbed and remain in the GI tract. Finally, we need to remember that in vitro test results may not correlate well with desired clinical response for various reasons. Having said this, we will attempt to draw some conclusions from the data.

When looking at the current 1995 study alone, all MIC values for virginiamycin were within 3 dilutions of the ATCC reference strain, but when looking at the bacitracin results, 5 out of 11 isolates (45%) were at least 5 dilutions greater than the ATCC's MIC value. It has been suggested that 8 fold increases (4 dilution differences) can be used to indicate resistance. Using these criteria, it can be stated that there does not appear to be any real resistance to virginiamycin despite many years use. On the other hand, resistance to bacitracin following a year's use may be a legitimate concern at this operation.

When compared with the earlier study results (1993), all of the current studies' (1995) MIC values to both antibiotics were higher including the ATCC reference strain. This is probably due to laboratory variation, hence we should use the ATCC strain result as a reference point for each study. This comparison further validates our earlier conclusions, as the earlier (1993) study's results demonstrated *C. perfringens* susceptibility to both virginiamycin and bacitracin. Keep in mind that the earlier study's results were obtained from turkeys which had not been exposed to bacitracin for quite some time, but the 1995 study involved turkeys being fed bacitracin in combination with monensin for over a year. The lack of apparent resistance build-up to virginiamycin may be due in part to the two, synergistic components which serve as the "ingredient" of virginiamycin, thus making it more difficult for the organism to concentrate on a single component.

In conclusion, the evidence presented here indicates that normal clostridia inhabitants of healthy turkey GI tracts from a commercial poultry operation remained sensitive to virginiamycin despite prolonged use (>4 years), but 5/11 isolates (45%) appeared to have developed some degree of resistance to bacitracin in slightly over one year. This goes against the common perception by the industry that all growth promotant antibiotics are the same with regard to resistance development, thus a major reason for rotating/shuttling products. Although these results may not apply to every situation, the use of certain growth enhancers over a prolonged period of time may be just as effective as shuttling.

EXPERIMENTAL INFECTION OF TURKEY POULTS WITH WESTERN EQUINE ENCEPHALITIS VIRUS

INFECCION EXPERIMENTAL DE PAVIPOLLOS CON EL VIRUS DE LA ENCEFALITIS EQUINA DEL OESTE

G. L. Cooper[A], H. A. Medina[B], P. A. Woolcock[A], and B. Reynolds[A]

[A]California Veterinary Diagnostic Laboratory System
Turlock/Fresno/Davis
[B]Foster Farms, Inc., Livingston, CA

RESUMEN

Se probó la patogenicidad de un aislamiento del virus de la encefalitis equina del oeste (WEE, por sus siglas en inglés) que fue recuperado de una pava adulta durante las investigaciones realizadas en casos de baja de postura en parvadas de pavos reproductores en California, utilizando para la investigación pavipollos de 2 semanas de edad. No se observó mortalidad ni signos visibles de enfermedad en los pavipollos inoculados intramuscularmente con 2,000 dosis letales para el embrión 50% (DLE/50 unidades virales), pero se observaron lesiones histológicas consistentes en necrosis linfoide aguda y deplesión de linfocitos en la bolsa de Fabricio, además de una leve necrosis linfoide en el timo de los pavipollos infectados experimentalmente. Fue posible aislar al virus de la encefalitis equina del oeste a partir del torrente circulatorio

de los pavipollos infectados hasta durante 3 días postinoculación.

Western equine encephalomyelitis (WEE) is a mosquito born viral infection affecting equines and humans primarily. The disease has been seen in the Western and Central United States, Canada, Mexico, and South America. The causative agent is an *Alphavirus*, belonging to the family *Togoviridae*. Mosquitoes serve as vectors and wild birds are the usual reservoir hosts. The disease is endemic in certain areas of California, particularly in the Central San Joaquin and Sacramento valleys. In these areas the virus is amplified in a transmission cycle involving *Culex tarsalis* mosquitoes as primary vectors and house finches and house sparrows as the primary amplifying hosts. A secondary amplification cycle involving *Culex* mosquitos and chickens, pheasants and blackbirds also exists[3].

Subclinical infection with WEE virus is common in wild bird populations in California as well as in domestic chickens and turkeys, based on the results of numerous serological surveys dating back to the 1930's and 1940's[3]. Although infections in chickens and turkeys are usually inapparent, recent reports suggest that the WEE virus may be associated with egg production drops in breeder turkeys in California[4]. Highlands J virus (HLJ), a related but antigenically distinct member of the WEE complex and eastern equine encephalitis virus (EEE), another member of the *Togoviridae* family, have also been implicated in egg production drops in breeder turkeys[5], as well as with high mortality in young turkey poults in the Southeastern United States[1]. Studies with these viruses indicate that HLJ and EEE can be pathogenic in 2-week-old turkey poults when inoculated via the intramuscular route, resulting in significant morbidity and mortality, and persisting in the blood of experimentally infected poults for up to 2 days post-inoculation[2].

In the current investigation the pathogenicity of a WEE virus isolate, which was obtained from a turkey hen during investigations of egg production drops in California, was tested in 2-week-old turkey poults. Poults were inoculated through the intramuscular route with 2,000 ELD/50 units of virus. The infection produced acute lymphoid necrosis in the bursa of Fabricius and thymus glands, and the virus persisted in the blood stream of experimentally infected poults for up to 3 days post-inoculation. Although no mortality or morbidity were noted, it was concluded that, under the conditions of the experiment, WEE virus is at least mildly pathogenic in young turkey poults.

REFERENCES

1. Ficken, M.D., D.P. Wages, J.S. Guy, J.A. Quinn, and W.H. Emory. High mortality of domestic turkeys associated with Highlands J virus and eastern equine encephalitis virus infections. Avian Dis. 37:585-590.1993.
2. Guy, J.S., M.D. Ficken, H.J. Barnes, D.P. Wages, and L.G. Smith. Experimental infection of young turkeys with eastern encephalitis virus and Highlands J virus. Avian Dis. 37:389-395. 1995.
3. Hardy, J.L. The ecology of western equine encephalomyelitis virus in the central valley of California. Am. J. Trop. Med. Hyg. 37(3) Suppl. pp 18S-32S. 1987.
4. Medina, H.A., G.L. Cooper, P. Woolcock. Egg-production drops in turkeys associated with western encephalitis virus. Presented at the 132nd annual AVMA meeting, Pittsburgh, PA. 1995.
5. Wages, D.P. Egg-production drop in turkeys associated with alphaviruses: eastern equine encephalitis virus and Highlands J virus. Avian Dis. 37:1163-1166. 1993.

HEXAMITIASIS - REAPPEARANCE OF AN OLD DISEASE?

LA HEXAMITIASIS: ¿REAPARICION DE UNA VIEJA ENFERMEDAD?

B. R. Charlton[A], C. R. Gustafson[A], A. A. Bickford[A], G. L. Cooper[A], and E. M. Johnson[B]

[A]California Veterinary Diagnostic Laboratory System - Turlock Branch
University of California - Davis, 1550 N. Soderquest Ave
P.O. Box 1552, Turlock, CA 95381
[B]Clinical Parasitiology, Veterinary Teaching Hospital
University of California - Davis, Davis, CA 95617

RESUMEN

La enteritis de los pavipollos es un síndrome clínico debido a diversos agentes infecciosos que pueden causar enteritis. El reto que se tiene para el diagnóstico de esta enfermedad consiste en detectar cuáles de estos varios agentes infecciosos son los que están involucrados. En el diagnóstico diferencial se debe considerar a varios agentes parasitarios, como son las coccidias, las criptosporidias, los ascáridos y los protozoarios flagelados que pueden causar enteritis si la carga parasitaria rebasa un cierto umbral, o bien si están presentes otros agentes infecciosos. Tres son los protozoarios flagelados que se han indicado en la enteritis de los pavos. *Cochlosoma anatis* e *Histomonas meleagridis* son temas de charlas que se han presentado en la XLII y en la XLIV Conferencia Internacional Avícola del Oeste (Western Poultry Disease Conference, respectivamente). *Hexamita meleagridis* (ahora conocido como *Spironucleus meleagridis,* dentro de la familia *Hexamitidae*) fue diagnosticado como un componente de un caso de enteritis de los pavipollos en California durante el otoño de 1995. Presentaremos la historia de este caso y los hallazgos diagnósticos.

Poult enteritis is a clinical syndrome of turkey poults due to a number of infectious agents that can cause enteritis. The diagnostic challenge of poult enteritis is to detect which of several infectious agents are involved. Several parasitic agents must be included in the differential diagnosis. Coccidia, cryptosporidia, ascarids and flagellated protozoa can cause enteritis if the parasitic load is above a certain threshold or if other infectious agents are present. Three flagellated protozoa have been implicated in enteritis of turkeys[3]. *Cochlosoma anatis*[1] and *Histomonas meleagridis*[4] were subjects of talks given during the 42nd and 44th Western Poultry Disease Conference, respectively. *Hexamita meleagridis* (now called *Spironucleus meleagridis* in the family *Hexamitidae*[2]) was diagnosed as a component of a case of poult enteritis in California during the fall of 1995.

A flock of 43,000 3.5-weeks-old hen turkeys were suspected of having an enteritis problem and treatment with bacitracin was initiated. Five days later, the birds continued to show huddling, ruffled appearance and slight nervousness. Field necropsy by company personnel revealed watery caeca and sloughing of the intestinal mucosa. Eight birds were submitted to the Turlock Branch of the California Veterinary Diagnostic Laboratory System. Simultaneously, bacitracin was withdrawn and the birds were started on neomycin and 3-Nitro. Necropsy confirmed the watery caeca and revealed excessive watery contents in the proximal portion of the intestines. Three birds had focal areas of discoloration in the pancreas and 1 bird had severe crop mycosis. Numerous, small, rapidly moving flagellated protozoa was observed in the direct mucosal scrapings of the proximal intestines of 3 birds. The remaining 5 birds either were negative or had only rare protozoa observed. A tentative diagnosis of hexamitiasis was made based on the small size and the rapid movement of the organism and its presence in the upper intestines.

Direct electron microscopic examination of intestinal samples from these birds was positive for rotavirus-like particles and 25-30 nm virus particles. Bacterial examination was negative for *Salmonella* sp. and no significant isolations were made from the tracheas or livers. Serologically, the flock was negative for hemorrhagic enteritis virus, paramyxovirus 1, *Bordetella avium*, and the mycoplasmas. Histopathology of the intestines showed numerous protozoal organisms primarily at the base of the crypts. Lesions in the pancreas and liver were compatible with turkey viral hepatitis.

Determining the relative importance of the viral agents versus the hexamita in this particular case of poult enteritis is difficult. Three days after the initial submission, 8 additional birds were examined. Direct mucosal scrapings showed the small rapidly moving protozoa in heavy numbers in 7 birds and slight numbers in 1 bird. The proximal two thirds of the intestines were

involved. Additionally, numerous trichomonads were present in the caeca. At this time, treatment was switched to oxytetracycline in the water at 2000 mg/3.78 l. After 3 days of treatment, 8 additional birds were submitted in which only 2 birds had slight and occasional hexamita.The lack of response to initial treatment and the increased severity of the hexamita infection suggest the parasitic agent was a factor.

REFERENCES

1. Cooper, G., and H.L. Shivaprasad. Catarrhal enteritis in turkeys associated with an unusual flagellated protozoan. Proc. 42nd West. Poult. Dis. Conf. p. 2. 1993.
2. Kulda J. and Eva Nohýnko_a. Flagellates of the human intestine and of intestines of other species. In Parasitic Protozoa, Vol.II., J.P. Kreier ed. Academic Press, New York. pp. 36-138. 1978
3. McDougald, L.R. Other protozoan diseases of the intestinal tract. In: Diseases of poultry, 9th ed. B.W. Calnek, H.J. Barns, C.W. Beard, W.M. Reid, and H.W. Yoder, Jr., eds. Iowa State University Press, Ames, Iowa. pp. 804-813. 1991.
4. Norton R.A. and F.D. Clark. Histomoniasis - a re-emerging problem? Proc.44th West. Poult. Dis. Conf. p. 10. 1995.

EVALUATION IN TURKEYS OF A LIVE TEMPERATURE SENSITIVE MUTANT E. COLI VACCINE(GARAVAX-T)

EVALUACION DE UNA VACUNA ELABORADA A BASE DE *ESCHERICHIA COLI* MUTANTE VIVA Y TERMOSENSIBLE (GARAVAX-T) EN PAVOS

Lanny M. Howell

American Scientific Laboratories, Inc., 8001 W. 102 Terrace, Overland Park, KS 66212

RESUMEN

Se obtuvo una vacuna elaborada a base de *Escherichia coli* mutante viva, serotipo 078 termosensible, en la Universidad de Minnesota, para evaluar su utilidad como vacuna potencial para proteger a los pavos contra el desafío con *E. coli* serotipo 078. Se determinó que esta mutante termosensible es capaz de crecer a 320C pero no a 410C, lo cual le permite colonizar la mucosa nasal, pero hacerlo en la tráquea sólo a un nivel mínimo. Para evaluar la eficacia de esta vacuna se llevaron a cabo varios estudios de su inmunogenicidad. Se vacunaron los pavipollos al día de edad, utilizando para ello un gabinete de aspersión y se revacunaron a las 3 semanas de edad en el agua de bebida. Tanto los grupos vacunados como los controles se desafiaron intratraquealmente con una cepa virulenta del serotipo 078/V a los 14 días posteriores a la revacunación. Más del 85% de las aves de los grupos vacunados quedó protegido, mientras que el 84% de las aves de los grupos controles mostró signos clínicos de colibacilosis. En base a los resultados de los estudios de inmunogenicidad, quedó demostrado que una dosis de 20 a 30 millones de microorganismos mutantes dio la protección adecuada contra el desafío con el serotipo virulento 078/V.

A live temperature sensitive mutant of *Escherichia coli*, serotype 078 was obtained from the University of Minnesota to evaluate its utility as a potential vaccine to protect turkeys against challenge with *E. coli* serotype 078. It was determined this ts-mutant is able to grow at 32°C but unable to grow at 41°C. This allows for the mutant to colonize on the nasal mucosa but minimal colonization in the trachea.

SAFETY

To determine the safety of this vaccine under laboratory conditions, 100 poults were vaccinated with 10 times the established dosage and observed for any adverse signs related to the vaccine. None of the birds showed any adverse signs. To evaluate the safety of the vaccine in turkeys under field conditions, studies were conducted in North Carolina, Arkansas, and Virginia. Over 125,000 turkeys were involved in the studies. The vaccine was administered at day of age by spray cabinet and then revaccinated at 3 weeks via the drinking water. Flocks were observed daily for 14 days after each vaccination for any untoward clinical signs which might be attributed to the vaccine. In all the trials, there were no evidence of any unusual mortality or any other untoward reactions reported through the course of

observation. In addition, a study was conducted to determine if the avirulent *E. coli* strain contained in the vaccine had any potential for reversion to virulence on back passage in turkey poults. Based on the results of the study there was no indication of increasing virulence with passage, as all birds remained normal throughout the study.

CROSS-PROTECTION

A study was conducted in SPF chickens to demostrate immunogenicity of this ts-mutant vaccine against respiratory challenge with virulent *E. coli* strains representing serotypes 078, 01A, and 02A. Separate groups of 35-45 healthy chicks per dosage level were vaccinated via drinking water at 7 days of age. A group of 30-40 hatchmates were set aside as controls. Three weeks post-vaccination, each chicken was inoculated with virulent *Mycoplasma gallisepticum*(Strain R) by the infra-orbital sinus route. At the same time, each bird received virulent infectious bronchitis (Strain 41) by eyedrop route. These procedures were done to create a pre-challenge stress. At 4 weeks post-vaccination, each chicken was inoculated intra-nasally with virulent *E. coli* of serotype 078, 01A, or 02A. Seven days later, the birds were sacrificed and examined for gross pathology typical of colibacillosis. To aid in evaluating results, each bird was scored for clinical signs as follows:

1 = normal
2 = air sacs cloudy
3 = lesions in air sacs - one side
4 = lesions in air sacs - both sides
5 = pericarditis, perihepatitis, and/or enteritis
6 = unthrifty appearance, moribund or dead

The results from these studies show the ts-mutant *E. coli* vaccine is capable of colonizing the upper respiratory tract, and providing protection against penetration of this barrier by 078/V, 02A/V, and 01A/V strains of virulent *E. coli*. The results indicate the presence of significant protection. Even though these cross-protection studies were conducted in chickens, one would expect the same results in turkeys.

FIELD EFFICACY STUDIES

Field efficacy studies are in progress in which the vaccine is administered on farms with a history of colibacillosis problems. The test farms have at least 2 brood barns so 1 will serve as a control. Economic factors such as mortality, weight gains, feed conversion, and condemnation will be evaluated.

COMPARISON OF PRODUCTIONS PARAMETERS IN THREE COMMERCIAL TURKEY BREEDS

COMPARACION DE LOS PARAMETROS PRODUCTIVOS EN TRES RAZAS COMERCIALES DE PAVOS

Julie D. Helm, Karla S. Pecelunas, and Dennis P. Wages

Department of Food Animal and Equine Medicine
College of Veterinary Medicine, North Carolina State University, Raleigh, NC 27606

RESUMEN

Se compararon los parámetros de producción de 3 razas de pavos comerciales (BUTA, Hybrid y Nicholas) desarrollados bajo condiciones idénticas de manejo. Las comparaciones de producción incluyeron: ganancia de peso, emplume de la pechuga, ampollas en la pechuga (bursitis del esternón), botones en la pechuga (dermatitis ulcerativa focal) y producción de carne al sacrificio. Los parámetros de producción que resultaron ser significativamente diferentes entre las 3 razas fueron la cobertura de la pechuga con plumas, las ampollas de la pechuga y la producción de carne del músculo pectoral profundo, del muslo, todos los componentes de la piel y esqueleto.

MATERIALS AND METHODS

Day-old tom poults (650 of each breed) were grown to 17 weeks of age at the North Carolina State University Teaching Animal Unit poultry house. Three different dew claw trim patterns were used to separate the breeds and the poults were randomly placed throughout the house. Starting at 1 day of age, 100

birds of each breed were randomly selected and weighed weekly until processing at 17 weeks of age. From 9 - 16 weeks of age, 100 birds of each breed were scored weekly for breast feather covering and the development of breast blisters and breast buttons. Before processing, 75 birds from each breed were randomly selected, weighed and wing tagged to be identified at the processing plant for a meat yield study. All mortality and necropsy results were recorded and compared between the breeds.

Data were analyzed for mean body weights, breast feathering, breast blisters, breast buttons, and meat yield results using a one-way analysis of variance. Where differences significant at the 5% level were found, group means were separated using the Student-Newman-Keuls multiple comparison procedure. Correlation between breast feather covering and the development of breast blisters and/or breast buttons was analyzed using Spearman Correlation Coefficients. All computations were performed using the Statistical Analysis System.

RESULTS

Weight Gain. The Hybrid and Nicholas breeds weighed significantly more than BUTA during 0-3 weeks of age and at 5 weeks of age. No significant differences in weight gain were observed among the breeds between 7-17 weeks of age.

Breast Feathering. Hybrid and Nicholas had significantly better breast feathering scores from 9-16 weeks of age when compared to BUTA.

Breast Blisters. Hybrid and Nicholas had significantly lower breast blister scores from 13-16 weeks of age when compared to BUTA.

Breast Buttons. BUTA had a significantly worse breast button score at 13 weeks of age when compared to Hybrid, but not Nicholas.

Table 1. Comparison of significant yield results among BUTA, Hybrid and Nicholas Turkeys.

AS % OF CWOG:	BUTA (47)*	HYBRID (34)	NICHOLAS (43)
% All White Meat**	30.57 (b)	31.36 (a)	31.00 (a,b)
% Deep Pectoral Mus.	5.85 (b)	6.26 (a)	6.08 (a,b)
% Thigh Meat	13.92 (b)	14.42 (a)	13.75 (b)
% All Skin***	7.78 (b)	7.79 (b)	8.95 (a)
% Breast & Neck Skin	4.33 (b)	4.46 (b)	5.31 (a)
% Frame	20.89 (a)	20.08 (b)	20.28 (b)

(a,b) Figures in the same row with the same letter are not significantly different at the 5% level using the SNK multiple comparison procedure.
*Number of birds recovered for yield study.
**All White Meat includes: scapula meat, superficial and deep pectoral muscles.
***All Skin includes: thigh, scapula, neck and breast skin.

Breast Feathering and Breast Blisters/Breast Buttons Correlation. There was a positive correlation between poor breast feather covering and the development of breast blisters in BUTA and Nicholas at 15 and 16 weeks of age and in Hybrid at 14 and 16 weeks of age. No correlation between poor breast feather covering and the development of breast buttons was observed.

Yield Results. Yield results were determined as a percent of the killed carcass without giblets (CWOG). Non-significant yield comparisons among the 3 breeds included: wings, drums, thigh skin, thigh bone, scapula skin, scapula meat, and superficial pectoral muscle. Significant yield comparisons among the 3 breeds (Table 1) included: thigh meat, deep pectoral muscle, all white meat (scapula, superficial and deep pectoral muscles), all skin (thigh, scapula, neck and breast skin), and frame.