

INVESTIGATION OF THE PRESENCE OF ANTIBODIES AGAINST SEVERAL AVIAN VIRUSES IN BACKYARD CHICKEN SERA COLLECTED IN MACEDONIA IN 1999

D. Mitevski¹, E. F. Kaleta², M. Dodovski³, R. Prodanov¹

¹ Veterinary Institute, Skopje, Macedonia

² Institute for Disease of Poultry, Justus-Liebig University, Giessen, Germany

³ Faculty of Veterinary Medicine, Skopje, Macedonia

ИСПИТУВАЊЕ НА ПРИСУСТВОТО НА АНТИТЕЛА ПРОТИВ НЕКОЛКУ ПТИЧЈИ ВИРУСИ ВО СЕРУМИТЕ НА СЕЛСКА ЖИВИНА ОД МАКЕДОНИЈА ЗЕМЕНИ ВО ТЕКОТ НА 1999 ГОДИНА

Д. Мишевски¹, Е.Ф. Калета², М. Додовски³, Р. Проданов¹

¹ Ветеринарен институт, Скопје, Македонија

² Институт за болести на живината, Јустус-Либиг Универзитет, Гисен, Германија

³ Факултет за ветеринарна медицина, Скопје, Македонија

SUMMARY

During the spring 1999, sera were collected from backyard chickens in several regions in Macedonia. Those chickens were not vaccinated against major viral diseases (except some against ND), which creates a reservoir of infection for farm poultry flocks in the country.

Presence of antibodies against eight avian viruses were tested: Newcastle Disease (ND), Avian Influenza (AI) (H5 and H7) virus, Infectious bronchitis (IB) and Egg drop syndrome (EDS) applying haemagglutination inhibition test and Infectious Bursal Disease (IBD), Marek's Disease (MD) (HVT), Infectious Laryngotracheitis (ILT) virus and Turkey Rinotracheitis (TRT) virus applying virus neutralization test (VN).

Antibodies against AI, EDS and TRT could not be detected in any serum samples that were examined. However most of the backyard chickens experienced antibodies against ND, IB, IBDV, ILT and MDV. At the same time antibodies against ND, IB, IBD, ILT, EDS and MD were detected in the sera collected from the parent chicken flock in Belimbegovo.

The relevance of the obtained results, from epidemiological point of view, is discussed in this paper.

INTRODUCTION

Poultry industry in Macedonia, is an important part of the agricultural industry. There are farms with ca-

КРАТКА СОДРЖИНА

Во текот на пролетта 1999 година беа земени проби на крв од селска живина од неколку места во Македонија. Живината не беше вакцинирана против најважните вирусни болести (освен во некои случаи против Атипична чума) и е потенцијален резервоар на инфекција за јатата во фармите.

Беше испитувано присуството на антитела против осум вируси и тоа против вирусот на: Атипична чума (АЧ), Авијарна инфлуенца (АИ) (Х5и Х7), Заразниот бронхитис (ЗБ) и Синдромот на пад на несивост (ЕДС 76) со тест на инхибиција на хемаглутинација и против вирусите на Заразната болест на бурзата (ЗББ), Марковата болест (МБ) (ХВТ сој), Заразен ларинготрахеитис (ЗЛТ) и Мисиркин ринотрахеитис (МРТ) со вирус неутрализационен тест.

Во испитуваните серуми не беа пронајдени антитела против вирусите на АИ, ЕДС и МРТ. Од друга страна, поголемиот дел на испитувани серуми имаа различни вредности на титарот против АЧ, ЗБ, ЗББ, ЗЛТ и МБ. Во серумите од родителските пилиња се пронајдени антитела против вирусите на АЧ, ЗБ, ЗББ, ЗЛТ, ЕДС и МБ.

Во трудот се дискутира значењето на добиените резултати од епизоотиолошка гледна точка.

capacity of about 2.5 million day-old chickens raised on floor or cage system and farms for 2.5 million laying hens in cages.

Despite the well-developed intensive production, an unknown number of backyard chickens exists in the villages. Backyard chickens are usually not vaccinated and are susceptible to number of viral and bacterial diseases, which makes them a potential source of infection for the farm population.

In this paper we analyze the presence of antibodies against several avian viruses in the sera of backyard chickens as a way to indirectly collect more data of the population health status and the avian viral pathogens that are circulating in Macedonia.

MATERIAL AND METHODS

Collection of sera

Sera were collected from different age chickens, hatched from dams which do not belong to commercial hybrids and were raised at backyards. Chickens selected upon the described conditions, did not have a vaccination history, except for Newcastle disease, since a vaccine containing 25 doses is available in Macedonia. However, vaccination records for NDV for these chickens were not accessible.

We have collected 15 sera from villages in the region of Negotino, 15 around Struga, 19 around Tetovo, 12 around Kriva Palanka, 12 around Probistip and 14 around Gevgelija and Valandovo. Additionally, sera from 6 five-weeks-old parent chickens from Belimbegovo Poultry Farm were serologically tested.

Serological tests

Presence of antibodies against eight avian viruses were detected: Newcastle disease (ND) virus, Avian influenza (AI) strain H5 and H7, infectious bronchitis (IB) strain M41, infectious bursal disease IBD, Marek's disease (MD) strain HVT, infectious laryngotracheitis (ILT), egg drop syndrome (EDS) and turkey rinotracheitis (TRT). Presence and antibody titer against NDV, AIV, IBV and EDS was checked by Haemagglutination Inhibition (HI) test and for IBDV, MDV, TRT and ILT with Virus Neutralization (VN) test.

Haemagglutination Inhibition (HI) test

Standard β procedure was performed in 96 well plates. Briefly, 25 μ l of Phosphate buffer saline (PBS) were added in all wells. 25 μ l of each examined serum was added in the first row and double dilutions were made (1,2,3 etc. \log_2). 25 μ l of antigen suspension with 4HA was added in each well and after 10 minutes incubation 25 μ l of 1-% erythrocyte suspension was dispensed. Control sera were added to each plate. Plates were read after 30 minutes. The highest dilution of the sera that inhibited

ВОВЕД

Живинарството во Македонија е значаен дел од сточарството на земјата. Постојат фарми со капацитет од 2.5 милиони еднодневни пилиња кои се одгледуваат на под или во кафези и фарми за 2.5 милиони несилки во кафези.

Покрај добро развиениот систем на интензивно одгледување, непознат број на селска живина се одгледува во домаќинствата. Таа живина вообичаено не се вакцинира (освен во некои случаи против АЧ) и е приемлива за голем број на вирусни и бактериски болести а со тоа и потенцијален извор за заразување на живината во фармите.

Во овој труд го испитуваме присуството на антитела против неколку вирусни болести во серумите од селска живина како начин да индиректно добиеме повеќе податоци за здравствениот статус на популацијата и птичјите вируси кои циркулираат во Македонија.

МАТЕРИЈАЛ И МЕТОДИ

Серуми

Крв беше земена од живина од различна старост, изведени од јајца од родители кои не припаѓаат на комерцијални хибриди и одгледувани во домашни услови во селата. Вака избраните единки никогаш не се вакцинирани освен во некои случаи против Атипичната чума бидејќи вакцина од 25 дози е достапна на пазарот. За жал неможеме да добиеме податоци дали живината од која се земени мострите крв е или не е вакцинирана против АЧ.

Земени се 15 проби крв од селата околу Неготино, 15 околу Струга, 19 околу Тетово, 12 околу Крива Паланка, 12 околу Пробиштип и 14 околу Гевгелија и Валандово. За споредување се земени и серуми од 6 родителски пилиња од фармата Белимбегово.

Серолошки испитувања

Од пробите крв е издвоен серумот и замрзнат до испитувањето.

Беше испитувано присуството на антитела против осум вируси и тоа против вирусот на: Атипична чума (АЧ), Авијарна инфлуенца (АИ) (Х5и Х7), Заразниот бронхитис (ЗБ) и Синдромот на пад на несивост (ЕДС 76) со тест на инхибиција на хемаглутинација и против вирусите на Заразната болест на бурзата (ЗББ), Мареквата болест (МБ) (ХВТ сој), Заразен ларинготрахеитис (ЗЛТ) и Мисиркин ринотрахеитис (МРТ) со вирус неутрализационен тест.

the heamagglutination of the erythrocytes by the antigen was considered as a titer.

Virus neutralization test

Cell culture of Chicken Embryo Fibroblasts (CEF) or Chicken Embryo Liver Cells (CELC) was prepared from 9-day-old SPF chickens embryos (Valo SPF Lohman Tierzucht GMBH). Cells were grown in 25-ml bottles in BEM with 5% fetal calf serum.

Twenty-five μ l of Basal Eagle Medium (BEM) was added in all 96 wells plate. Double dilutions of the sera were made from the row A2 to A11. Twenty-five μ l of virus suspension previously diluted to 100 TCID₅₀ was added in columns A2-A12 and plate incubated in CO₂ incubator for one hour at 37°C. Fifty (50) μ l of cell suspension was dispensed in all wells. In the next seven days plates were examined daily. The highest dilution of the sera that inhibited the occurrence of CPE was considered a titer. Column A1 was a cell control and column A12 was virus control.

Sera, according to the obtained titer, were divided in three groups: negative, with titer from 1 log₂ to 4 log₂ and with titer from 5 log₂ to 8 log₂.

RESULTS AND DISCUSSION

The serological methods used, could not detect presence of antibodies in any of examined sera against AI, EDS and TRT.

Тест на инхибиција на хемаглутинација

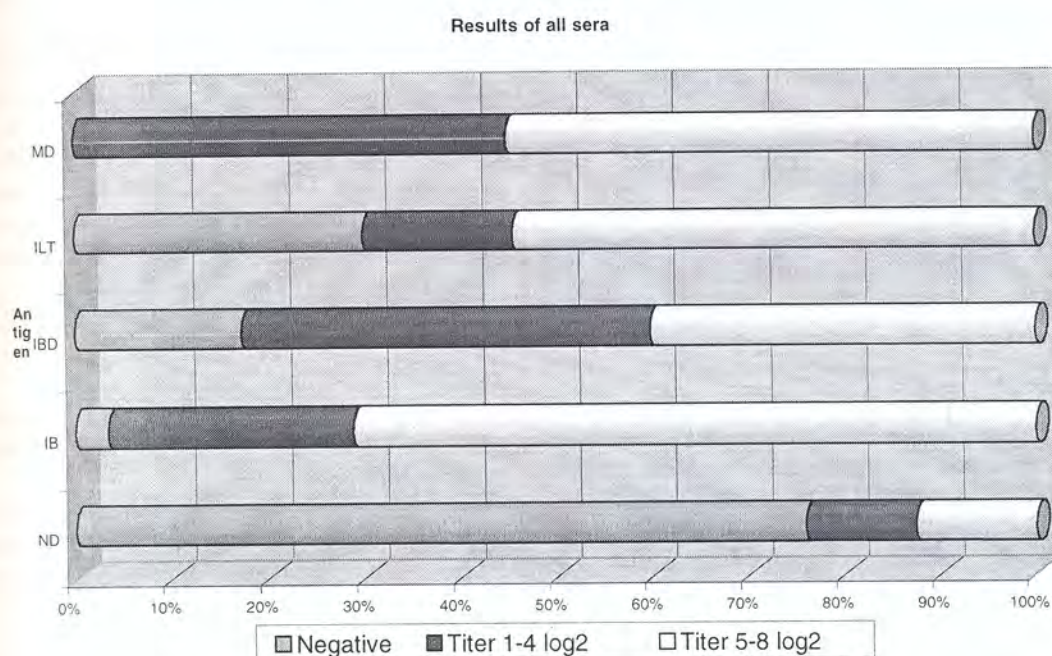
Изведувана е стандардната β процедура во плочи со 96 базенчиња. Накратко, 25 μ l фосфатен пуфериран раствор е додаден во сите базенчиња. По 25 μ l од секој испитуван серум е додаден во првиот ред и направени се двојни разредувања (1,2,3 итд. log со основа 2). Дваесет и пет μ l од вирусната суспензија со 4ХА единици се додадени во секое базенче и по 10 минути инкубација се доадени 25 μ l 1% раствор од еритроцити. Беа додадени и контролни серуми во секоја плоча. Плочите беа читувани по 30 минути. Највисокото разредување на серумите кое ја инхибира хемаглутинацијата на еритроцитите се сметаше за титар на испитуваниот серум.

Вирус неутрализациски тест

Култури од примарни клетки на пилешки ембрионални фибробласти и пилешки ембрионални клетки од црн дроб беа приготвени од 9 денови стари пилешки SPF ембриони (Valo SPF Lohman Tierzucht GMBH). Клетките беа ставени да растат во 25 милилитарски флакони со Базален медиум и 5% фетален говедски серум.

Дваесет и пет μ l од Базалниот медиум беа додадени во секое базенче од плочата. Двојни разредувања на 25 μ l од серумот беа направени во редовите од A2 до A11. По 25 μ l од вирусната суспензија, претходно разредена да содржи 100 TCID₅₀ беа додадени во колумните од A2 до A12 и плочите

Chart 1 – Summary of the results of all sera from backyard poultry



Out of 87 sera, 21 were positive and 66 negative against ND, 84 positive and 3 negative against IB, 72 sera had antibodies against IBD and 15 were negative, 54 sera were positive against ILT and 23 were negative (10 sera give doubtful results and unfortunately there was no serum left to repeat the test) and all of the examined sera had antibodies against MD. In the same time, antibodies against ND, IB, IBD, ILT, EDS and MD were detected in the sera collected from the parent chicken flock. The results are given in the chart below.

The health control of the backyard poultry is not systematic in Macedonia. In most circumstances the veterinarians are not in a position to record mortality and to

инкубирани во CO₂ инкубатор еден час. Педесет μ l од суспензијата на клетки беше потоа додадена во сите базенчиња на плочата. Плочите беа набљудувани секој ден во текот на наредните седум денови. Највисокото разредување на серумот кое ја инхибираше појавата на цитопатоген ефект се сметаше за титар на испитуваниот серум. Колумната A1 беше клеточна контрола а колумната A12 контрола на вирусот.

Серумите, во однос на добиените вредности на титарот, беа поделени во три групи: негативни, со титар од 1 log₂ до 4 log₂ и со титар од 5 log₂ до 8 log₂.

Table 1 Positive and negative sera

	ND		IB		IBD		ILT		MD	
	negat	posit	negat	posit	negat	posit	negat	posit	negat	posit
Negotino	13	2	0	15	1	14	2	9	0	15
Struga	12	3	0	15	1	14	4	10	0	15
Tetovo	8	11	0	19	5	14	0	16	0	19
K. Palanka	12	0	0	12	4	8	12	0	0	12
Probistip	11	1	0	12	0	12	2	8	0	12
Valandovo and Gevgelija	10	4	3	11	4	10	3	11	0	14
Belimbegovo	6	0	0	6	0	6	0	6	0	6

make diagnosis in such flocks. Furthermore, carcasses are not properly thrown away by owners, which creates a possibility for an easy spread of the infectious diseases.

From epizootiological point of view, the absence of antibodies against AI, EDS and TRT is good result.

Percentage of positive sera against ND was not high and some could be considered as result of vaccination. However there are repeated cases of ND outbreaks in backyard chickens confirming the presence of the virus in the field. At the major poultry farms, where vaccination protocols are strictly followed, there were no outbreaks of ND in the past 20 years. Therefore, in order to prevent possible spread of NDV and to eradicate the disease in the country, vaccination must be applied to backyard chickens as well.

The presence of IBD virus in Macedonia is well known (1). Repeated vaccinations have been introduced few years ago and "all in all out" principle are obligated. Moreover if an IBD outbreak occurs, there is an effective policy of non- introducing new flocks at the farm in a period of 6 months. So far the results are promising, but it is certain that IBDV will continue to threaten poultry farmers in Macedonia. It should be emphasized here that vaccination of backyard chickens against IBD must be introduced to completely control the disease.

РЕЗУЛТАТИ И ДИСКУСИЈА

Со серолошките тестови кои ги користевме не можевме да откриеме присуство на антитела против АИ, ЕДС и МРТ во испитуваните серуми.

Од вкупно 87 серуми, 21 беа позитивни а 66 негативни против АЧ, 84 позитивни и 3 негативни против ЗБ, 72 серуми имаа антитела против ЗББ а 15 беа негативни, 54 серуми беа позитивни против ЗЛТ а 23 беа негативни (10 серуми дадоа сомнителен резултат и за жал немаше доволно серум да се повтори тестот) и сите испитани серуми имаа антитела против МБ. Во исто време се откриени и антитела против АЧ, ЗБ, ЗББ, ЗЛТ, ЕДС и МБ во серумите на родителските пилиња. Резултатите се прикажани во графикот.

Во табелата се дадени бројот на позитивните и негативните серуми за секој антиген и за секое место на земање.

Контролата на здравствената состојба на селската живина во Макеонија не е систематска. Ветеринарите во најголемиот број случаи не се во можност да ја дијагностицираат причината за угнување во овие јата. Покрај тоа, мрштите се фрлаат непрописно од страна на сопствениците со што

The high number of positive sera against IB virus is somehow a surprise, especially since the disease has not been recognized on poultry farms. In the intensive production, vaccination against IB is common measure and the results made it obvious that IB could become a problem in the future, and deserves more attention. We are aware that new variant strains emerged in Europe and elsewhere (3,5).

Positive sera against MD virus was an expected result (1). However, serological methods can not give any data about the pathogenicity of the viruses that are circulating in backyard chickens. Attention has been pointed out recently to very virulent + MDV strains, isolated in some countries in Europe (6). So far, the good vaccination practice in hatcheries and carefully selected vaccines did prevent MDV outbreaks in the poultry farms in Macedonia.

First time that even indirectly the presence of ILT virus, has been detected in Macedonia. In neighboring Greece vaccination against ILT is a common measure. There was a report of ILT outbreak in Yugoslavia from chickens imported from Greece, but the disease was located at one farm and did not spread further, and vaccination was not introduced among chicken flocks in Yugoslavia (4). Additional examination is needed to assess the need of ILT vaccine introduction.

The abovementioned data is a useful start to change the strategy in backyard chickens health control and to improve existing one at farms. In the future more samples should be collected as well as direct isolation of the viral pathogens to confirm presence of certain disease.

ACKNOWLEDGEMENT

I would like to thank the colleagues from the veterinary stations in Tetovo, Negotino, Kriva Palanka, Probistip, and Struga as well as from poultry farms Valandovo, Gevgelija and Belimbegovo for their help in this research.

се зголемува можноста за ширење на заразните болести.

Отсуството на антитела против АИ, ЕДС и МРТ е добар резултат од епизоотиолошка гледна точка.

Процентот на позитивните серуми против АЧ не е висок и кај некои од серумите титрите можат да се сметаат за вакцинални. Од друга страна постојат повеќе случаи на појава на АЧ кај селската живина со што се потврдува присуството на вирусот на теренот. Во изминатите 20 години нема појава на АЧ на големите фарми во земјата каде што стриктно се следи програмата за вакцинација. Неопходна е вакцинација на селската живина со што ќе се спречи можното ширење на болеста и ќе се придонесе кон нејзина ерадикацијата.

Присуството на вирусот на ЗББ во Македонија е добро познат податок (1). Неколкукратна вакцинација е воведена како редовна мерка заедно со all in all out принципот на одгле дување. Покрај тоа на фармите каде се појавила болеста се препорачува да не се вселуваат нови пилиња во наредните 6 месеци. Резултатите досега се добри но факт е дека сепак оваа болест ќе ги загрозува фармите и во иднина. Би сакале да нагласиме дека е неопходна вакцинација и на селската живина за да може болеста што покомлетно да се контролира.

Високиот процент на позитивни серуми против ЗБ е помалку изненадување со оглед на тоа што оваа болест не е регистрирана на поголемите фарми. Вакцинацијата против ИБ е редовна пракса и очигледно е дека ЗБ може да се појави како проблем кој заслужува поголемо внимание во иднина. Постојат податоци за варијатни соеви кои се појавуваат во Европа и на други места (3,5).

Очекувавме позитивни серуми против МБ (1,2). Од друга страна, користените серолошки методи неможат да ни дадат никаков податок за патогеноста на вирусите кои циркулираат на теренот кај селската живина. Од неодамна особено внимание се посветува на појавата на високовирulentни соеви на вирусот на МБ кои се изолирани од некои земји во Европа (6). Добрата вакцинација во инкубаторските станици и изборот на вакцините засега се успешни во заштитата на живината на фармите во Македонија.

Ова е прв случај на индиректно регистрирање на појава на вирусот на ЗЛТ во Македонија. Во соседна Грција вакцинацијата е редовна мерка. Постои и случај на појава на ЗЛТ кај живина во Југославија увезена од Грција, но болеста беше лоцирана на една фарма и не се прошири, па засега не се применува вакцинација на живината во Југославија (4). Подетални истражувања се неопходни пред да се воведат вакцинација против ЗЛТ како редовна мерка.

Добиените резултати се корисни и се добар почеток за промена на стратегијата во здравствената заштита на селската живина и за подобрување на постојната на фармите. Неопходно е да се собере поголем број на проби како и да се направи обид за директна изолација на вирусите за потврдување на одредени болести.

БЛАГОДАРНОСТ

Би сакал да се заблагодарам на колегите од ветеринарните станици во Тетово, Неготино, Крива Паланка, Пробиштип и Струга како и од живинарските фарми во Валандово, Гевгелија и Белимбегово кои ми помогнаа во собирањето на серумите.

REFERENCES

- 1) Dodovski M, Mitevski D, Prodanov R, Dodovska Katewrina, Lukarev T The health status of the poultry in the Republic of Macedonia in the period from 1993 to 1997, VI Macedonian Poultry Days, Ohrid 1998
- 2) Gagić Maja, T. Palić, D. Orlić: Ispitivanja raširenosti virusa Marekove bolesti u jatima pilića lakih i teških hibrida. Živinarstvo, Br. 4-6, Str. 43-46, 1993.
- 3) Miljković Biljana, T. Palić, Maslić Strižak Danka, Voja Ivetić, Ilić Živka, Spalović Ljiljana. Serokonverzija titra antitela prema virusnom antigenu infektivnog bronhitisa tokom dvogodišnjeg serološkog ispitivanja. Živinarstvo, VI-VII, str. 103-107, 2000.
- 4) Miljković Biljana, Voja Ivetić, Maslić Strižak Danka i Ilić Živka: Pojava Infektivnog laringotraheitisa kod nosilja konzumnih jaja. III Jugoslovenski Simpozijum "Nauka u živinarstvu", Vrnjačka Banja, Zbornik kratkih sadržaja 18-20, Nov. 1998.
- 5) Miljković Biljana, Ilić Živka, Gagić Maja: Infektivni bronhitis na farmama konzumnih nosilja. Živinarstvo Br. 10-11, Str. 93-95, 1994.
- 6) Witter R.L.: Increased virulence of Mrak's disease virus field isolates. Avian Disease 41: 149-163, 1997.