

Evaluación de la presencia de receptores celulares al virus de Influenza Aviar en oviductos de aves sujetas a muda forzada usando inmunofluorescencia

Elizabeth Castillo-Villanueva¹

0000-0001-8161-5565

Félix Sánchez-Godoy²

0000-0002-8764-5762

Magdalena Escorcía^{2*}

0000-0002-3936-4907

¹ Departamento de Microbiología y Parasitología,
 Laboratorio de Virología, Facultad de Medicina,
 Universidad Nacional Autónoma de México,
 Av. Ciudad Universitaria, No. 3000,
 Col. Ciudad Universitaria, Delegación Coyoacán,
 Cd. de México, 04510.

² Departamento de Medicina y Zootecnia de Aves,
 Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia,
 Universidad Nacional Autónoma de México,
 Av. Ciudad Universitaria, No. 3000,
 Col. Ciudad Universitaria, Delegación Coyoacán,
 Cd. de México, 04510.

***Autor para correspondencia:**

Tel: + 52-55-56-22-58-68

Correo electrónico:

magdaesc@unam.mx

Resumen

Durante el 2012, un brote de Influenza Aviar de Alta Patogenicidad ocasionado por el subtipo H7N3, en México, infectó y ocasionó la muerte o el sacrificio de alrededor de 22 millones de aves ponedoras. Durante este periodo, el principal desafío de los avicultores fue asegurar el flujo de comercialización del huevo. Además de los protocolos sanitarios y de vacunación, se implementaron manejos de muda forzada en la zona afectada. Este manejo aseguró el mantenimiento de la producción de huevo en zonas cuarentenadas, pues disminuyó la mortalidad de las parvadas infectadas y reestimuló el retorno a la producción normal de huevo. Para entender cómo la muda forzada redujo la mortalidad de las aves infectadas, examinamos la distribución del receptor del virus de Influenza Aviar en el oviducto de gallinas sujetas a muda forzada. Evaluamos si los cambios en el tracto reproductivo causado por la muda forzada disminuyen la expresión del receptor específico en la membrana celular. La presencia de receptores específicos determina la susceptibilidad del hospedador al virus de Influenza. Utilizamos la técnica de inmunofluorescencia con la lectina *Maackia amurensis* para identificar la presencia del receptor viral en cortes histológicos de oviductos de aves en producción y en oviductos de aves con muda forzada. Los resultados mostraron la presencia y distribución de los receptores a Influenza Aviar. Observamos una fuerte señal de los receptores en los cortes histológicos de los oviductos de aves en producción. Por el contrario, la señal fue baja en los oviductos de aves sometidas a muda. Estos resultados demuestran una disminución en el número de receptores de aves sometidas a muda forzada. La falta de receptores afecta la infección y la replicación del virus, así como los daños inducidos por el virus en el oviducto, lo que podría ayudar a explicar la observación en el campo de que las aves infectadas con Influenza Aviar y sometidas a muda forzada sobreviven más que las aves a las que no se les somete a muda.

Palabras clave: influenza aviar, inmunofluorescencia, muda forzada, oviducto, pelecha, producción de huevo.

Recibido: 2016-10-25

Aceptado: 2016-12-02

Publicado: 2017-02-17

Información y declaraciones adicionales
 en la página 8

© Derechos de autor:

Elizabeth Castillo-Villanueva et al. 2017

acceso abierto 



Distribuido bajo una Licencia Creative Commons
 Atribución 4.0 Internacional (CC-BY 4.0)

Introducción

El 21 de junio de 2012, las autoridades mexicanas reportaron la presencia del virus de Influenza Aviar de Alta Patogenicidad (IAAP) subtipo H7N3 en tres granjas de ponedoras comerciales en el estado de Jalisco, México. Las aves afectadas mostraron signos clínicos como plumas erizadas, letargo, anorexia, postración, depresión y muerte aguda.¹ Las edades de las aves infectadas fluctuaron entre las 32, 72, 75, 84 y 94 semanas de edad. Para prevenir la diseminación de la enfermedad, las autoridades sanitarias implementaron la cuarentena, la restricción de los movimientos tanto de los productos como de los subproductos en la zona donde se identificaron los brotes. Se inició la vigilancia epidemiológica para determinar la diseminación viral, el sacrificio humanitario de las aves sobrevivientes de las granjas afectadas y la desinfección de áreas o establecimientos infectados.²

A pesar de las medidas implementadas, el virus continuó diseminándose en diferentes granjas avícolas de la zona, así como en dos estados más de la República Mexicana.³ La infección afectó de manera importante a gallinas ponedoras, reproductores, y aunque en forma escasa, a granjas productoras de pollo de engorda. En el caso de ponedoras, y tras la implementación de la vacunación, las parvadas vacunadas e infectadas presentaban mortalidad baja, sin embargo, el impacto más negativo del virus, fue en los porcentajes de producción gallina-día, los cuales, una vez que descendían, no se recuperaban. El huevo presentaba mala calidad interna y externa, y estaba deforme.⁴ El primer paso para que el virus de Influenza infecte y se propague con éxito dentro de un huésped, es la unión de la Hemaglutinina (HA) a los receptores de superficie en la célula huésped, esta interacción ocurre con una afinidad y especificidad significativas.^{5,6} La presencia de receptores del virus de influenza en los órganos de las aves es vital para el éxito de la infección por el virus de influenza.⁵⁻⁷

En Jalisco, además de las medidas implementadas y ante el desafío de asegurar el flujo de comercialización del huevo, un producto de la canasta básica del mexicano, se tomaron medidas de manejo como la muda forzada en aves de zonas cuarentenadas.⁸ La muda forzada implica disminuir la ingesta calórica y la cantidad de horas luz a la que se exponen los animales para detener la producción de huevo. Con estos manejos, el tracto reproductor se rejuvenece y nuevamente vuelve a producir huevos.⁹

Los productores de huevos comerciales utilizan la muda para optimizar y sincronizar sus parvadas de ponedoras. Históricamente, las aves ponedoras producían durante un ciclo de postura y se les sacrificaba¹⁰; con la muda forzada, las aves ponedoras pueden tener un segundo ciclo de producción, ponen un huevo más grande y con un cascarón más resistente en comparación con los huevos producidos en el primer ciclo.

Grupos de aves vacunadas que comenzaron a experimentar mortalidad, de inmediato fueron sometidos a muda forzada; tanto la mortalidad como la producción de huevos se detuvieron. Después se volvió a estimular la producción y la tasa de producción de huevos de gallina-día aumentó hasta 90 %, a diferencia de la alta tasa de mortalidad que continuó en las parvadas vacunadas que iniciaron con mortalidad y no se sometieron a muda forzada, mostrando una tasa de producción de huevos gallina-día de 50 % o menos (comunicación personal del Dr. Ramón López). La muda forzada también evitó las deformidades de los huevos y preservó su calidad interna y externa.

La muda forzada es una práctica controversial debido a la percepción que se tiene en relación con los métodos para producirla. Esta práctica puede realizarse con manejos adecuados de cuidado animal que son mínimamente estresantes para las aves, con lo que se promueve con éxito la producción de huevos en situaciones de emergencia, como lo sucedido durante el brote de HPAI en México. Nuestro objetivo fue explicar por qué las aves infectadas con HPAI sometidas a muda forzada tuvieron tasas de mortalidad más bajas que las no sometidas a muda forzada.

Nuestra hipótesis fue que la muda forzada provocó atrofia fisiológica del aparato reproductivo del ave, lo que generó cambios en la densidad de receptores para el virus de la Influenza Aviar (IA) en el revestimiento del tracto reproductivo de las aves, lo que las protegió de la infección por el virus de la IAAP. Para demostrar esta hipótesis, determinamos si los cambios del tracto reproductivo causados por la muda forzada provocaban una disminución en la expresión del receptor específico al virus de IA. Tales efectos prevendrían la infección y la replicación con el virus de IAAP, esto permitiría a las aves alcanzar sus tasas de producción óptimas sin afectar la calidad interna y externa de los huevos.

Materiales y métodos

Colección de muestras

Para asegurar la ausencia de infección de IA en las parvadas de las que se obtuvieron las muestras para esta nota, todas las aves tanto en producción como las inducidas a muda forzada, se obtuvieron del estado de Nuevo León, estado identificado oficialmente como libre a IA tanto de baja patogenicidad como de alta patogenicidad de los subtipos H5N2 y H7N3 presentes en México.¹¹

Se obtuvo un grupo de 20 aves ponedoras sanas de 30 semanas de edad de la estirpe Bovans White en producción, denominado en lo sucesivo grupo en producción. Se les sacrificó de forma humanitaria con autorización del encargado de la granja,¹² y se les realizó la necropsia. Se recuperó el oviducto de cada una. Se obtuvieron cortes de la región del mágnum y del útero, que se incluyeron en solución de formalina buferada al 10 % para su posterior procesamiento. Solo se tomaron muestras de estas dos regiones, porque observamos que las ponedoras infectadas por el virus de IAAP H7N3 producían huevos con mala calidad de albúminas (mágnum) y mala calidad de mineralización (útero).¹³

Un segundo grupo, de aves en muda forzada, incluyó aves sanas de la estirpe Bovans White que concluyeron su primer ciclo de producción y a las que se les indujo a muda forzada (70 semanas de edad). Se seleccionaron 20 aves y se les practicó el sacrificio humanitario con autorización del encargado de la granja.¹² Se realizó la necropsia y se recuperaron los oviductos. Por la atrofia de los oviductos, las regiones de estos órganos no se pudieron diferenciar. Por esta razón, se obtuvieron cortes a diferentes distancias, que se incluyeron en solución de formalina buferada al 10 % para su posterior procesamiento.

Tinción de hematoxilina-eosina (HE)

Para visualizar las estructuras que forman las diferentes regiones de los oviductos y sus diferencias entre aves en producción y aves en muda forzada, los oviductos

de ambos grupos de aves de acuerdo con los protocolos establecidos se tiñeron con HE.¹³

Ensayo de Inmunofluorescencia (IF)

Para demostrar la presencia del receptor de IA, acoplamos al fluoróforo FITC (M 1061-50F) (US Biological Life Science, México)¹⁴ la lectina de *Maackia amurensis* (MAA), que reconoce específicamente el ácido siálico en una conformación α 2-3. Las muestras fijadas en formalina las incluimos en parafina y, a partir de este material, obtuvimos cortes de 3 μ m de grosor y las colocamos en portaobjetos cargados positivamente (Klingon HIER Slides, Biocare Medical, México). Mantuvimos los portaobjetos a 57 °C por dos horas. Desparafinamos las secciones mediante una incubación en xilol durante 15 minutos a temperatura ambiente, a continuación se rehidrataron mediante una serie graduada de etanol y agua. Después de la hidratación, las expusimos al antígeno de recuperación con 1X DIVA Decloaker (Biocare Medical, México) en una olla a presión durante 10 minutos.

Incubamos los portaobjetos durante la noche a 4 °C con FITC-MAA, que reconoce ácido siálico α 2-3, diluido 1:1000 en Da Vinci Green Diluent buffer (Biocare Medical, México). Los lavamos tres veces con 1X de PBS. Incubamos de nuevo los portaobjetos, ahora por 20 minutos con 4'-6-diamidino-2-phenylindole dihydrochloride (DAPI) (DAPI; Sigma-Chemical, México) para teñir el núcleo celular.

Preparamos los portaobjetos con medio de montaje VECTASHIELD® (Laboratorios Vector, México) y los examinamos con un microscopio confocal Leica TCS SP5 (Leica Microsystems, Wetzlar, Germany). Para los controles negativos, reemplazamos la lectina MAA con 1X PBS y acoplamos un segundo anticuerpo al fluoróforo FITC (Alexa 488, Invitrogen, México).

Resultados y discusión

Los datos reportados a continuación los encontramos en todos los oviductos de las aves del estudio. En los cortes histológicos del grupo en producción, la mucosa del mágnum presentó epitelio cilíndrico pseudoestratificado ciliado. Por debajo del epitelio, observamos glándulas tubulares secretoras con núcleos picnóticos basales y un citoplasma ocupado con gránulos acidófilos (figura 1A). En el útero, la mucosa presentaba un epitelio cilíndrico pseudoestratificado ciliado y por debajo una cantidad abundante de glándulas de la cáscara (figura 1B).

En los oviductos del grupo de muda forzada, notamos atrofia moderada caracterizada por pliegues de la mucosa pequeños y estrechos. El revestimiento epitelial disminuyó de tamaño, el material secretor en el citoplasma fue mínimo y solo hallamos unas pocas células caliciformes. En la porción glandular, detectamos glándulas escasas y poco desarrolladas caracterizadas por núcleos redondos eucromáticos con pequeñas cantidades de citoplasma, y una cantidad moderada de tejido conectivo (figuras 1C y 1D). Los resultados descritos anteriormente son consistentes con los resultados reportados por Eroschenko y Wilson.¹⁵

En la inmunofluorescencia, detectamos abundante expresión del receptor del virus de IA en las áreas apicales de las células de la mucosa del epitelio, en las células epiteliales de los ductos glandulares de las regiones de mágnum y de útero

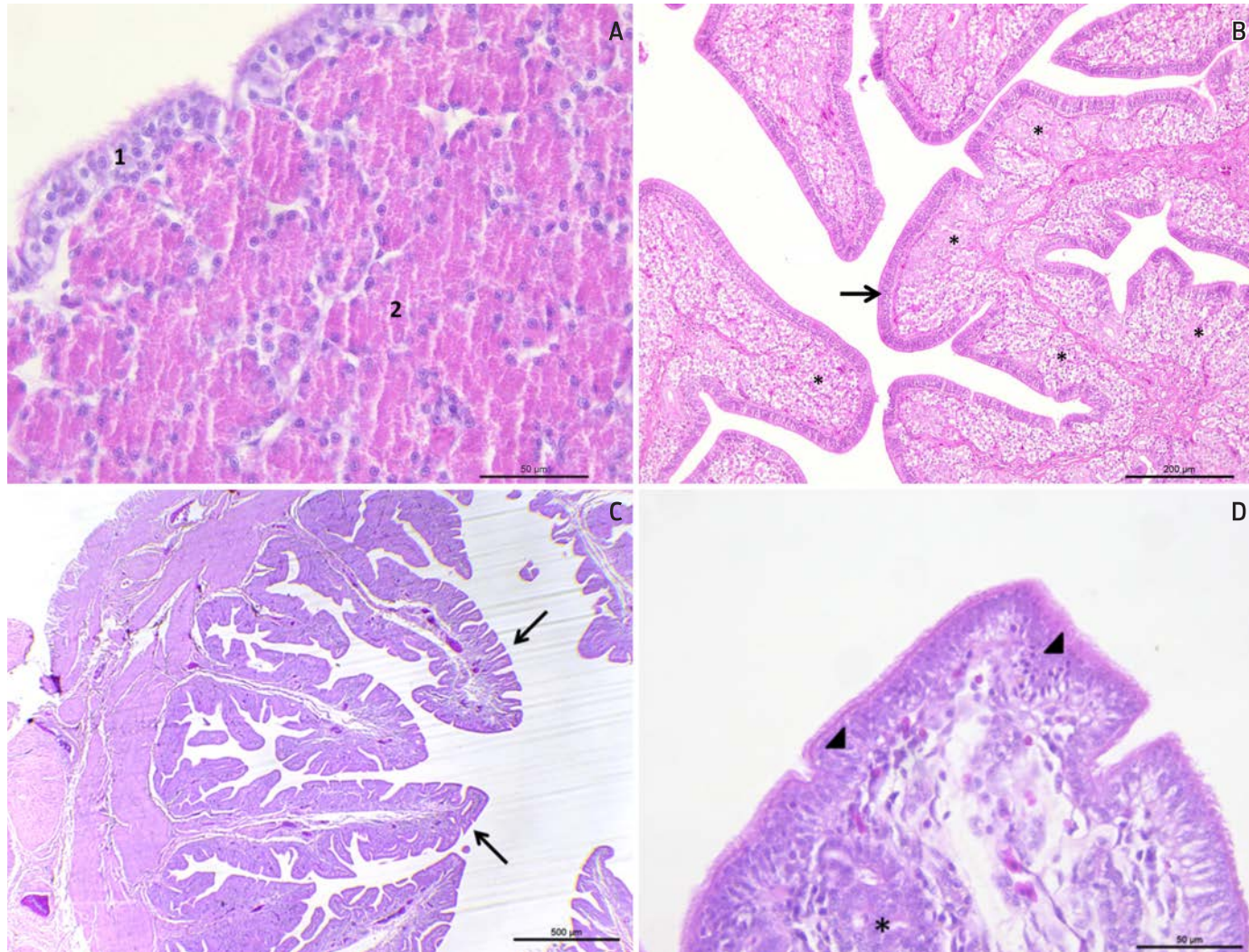


Figura 1. A. Fotografía de corte histológico de la región de magnum de gallinas sanas en producción. La mucosa presenta epitelio cilíndrico pseudoestratificado ciliado (1), por debajo del epitelio, observamos glándulas tubulares secretoras con núcleos picnóticos basales y un citoplasma ocupado con gránulos acidófilos. Tinción HE. Barra: 50 μ m. B. Fotografía de un corte histológico de la región del útero de gallinas sanas en producción. La mucosa (flecha) presentaba un epitelio cilíndrico pseudoestratificado ciliado y por debajo una cantidad abundante de glándulas de la cáscara con núcleos activos. Tinción HE. Barra: 200 μ m. C. Fotografía de un corte histológico de oviducto de gallinas sanas, sometidas a muda forzada. Se observa atrofia de la mucosa, caracterizada por pliegues de la mucosa pequeños y estrechos (flecha). Tinción HE. Barra: 500 μ m. D. Fotografía de un corte histológico de oviducto de gallinas sanas, sometidas a muda forzada. Se observa hiposecreción en revestimiento epitelial (cabeza de flecha). En la porción glandular detectamos glándulas escasas y poco desarrolladas (asterisco). Tinción HE. Barra: 50 μ m.

del oviducto del grupo de aves en producción (figuras 2A y 2B). Estos resultados concuerdan con los obtenidos por Wang et al.¹⁶

En los oviductos de aves sometidas a muda forzada, hallamos una disminución de la intensidad de la señal del receptor al virus de IA en comparación con la señal en los oviductos de las aves en producción. Este fenómeno puede explicarse por la atrofia de este órgano como consecuencia de la muda forzada (figura 2C). La presencia de receptores en las células epiteliales de los conductos glandulares es la clave para la infección del tracto reproductivo por la viremia que sufre el virus de IA. Wang et al.¹⁶ realizaron un análisis de regresión lineal y mostraron que el coeficiente de correlación entre la presencia de receptores del virus de IA y la carga viral fue 0.9 con una pendiente de 3.5, lo que indica que estas variables están fuertemente asociadas.

En conjunto, las pruebas presentadas por Wang et al.¹⁶ y nuestros resultados, sugieren que en aves sometidas a muda forzada, el virus de la IA no es capaz de replicarse en el tracto reproductivo o se replica escasamente. Por lo tanto, en las aves sometidas a muda forzada, su carga viral fue baja, secundaria a la falta de receptores en su tracto reproductivo, lo que les permitió que los anticuerpos estimulados por la vacunación previa evitaran el daño en el oviducto y en la calidad del huevo. Estos resultados contrastan con los datos obtenidos para las aves que fueron vacunadas pero que no fueron sometidas a muda forzada. García et al.¹⁷ evaluaron la concentración antigénica de las vacunas emulsionadas, utilizadas para vacunar a las aves contra esta infección, y mostraron la importancia de la carga antigénica para inducir una inmunidad adecuada en los desafíos de campo. Una pregunta que queda pendiente de contestar es

¿qué cantidad de antígeno de IAAP es necesario para causar daño al tracto reproductivo de las aves vacunadas sujetas a muda forzada?

No podemos concluir definitivamente que nuestra hipótesis es correcta, se necesitan más investigaciones. Específicamente, el siguiente paso obvio en la prueba de nuestra hipótesis sería la infección controlada de la IA en aves sometidas a muda. Además, otra variable importante a evaluar es el número de dosis de vacunación que se necesitan para reducir el nivel de excreción viral de aves vacunadas sometidas a muda forzada e infectadas con IA bajo condiciones controladas.

Conclusión

Nuestros resultados mostraron que la muda forzada disminuyó la presencia y distribución del receptor del virus de Influenza Aviar en los oviductos de gallinas ponedoras. Estos resultados sugieren que un método para contrarrestar las infecciones ocasionadas por el virus de Influenza Aviar en gallinas en riesgo de exposición viral, es implementar la muda forzada, tal como se llevó a cabo en la zona de cuarentena de México durante el brote de IAAP en el verano de 2012.

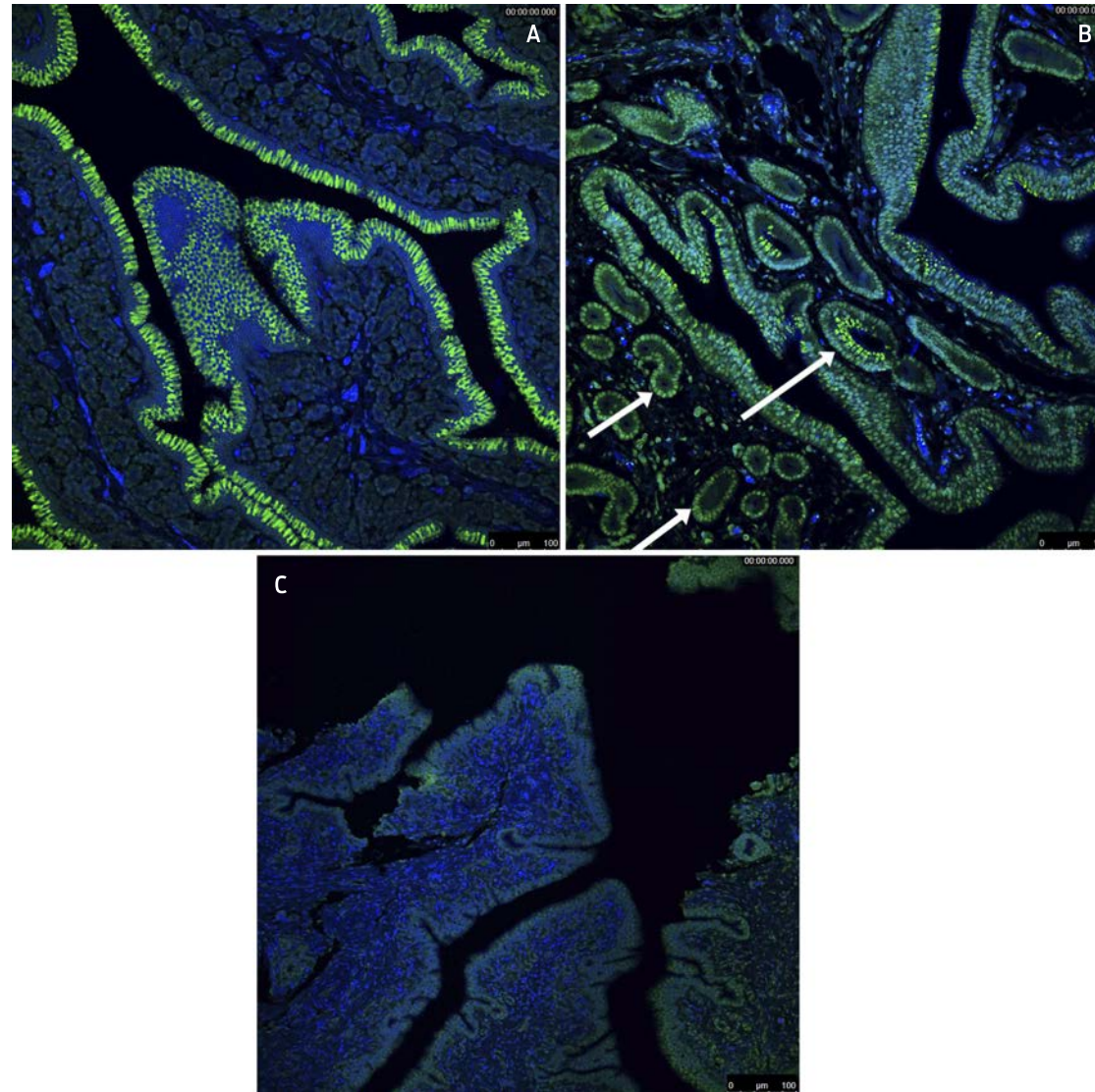


Figura 2. **A.** Se observa abundante expresión del receptor del virus de IA, marcado con fluorescencia verde manzana en las áreas apicales de las células de la mucosa del epitelio de la región del útero de oviductos de gallinas sanas en producción. Barra 100 µm. **B.** Receptores al virus de influenza (flechas), marcados por fluorescencia verde manzana, localizados en las células epiteliales de los ductos glandulares de la región de mágnun del oviducto del grupo de aves sanas en producción. Barra: 100 µm. **C.** Corte histológico de aves sanas sometidas a muda forzada. El receptor del virus de influenza, marcado con fluorescencia verde manzana, se observa en la región apical del epitelio de la mucosa; la intensidad de la fluorescencia es baja en intensidad a lo mostrado en la Figura 2A y 2B. Barr: 100 µm.

Financiamiento

Este estudio fue financiado por CONACYT: SALUD 2009-CO2-126619. Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia. Universidad Nacional Autónoma de México.

Agradecimientos

Los autores agradecen al MVZ Ramón López por su invaluable apoyo al permitirnos acceder a los registros de producción de las parvadas de ponedoras comerciales infectadas, y al MVZ Carlos Cubillas y MVZ Daniel Juárez Pérez, quienes nos ayudaron a obtener los órganos con los que se realizaron las técnicas que nos permitieron obtener los resultados publicados. Agradecemos a los técnicos María J.I Gomora, V Rodríguez-Mata y M Peña Rico por la asistencia técnica en el proceso histológico. Finalmente, agradecemos a la Dra. Patti Miller por los comentarios al manuscrito.

Conflictos de interés

Los autores declaran que no hay conflictos de interés.

Contribución de los autores

Magdalena Escorcía dirigió la investigación, diseñó la fase experimental del trabajo, analizó los datos y escribió parte del manuscrito. Elizabeth Castillo-Villanueva interpretó los resultados y escribió parte del manuscrito, y Félix Sánchez-Godoy interpretó los resultados y escribió parte del manuscrito.

Referencias

1. Organización Mundial de la Salud Anima [OIE]. Update on avian influenza Paris, France: OIE; 2012 [Available from: www.oie.int/en/animal-health-in-the-world/update-on-avian-influenza/2012/].
2. Diario Oficial de la Federación. Acuerdo Sanitario para la Erradicación de Influenza Aviar de Alta Patogenicidad H7N3. In: SAGARPA, editor. México D F: Secretaría de Gobernación; 2013.
3. Organización Mundial de la Salud Animal [OIE]. Update on avian influenza Paris, France: OIE; 2013 [Available from: <http://www.oie.int/es/sanidad-animal-en-el-mundo/actualizacion-sobre-la-influenza-aviar/2013/>].
4. Kapczynski DR, Patin-Jackwood M, Guzman SG, Ricardez Y, Spackmen E, Bertran K, et al. Characterization of the 2012 highly pathogenic avian influenza H7N3 virus isolated from poultry in an outbreak in Mexico: Pathobiology and vaccine protection. *J Virol*. 2013;87(16):9086-96. doi: 10.1128/JVI.00666-13.
5. Fouchier RA, Kawaoka Y, Cardona C, Compans RW, García-Sastre A, Govorkova EA, et al. Gain-of-function experiments on H7N9. *Science*. 2013;341(6146):612-3. doi: 10.1126/science.341.6146.612.
6. Skehel JJ, Wiley DC. Receptor binding and membrane fusion in virus entry: The influenza hemagglutinin. *Annu Rev Biochem*. 2000;69:531-69. doi: 10.1146/annurev.biochem.69.1.531.
7. Sasaki GL, Elli S, Rudd TR, Macchi E, Yates EA, Naggi A, et al. Human (α 2,6) and avian (α 2,3) sialylated receptors of Influenza A virus show distinct conformations and dynamics in solution. *Biochemistry*. 2013;52:7217-30. doi: 10.1021/bi400677n.
8. INEGI. Índice Nacional de Precios al Consumidor. In: Geografía INdEy, editor. México D. F.2016.

9. Sariözkan S, Güclü BK, Kara K, Gürçan S. Comparison of different molting methods and evaluation of the effects of postmolt diets supplemented with humate and carnitine on performance, egg quality, and profitability of laying hens. *J App Poult Res.* 2013;22(4):689-99. doi: 10.3382/japr.2012-00612.
10. Bell DD. Historical and current molting practices in the U.S. table egg industry. *Poult Sci.* 2003;82:965–70.
11. Organización Mundial de la Salud Animal [OIE]. Update on avian influenza Paris, France: OIE; 2016 [Available from: www.oie.int/en/animal-health-in-the-world/update-on-avian-influenza/2016/].
12. Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia. Norma Oficial Mexicana. Especificaciones técnicas para la producción, cuidado y uso de los animales de laboratorio. México D F: Universidad Nacional Autónoma de México; 2014.
13. Prophet EB, Mills B, Arrington JB, Sobin LH. *Laboratory Methods in Histotechnology* (Armed Forces Institute of Pathology). Washington D C, USA: American Registry of Pathology; 1992. 279 p.
14. França M, Stallknecht DE, Howerth EW. Expression and distribution of sialic acid influenza virus receptors in wild birds. *Avian Pathol.* 2013;42(1):60-71. doi: 10.1080/03079457.2012.759176.
15. Eroschenko VP, Wilson WO. Histological changes in the regressing reproductive organs of sexually mature male and female Japanese quail. *Biol Reprod.* 1974;11:168-79.
16. Wang JY, Chen ZL, Li CS, Cao X, Wang R, Tang C, et al. The distribution of sialic acid receptors of avian influenza virus in the reproductive tract of laying hens. *Molecular and Cellular Probes.* 2015;29:129-34. doi: 10.1016/j.mcp.2015.01.002.
17. García A, Johnson H, Srivastava DK, Jayawardene DA, Wehr DR, Webster RG. Efficacy of inactivated H5N2 influenza vaccines against lethal A/Chicken/Que-retaro/19/95 infection. *Avian Dis.* 1998;42(2):248-56.

Evaluation of the presence of avian influenza receptors in oviducts of forced moulting birds using immunofluorescence

Elizabeth Castillo-Villanueva¹
 0000-0001-8161-5565
Félix Sánchez-Godoy²
 0000-0002-8764-5762
Magdalena Escorcía^{2*}
 0000-0002-3936-4907

¹ Departamento de Microbiología y Parasitología,
 Laboratorio de Virología, Facultad de Medicina,
 Universidad Nacional Autónoma de México,
 Av. Ciudad Universitaria, No. 3000,
 Col. Ciudad Universitaria, Delegación Coyoacán,
 Cd. de México, 04510.

² Departamento de Medicina y Zootecnia de Aves,
 Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia,
 Universidad Nacional Autónoma de México,
 Av. Ciudad Universitaria, No. 3000,
 Col. Ciudad Universitaria, Delegación Coyoacán,
 Cd. de México, 04510.

***Corresponding author:**
 Tel: + 52-55-56-22-58-68
 Email address:
magdaesc@unam.mx

Abstract

During the 2012 highly pathogenic avian influenza outbreak in Mexico caused by the H7N3 subtype, infection led to the death of approximately 22 million laying hens. Thus, poultry farmers were faced with a challenge to ensure the continued commercial flow of eggs. In addition to implementing established sanitary protocols and vaccination programs, forced moulting management was utilized in the affected areas. This strategy guaranteed the maintenance of egg production in the quarantined areas by decreasing the mortality of the infected flock while re-stimulating egg production. To understand how forced moulting reduced mortality of the infected birds, we examined the distribution of the avian influenza receptor in the oviduct of hens subjected to forced moulting. We tested if changes in the reproductive tract caused by forced moulting generated a decrease in the expression of the specific virus receptor in the cell membranes. Host susceptibility to the influenza virus was determined by the presence of these specific receptors. We utilized immunofluorescence of the *Maackia amurensis* lectin to identify the presence of the virus receptor in histological sections of the oviducts of birds in egg production and birds undergoing forced moulting. The results showed the presence and distribution of the receptors for avian influenza. A strong signal of the receptor was observed in the histological sections of the oviducts of birds in egg production. Conversely, the signal was low in the oviducts of birds undergoing forced moulting. These results demonstrate a decrease in the number of receptors of birds subjected to forced moulting. A lack of receptors would affect virus infection and replication as well as virus-induced damage in the oviduct, which may help explain the observation in the field that birds infected with avian influenza and subjected to forced moulting have decreased mortality.

Keywords: avian influenza, immunofluorescence, forced moulting, oviduct, egg production.

Received: 2016-10-25
 Accepted: 2016-12-02
 Published: 2017-02-17

Additional information and declarations
 can be found on page 7

© Copyright 2017
 Elizabeth Castillo-Villanueva et al.

open access 



Distributed under Creative Commons CC-BY 4.0

Introduction

On June 21, 2012, Mexico officially reported the presence of the highly pathogenic avian influenza (HPAI) virus subtype H7N3 in three commercial egg laying farms in the state of Jalisco. The affected birds showed clinical signs of ruffled feathers,

lethargy, anorexia, prostration, depression, and acute death.¹ The ages of the infected birds were 32, 72, 75, 84, and 94 weeks. To prevent the dissemination of the disease, health authorities implemented a quarantine, restricting the movement of both products and by-products to and from the areas where the outbreaks were identified. They also initiated epidemiological surveillance to determine viral dissemination, humane slaughter of the surviving birds from the affected farms, and disinfection of infected areas or establishments.² Despite these implemented measures, the virus continued to disseminate to different poultry farms in the area and two additional states of Mexico.³ The infection significantly affected laying and breeding hens but had limited effects on farms producing broilers. Following the implementation of vaccination, the infected flocks of vaccinated laying hens exhibited decreased mortality. However, the virus's most significant impact was on the hen-day-egg production rates, which did not recover after their initial descent. Additionally, eggs exhibited poor internal and external qualities and deformities.⁴ A first step for influenza virus to successfully infect and propagate within a host is the binding of hemagglutinin (HA) to surface receptors in the host cell, which occur with significant affinity and specificity.^{5,6} Thus, the presence of influenza virus receptors in the organs of birds is vital to the success of influenza virus infection.⁵⁻⁷

In addition to the sanitary measures implemented in Jalisco, the forced moulting of birds was performed in the quarantined areas to further ensure the flow of eggs in the market, as eggs are considered a staple food in Mexico.⁸ Forced moulting involves decreasing the caloric intake and amount of daylight animals are exposed to in order to first stop egg production; afterwards, the reproductive track is rejuvenated and again begins to produce eggs.⁹ Commercial egg producers use moulting to optimize and synchronize their layer flocks. Historically, laying birds have been produced for one laying cycle and then subsequently culled¹⁰; with forced moulting, laying birds are used for a second production cycle that produces a larger egg with a more resistant shell compared to the eggs produced on the first cycle.

Groups of vaccinated birds that were beginning to experience increased mortality were immediately subjected to forced moulting; egg production was stimulated and the rate of hen-day-egg production increased up to 90 percent. In contrast, the high mortality rate continued in the vaccinated flocks that became infected and were not subjected to forced moulting, showing a hen-day-egg production rate of 50 percent or less (personal communication of Dr. Ramón López). Forced moulting also prevented egg deformities and preserved egg quality.

Despite the controversy behind forced moulting secondary to public perceptions of the production methods, this practice can be performed with proper animal care parameters that are minimally stressful to the birds while successfully promoting egg production, as observed during emergency situations, such as the last HPAI outbreak in Mexico, and ensure the commercial egg supply. We aimed to explain why HPAI infected birds undergoing forced moulting had lower mortality rates than birds not subjected to forced moulting. We hypothesized that forced moulting provoked physiological atrophy of the reproductive system, causing changes (i.e., receptor density for the avian influenza (AI) virus) in the lining of the reproductive tract of the birds that protected them from HPAI virus infection. To test this hypothesis, we determined if changes in the reproductive tracts of laying hens caused by forced moulting provoked a decrease in the expression of the specific receptor for

the AI virus. Such effects would prevent infection and replication with HPAI, allowing birds to reach their optimal production rates without affecting internal and external egg qualities.

Materials and methods

Sample collection

To ensure the absence of AI infection in the flocks from which samples for this study were obtained, all birds in either production or induced into forced moulting were obtained from the State of Nuevo Leon, Mexico, which was officially identified as free of both the low pathogenic and high pathogenic H5N2 and H7N3 subtypes of AI.¹¹ A group of 20 healthy laying hens aged 30 weeks from the Bovans White line was obtained (henceforth referred to as the production group). The hens were euthanized with the permission of the farm manager,¹² and necropsies were performed. The oviduct was isolated from each hen. Sections of the magnum region and the uterus were obtained and placed in a 10 % buffered formalin solution for processing. Samples were collected from these two regions because we observed that vaccinated and HPAI H7N3 infected laying hens produced eggs with poor albumin content (performed in the magnum) and mineralization (performed in the uterus).¹³ In a second group (henceforth referred to as the forced moulting group), a flock of healthy birds from the Bovans White line (75 weeks old) that had completed their first production cycle were induced into forced moulting. Twenty birds were randomly selected and euthanized with the permission of the farm manager.¹² Necropsies were performed, and the oviducts were recovered. The regions that comprised the organs could not be differentiated because they were atrophic. Therefore, sections were obtained at different distances and placed in a 10 % buffered formalin solution for processing.

Haematoxylin and Eosin (HE) Staining

To visualize the structures forming the different regions of the oviduct and the structural differences between birds in production and birds in forced moulting, HE staining was performed on the oviducts of both groups of birds according to standard protocols.¹³

Immunofluorescence (IF) Assays

To demonstrate the presence of the AI receptor, *Maackia amurensis* lectin (MAA), which specifically recognizes sialic acid in an α 2-3 conformation, was coupled to the FITC fluorophore (M1062-50F); US Biological Life Science, Mexico.¹⁴ The samples of the oviduct tissue were fixed in formalin and embedded in paraffin. Sections with 3 mm thickness were obtained and placed on positively charged slides (Klingon HIER Slides, Biocare Medical, Mexico). The slides were maintained at 57 °C for 2 hours. The sections were deparaffinized, incubated in xylol for 15 minutes at room temperature, and then rehydrated in a graduated series of ethanol and water. Following hydration, antigen retrieval was performed with 1X DIVA Decloaker (Biocare Medical, Mexico) in a pressure cooker for 10 minutes. The slides were incubated overnight at 4 °C with FITC-MAA, which specifically recognizes sialic acid α 2-3, diluted 1:1000 in Da Vinci Green Diluent buffer (Biocare Medical, Mexico).

Three washes were performed with 1X PBS. The slides were then incubated for 20 min with 4'-6-diamidino-2-phenylindole dihydrochloride (DAPI; Sigma-Chemical, Mexico) to stain cell nuclei. The slides were prepared with VECTASHIELD® mounting medium (Vector Laboratories, Mexico) and then examined with a Leica TCS SP5 confocal laser microscope (Leica Microsystems, Wetzlar, Germany). For the negative controls, MAA lecithin was replaced with 1X PBS and a secondary antibody coupled to the FITC fluorophore (Alexa 488, Invitrogen, Mexico).

Results and discussion

The data reported below was found in the oviducts of birds in this study. In the histological sections from the production group, the magnum mucosa was lined with a ciliated pseudostratified cylindrical epithelium. Underneath the epithelium, we observed tubular secretory glands with basal pyknotic nuclei and a cytoplasm occupied by acidophilic granules (Figure 1A). In the uterus, the mucosa was lined with a ciliated pseudostratified cylindrical epithelium that overlaid an abundant amount of eggshell glands (Figure 1B).

Moderate atrophy characterized by folds of the small and narrow mucosa was observed in the oviducts of the forced moulting group. The epithelial lining was decreased in size, the secretory material in the cytoplasm was minimal, and only a few caliciform cells were observed. In the glandular portion, scarce and poorly developed glands characterized by round, euchromatic nuclei with small amounts of cytoplasm were detected; a moderate amount of connective tissue was also observed (Figures 1C and 1D). The results described above are consistent with the results reported by Eroschenko and Wilson.¹⁵

In the immunofluorescence assay, we detected abundant expression of the AI virus receptor in the apical areas of the cells of the mucosal epithelium, in the epithelial cells of the glandular ducts of the magnum regions and in the uterus of the oviduct of the birds in production (Figures 2A and 2B). These results agreed with the results obtained by Wang *et al.*¹⁶ In the oviducts of birds subjected to forced moulting, a decreased signal intensity of the AI virus receptor was observed compared to the signal in the oviducts of birds in production. This phenomenon may be explained by the atrophy of this organ as a consequence of forced moulting (Figure 2C). The presence of AI virus receptors causes host cells to be susceptible to infection and thus plays an important role in viral pathogenesis. The presence of receptors in the epithelial cells of the glandular ducts is key for the infection of the reproductive tract and contributes to AI viremia. Wang *et al.*¹⁶ performed a linear regression analysis and showed that the correlation coefficient between the presence of AI virus receptors and the viral load was 0.9 with a slope of 3.5, indicating that these variables are strongly associated. Together, the evidence presented by Wang *et al.*¹⁶ and our results suggest that in birds subjected to forced moulting, the AI virus is not able to replicate in the reproductive tract. Therefore, the viral load was low in birds subjected to forced moulting, secondary to the low presence of receptors in their reproductive tract, allowing that the antibodies stimulated by the previous vaccination prevented damage in the oviduct and in the quality of the egg.

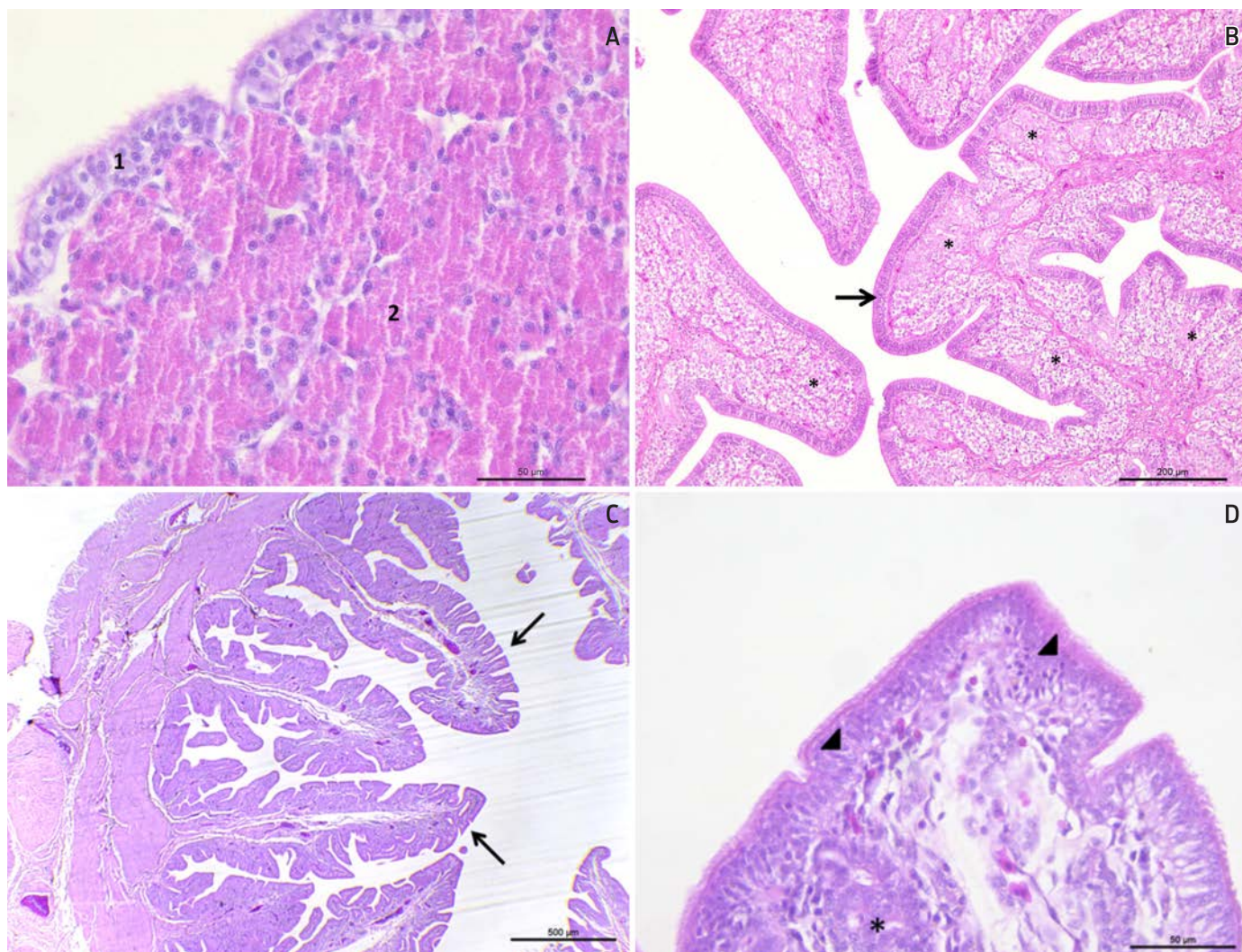


Figure 1. A. Photograph of a histological section of the magnum region of healthy hens in production. The mucosa was lined with a ciliated pseudostratified cylindrical epithelium (1) on top of tubular secretory glands (2) with basal, pyknotic nuclei and a cytoplasm occupied by acidophilic granules. HE staining. Bar: 50 μ m. B. Photograph of a histological section of the uterus region of healthy hens in production. Mucosa (arrow) was formed by a ciliated pseudostratified cylindrical epithelium and a glandular epithelium containing a significant quantity of cells with active nuclei. HE staining. Bar: 200 μ m. C. Photograph of a histological section of the oviduct from a hen in forced moulting. Severe mucosal atrophy is observed, which is characterized by small and narrow folds (arrows). HE staining. Bar: 500 μ m. D. Photograph of a histological section of the oviduct of a hen in forced moulting. Hyposecretion of the epithelial lining (arrowhead) and scarce glands in the regenerative phase (asterisk) are observed. HE staining. Bar: 50 μ m.

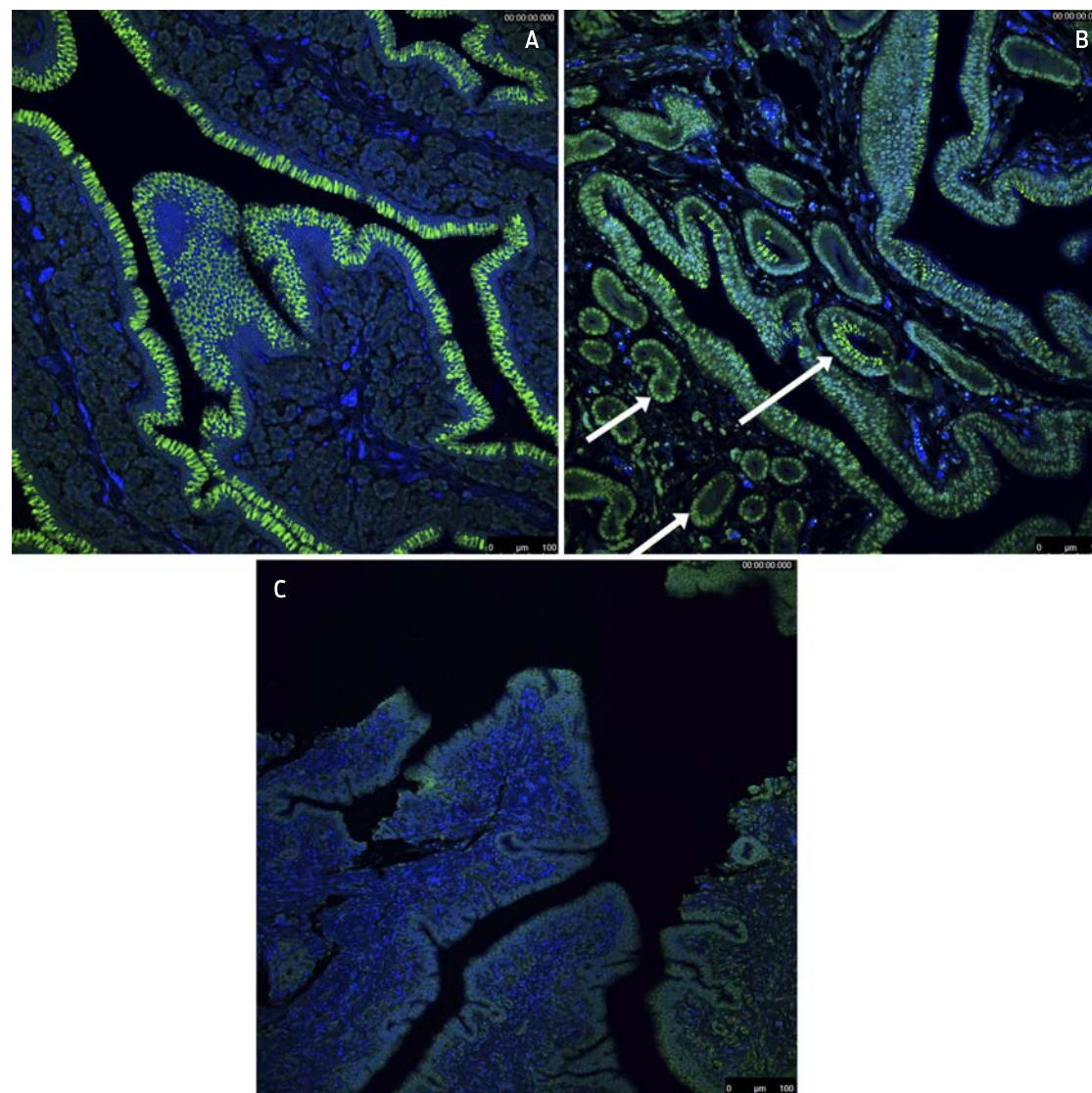


Figure 2. **A.** Abundant amount of influenza-like receptors, labelled with apple-green fluorescence, on the apical region of the ciliated cylindrical pseudostratified epithelium of the uterine region of healthy hens in production. Bar: 100 µm. **B.** Influenza-like receptors (arrows), marked by apple-green fluorescence, located on the epithelial cells of the glandular ducts of the magnum region of healthy hens in production. Bar: 100 µm **C.** Histological section of birds in forced moulting. The influenza virus receptor, labelled with apple-green fluorescence, is localized in the apical area of the mucosal epithelium; the fluorescence intensity is lower than the intensities shown in Figures 2A and 2B. Bar: 100 µm.

This result is in contrast to data obtained for birds that were vaccinated but were not subjected to forced moulting. García *et al.*¹⁷ evaluated the antigenic concentration of emulsified vaccines and showed the importance of the antigenic load for inducing adequate immunity in field challenges. One question that remains is how much HPAI antigen is necessary to cause damage to the reproductive tract of vaccinated birds subject to forced moulting.

Currently, we cannot conclude definitively that our hypothesis is correct, and further research is needed. Specifically, a next obvious step in testing our hypothesis would be controlled AI infection in birds undergoing forced moulting. Furthermore, another important variable to test is the number of doses of vaccination that are needed to reduce the level of viral shedding from vaccinated birds subjected to forced moulting and infected with AI under controlled conditions.

Conclusion

Our results showed that forced moulting decreased the presence and distribution of the receptor for avian influenza in the oviducts of laying hens. These results suggest that one method to counteract the risk of infection of laying hens exposed to avian influenza virus, is to implement forced moulting as was performed in the quarantine zone of Mexico, during the HPAI outbreak in the summer of 2012.

Funding

This study was supported by CONACYT: SALUD 2009-C02-126619, Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia. Universidad Nacional Autónoma de México.

Acknowledgements

The authors thank Ramón López, MVZ for his valuable assistance in allowing us access to production records from infected flocks and Carlos Cubillas, MVZ, and Daniel Juárez Pérez, MVZ, for providing organs that allowed us to obtain the results published in this study. We also thank the technicians Maria J. Gomora, V. Rodríguez-Mata, and M. Peña Rico for technical assistance in the histological process. Additionally, we thank Dr. Patti Miller for comments on the manuscript.

Conflicts of interest

The authors declare that they have no conflicts of interest.

Author contributions

Magdalena Escorcía led the research and experimental design, analysed the data and wrote part of the manuscript. Elizabeth Castillo-Villanueva interpreted the results and wrote part of the manuscript, and Félix Sánchez-Godoy interpreted the results and wrote part of the manuscript.

References

1. Organización Mundial de la Salud Animal [OIE]. Update on avian influenza Paris, France: OIE; 2012 [Available from: www.oie.int/en/animal-health-in-the-world/update-on-avian-influenza/2012/].
2. Diario Oficial de la Federación. Acuerdo Sanitario para la Erradicación de Influenza Aviar de Alta Patogenicidad H7N3. In: SAGARPA, editor. México D F: Secretaría de Gobernación; 2013.
3. Organización Mundial de la Salud Animal [OIE]. Update on avian influenza Paris, France: OIE; 2013 [Available from: <http://www.oie.int/es/sanidad-animal-en-el-mundo/actualizacion-sobre-la-influenza-aviar/2013/>].
4. Kapczynski DR, Patin-Jackwood M, Guzman SG, Ricardez Y, Spackmen E, Bertran K, et al. Characterization of the 2012 highly pathogenic avian influenza H7N3 virus isolated from poultry in an outbreak in Mexico: Pathobiology and vaccine protection. *J Virol*. 2013;87(16):9086-96. doi: 10.1128/JVI.00666-13.
5. Fouchier RA, Kawaoka Y, Cardona C, Compans RW, García-Sastre A, Govorkova EA, et al. Gain-of-function experiments on H7N9. *Science*. 2013;341(6146):612-3. doi: 10.1126/science.341.6146.612.
6. Skehel JJ, Wiley DC. Receptor binding and membrane fusion in virus entry: The influenza hemagglutinin. *Annu Rev Biochem*. 2000;69:531-69. doi: 10.1146/annurev.biochem.69.1.531.
7. Sasaki GL, Elli S, Rudd TR, Macchi E, Yates EA, Naggi A, et al. Human (α 2,6) and avian (α 2,3) sialylated receptors of Influenza A virus show distinct conformations and dynamics in solution. *Biochemistry*. 2013;52:7217-30. doi: 10.1021/bi400677n.
8. INEGI. Índice Nacional de Precios al Consumidor. In: Geografía INdEy, editor. México D. F. 2016.
9. Sariözkan S, Güclü BK, Kara K, Gürçan S. Comparison of different molting methods and evaluation of the effects of postmolt diets supplemented with humate and carnitine on performance, egg quality, and profitability of laying hens. *J App Poult Res*. 2013;22(4):689-99. doi: 10.3382/japr.2012-00612.
10. Bell DD. Historical and current molting practices in the U.S. table egg industry. *Poult Sci*. 2003;82:965-70.
11. Organización Mundial de la Salud Animal [OIE]. Update on avian influenza Paris, France: OIE; 2016 [Available from: www.oie.int/en/animal-health-in-the-world/update-on-avian-influenza/2016/].
12. Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia. Norma Oficial Mexicana. Especificaciones técnicas para la producción, cuidado y uso de los animales de laboratorio. México D F: Universidad Nacional Autónoma de México; 2014.
13. Prophet EB, Mills B, Arrington JB, Sobin LH. Laboratory Methods in Histotechnology (Armed Forces Institute of Pathology). Washington D C, USA: American Registry of Pathology; 1992. 279 p.
14. França M, Stallknecht DE, Howerth EW. Expression and distribution of sialic acid influenza virus receptors in wild birds. *Avian Pathol*. 2013;42(1):60-71. doi: 10.1080/03079457.2012.759176.
15. Eroschenko VP, Wilson WO. Histological changes in the regressing reproductive organs of sexually mature male and female Japanese quail. *Biol Reprod*. 1974;11:168-79.

16. Wang JY, Chen ZL, Li CS, Cao X, Wang R, Tang C, et al. The distribution of sialic acid receptors of avian influenza virus in the reproductive tract of laying hens. *Molecular and Cellular Probes*. 2015;29:129-34. doi: 10.1016/j.mcp.2015.01.002.
17. García A, Johnson H, Srivastava DK, Jayawardene DA, Wehr DR, Webster RG. Efficacy of inactivated H5N2 influenza vaccines against lethal A/Chicken/Que-retaro/19/95 infection. *Avian Dis*. 1998;42(2):248-56.