CAPÍTULO 2. 7. 12.

GRIPE AVIAR

RESUMEN

La gripe aviar (GA), está causada por virus específicos de la gripe del grupo A que son miembros de la familia Orthomyxoviridae y pertenecen a lgénero influenzavirus A.. Existen tres tipos de gripe - A, B y C; sólamente infectan las aves los influenzavirus del tipo A. El diagnóstico se realiza mediante el aislamiento y la caracterización del virus. Ello se debe a que las infecciones en las aves pueden dar lugar a una amplia variedad de signos clínicos dependiendo del hospedador, la cepa de virus, el estado inmune del hospedador, la presencia de algún microorganismo secundario exacerbante y las condiciones ambientales.

Identificación del agente: *Se inoculan en la cavidad alantoidea de embriones de pollo de 9-11 días de edad suspensiones en una solución de antibióticos obtenidas a partir de frotis traqueales o cloacales (o heces) recogidos de aves vivas, o de heces y muestras de órganos de aves muertas. Los embriones se incuban a 35-37ºC durante 4-7 días. El líquido alantoideo de aquellos huevos que contienen embriones muertos o moribundos y todos los embriones en el periodo final de incubación se utilizan para determinar la presencia de actividad hemaglutinante. La existencia de virus de la gripe tipo A puede confirmarse mediante un ensayo de inmunodifusión entre el virus concentrado y un antisuero frente a los antígenos de la nucleocápsida o de la matriz, que son comúnes en todos los virus de la gripe tipo A. Recientemente, en ciertos casos, se ha sustituido el aislamiento en embriones por la reacción en cadena de la polimerasa inversa.*

Para realizar el subtipado del virus, el laboratorio debe poseer antisueros monoespecíficos preparados frente a los antígenos aislados de cada uno de los 16 subtipos de hemaglutinina (H1-H16) y 9 subtipos de neuraminidasa (N1-N9) de los virus de gripe tipo A, los cuales pueden utilizarse en ensayos de inmunodifusión. Alternativamente, el virus recién aislado puede examinarse mediante ensayos de inhibición de la hemaglutinación y de la neuraminidasa frente a una serie de anticuerpos policlonales contra un amplio rango de cepas de todos los subtipos.

Como los términos "gripe aviar muy virulenta" y "peste aviar" se refieren a la infección con cepas virulentas del virus de la gripe tipo A, es necesario evaluar la virulencia de un aislamiento en aves domésticas. Cualquier aislamiento de la gripe aviar se clasifica como gripe aviar notificable (GAN). Aunque todas las cepas aisladas hasta la fecha han pertenecido bien al subtipo H5 ó H7, la mayoría de los aislamientos H5 ó H7 han mostrado una baja virulencia. Debido al riesgo de que un H5 o un H7 de baja virulencia se conviertan en virulentos por mutación en aves hospedadoras, todos los virus H5 y H7 han sido clasificados como virus de la GAN. En los últimos años los métodos empleados para la determinación de la virulencia de una cepa en las aves han evolucionado y existe una mayor comprensión de las bases moleculares de la patogenicidad, pero todavía implican la inoculación del virus infeccioso de un mínimo de ocho gallinas susceptibles de 4-8 semanas de edad; las cepas se consideran muy virulentas si causan más del 75% de mortalidad en 10 días o tienen un índice de patogenicidad intravenosa (IPIV) mayor de 1.2. La caracterización de las cepas del virus patógenas que son sospechosas deberían realizarse en un laboratorio de seguridad virológica. Todos los aislamientos de GA se identifican como virus de la gripe aviar notificable y muy virulenta (GANMV). Independientemente de su virulencia en los pollos, los virus H5 o H7 con una secuencia de aminoácidos en el sitio de corte de la HAO similar a cualquiera de las observadas en los virus virulentos son considerados como virus GANMV. Los aislamientos de H5 y H7 que no son patógenos para los pollos y no tienen una secuencia de aminoácidos en el sitio de corte HAO similar a cualquiera de las que se han observado los virus GANMV se identifican como virus de la gripe aviar notificable poco virulenta (GANPV) y los

aislamientos de GA distintos de H5 o H7 que no son muy virulentos en los pollos se identifican como gripe aviar poco virulenta (GAPV).

Ensayos serológicos: *Como todos los virus de la gripe tipo A poseen nucleocápsidas y antígenos de la matriz similares antigénicamente, para detectar anticuerpos frente a estos antígenos se emplean ensayos de inmunodifusión en gel de agar. Se utilizan en estos ensayos las preparaciones de virus concentradas que contienen uno o ambos tipos de antígenos. No todas las aves desarrollan anticuerpos precipitantes demostrables. Los ensayos de inhibición de la hemaglutinación también se han empleado en la serología diagnóstica de rutina, aunque es posible que esta técnica no detecte algunas infecciones concretas debido a que la hemaglutinina es específica del subtipo vírico. Se han empleado los enzimoinmunoensayos para detectar anticuerpos frente a antígenos específicos del virus de la gripe tipo A.*

Requisitos para las vacunas y los materiales de diagnóstico: *Históricamente, en la mayoría de los países las vacunas diseñadas específicamente para contener o prevenir la GANMV se encuentran prohibidas o están desaconsejadas por las agencias gubernamentales porque pueden interferir con las políticas de control o eliminación de la enfermedad. Durante la década de 1990 en México y Pakistán se utilizaron profilácticamente vacunas inactivadas mediante emulsión con aceites para controlar brotes generalizados de GAN, y en México, El Salvador y Guatemala, también se probó, en pruebas de campo, una vacuna recombinante del virus de la viruela aviar que expresaba un gen HA homólogo. Durante el brote de GANPV de 1999-2001 en Italia, se utilizó una vacuna inactivada del mismo tipo de hemaglutinina que el virus silvestre, pero con una neuraminidasa diferente. Ello permitió distinguir entre las aves vacunadas y aquellas infectadas con el virus silvestre y eventualmente desembocó en la erradicación del virus silvestre Se ha llevado a cabo el uso profiláctico de vacunas contra H5 y H7 en partes de Italia para prevenir las infecciones por GANPV y varios países del sureste asiático han utilizado vacunación profiláctica para controlar las infecciones por el H5N1 de la GANPV.*

Si la GANMV se para la producción de vacunas o en estudios de sensibilización, la instalación debería cumplir los requisitos de la OIE para la Contención de los patógenos del Grupo 4.

A. INTRODUCCIÓN

La gripe aviar notificable (GAN) está causada por virus del tipo A de la familia *Orthomyxoviridae,* del género *influenzavirus A*. . Los virus de la gripe tipo A son los únicos ortomyxovirus conocidos que afectan a las aves. Se ha demostrado que muchas especies de aves son susceptibles a la infección con los virus de la gripe tipo A; las aves acuáticas constituyen el reservorio mayoritario de estos virus, pero una abrumadora mayoría de los aislamientos han sido poco patógénos en pollos y pavos, que son las principales aves con importancia económica afectadas. Los virus de la gripe tipo A poseen nucleocápsidas y proteínas de la matriz relacionadas antigénicamente, aunque se clasifican en subtipos en base a los antígenos de hemaglutinina (H) y neuraminidasa (N) (67). En la actualidad se reconocen 16 subtipos H (H1-H16) y 9 subtipos N (N1-N9). Hasta la fecha, los virus muy virulentos de la gripe tipo A, que producen una enfermedad clínica aguda en los pollos y pavos, solamente se han asociado con los subtipos H5 y H7 (con la excepción de dos subtipos H10 que podrían también cumplir la definición de GAMV ofrecida anteriormente, aunque las razones no están claras. Muchos virus del subtipo H5 y H7 aislados a partir de aves han sido poco virulentos en las aves de corral (1). Debido al riesgo de que los virus H5 y H7 de baja virulencia se conviertan en virulentos por mutación, todos los virus H5 y H7 han sido identificados como virus de la gripe aviar notificable (GAN) (68)

Dependiendo de la edad, el tipo de ave y los factores ambientales, la enfermedad muy virulenta puede variar desde una muerte súbita con pocos signos o sin signos patentes, hasta una enfermedad más característica con síntomas respiratorios, exceso de lagrimeo, sinusitis, edema en la cabeza, cianosis de la piel no cubierta de plumas y diarrea. Sin embargo, ninguno de estos signos puede considerarse patognomónico. Por lo tanto, el diagnóstico de la enfermedad depende del aislamiento del virus y de la demostración de que cumple con uno de los criterios definidos en la sección B.2. Eso se puede lograr en algunas circunstancias específicas mediante la detección del virus en el hospedador infectado, sobre todo, mediante técnicas moleculares que permitan la determinación de la virulencia del virus. La comprobación de los sueros de las aves sospechosas empleando métodos de detección de anticuerpos puede complementar el diagnóstico, aunque estos métodos no son adecuados para una identificación detallada. El diagnóstico con vistas a un control oficial se establece en base a los criterios de patogénesis acordados oficialmente, de acuerdo con ensayos *in-vivo* o determinantes moleculares (p. ej. la presencia de muchos aminoácidos básicos en el sitio de corte de la proteína precursora de la hemaglutinina HAO) y tipado de la hemaglutinina. Estas definiciones evolucionan con el aumento del conocimiento científico de la enfermedad.

La GAMV y la GAN está sometidas a un control oficial y el virus presenta un gran riesgo de diseminarse fuera del laboratorio; en consecuencia, debería realizarse una valoración de riesgo para determinar el nivel de bioseguridad que es necesario para el diagnóstico y la caracterización del virus. La instalación debería cumplir los requerimientos para el Grupo de Contención adecuado, determinado mediante la valoración del riesgo, como se resume en del capítulo I.1.6 de este *Manual de animales terrestres*. Los países que carezcan de acceso a un laboratorio nacional o regional especializado deberían enviar sus muestras a un laboratorio de referencia de la OIE.

B. TÉCNICAS DE DIAGNÓSTICO

1. Identificación del agente

Las muestras recogidas a partir de las aves deberían incluir el contenido intestinal (heces) o frotis cloacales y faringo-esofágicos. Las muestras de la tráquea, pulmones, sacos aéreos, intestino, bazo, riñón, cerebro, hígado y corazón también pueden recogerse y procesarse, bien separada o conjuntamente.

Las muestras de aves vivas deberían incluir frotis traqueales y cloacales. Como las aves pequeñas y frágiles pueden ser dañadas durante la realización del frotis, la recogida de las heces puede servir como una alternativa adecuada. Para optimizar las opciones de aislamiento del virus, se recomienda se recomienda procesar por lo menos un gramo de heces o recubrir el frotis.

Las muestras deberían colocarse en tampón salino fosfato isotónico (PBS), pH 7,0-7,4, con antibióticos. Los antibióticos pueden modificarse de acuerdo con los condicionantes locales, pero podrían ser, por ejemplo, la penicilina (2.000 unidades/ml), estreptomicina (2 mg/ml), gentamicina (50 µg/ml) y micostatina (1.000 unidades/ml) para los tejidos y los frotis traqueales, pero a una concentración cinco veces mayor para las heces y los frotis cloacales. Es importante reajustar el pH de la solución hasta un pH 7,0-7,4 después de la adición de los antibióticos. Las heces y los tejidos finamente picados deberían prepararse como suspensiones del 10-20% (p/v) en la solución de antibióticos. Las suspensiones deberían procesarse lo antes posible después de la incubación durante 1-2 horas a temperatura ambiente. Cuando no se pueda realizar el procesado inmediato las muestras pueden guardarse a 4ºC hasta 4 días. Para un almacenamiento prolongado, las muestras diagnósticas y los aislamientos deberían almacenarse a –80ºC.

El método preferido para el cultivo de los influenzavirus de tipo A es mediante la inoculación de embriones de pollo específicamente libres de patógenos (SPF), o embriones específicamente libres de anticuerpos (SAN). Los líquidos sobrenadantes de las heces o las suspensiones de tejidos obtenidos mediante clarificación por centrifugación a 1.000 ***g*** se inoculan en la cavidad alantoidea de al menos 5 embriones de aves SPF o SAN con 9-11 días de incubación. Los embriones se incuban a 35-37ºC durante 4-7 días. Los huevos que contienen embriones muertos o moribundos, y todos los embriones restantes al final del periodo de incubación, deberían en primer lugar enfriarse hasta los 4ºC, y entonces los fluidos alantoideos deberían estudiarse para determinar la presencia de actividad hemaglutinante (HA) (ver Sección B.3.b.). La detección de la actividad HA indica una alta probabilidad de presencia de un virus de gripe tipo A o de un paramyxovirus aviar. Los fluidos que dan una reacción negativa deberían pasarse en, al menos, uno o más lotes de embriones de pollo.

La presencia del virus de la gripe tipo A puede confirmarse en pruebas de inmunodifusión en gel de agar (IGDA), demostrando la presencia de los antígenos de la nucleocápsida o la matriz, siendo ambos comunes a todos los virus de gripe tipo A (ver Sección B.3.a.). Los antígenos pueden preparase concentrando el virus a partir del líquido alantoideo infectivo o extrayendo las membranas corioalantoideas infectadas; estas se prueban frente a antisueros positivos conocidos. Los virus pueden concentrarse a partir del líquido alantoideo infectivo mediante ultracentrifugación, o mediante precipitación en ambiente ácido. Este último método consiste en la adición de HCl 1,0 M al líquido alantoideo infectivo hasta que alcanza aproximadamente un pH de 4,0. La mezcla se coloca en un baño con hielo durante 1 hora y entonces se clarifica mediante centrifugación a 1.000 ***g*** a 4ºC. Se descarta el líquido sobrenadante. Los concentrados víricos se resuspenden en tampón glicina/sarcosil: consiste en un 1% de lauril sarcosinato sódico tamponado hasta pH 9,0 con glicina 0,5 M. Estos concentrados contienen polipéptidos de la nucleocápsiday de la matriz.

Las preparaciones del antígeno enriquecido en nucleocápside pueden también obtenerse a partir de las membranas corioalantoideas para su uso en el ensayo IGDA (6). Este método implica retirar las membranas corioalantoideas de los embriones infectados que presentan líquidos alantoideos con actividad HA. Entonces las membranas se homogenizan o se trituran hasta obtener una pasta. Esta se somete a tres ciclos de congelación-descongelación, seguido de una centrifugación a 1.000 ***g*** durante 10 minutos. El precipitado se desecha y el sobrenadante se emplea como antígeno después de un tratamiento con formalina al 0,1%.

El empleo del ensayo IGDA para demostrar los antígenos de la nucleocápsida o la matriz constituye una forma satisfactoria de indicar la presencia de virus de la gripe aviar en el líquido amnioalantoideo, aunque actualmente están disponibles varios enzimoinmunoensayos (ELISAs). Existe un ELISA sensible y específico que demuestra

la nucleoproteína del virus de la gripe tipo A empleando un anticuerpo monoclonal frente a la nucleoproteína de este virus (41, 43, 52). Se encuentra disponible como un sistema comercial.

Cualquier actividad HA en los fluidos estériles concentrados a partir de los embriones inoculados es debida, muy probablemente, a un virus de gripe tipo A o a un paramyxovirus aviar (unas cuantas cepas de reovirus aviar pueden dar esta reacción, o el fluido no estéril podría contener HA de origen bacteriano). Actualmente existen nueve serotipos reconocidos del paramyxovirus aviar. La mayoría de los laboratorios dispondrán de antisuero específico frente al virus de la enfermedad de Newcastle (paramyxovirus aviar tipo 1), y en vista de su existencia ampliamente generalizada y uso casi universal como vacuna viva en las aves de corral, es mejor evaluar su presencia mediante ensayos de inhibición de la hemaglutinación (IH) (véase el capítulo 2.7.13. La enfermedad de Newcastle).

Alternativamente, la presencia de virus de la gripe puede confirmarse mediante el empleo de la reacción en cadena de la polimerasa inversa (RT-PCR) empleando cebadores conservados específicos de la nucleoproteína o específico de la matriz (2, 44). La presencia de los subtipos H5 ó H7 del virus de la gripe también puede confirmarse utilizando cebadores específicos de los subtipos H5 ó H7 (18, 40, 44, 66).

El método recomendado por el Comité de Expertos de la Organización Mundial de la Salud (OMS)(67) para el subtipado antigénico definitivo de los virus de la gripe tipo A implica la utilización de antisueros muy específicos dirigidos frente a los subtipos H y N (39), y preparados en un animal que ofrezca un mínimo de reacciones inespecíficas (p.ej. la cabra). Una técnica alternativa consiste en el uso de antisueros policlonales obtenidos frente a una serie de virus de la gripe intactos. La identificación del subtipo mediante esta técnica se encuentra fuera del alcance de la mayoría de los laboratorios de diagnóstico no especializados en el virus de la gripe. Existe ayuda disponible por parte de los Laboratorios de Referencia de la OIE (ver el cuadro que se muestra en la Parte 3 de este *Manual de animales terrestres*).

2. Evaluación de la patogenicidad

El término gripe aviar muy virulenta implica la relación con cepas virulentas del virus. Se emplea para describir una enfermedad en las aves con signos clínicos tales como el lacrimeo excesivo, fatiga respiratoria, sinusitis, edema de la cabeza y la cara, cianosis de la piel no cubierta de plumas, y diarrea. La muerte repentina puede ser el único síntoma. Estos síntomas pueden variar enormemente dependiendo del hospedador, la edad del ave, la presencia de otros microorganismos y las condiciones ambientales. Además, los virus que normalmente no causan enfermedad o causan una enfermedad leve pueden imitar a la gripe aviar muy virulenta si se dan condiciones exacerbantes.

En el Primer Simposium Internacional sobre la Gripe Aviar celebrado en 1981 (4), se decidió abandonar el término “peste aviar” y definir a las cepas muy virulentas en base a su capacidad para producir no menos de un 75% de mortalidad en 8 días, en al menos ocho pollos susceptibles de 4-8 semanas de edad e inoculados por la vía intramuscular, intravenosa o en el saco aéreo caudal. Sin embargo esta definición resultó poco adecuada cuando se aplicó a los virus responsables de los brotes extensos surgidos en gallinas en 1983 en Pensilvania y los estados circundantes de los EEUU. El problema fue causado principalmente por la presencia de un virus con baja patogenicidad, demostrada en ensayos de laboratorio, pero que mostró ser muy patógeno después de sufrir una mutación puntual. Después de considerarlo detenidamente, varios grupos internacionales asumieron consideraciones posteriores para incluir a tales virus como “potencialmente patógenos”.

Las consideraciones finales realizadas se basaron en el hecho de que mientras que se han producido numerosos aislamientos de cepas de los subtipos H5 y H7 de baja patogenicidad, todas las cepas de la gripe de alta patogenicidad aisladas hasta la fecha han presentado hemaglutinina bien de tipo H5 ó H7. Puede obtenerse más información relativa a la patogenicidad potencial de los subtipos H5 óH7 secuenciando su genoma, ya que la patogenicidad se encuentra asociada con la presencia de múltiples aminoácidos básicos (arginina o lisina) en el sitio de corte de la hemaglutinina. Por ejemplo, la mayoría de los virus del subtipo H7 con baja virulencia han presentado los motivos de aminoácidos en el sitio de corte HA0 –PEIPKGR*GLF- o –PENPKGR*GLF-, mientras que algunos ejemplos de motivos de aminoácidos en los virus de la gripe aviar muy virulenta (o virus GAMV) H7 son: -PEIPKKKKR*GLF-, PETPKRKRKR*GLF, -PEIPKKREKR*GLF-, y -PETPKRRRR*GLF-. La secuenciación de aminoácidos del sitio de corte en los aislamientos de virus de la gripe con baja virulencia en aves de los subtipos H5 y H7 permitiría identificar los virus que, como el virus Pennsylvania, tienen la capacidad de convertirse en muy patógenos para las aves de corral después de sufrir una mutación puntual. En 1992, la OIE adoptó criterios para clasificar los virus de la gripe aviar como muy patógenos, basándose en la patogenicidad en pollos, crecimiento en cultivo celular y la secuencia de aminoácidos para la péptida conectada (36), La Unión Europea adoptó criterios similares en 1992 (14).

La OIE ha adoptado los siguientes criterios, que constituyen una modificación del procedimiento previo de la Organización, para la clasificación del virus de la gripe aviar como GANMV

a) Se utiliza uno de los dos métodos siguientes para determinar la patogenicidad en los pollos. Un virus GANMV es:

i) Cualquier virus que es letal para seis, siete u ocho gallinas susceptibles de 4-8 semanas de edad durante 10 días después de la inoculación intravenosa con 0,2 ml de una dilución 1/10 de líquido alantoideo infectivo libre de bacterias.

O

ii) Cualquier virus que tenga un índice de patogenicidad intravenosa 1.2. El procedimiento el IVPI es como sigue:

- Se diluye 1/10 en tampón salino estéril el fluido alantoideo fresco con un título >1/16 (>2^4 o >$\log_2$ 4 expresado como el inverso).
- Se inyectan 0,1 ml del virus diluido intravenosamente en diez pollos SPF o SAN de 6 semanas de edad.
- Las aves se examinan en intervalos de 24 horas durante 10 días. Durante cada observación cada ave se puntúa como 0 si se encuentra normal, 1 si está enferma, 2 si está muy enferma, 3 si se ha muerto. (El juicio sobre las aves enfermas o muy enfermas es una valoración clínica subjetiva. Normalmente las aves "enfermas" deberían manifestar uno de los siguientes síntomas, y las "muy enfermas" más de uno: afectación respiratoria, depresión, diarrea, cianosis en la piel expuesta o en las barbas, edema en la cara y/o en la cabeza, síntomas nerviosos. Las aves muertas deben puntuarse como 3 en cada uno de los días siguientes de observación después de la muerte[1].)
- El índice de patogenicidad intravenosa (IVPI) es la puntuación media por ave por observación durante un periodo de 10 días. Un índice de 3,00 significa que todas las aves murieron en 24 horas, y un índice de 0,00 significa que ninguna ave mostró signo clínico alguno durante los 10 días del periodo de observación.

b) Para todos los virus H5 y H7de baja virulencia en pollos, debe dterminarse la secuencia de aminoácidos de la péptida de conexión de la hemaglutinina. Si la secuencia es similar a la observada para otros aislamientos de GA muy virulenta, los aislamientos de ensayo deben considerarse como muy virulentos.

La OIE tiene el siguiente sistema de clasificación para identificar los virus en torno a los cuales se deberán tomar medidas para la información sobre la enfermedad y su control (68):

a) Todos los aislamientos de GA que cumplen con los criterios anteriores se identifican como gripe aviar notificable muy virulenta (GANMV)

b) Los aislamientos H5 y H7 que no son virulentos para los pollos y no tienen una secuencia de aminoácidos en el sitio de corte HAO similar a la de los observadoa para los virus de la GANMV, se identifican gripe aviar notificable poco virulenta (GANPV).

c) Los aislamientos distintos de H5 o H7 que no sean virulentos para los pollos se identifican como gripe avir poco virulenta (GAPV).

Se han empleado con éxito una variedad de técnicas y estrategias para secuenciar los nucleótidos de la región del gen *HA* que codifica la región del sitio de corte de la hemaglutinina de los subtipos H5 y H7 del virus de la gripe aviar, lo que permite deducir los aminoácidos presentes. El método utilizado más frecuentemente ha sido RT-PCR empleando parejas de cebadores complementarios a zonas del gen a cada lado de la región codificante del sitio de corte, seguido de secuenciación directa (65). Pueden facilitarse varias fases del protocolo empleando sistemas comerciales y secuenciadores automáticos.

Ya que la presencia de múltiples aminoácidos básicos en el sitio de corte de la HA se ha establecido como un indicador preciso de la virulencia o virulencia potencial de los virus de la gripe H5 y H7, parece inevitable que la determinación del sitio de corte mediante secuenciación u otros métodos se convertirá en el método de elección para la valoración inicial de la virulencia de estos virus, y se incorporará en las definiciones acordadas. Ello permitirá reducir el número de ensayos *in vivo*, aunque, en la actualidad, todavía se requeriría la inoculación de las aves para confirmar un resultado negativo, ya que no puede desecharse la posibilidad de existencia de cultivos víricos que contengan poblaciones mixtas de virus con alta y baja virulencia.

Aunque los verdaderos virus de la GAMV aislados hasta la fecha han pertenecido a los subtipos H5 ó H7, se ha descrito que al menos dos aislamientos, ambos del subtipo H10 (H10 N4 y H10 N5), habrían cumplido las definiciones de la OIE y la UE para los virus de la GA muy virulenta (GAMV) (63), ya que mataron 7/10 y 8/10 pollos con valores IVPI>1,2 cuando las aves se inocularon por vía intravenosa. Sin embargo no produjeron

1 Cuando las aves están muy enfermas para comer o beber, deben sacrificarse de forma humanitaria y computadas como muertas en la siguiente observación.

muertes o signos de la enfermedad cuando se inocularon intranasalmente, y no presentaron múltiples aminoácidos básicos en sus sitios de corte de la hemaglutinina.

3. Pruebas serológicas

a. Inmunodifusión en gel de agar

Todos los virus de la gripe poseen una nucleocápsida y antígenos de la matriz similares antigénicamente. Este hecho permite detectar la presencia o ausencia de anticuerpos frente a cualquier virus de la gripe mediante ensayos IGDA. Las preparaciones concentradas de virus, como se describió anteriormente, contienen antígenos de la matriz y la nucleocápsida; el antígeno de la matriz difunde más rápidamente que el antígeno de la nucleocápsida. Los ensayos IGDA se han empleado extensa y rutinariamente para detectar anticuerpos específicos en rebaños de pollos o pavos como un indicador de la existencia de infección. Generalmente, estos ensayos han utilizado preparaciones enriquecidas de nucleocápsida obtenidas a partir de las membranas corioalantoideas de embriones de pollo (6) que han sido infectados a los 10 días de edad, se han homogenizado, congelado y descongelado tres veces, y centrifugado a 1.000 ***g***. Los fluidos sobrenadantes se inactivan mediante la adición de formalina al 0,1% o betapropiolactona al 1%, se centrifugan de nuevo y se utilizan como antígeno. No todas las especies de aves pueden producir anticuerpos precipitantes después de la infección con el virus de la gripe.

Normalmente, los ensayos se realizan empleando geles de agarosa al 1% (p/v) o agar purificado con un 8% (p/v) de NaCl en tampón fosfato 0,1M, pH 7,2, que se vierten en placas de Petri o en portaobjetos hasta obtener un grosor de 2-3 mm. Se cortan pocillos en el agar de aproximadamente 5 mm de diámetro y separados 2-5 mm empleando un molde y un cúter. Usando un patrón para los pocillos, debe colocarse cada suero sospechoso al lado de un suero y antígeno positivo conocido. Ello creará una línea continua de identidad entre el control positivo conocido, el suero sospechoso y el antígeno de la nucleocápsida. Deberían añadirse en cada pocillo aproximadamente 50 µl de cada reactivo.

Las líneas de precipitina pueden detectarse después de aproximadamente 24-48 horas, aunque esto puede depender de las concentraciones de anticuerpo y antígeno. Estas líneas se observan mejor frente a un fondo oscuro iluminando por detrás. Se considera un resultado específico positivo cuando la línea de precipitina entre el pocillo del control positivo es continua con la línea entre el antígeno y el pocillo problema. Las líneas cruzadas se interpretan como debidas a un suero problema que carece de identidad con los anticuerpos del pocillo del control positivo.

b. Ensayos de hemaglutinación e inhibición de la hemaglutinación

En diferentes laboratorios se realizan distintas variantes de los protocolos de los ensayos de HA y HI. Los siguientes ejemplos recomendados se basan en el uso de placas de micropocillos de plástico con el fondo en V, y en las que el volumen final para ambos ensayos es de 0,075 ml. Los reactivos necesarios para realizar estos ensayos son PBS isotónico (0,1 M), pH 7,0-7,2, y hematíes (RBCs) obtenidos a partir de un mínimo de tres pollos SPF o SANy resuspendidos en un volumen igual de solución de Alsever. Las células deberían lavarse tres veces en PBS antes de emplearse como una suspensión al 1% (células concentradas v/v). Cuando sea adecuado deberían utilizarse en cada ensayo antígenos y sueros control positivos y negativos.

- **Ensayo de hemaglutinación**

i) Distribuir 0,025 ml de PBS en cada pocillo de un placa de microensayo de plástico con el fondo en V.

ii) Colocar 0,025 ml de la suspensión vírica (p.ej. fluido alantoideo infectivo) en el primer pocillo. Para una determinación precisa del contenido de HA, debería realizarse a partir de un rango estrecho de una serie de diluciones, p.ej. 1/3, 1/4, 1/5, 1/6, etc.

iii) Preparar y distribuir diluciones medias de 0,025 volúmenes de la suspensión vírica en toda la placa.

iv) Distribuir 0,025 ml más de PBS en cada pocillo.

v) Repartir 0,025 ml de RBCs de pollo al 1% (v/v) en cada pocillo.

vi) Mezclar cuidadosamente tapando la placa y dejar sedimentar los RBCs durante 40 minutos a temperatura ambiente, p.ej. 20ºC, o durante 60 minutos a 4ºC si la temperatura ambiente es elevada, por lo que los RBCs deberían sedimentarse hasta observar un botón nítido.

vii) La HA se determina inclinando la placa y observando la presencia o ausencia de arrastre de los RBCs con forma de gota. El título debería leerse como la dilución más alta que da lugar a una HA completa (ausencia de arrastre); esto representa 1 unidad HA (UHA) y puede calcularse de manera precisa a partir del rango inicial de las diluciones.

- **Ensayo de inhibición de la hemaglutinación**

i) Distribuir 0,025 ml de PBS en cada pocillo de una placa de microtitulación con fondo en V.

ii) Colocar 0,025 ml de suero en el primer pocillo de la placa.

iii) Preparar y distribuir diluciones medias de 0,025 volúmenes de suero en toda la placa.

iv) Añadir 4UHA de virus/antígeno en 0,025 ml a cada pocillo y dejar durante un mínimo de 30 minutos a temperatura ambiente (p. ej. unos 20ºC) o 60 minutos a 4ºC.

v) Añadir 0,025 ml de RBCs de pollo al 1% (v/v) en cada pocillo y, después de mezclar cuidadosamente, dejar sedimentar los RBCs durante unos 40 minutos a temperatura ambiente, p. ej. 20ºC, o durante 60 minutos a 4ºC si la temperatura ambiente es elevada, por lo que los RBCs deberían sedimentarse hasta observar un botón nítido.

vi) El título HI es la dilución más alta de suero que ocasiona la inhibición completa de 4UHA de antígeno. La aglutinación se valora inclinando las placas. Solamente en aquellos pocillos en los que los RBCs se arrastran en la misma proporción que los pocillos control (que contienen sólo 0,025 ml de RBCs y 0,,05 ml de PBS) debería considerarse que presentan inhibición.

vii) La validez de los resultados debería evaluarse frente a un suero negativo control, el cual no debería producir un título >1/4 (>22 o >log2 2 expresado como el inverso), y un suero control positivo en el que el título debería encontrarse dentro de una dilución del título conocido.

Los títulos HI pueden considerarse positivos si existe inhibición a una dilución del suero de 1/16 ($>2^4$ o $>\log_2$ 4 expresado como el inverso) o más alta frente a un antígeno de 4UHA. Algunos laboratorios prefieren emplear 8UHA en los ensayos HI. Aunque está permitido, afecta a la interpretación de los resultados de forma que un título positivo es 1/8 (2^3 o $\log_2$ 3) o más alto. El significado de un título positivo mínimo no debe ser malinterpretado; no implica, por ejemplo, que las aves inmunizadas con ese título estarán protegidas contra el desafío o que las aves con títulos inferiores setán susceptibles al desafío

En este ensayo los sueros de las gallinas raramente dan lugar a reacciones positivas inespecíficas, y por lo tanto no es necesario su pretratamiento. Los sueros de otras especies distintas a las gallinas pueden a veces causar la hemaglutinación de sus RBCs, por lo que esta propiedad debería determinarse antes y eliminarse mediante adsorción del suero con RBCs de gallina. Se realiza añadiendo 0,025 ml de RBCs concentrados de gallina a 0,5 ml de cada antisuero, agitando cuidadosamente y dejando reposar durante al menos 30 minutos; los RBCs se precipitan mediante centrifugación a 800 ***g*** durante 2-5 minutos y se decantan los sueros adsorbidos. Alternativamente pueden usarse los RBCs de las aves investigadas.

El ensayo de inhibición de la neuraminidasa se ha utilizado para identificar el tipo de neuraminidasa GA de los aislamientos, y para caracterizar los anticuerpos en las aves infectadas. El procedimiento necesita unos conocimientos y reactivos especializados; en consecuencia este ensayo se realiza normalmente en un Laboratorio de Referencia de la OIE. La estrategia DIVA utilizada en Italia (distinción de los animales infectados de los vacunados) también se basa en el empleo de un ensayo serológico para detectar anticuerpos específicos anti-N; se ha descrito el procedimiento del ensayo (9).

Se encuentran disponibles sistemas comerciales ELISA que detectan anticuerpo frente a la proteína de la nucleocápsida. Se utilizan diferentes ensayos y métodos de preparación del antígeno. Normalmente, tales ensayos han sido evaluados y validados por el fabricante, y es por tanto importante que se sigan cuidadosamente las instrucciones específicas para su empleo.

4. Técnicas para el diagnóstico de la gripe aviar en vías de desarrollo

En la actualidad, las técnicas convencionales para el aislamiento, caracterización y diagnóstico del virus de la gripe aviar continúan siendo el método elegido, al menos para el diagnóstico inicial de las infecciones. Sin embargo los métodos convencionales tienden a ser costosos, emplean numerosa mano de obra y son lentos. Los últimos 10 años han visto grandes desarrollos y mejoras en las técnicas moleculares y en otras técnicas diagnósticas, muchas de las cuales se han aplicado para el diagnóstico de las infecciones de gripe aviar.

a. Detección del antígeno

Existen varios sistemas disponibles comercialmente para la detección de los virus de la gripe tipo A en las aves de corral (43). La mayoría son enzimoinmunoensayos y utilizan un anticuerpo monoclonal frente a la nucleoproteína; deben ser capaces de detectar cualquier virus de la gripe del tipo A. La principal ventaja de estos ensayos consiste en que pueden demostrar la presencia de GA en 15 minutos. Las desventajas son que puede carecer de sensibilidad, pueden no haber sido validados para diferentes especies de aves, no se consigue la identificación del subtipo vírico y es un sistema caro. Las pruebas deben interpretarse sólo en

términos de la bandada y no como prueba de un ave individual. Es más las muestras oro-faríngeas o traqueales de aves clínicamente infectadas o muestas proporcionan la mejor sensibilidad.

El sistema disponible comercialmente Directigen® Flu A (Becton Dickinson Microbiology Systems), que consiste en un sistema de enzimoinmunoensayo de captura antigénica, se ha utilizado concretamente en EEUU para detectar la presencia de virus de la gripe tipo A en las aves de corral (28). El sistema utiliza un anticuerpo monoclonal frente a la nucleoproteína, y por lo tanto debería ser capaz de detectar cualquier virus de la gripe del tipo A. Aunque se desarrolló para detectar virus en infecciones de mamíferos, se ha aplicado con éxito para detectar virus en aves de corral y otras aves, aunque puede existir alguna variación en la sensibilidad en diferentes muestras.

b. Detección directa del ARN

Aunque, como queda demostrado por las definiciones actuales de la GANMV, las técnicas moleculares se han empleado para el diagnóstico de la gripe aviar durante algún tiempo, recientemente se han producido avances para su aplicación en la detección y caracterización de los virus de la gripe aviar directamente a partir de muestras clínicas de las aves infectadas.

Con la definición de los cebadores adecuados, la técnica de RT-PCR con muestras clínicas podría conllevar una detección rápida e identificación del subtipo (al menos del H5 ó H7), además de posibilitar la obtención de un ADNc que puede emplearse para la secuenciación de nucleótidos (32, 45, 46). Los resultados obtenidos por Koch (25) indicaron que debería ponerse cuidado en qué muestras clínicas se utilizan, ya que, mientras que las muestras traqueales de aves infectadas mostraron una alta sensibilidad y especificidad en relación con el aislamiento del virus, los ensayos de RT-PCR con muestras fecales carecieron de sensibilidad. La aplicación efectiva de los ensayos de RT-PCR puede consistir en la identificación rápida de brotes sucesivos una vez que se han detectado los casos primarios y ha sido caracterizado el virus. Esta técnica se utilizó con éxito durante los brotes de GAMV en 2003 en los Países Bajos.

Se han aplicado modificaciones en el empleo de la RT-PCR para reducir el tiempo de identificación del subtipo vírico y la secuenciación. Por ejemplo, Spackman et al. (44) emplearon un sistema de RT-PCR de un sólo paso con cebador/hidrólisis de sonda fluorescente en “tiempo real”, para permitir la detección de virus de la gripe aviar y la determinación del subtipo H5 ó H7. Los autores concluyeron que el ensayo cumplió bien su función en relación al aislamiento del virus y ofreció una alternativa más barata y mucho más rápida con diagnóstico de muestras clínicas en menos de 3 horas.

Se han diseñado modificaciones del método RT-PCR directo para la detección de ARN vírico con el fin de reducir el efecto de sustancias inhibidoras presentes en la muestra recogida, la posible existencia de ácidos nucleicos contaminantes, y el tiempo necesario para obtener un resultado. Por ejemplo, la amplificación de secuencias basadas en ácidos nucleicos (NASBA) junto con la detección electro-quimioluminiscente (NASBA/ECL) consiste en una reacción isoterma continua en la que no se necesita un equipamiento especializado tipo termociclador. Se han desarrollado ensayos NASBA para la detección en 6 horas del virus de la gripe aviar de los subtipos H5 y H7 en muestras clínicas (13, 24).

Parece muy probable que en muy poco tiempo la tecnología basada en métodos moleculares se haya desarrollado lo suficiente para permitir realizar ensayos “ a pie del rebaño” para la detección de la presencia del virus de la gripe aviar, el subtipo específico y los marcadores de virulencia. El grado en que empleen tales ensayos en el diagnóstico de la gripe aviar dependerá mucho del acuerdo y la adopción de definiciones legales de las infecciones con vistas al control y el comercio.

C. REQUISITOS PARA LAS VACUNAS Y LOS MATERIALES DE DIAGNÓSTICO

Se ha demostrado empíricamente que la vacunación proporciona protección contra los síntomas clínicos y la mortalidad debida a la GAN y la GANPV, reduce la diseminación del virus y aumenta la resistencia al la infección, protégé contra diversos virus de campo dentro del mismo subtipo de hemaglurinina, protege contra la exposición baja y a al desafío y reduce la excreción y, como consecuencia, de la transmisión del virus de desafío por contacto (12, 16, 47, 53). Sin embargo, el virus aún es capaz de infectar y replicarse en aves vacunadas clínicamente sanas. La mayor parte de los trabajos en los que se evalúan las vacunas se han realizados sobre pollos y pavos, y debe evitarse la extrapolación de los resultados obtenidos a otras especies. Por ejemplo, en un sistema experimental en el que se utilizó GAMV (GAMV) H7N7como virus de desafío se demostró que, para los pollos y cercetas de collar (*Callonetta leucophrys*), la vacunación redujo bastante la excreción y aumentó la dosis infectiva, que se redujo drásticamente el contagio entre aves, pero que, en el caso de los faisanes dorados, *Chrysolophus pictus*, la vacunación proporcionaba protección clínica pero no surtía efecto sobre la excreción del virus de desafío y no influía en la transmisión (58, 59). En algunos países las vacunas diseñadas para prevenir la

GAN están prohíbidas de forma explícita o no recomendadas por las agencias gubernamentales porque se ha considerado que pueden interferir con las políticas de control para la erradicación. No obstante, la mayor parte de las normas de control de la GA reserva el derecho a utilizar vacunas en casos de emergencia.

Es importante que la vacunación no se considere como la única solución para el control de los subtipos de la GAN o la GAPV si lo que se persigue es la erradicación. Sin la aplicación de sistemas de control, bioseguridad y despoblación estrictas a la vista de la infección, cabe la posibilidad de que esos virus se hagan endémicos en poblaciones de aves de corral vacunadas. La circulación del virus a largo plazo en una población vacunada puede desembocar en cambios antigénicos y genéticos del virus, lo que ya ha ocurrido en México (27).

No se recomiendan las vacunas vivas convencionales de la gripe frente a ningún subtipo.

- **Vacunas convencionales**

Tradicionalmente, las vacunas que usadas contra GAN o GAPV se han preparado con líquido alantoide infectado e inactivado por beta-propiolactona o formalina y emulsionado con aceite mineral.

La existencia de un gran número de subtipos víricos, junto con la conocida variación de diferentes cepas de un subtipo, plantea serios problemas a la hora de seleccionar cepas para producir vacunas de la gripe, especialmente la gripe GAPV. Además, algunos aislamientos no crecen hasta un título suficientemente elevado como para producir vacunas potentes sin tener que realizar una concentración previa costosa. Las vacunas producidas han sido bien endógenas, p. ej., preparadas a partir de aislamientos implicados específicamente en una epizootia, o bien se han preparado a partir de virus que poseen el mismo subtipo de hemaglutinina y que proporcionan grandes concentraciones de antígeno. En este último caso en los EEUU se ha llevado a cabo cierta estandarización, en el sentido de que los National Veterinary Services Laboratories han propagado y mantenido virus de la gripe de cada subtipo para su empleo como inóculo vírico en la preparación de vacunas inactivadas (5).

Desde los años setenta, en EE.UU. se han empleado de forma restringida vacunas inactivadas producidas con una licencia especial con fines comerciales (22, 30, 37). Se las ha usado sobre todo en pavos y contra virus que no son muy virulentos, pero que pueden causar graves problemas, especialmente en circunstancias exacerbantes. Se han empleado cantidades importantes de esas vacunas (23, 30). En Italia también se ha utilizado durante varios años la vacunación convencional contra la principal cepa de la GAPV (15). Se ha utilizado la vacunación contra las infecciones por H9N2 en Pakistán (34), en Irán (57) y en la República Popular China (28).

En Utah se elaboró en 1995 una vacuna inactivada a partir del virus de la GANPV, subtipo H7N3, responsable de una serie de brotes en pavos, en conjunción con otras medidas, para controlar dichos brotes (23). De forma similar, en 2003 en Connecticut, se implementó la vacunación de gallinas y pollitas de reposición con vacuna de H7N2 o H7N3 tras el surgimiento de un brote de GANPV causado por un virus H7N2 (49).

La vacunación contra GANMV del subtipo H5N2 se utilizó en México tras los brotes de 1994–1995, y en Pakistán contra el subtipo H7N3 (19, 27, 33) tras los brotes de 1995. Parece que en México se ha erradicado el virus de la GANMV, pero el virus de la GANPV del subtipo H5N2 ha seguido circulando, mientras que en Pakistán en 2002 (54) y 2004 todavía se estaban aislando los virus muy virulentos de la GA, que, desde el punto de vista genético, son parecidos a los virus muy virulentos originales de la GA. Después de los brotes de GANMV causados por el virus H5N1 en Hong Kong en 2002 (42), se adoptó una política de vacunación en ese territorio usando una vacuna contra el H5N2. En 2004 la extensión de los brotes de GA muy virulenta de tipo H5N1 en varios países del Sureste asiático provocó que se utilizara una vacunación profiláctica en la República Popular China e Indonesia. También se ha utilizado la vacunación profiláctica en zonas restringidas de Italia para facilitar el control de los virus GANPV de tipo H5 y H7.

- **Vacunas recombinantes**

Se han fabricado vacunas recombinantes contra los virus de la GA mediante la inserción del gen codificador de la hemaglutinina del virus de la gripe en un vector del virus vivo y la utilización de ese virus recombinante para inmunizar aves de corral contra la GA. Las vacunas con vector vivo recombinante tienen varias ventajas: [1] se trata de vacunas vivas capaces de proporcionar inmunidad humoral y celular; [2] se pueden administrar a aves jóvenes y producen una protección inicial, p.ej. el poxvirus aviar puede administrarse a pollos de un día, es compatible con la vacuna de la enfermedad de Marek's, y proporciona una protección importante a la semana siguiente; [3] ayudan a distinguir entre aves infectadas y aves vacunadas, ya que, por ejemplo, no inducen la producción de anticuerpos contra los antígenos de la nucleoproteína o de la matriz que son comunes en todos virus de la GA. Por tanto, sólo las aves infectadas de forma natural mostrarán anticuerpos en la prueba IGDA o en las pruebas ELISA utilizadas para la detección de anticuerpos de la gripe del grupo A (nucleoproteína y/o matriz). Sin embargo, estas vacunas tienen inconvenientes en el sentido de que replicarán de forma poco

satisfactoria y proporcionarán inmunidad solamente parcial en aves que hayan estado sometidas a exposición natural al virus vector o hayan sido vacunadas con dicho virus, i.e. poxvirus aviar o virus infecciosos de la laringotraqueitis para las vacunas recombinantes disponibles en la actualidad (29, 50). Si se usa en aves de un día o en aves jóvenes, el efecto de los anticuerpos maternos frente al virus vector sobre la eficacia de la vacuna puede variar según el tipo de vector. En relación con la vacuna recombinante con poxvirus aviar, se ha informado de que se consiguió una inmunización efectiva cuando se administró a pollos de 1 día que tenían distintos niveles de inmunidad materna (3). No obstante, cuando se esperan niveles altos de anticuerpos maternos debido a la infección o vacunación previas, se deberá confirmar la eficacia de la vacuna con vector de viruela aviar en los pollos de un día de edad. Además, puesto que los vectores son virus vivos con un rango restringido de hospedadores (el virus de la laringotraqueítis, por ejemplo, no se replica en los pavos), debe restringirse el uso de estas vacunas en especies para las que se haya demostrado la eficacia de las mismas.

El uso de vacunas recombinantes está restringido a países en los que están autorizadas y su existencia es legal. La vacuna recombinante H5 de la viruela-GA está autorizada en El Salvador, Guatemala, México y EE.UU. (47). Las vacunas de poxvirus aviar que contienen H5 HA se han elaborado y evaluado mediante pruebas de campo (7, 20, 38, 51), pero la únicas experiencias de campo con esta vacuna han tenido lugar en México, El Salvador y Guatemala, países en los se utilizó durante la campaña de vacunación contra el virus H5N2. Entre 1995 y 2001, en México se usaron más de 1.423 billones de dosis de la vacuna H5N2 inactivada en su programa de control del H5N2 (61). Además, en México, Guatemala y El Salvador, se han usado más de mil millones de dosis de la vacuna recombinante H5 para la viruela-GA para el control de la GANPV del tipo H5N2 desde 1997 a 2003.

También se puede utilizar el virus de la enfermedad de Newcastle como vector para expresar los genes HA de la gripe (35). Se demostró que el virus de la vacuna recombinante contra la enfermedad de Newcastle (clon 30) que contiene y expresa un gen H5 HA protege a los pollos contra el desafío con virus virulento de la enfermedad de Newcastle o con virus H5N2 de la GAMV virus (60). En China (21), se produjo una cepa vacunal de virus recombinante similar basada en la enfermedad de Newcastle, denominado La Sota, que expresa la procedencia asiática del gen H5 HA y se ha informado de su eficacia en estudios sobre protección en los que se han utilizado los dos virus. Este último virus se autorizó y utilizó ampliamente en China como una de las cuatro vacunas H5 autorizadas de acuerdo con la política actual de vacunación obligatoria en virtud de la cual se vacunaron 8.200 billones de aves entre enero y septiembre de 2006 (31). Al igual que sucede con otras vacunas recombinantes, parece de dudosa adecuación el uso de esta vacunación aves adultas que estén bien inmunizadas contra la enfermedad de Newcastle, y no está claro hasta qué punto pueda verse afectada la eficacia de la vacuna por la presencia de inmunidad materna para el vector o la HA de la GA en pollos jóvenes.

- **Otras vacunas novedosas**

Se ha utilizado un sistema de expresión del baculovirus para producir antígenos recombinantes H5 y H7 para incorporarlos a las vacunas (62).

Se ha evaluado el ADN codificador de la hemaglutina de H5 como posible vacuna para las aves de corral (26).

- **Detección de la infección en parvadas vacunadas y en aves vacunadas**

Se ha propuesto una estrategia para la “diferenciación entre animales infectados y animales vacunados” (DAIAV) como posible solución para la eventual erradicación de GAN sin necesidad de sacrificar aves de forma masiva con el consiguiente perjuicio económico que eso conllevaría, especialmente en países en vías de desarrollo. (17). Esa estrategia proporciona las ventajas de la vacunación (menos virus en el medio ambiente), pero la capacidad para identificar parvadas infectadas permitiría la puesta en práctica de otras medidas de control, incluida la erradicación. En las parvadas, un método sencillo consiste en la observación regular de aves centinela sin vacunar dentro de cada bandada vacunada, pero este método conlleva algunos problemas, especialmente el relativo a la identificación de las aves centinela dentro de grandes parvadas. Como sistema alternativo o subsidiario, se pueden realizar pruebas de infección natural de aves vacunadas. Para lograr tal cosa, deben utilizarse sistemas de vacunación que faciliten la detección de la infección natural en poblaciones vacunadas. Se han desarrollado varios sistemas en los últimos años. Uno de ellos es el uso de vacunas que contengan un virus con el mismo subtipo de hemaglutinina (H) pero diferente neuraminidasa (N) que el virus natural. Los anticuerpos frente a la N del virus natural actúan como marcadores naturales de la infección. Este sistema se ha utilizado en Italia tras el resurgimiento en el año 2000 de un virus H7N1 de la GANPV. Para complementar las medidas directas de control, se desarrolló una estrategia de “DAIAV” usando una vacuna que contenía H7N3 para combatir una infección natural por H7N1. Las aves vacunadas y las infectadas naturalmente se distinguieron empleando un ensayo serológico para detectar anticuerpos específicos anti-N (9, 10). La misma estrategia se utilizó controlar la GANPV causada por H7N3 en Italia en 2002–2003 (8), en este caso con una vacuna de H7N1. En los dos casos, la erradicación mediante la estrategia DAIAV trajo como resultado la erradicación del virus natural. Puede haber problemas con ese sistema en caso de que surja un virus natural con un antígeno frente a la N diferente o si ya hay subtipos con diferentes antígenos frente a la N circulando en el campo.

Como alternativa, el uso de vacunas que solo tengan HA, por ejemplo, vacunas recombinantes, permite la utilización del clásico IGDA y de pruebas ELISA basados en NP o en matriz para detectar la infección en aves vacunadas. En relación con las vacunas inactivadas, se ha descrito una prueba para la detección de anticuerpos frente a la proteína vírica no estructural (55). Este sistema todavía tiene que ser validado en condiciones de campo.

- **Producción de vacunas convencionales**

La información que se da a continuación se basa principalmente en la experiencia en EEUU, y en las instrucciones y política para la licencia de las vacunas de gripe aviar en ese país (58). Los principios básicos de producción de vacunas, concretamente las vacunas inactivadas, son comunes a varios virus, p. ej. la enfermedad de Newcastle (capítulo 2.7.13).

Las instrucciones para la producción de vacunas veterinarias se dan en el Capítulo 1. 1. 7. *Principios de producción de vacunas veterinarias*. Las directrices que se muestran aquí y en el Capítulo 1. 1. 7 pretenden ser de carácter general y pueden completarse mediante requisitos nacionales o regionales.

La instalación para la producción de la vacuna debería funcionar bajo los procedimientos y prácticas de seguridad adecuados. Si se emplea un virus GANMV para la producción de la vacuna o en estudios de sensibilización con la vacuna, la zona de la instalación donde se realiza este trabajo debería cumplir los requisitos para los patógenos del Grupo 4 de Contención tal como se esbozó en el capítulo 1.1.6 de este *Manual Terrestre.*

1. Control del inóculo

a) Características del inóculo

Solamente deberían emplearse virus de la gripe tipo A bien caracterizados y de probada baja patogenicidad, obtenidos preferiblemente a partir de un depósito nacional o internacional, para establecer el inóculo original para la obtención de vacunas inactivadas de cualquier subtipo.

b) Método de cultivo

Se establece un inóculo original, y a partir de éste un inóculo de trabajo. El inóculo original y el inóculo de trabajo se producen en huevos embrionados SPF y SAN. El establecimiento de un cultivo original puede implicar solamente la producción de un gran volumen de líquido alantoideo infectivo (mínimo 100 ml), que puede almacenarse en alícuotas liofilizadas (0,5 ml).

c) Validación como vacuna

El inóculo original debería revisarse después de su preparación en cuanto a su esterilidad, inocuidad, potencia y ausencia de agentes externos específicos.

2. Método de fabricación

Para producir la vacuna, en primer lugar se establece un inóculo de trabajo en huevos embrionados SPF o SAN, a partir del cual se producen los lotes de vacuna, mediante la expansión de una alícuota del inóculo original hasta un volumen suficiente que permita la producción de la vacuna durante 12-18 meses. Es mejor almacenar el inóculo original en forma líquida a menos de –60º C, ya que los virus liofilizados no siempre se multiplican con títulos altos después del primer pase.

Las vacunas inactivadas de la gripe preparadas a partir de virus convencionales se producen en embriones de pollo. El método de producción consiste básicamente en la propagación del virus de manera aséptica; todos los procedimientos se llevan a cabo en condiciones estériles.

Es habitual diluir el inóculo de trabajo en tampón isotónico estéril (PBS, pH 7,2), de manera que se inoculan en cada cavidad alantoidea de 9 ó 11 embriones de pollo SPF o SAN de diez días de edad aproximadamente 10^3-10^4 EID_{50} (dosis infectiva 50% por embrión) por 0,1 ml. Dichos embriones se incuban a 37ºC. Los embriones que mueren en 24 horas deberían descartarse. El periodo de incubación dependerá de la cepa de virus que se emplee y tendrá que ser predeterminado para asegurar un máximo rendimiento con el mínimo número de muertes de embriones.

Los embriones infectados deberían enfriarse a 4ºC antes de concentrarse. Se elimina la cáscara de la parte superior de los huevos y los líquidos alantoideos se aspiran. Deberá evitarse la inclusión de cualquier material de

la yema y albúmina. Todos los fluidos deberían almacenarse inmediatamente a 4ºC y ensayarse para la existencia de contaminación bacteriana.

Durante la preparación de vacunas inactivadas, el líquido alantoideo concentrado se trata, bien con formaldehído (una concentración final típica es 1/1.000–1/4000) o beta-propiolactona (una concentración típica final es 1/2.000-1/4.000). El tiempo necesario debe ser suficiente para asegurar la ausencia de virus vivos. La mayoría de las vacunas inactivadas se formulan con líquido alantoideo (ingrediente activo) inactivado y no concentrado. Sin embargo los ingredientes activos pueden concentrarse para facilitar el almacenamiento de antígeno. El ingrediente activo se emulsiona normalmente con aceite mineral o vegetal. Las formulaciones precisas generalmente son secretos comerciales.

3. Control del proceso

En las vacunas inactivadas, la eficacia del proceso de inactivación debería ensayarse en embriones de pollo, tomando por lo menos 10 alícuotas de 0,2 ml de cada lote y pasando cada alícuota al menos dos veces en embriones SPF o SAN.

4. Control del lote

La mayoría de los países han publicado especificaciones para el control de la producción y ensayo de las vacunas, que incluyen la definición de las pruebas obligatorias con las vacunas durante y después de su fabricación.

a) Esterilidad

Las determinaciones de esterilidad y ausencia de contaminación con materiales biológicos pueden encontrarse en el Capítulo I.1.5.

b) Inocuidad

En las vacunas inactivadas, se administra una dosis doble por la ruta recomendada a diez aves de 3 semanas de edad, y se observa durante 2 semanas la ausencia de signos clínicos de enfermedad o lesiones locales.

c) Potencia

Generalmente se evalúa la potencia de la vacuna contra la gripe aviar ensayando su capacidad para producir un título de HI elevado en las aves. Puede emplearse un ensayo convencional de potencia que implique el empleo de tres dosis diluidas y la sensibilización con el virus virulento (p. ej. Capítulo 2.7.13.) para vacunas preparadas para proteger frente a subtipos de GANMV o GAPV. En las vacunas inactivadas frente a otros subtipos cuando no se encuentran disponibles virus virulentos, los ensayos de potencia pueden basarse en la medida de la respuesta inmune o la sensibilización y valoración de la morbilidad y la reducción cuantitativa de la replicación de virus de desafío en los tractos respiratorio (orofaríngeo o traqueal) e intestinal (cloaca). La valoración del contenido de antígeno de hemaglutinina (64) puede permitir la extrapolación *in vitro* de la potencia en los siguientes lotes de vacuna.

d) Estabilidad

Cuando se almacena bajo las condiciones recomendadas, la vacuna debería mantener su potencia durante al menos 1 año. Las vacunas inactivadas no deben congelarse.

e) Conservantes

Puede utilizarse un conservante para la vacuna distribuida en contenedores multidosis.

f) Precauciones (riesgos)

Debe tenerse cuidado en evitar la autoinyección con las vacunas emulsionadas en aceite.

5. Pruebas en el producto final

a) Inocuidad

Ver Sección C. 4. b. arriba

b) Potencia

Ver Sección C. 4. c. arriba

REFERENCIAS

1. ALEXANDER D.J. (1993). Orthomyxovirus infections. *In:* Viral Infections of Vertebrates, Volume 3: Viral Infections of Birds, McFerran J.B. & McNulty M.S., eds. Horzinek M.C., Series editor. Elsevier, Amsterdam, The Netherlands, 287–316.

2. ALTMULLER A., KUNERL M., MULLER K., HINSHAW V.S., FITCH W.M. & SCHOLTISSEK C. (1991). Genetic relatedness of the nucleoprotein (NP) of recent swine, turkey and human influenza A virus (H1N1) isolates. *Virus Res*., **22**, 79–87.

3. ARRIOLA J.M., FARR W., URIBE G. & ZURITA J. (1999). Experiencias de campo en el uso de vacunos contra influenza aviar. *In;* Proceedings Curso de Enfermedades Respiratorias de las Aves, Asociacion Nacional de Especialistas en Cienvias Avicelase, 3–13.

4. BANKOWSKI R.A. (1982). Proceedings of the First International Symposium on Avian Influenza, 1981. Carter Comp., Richmond, USA.

5. BANKOWSKI R.A. (1985). Report of the Committee on Transmissible Diseases of Poultry and Other Avian Species. Proceedings of the 88th Annual Meeting of the U.S. Animal Health Association, 474–483.

6. BEARD C.W. (1970). Demonstration of type-specific influenza antibody in mammalian and avian sera by immunodiffusion. *Bull. WHO*, **42**, 779–785.

7. BEARD C.W., SCHNITZLEIN W.M. & TRIPATHY D.N. (1991). Protection of chickens against highly pathogenic avian influenza virus (H5N2) by recombinant fowlpox viruses. *Avian Dis*., **35,** 356–359.

8. CAPUA I. & ALEXANDER D.J. (2004). Avian influenza: recent developments. *Avian Pathol*., **33**, 393–404.

9. CAPUA I., CATTOLI G., MARANGON S., BORTOLOTTI L. & ORTALI G. (2002). Strategies for the control of avian influenza in Italy. *Vet. Rec*., **150**, 223.

10. CAPUA I. &. MARANGON S. (2000). Review article: The avian influenza epidemic in Italy, 1999–2000. *Avian Pathol.,* **29**, 289–294.

11. CAPUA I., TERREGINO C., CATTOLI G., MUTINELLI F. & RODRIGUEZ J.F. (2003). Development of a DIVA (Differentiating Infected from Vaccinated Animals) strategy using a vaccine containing a heterologous neuraminidase for the control of avian influenza. *Avian Pathol*., **32**, 47–55.

12. CAPUA I., TERREGINO C., CATTOLI G. & TOFFAN A. (2004). Increased resistance of vaccinated turkeys to experimental infection with an H7N3 low-pathogenicity avian influenza virus. *Avian Pathol.,* **33**, 47–55.

13. COLLINS R.A., KO L.S., SO K.L., ELLIS T., LAU L.T. & YU A.C.H. (2002). Detection of highly pathogenic and low pathogenic avian influenza subtype H5 (Eurasian lineage) using NASBA. *J. Virol. Methods*, **103**, 213–225.

14. COUNCIL OF THE EUROPEAN COMMUNITIES (1992). Council Directive 92/40/EEC of 19th May 1992 introducing Community measures for the control of avian influenza. *Off. J. European Communities*, **L167**, 1–15.

15. DAPRILE P.N. (1986). Current situation of avian influenza in Italy and approaches to its control. *In:* Acute Virus Infections of Poultry, McFerran J.B. & McNulty M.S., eds. Martinus Nijhoff, Dordrecht, The Netherlands, 29–35.

16. EUROPEAN UNION (EU) SCIENTIFIC COMMITTEE ON ANIMAL HEALTH AND ANIMAL WELFARE (SCAHAW) (2003). Food Safety: Diagnostic Techniques and Vaccines for Foot and Mouth Disease, Classical Swine Fever, Avian Influenza and some other important OIE List A Diseases. Report of the Scientific Committee on Animal Health and Animal Welfare. http://europes.eu.int/comm/food/fs/sc/scah/out93

17. FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION OF THE UNITED (FAO) (2004). FAO, OIE & WHO Technical consultation on the Control of Avian Influenza. Animal health special report. http://www.fao.org/ag/againfo/subjects/en/health/diseases-cards/avian_recomm.html

18. GARCIA A., CRAWFORD J.M., LATIMER J.W., RIVERA-CRUZ E. & PERDUE M.L. (1996). Heterogeneity in the haemagglutinin gene and emergence of the highly pathogenic phenotype among recent H5N2 avian influenza viruses from Mexico. *J. Gen. Virol.*, **77**, 1493–1504.

19. GARCIA A., JOHNSON H., KUMAR SRIVASTAVA D., JAYAWARDENE D.A., WEHR D.R. & WEBSTER R.G. (1998). Efficacy of inactivated H5N2 influenza vaccines against lethal A/chicken/Queretaro/19/95 infection. *Avian Dis.*, **42**, 248–256.

20. GARCIA-GARCIA J., RODRIGUEZ V.H. & HERNANDEZ M.A. (1998). Experimental studies in field trials with recombinant fowlpox vaccine in broilers in Mexico. Proceedings of the Fourth International Symposium on Avian Influenza, Athens, Georgia, USA. Swayne D.E. & Slemons R.D., eds. U.S. Animal Health Association, 245–252.

21 GE, J. DENG, G., WEN, Z., TIAN, G., WANG, Y., SHI, J., WANG, X., LI, Y., HU, S., JIANG, Y., YANG, C., YU, K., BU, Z. & CHEN, H. (2007). Newcastle disease virus-based live attenuated vaccine completely protects chickens and mice from lethal challenge of homologous and heterologous H5N1 avain influenza viruses. *J. Virol*. **81**, 150-158.

22. HALVORSON D.A. (1998). Strengths and weaknesses of vaccines as a control tool. Proceedings of the Fourth International Symposium on Avian Influenza, Athens, Georgia, USA. Swayne D.E. & Slemons R.D., eds. U.S. Animal Health Association, 223–227.

23. HALVORSON D.A., FRAME D.D., FRIENDSHUH A.J. & SHAW D.P. (1998). Outbreaks of low pathogenicity avian influenza in USA. Proceedings of the Fourth International Symposium on Avian Influenza, Athens, Georgia, USA. Swayne D.E. & Slemons R.D., eds. US Animal Health Association, 36–46.

24. KO L.S., LAU L.T., BANKS J., AHERNE R., BROWN I.H., COLLINS R.A., CHAN K.Y., XING J. & YU A.C.H (2004). Nucleic acid sequence-based amplification methods to detect avian influenza virus. *Biochem. Biophys. Res. Commun*. 313, 336-342.

25. KOCH G. (2003). Laboratory issues: Assessment of the sensitivity and specificity of PCR for NDV on cloacal and tracheal swabs compared to virus isolation. Proceedings of the Joint Eighth Annual Meetings of the National Newcastle Disease and Avian Influenza Laboratories of Countries of the European Union, Padova, Italy, 2002. Commission of the European Communities, pp 114–117.

26. KODIHALLI S. & WEBSTER R.G. (1998). DNA vaccines for avian influenza – a model for future poultry vaccines? Proceedings of the Fourth International Symposium on Avian Influenza, Athens, Georgia, USA. Swayne D.E. & Slemons R.D., eds. U.S. Animal Health Association, 263–280.

27. LEE C.W, SENNE D.A. & SUAREZ D.L. (2004). Effect of vaccine use in the evolution of Mexican lineage H5N2 avian influenza virus. *J. Virol.*, **78** (15), 8372–8381.

28. LIU H.Q., PENG D.X., CHENG J., JIA L.J., ZHANG RK. & LIU X.F. (2002). Genetic mutations of the haemagglutinin genes of H9N2 subtype avian influenza viruses. *J. Yangzhou University, Agriculture and Life Sciences Edition*, **23**, 6–9.

29. LYSCHOW D., WERNER O., METTENLEITER T.C. & FUCHS W. (2001). Protection of chickens from lethal avian influenza A virus infection by live-virus vaccination with infectious laryngotracheitis virus recombinants expressing the hemagglutinin (H5) gene. *Vaccine,* **19**, 4249–4259.

30. MCCAPES R.H. & BANKOWSKI R.A. (1985). Use of avian influenza vaccines in California turkey breeders – medical rationale. Proceedings of the Second International Symposium on Avian Influenza, Athens, Georgia, USA. U.S. Animal Health Association, 271–278.

31. MINISTRY OF AGRICULTURE, P.R. CHINA (2006). Poultry avian influenza vaccination in China. http://www.agri.gov.cn/ztzl/gdztzl/P020061023368529330005.pdf

32. MUNCH M., NIELSEN L., HANDBERG K. & JORGENSEN P. (2001). Detection and subtyping (H5 and H7) of avian type A influenza virus by reverse transcription-PCR and PCR-ELISA. *Arch. Virol.,* **146**, 87–97.

33. NAEEM K. (1998). The avian influenza H7N3 outbreak in South Central Asia. Proceedings of the Fourth International Symposium on Avian Influenza, Athens, Georgia, USA. Swayne D.E. & Slemons R.D., eds. U.S. Animal Health Association, 31–35.

34. NAEEM K., ULLAH A., MANVELL R.J. & ALEXANDER D.J. (1999). Avian influenza A subtype H9N2 in poultry in Pakistan. *Vet. Rec.*, **145***,* 560.

35. NAKAYA, T., CROS, J., PARK, M-S., NAKAYA, Y., SAGRERA, A., VILLAR, E., GARCIA-SASTRE, A. & PALESE, P. (2001). Recombinant Newcastle disease virus as a vaccine vector. *J. virol*. **74**, 11868-11873.

36. OFFICE INTERNATIONAL DES EPIZOOTIES (OIE) (1992). Chapter A15, Highly Pathogenic Avian Influenza (Fowl Plague). *In:* Manual of Standards for Diagnostic Tests and Vaccines, Second Edition. OIE, Paris, France.

37. PRICE R.J. (1982). Commercial avian influenza vaccines. *In:* Proceedings of the First Avian Influenza Symposium, 1981. Carter Comp., Richmond, USA, 178–179.

38. QIAO C.L., YU K.Z., JIANG Y.P., JIA Y.Q., TIAN G.B., LIU M., DENG G.H., WANG X.R., MENG Q.W. & TANG X.Y. (2003). Protection of chickens against highly lethal H5N1 and H7N1 avian influenza viruses with a recombinant fowlpox virus co-expressing H5 haemagglutinin and N1 neuraminidase genes. *Avian Pathol.*, **32**, 25–31.

39. SCHILD G.C., NEWMAN R.W., WEBSTER R.G., MAJOR D. & HINSHAW V.S. (1980). Antigenic analysis of influenza A virus surface antigens: considerations for the nomenclature of influenza virus. *Arch. Virol.*, **83**, 171–184.

40. SENNE D.A., PANIGRAHY B., KAWAOKA Y., PEARSON J.E., SUSS J., LIPKIND M., KIDA H. & WEBSTER R.G. (1996). Survey of the haemagglutinin (HA) cleavage site sequence of H5 and H7 avian influenza viruses: amino acid sequence at the cleavage site as a marker of pathogenicity potential. *Avian Dis*., **40**, 425–437.

41. SHAFER A.L., KATZ J.B. & EERNISSE K.A. (1998). Development and validation of a competitive enzyme-linked immunosorbent assay for detection of Type A influenza antibodies in avian sera. *Avian Dis*., **42**, 28–34.

42. SIMS L.D. (2003) Avian influenza in Hong Kong. Proceeding of the Fifth International Symposium on Avian Influenza, Athens, Georgia, USA, 14–17 April 2002. *Avian Dis.,* **47**, 832–838.

43. SLEMONS R.D. & BRUGH M. (1998). Rapid antigen detection as an aid in early diagnosis and control of avian influenza. *In:* Proceedings of the Fourth International Symposium on Avian Influenza, Athens, Georgia, USA. Swayne D.E. & Slemons R.D., eds. US Animal Health Association, 313–317.

44. SPACKMAN E., SENNE D.A., MYERS T.J., BULAGA L.L., GARBER L.P., PERDUE M.L., LOHMAN K., DAUM L.T. & SUAREZ D.L. (2002). Development of a real-time reverse transcriptase PCR assay for type A influenza virus and the avian H5 and H7 hemagglutinin subtypes. *J. Clin. Microbiol.,* **40**, 3256–3260.

45. STARICK E., ROMER-OBERDORFER A. & WERNER O. (2000). Type- and subtype-specific RT-PCR assays for avian influenza viruses. *J. Vet. Med.* [*B*]*,* **47**, 295–301.

46. SUAREZ D. (1998). Molecular diagnostic techniques: can we identify influenza viruses differentiate subtypes and determine pathogenicity potential of viruses by RT-PCR? Proceedings of the Fourth International Symposium on Avian Influenza, Athens, Georgia. US Animal Health Association, Pennsylvania, USA, 318–325.

47. SWAYNE D.E. (2003). Vaccines for list A poultry diseases; emphasis on avian influenza. *Dev. Biol.* (Basel), **114**, 201–212.

48. SWAYNE D.E. (2005). Application of new vaccine technologies for the control of transboundary diseases. *Dev. Biol*. In press.

49. SWAYNE D.E. & AKEY B. (2004). Avian influenza control strategies in the United States of America. *In:* Proceedings of the Frontis Workshop on Avian Influenza Prevention and Control, Wageningen, The Netherlands, 13–15 October 2003, R.S. Schrijver & Koch G., eds. http://www.wur.nl/frontis/

50. SWAYNE D.E., BECK J.R. & KINNEY N. (2000). Failure of a recombinant fowl poxvirus vaccine containing an avian influenza hemagglutinin gene to provide consistent protection against influenza in chickens preimmunized with a fowl pox vaccine. *Avian Dis*., **44**, 132–137.

51. SWAYNE D.E. & MICKLE T.R. (1997). Protection of chickens against highly pathogenic Mexican-origin H5N2 avian influenza virus by a recombinant fowlpox vaccine. Proceedings the 100th Annual Meeting of the US Animal Health Association, Little Rock, USA, 1996, 557–563.

52. SWAYNE D.E., SENNE D.A. & BEARD C.W. (1998). Influenza. *In:* Isolation and Identification of Avian Pathogens, Fourth Edition, Swayne D.E., Glisson J.R., Jackwood M.W., Pearson J.E. & Reed W.M., eds. American Association of Avian Pathologists, Kennett Square, Pennsylvania, USA, 150–155.

53. SWAYNE D.E. & SUAREZ D.L. (2000). Highly pathogenic avian influenza. *Rev. sci. tech. Off. Int. Epiz.*, **19**, 463–482.

54. SWAYNE D.E. & SUAREZ D.L. (2001). Avian influenza in Europe, Asia and Central America during 2001. *In:* Proceedings of the 104th annual meeting of the US Animal Health Association, USAHA, Richmond, Virgina, USA, 465–470.

55. TUMPEY T.M., ALVAREZ R., SWAYNE D.E. & SUAREZ D.L. (2005). A diagnostic aid for differentiating infected from vaccinated poultry based on antibodies to the nonstructural (NS1) protein of influenza A virus. *J. Clin. Microbiol.*, **43**, 676-683.

56. UNITED STATES DEPARTMENT OF AGRICULTURE (USDA) (1995). Memorandum No. 800.85. Avian influenza vaccines. USDA, Veterinary Biologics, Animal and Plant Health Inspection Services.

57. VAN DER GOOT, J.A., KOCH, G., DE JONG, M.C.M. & VAN BOVEN, M. (2005). Quantification of the effect of vaccination on transmission of avian influenza (H7N7) in chickens. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA,* **102**, 18141-18146.

58. VAN DER GOOT, J.A., VAN BOVEN, M., KOCH, G. & DE JONG M.C.M. (2006). Proceedings of the Joint 11th Annual Meetings of the National Laboratories for Newcastle Disease and Avian Influenza of EU Member States, VAG Uccle Brussels, 2005 pp 130-133. http://ec.europa.eu/food/animal/diseases/controlmeasures/avian/crls_proceedings_en.htm

59. VEITS, J., WIESNER, D., FUCHS, W., HOFFMANN, B., GRNZOW, H., STARICK, E., MUNDT, E., SCHIRRMEIER, H., MEBATSION, T., METTENLEITER, T.C., & ROMER-OBERDORFER, A. (2006). Newcastle disease virus expressing H5 hemagglutinin gene protects chickens against Newcastle disease and avian influenza. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **103**, 8197-8202.

60. VASFI MARANDI M., BOZORGMEHRI FARD M.H. & HASHEMZADEH M. (2002). Efficacy of inactivated H9N2 avian influenza vaccine against non-highly pathogenic A/chicken/Iran/ZMT-173/1999. *Arch. Razi Institute,* **53**, 23–32.

61. VILLAREAL-CHAVEZ C. & RIVERA CRUZ E. (2003). An update on avian influenza in Mexico. *In:* Proceedings of the 5th International Symposium on Avian Influenza. Georgia Center for Continuing Education, University of Georgia, Athens, Georgia, USA, 14–17 April 2002. *Avian Dis.*, **47**, 1002–1005.

62. WILKINSON B.E. (1998). Recombinant hemagglutinin subunit vaccine produced in a baculovirus expression vector system. Proceedings of the Fourth International Symposium on Avian Influenza, Athens, Georgia, USA. Swayne D.E. & Slemons R.D., eds. US Animal Health Association, 253–262.

63. WOOD G.W., BANKS J., STRONG I., PARSONS G. & ALEXANDER D.J. (1996). An avian influenza virus of H10 subtype that is highly pathogenic for chickens but lacks multiple basic amino acids at the haemagglutinin cleavage site. *Avian Pathol.*, **25,** 799–806.

64. WOOD J.M., KAWAOKA Y., NEWBERRY L.A., BORDWELL E. & WEBSTER R.G. (1985). Standardisation of inactivated H5N2 influenza vaccine and efficacy against lethal A/chicken/Pennsylvania/1370/83 infection. *Avian Dis.,* **29,** 867–872.

65. WOOD G.W., MCCAULEY J.W., BASHIRUDDIN J.B. & ALEXANDER D.J. (1993). Deduced amino acid sequences at the haemagglutinin cleavage site of avian influenza A viruses of H5 and H7 subtypes. *Arch. Virol.,* **130,** 209–217.

66. WOOD G.W., PARSONS G. & ALEXANDER D.J. (1995). Replication of influenza A viruses of high and low pathogenicity for chickens at different sites in chickens and ducks following intranasal inoculation. *Avian Pathol.*, **24**, 545–551.

67. WORLD HEALTH ORGANIZATION EXPERT COMMITTEE (1980). A revision of the system of nomenclature for influenza viruses: a WHO Memorandum. *Bull. WHO*, **58**, 585–591.

68. WORLD ORGANIZATION FOR ANIMAL HEALTH (OIE) (2005). Chapter 2.7.12 Avian Influenza. *In:* Terrestrial Animal Health Code, Fourteenth Edition. OIE, Paris, France pp294-300.

NB: Existen laboratorios de referencia de la OIE para la Gripe Aviar Muy Virulenta (véase el cuadro en la Parte 3 de este *Manual de animales terrestres* o consúltese la lista más actualizada en la página Web de la OIE: www.oie.int).