

## CAPÍTULO 2.3.4.

# INFLUENZA AVIAR (INFECCIÓN POR LOS VIRUS DE LA INFLUENZA AVIAR)

---

### RESUMEN

La influenza A está causada por virus específicos que son miembros de la familia Orthomyxoviridae y que pertenecen al género Influenzavirus A. Existen tres tipos de influenza, que son A, B y C; por lo que se sabe, solo los influenzavirus de tipo A infectan a las aves. El diagnóstico se lleva a cabo mediante el aislamiento del virus o por detección y caracterización de fragmentos de su genoma. 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 inmunitario del hospedador, la presencia de algún microorganismo secundario exacerbante y las condiciones ambientales.

**Identificación del agente:** Se inoculan en la cavidad alantoidea huevos de gallina embrionados de 9–11 días suspensiones en una solución de antibióticos obtenidas a partir de hisopos orofaríngeos o cloacales (o heces) tomados de aves vivas, o de heces y muestras de órganos de aves muertas. Se inoculan los huevos a 37°C (o a un intervalo de entre 35 y 39°C) durante 2–7 días. En el líquido alantoideo de aquellos huevos que contienen embriones muertos o moribundos durante la incubación y en todos los huevos en el periodo final de incubación se determina si hay presencia de actividad hemaglutinante. La existencia de virus de la influenza tipo A puede confirmarse mediante una prueba de inmunodifusión entre el virus concentrado y un antisuero frente a los antígenos de la nucleocápsida y/o de la matriz, ambos comunes en todos los virus de la influenza tipo A, o bien mediante la reacción en cadena de la polimerasa con transcripción inversa (RT-PCR) con líquido alantoideo. El aislamiento en embriones se ha sustituido recientemente, en algunos casos, por la detección directa en muestras de uno o más segmentos del genoma de la influenza tipo A mediante RT-PCR en tiempo real (rRT-PCR) u otras técnicas moleculares validadas.

Para la subtipificación serológica del virus, un Laboratorio de Referencia debe llevar a cabo pruebas de inhibición de la hemaglutinación y de la neuraminidasa contra una batería de antisueros policlonales o monoespecíficos frente a cada uno de los subtipos del virus de la influenza tipo A, determinados por 16 hemaglutininas (H1-H16) y 9 neuraminidasas (N1-9), o bien identificar el genoma de subtipos H y N específicos utilizando tecnologías de detección de ARN con cebadores y sondas específicos de subtipo (por ejemplo, la rRT-PCR) o secuenciación y análisis filogenético.

Como los términos genéricos “influenza aviar altamente patógena” y la denominación histórica “peste aviar” se refieren a la infección por cepas altamente patógenas del virus de la influenza tipo A, es necesario evaluar la patogenicidad de cada cepa del virus de la influenza tipo A en aves domésticas. Aunque todas las cepas naturales de “influenza aviar altamente patógena” aisladas hasta la fecha han pertenecido o bien al subtipo H5 o bien al H7, la mayoría de las cepas H5 o H7 han mostrado una baja patogenicidad. En los últimos años, han evolucionado los métodos empleados para la determinación de la virulencia de las cepas aviarias y existe un mayor conocimiento de las bases moleculares de la patogenicidad, pero todavía se basan en la inoculación intravenosa del virus infeccioso a un mínimo de ocho pollos susceptibles de 4–8 semanas de edad; las cepas se consideran altamente patógenas si causan más de un 75% de mortalidad en un plazo de 10 días o si la inoculación de 10 pollos susceptibles de 4 a 6 semanas de edad da lugar a un índice de patogenicidad intravenosa (IPIV) de 1,2 o superior. La caracterización de las cepas víricas sospechosas de ser altamente patógenas debe llevarse a cabo en un laboratorio que disponga de medidas de bioseguridad frente a los virus. Independientemente de su patogenicidad en los pollos, los virus H5 o H7 con una secuencia de aminoácidos en el

punto de escisión de la HA0 similar a cualquiera de las observadas en virus altamente patógenos son considerados como virus de la influenza A con alta patogenicidad. Las cepas de H5 y H7 que no son altamente patógenas para los pollos y no tienen una secuencia de aminoácidos en el punto de escisión de la HA0 similar a cualquiera de las que se han observado en los virus altamente patógenos se considera que tienen una baja patogenicidad. A los efectos del Código Sanitario para los Animales Terrestres de la OIE, la influenza aviar es de declaración obligatoria a la OIE y se define como una infección de las aves de corral causada por cualquier virus influenza A altamente patógeno (IAAP) y por los subtipos H5 y H7 levemente patógenos (IALP H5/H7). Los virus de la influenza A con alta patogenicidad en las aves que no sean de corral, incluidas las aves salvajes, también son de declaración obligatoria. Los virus de la influenza A de baja patogenicidad distintos de H5 y de H7 (es decir, H1–4, H6 y H8–16) no se definen como influenza aviar y no son de declaración obligatoria.

**Pruebas serológicas:** Como todos los virus de la influenza tipo A poseen antígenos de las nucleoproteínas y de la matriz antigénicamente similares, son las dianas de elección de los métodos serológicos destinados a detectar virus del grupo de la influenza A. Para detectar anticuerpos frente a estos antígenos, se emplean pruebas de inmunodifusión en gel de agar. En estas pruebas se utilizan preparaciones de virus concentradas que contengan uno o ambos tipos de antígeno. No todas las especies de aves desarrollan anticuerpos precipitantes demostrables. Se han empleado enzimoanálisis para detectar anticuerpos frente a antígenos específicos del virus de la influenza tipo A en formatos de prueba dependientes (indirecto) o bien independientes (de competición) de la especie. También se han utilizado pruebas de inhibición de la hemaglutinación en la serología diagnóstica de rutina, pero es posible que en esta técnica pasen desapercibidas algunas infecciones, debido a que la hemaglutinina es específica de subtipo.

**Requisitos para las vacunas:** Históricamente, en la mayoría de los países las vacunas diseñadas específicamente para contener o prevenir la IAAP se encuentran prohibidas o están desaconsejadas por las agencias gubernamentales porque pueden interferir con las políticas de control o eliminación de la enfermedad. La primera utilización de la vacuna en un programa de erradicación de la influenza aviar tuvo lugar contra virus IALP de los subtipos H5/H7. Los programas utilizaron vacunas inactivadas en emulsión oleosa con los mismos subtipos de hemaglutinina y neuraminidasa que los del virus natural circulante, y las parvadas infectadas se identificaron mediante la detección del virus o los anticuerpos contra el virus en aves centinela no vacunadas. Durante la década de 1990, en México y Pakistán se utilizaron profilácticamente vacunas inactivadas mediante emulsión oleosa para controlar brotes generalizados de IAAP y de IALP de los subtipos H5/H7, y en México, El Salvador y Guatemala, también se utilizó, en pruebas de campo, una vacuna recombinante del virus de la viruela aviar que expresaba el gen de la HA homólogo. Durante el brote de IALP del subtipo H7 de 1999–2001 de Italia, se utilizó una vacuna inactivada con el mismo subtipo de hemaglutinina (es decir, homóloga) que el virus natural, pero con una neuraminidasa diferente (es decir, heteróloga). Ello permitió distinguir serológicamente entre las aves vacunadas no infectadas y las infectadas por el virus natural, y terminó dando lugar a la erradicación del virus natural. Se ha llevado a cabo el uso profiláctico de vacunas contra H5 y H7 en zonas de Italia para prevenir las infecciones por IALP de los subtipos H5/H7, y varios países de Asia, África y Oriente Medio han utilizado la vacunación profiláctica para controlar las infecciones por el virus IAAP H5N1. Los virus de la IAAP no deberían usarse como inóculo en la producción de vacunas.

Si la IAAP se utiliza en estudios de desafío, la instalación debe cumplir los requisitos de la OIE para la Contención de los agentes patógenos del Grupo 4.

## A. INTRODUCCIÓN

La influenza aviar está causada por una infección por virus de la familia Orthomyxoviridae, del género *influenzavirus A*. Los virus de la influenza tipo A son los únicos ortomixovirus conocidos que se sabe que afectan a las aves de forma natural. Se ha observado que muchas especies de aves son susceptibles a la infección por los virus de la influenza tipo A; las aves acuáticas constituyen un importante reservorio de estos virus, y la inmensa mayoría de las cepas han sido levemente patógenas (de baja virulencia) tanto en pollos como en pavos. Los virus de la influenza tipo A poseen proteínas de la nucleocápsida y de la matriz antigénicamente relacionadas entre sí, aunque se clasifican en subtipos en base a los antígenos de hemaglutinina (H) y neuraminidasa (N) (Comité de Expertos de la Organización Mundial de la Salud, 1980). En la actualidad se

reconocen 16 subtipos H (H1–H16) y 9 subtipos N (N1–N9), aunque se han propuesto nuevos subtipos (H17, H18) para virus de la influenza A de murciélagos de Guatemala (Swayne *et al.*, 2013; Tong *et al.*, 2012; 2013). Hasta la fecha, los virus naturales de la influenza tipo A altamente patógenos que producen una enfermedad clínica aguda en los pollos, pavos, y otras aves económicamente importantes, solamente se han asociado a los subtipos H5 y H7. La mayoría de los virus del subtipo H5 y H7 aislados a partir de aves han sido de baja patogenicidad en las aves de corral. Debido al riesgo de que los virus H5 y H7 levemente patógenos (influenza aviar levemente patógena [IALP] por los subtipos H5/H7) se conviertan en altamente patógenos por mutación, todos los virus IALP H5/H7 de las aves de corral son de declaración obligatoria a la OIE. Además, todos los virus altamente patógenos de aves de corral u otros tipos de ave, incluidas las aves salvajes, son de declaración obligatoria a la OIE.

Actualmente, el *Código Sanitario para los Animales Terrestres* de la OIE (*Código Terrestre*) define la “influenza aviar” como una infección de **las aves de corral** causada por cualquier virus de la influenza A con alta patogenicidad (IAAP), y por los subtipos H5 y H7, de baja patogenicidad (IALP H5/H7). En versiones previas del *Código Terrestre* y del *Manual de las Pruebas de Diagnóstico y de las Vacunas para los Animales Terrestres* (*Manual Terrestre*), los virus IAAP y IALP H5/H7 se denominaban virus “de la influenza aviar de declaración obligatoria”, pero dadas las incongruencias en el uso de la expresión “de declaración obligatoria” respecto a otras enfermedades del *Código Terrestre*, las expresiones “influenza aviar de declaración obligatoria”, “influenza aviar de declaración obligatoria altamente patógena” e “influenza aviar de declaración obligatoria levemente patógena” se han eliminado tanto del *Código Terrestre* como del *Manual Terrestre*. Para evitar la confusión con el uso científico de “influenza aviar”, que empezó en 1955, en este *Manual Terrestre* se utilizarán los términos IAAP, IALP H5/H7 e influenza A. Este último indica cualquier virus de la influenza de las aves de los subtipos H1 a H16.

Dependiendo de la especie, la edad y el tipo de ave, los rasgos característicos de la cepa vírica implicada y los factores ambientales, la enfermedad altamente patógena que afecta a las aves totalmente susceptibles puede ir de una muerte súbita sin ningún signo clínico manifiesto, hasta una enfermedad más característica con varios posibles signos clínicos, como signos respiratorios, secreciones oculares y nasales, tos y disnea, hinchazón de los senos y/o la cabeza, apatía, disminución de la vocalización, disminución de la ingesta de agua y de alimentos, cianosis de la piel no cubierta de plumas, la barba y la cresta, falta de coordinación y signos nerviosos y diarrea. En las aves ponedoras, otros signos clínicos son un acusado descenso de la producción de huevos y un aumento de los de mala calidad. Lo normal es que la alta morbilidad curse con una alta mortalidad inexplicable y que se intensifica rápidamente. Sin embargo, ninguno de estos signos puede considerarse patognomónico. En algunas especies hospedadoras, como el pato de Pekín, algunos virus de la IAAP no necesariamente provocan una enfermedad clínica importante. Además, los virus de la influenza A de baja patogenicidad que normalmente solo causan una enfermedad leve o no clínica, pueden producir, en determinadas circunstancias, una gama de signos clínicos cuya gravedad se acerque a la de la IAAP, sobre todo si cursan con infecciones exacerbantes y/o condiciones ambientales adversas. De ahí que el diagnóstico confirmativo de la enfermedad se base en el aislamiento o la detección del virus causal y en la demostración de que cumple con uno de los criterios definidos en el apartado B.2. El análisis 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 definitiva. El diagnóstico con vistas a un control oficial se establece en base a los criterios de patogenicidad acordados oficialmente, de acuerdo con pruebas *in-vivo* o determinantes moleculares (es decir, la presencia de un punto de escisión de la proteína HA0 precursora de la hemaglutinina que sea compatible con virus IAAP) y la subtipificación de la hemaglutinina. Estas definiciones evolucionan a medida que aumenta el conocimiento científico de la enfermedad.

La IAAP y la IALP H5/H7 están sometidas a un control oficial. Los virus que causan IAAP e IALP H5/H7 pueden diseminarse fuera del laboratorio si no se aplican niveles suficientes de bioprotección y seguridad humana. Los virus de la influenza aviar se clasifican en el Grupo de Riesgo 2 de infección humana y animal y deben manipularse con las adecuadas medidas, según se describen en el Capítulo 1.1.4 *Bioseguridad y bioprotección: norma para la gestión del riesgo biológico en el laboratorio veterinario y en las instalaciones de los animales*. Las medidas exigidas pueden variar en función del subtipo, aunque para los virus IAAP e IALP H5/H7 se requiere un mayor nivel de contención (por ejemplo, Grupo de Riesgo 3 o 4). Los países que carezcan de un laboratorio nacional o regional especializado deben enviar sus muestras a un Laboratorio de Referencia de la OIE.

## B. TÉCNICAS DE DIAGNÓSTICO

**Tabla 1.** Métodos analíticos disponibles para el diagnóstico de la influenza aviar y su propósito

Método	Propósito					
	Demostrar ausencia de infección en la población	Demostrar ausencia de infección en animales individuales antes de los desplazamientos	Contribuir a las políticas de erradicación	Confirmar casos clínicos	Determinar la prevalencia de la infección – vigilancia	Determinar el estado inmunitario en animales o poblaciones tras la vacunación
<b>Identificación del agente<sup>1</sup></b>						
<b>Aislamiento del virus</b>	+	+++	+	+++	+	–
<b>Detección de antígeno</b>	+	+	+	+	+	–
<b>RT-PCR en tiempo real</b>	++	+++	++	+++	++	–
<b>Detección de respuesta inmunitaria<sup>2</sup></b>						
<b>AGID</b>	+ (Influenza A)	+ (Influenza A)	++ (Influenza A)	+ (convaleciente)	++ (Influenza A)	++ (Influenza A)
<b>HI</b>	+++ (H5 o H7)	++ (H5 o H7)	+++ (H5 o H7)	++ (convaleciente)	+++ (H5 o H7)	+++ (H5 o H7)
<b>ELISA</b>	+	+	++	+ (convaleciente)	++	++

Clave: +++ = método recomendado; ++ = método idóneo; + = puede utilizarse en algunas situaciones, pero el coste, la fiabilidad y otros factores limitan mucho su aplicación; – = no adecuado para este propósito.

Aunque no todas las pruebas clasificadas como +++ o ++ han sido validadas formalmente, su uso sistemático y hecho de que se hayan utilizado ampliamente sin resultados dudosos las hace aceptables.

RT-PCR = reacción en cadena de la polimerasa con transcripción inversa; AGID = inmunodifusión en gel de agar;

HI = prueba de inhibición de la hemaglutinación; ELISA = enzimoanálisis.

### 1. Identificación del agente

#### 1.1. Aislamiento del virus

El aislamiento del virus es el método de referencia, pero es muy laborioso e insensible al momento en que se realiza, y se utiliza principalmente para el diagnóstico del primer caso clínico y para obtener virus aislado para otras pruebas de laboratorio.

Las muestras obtenidas de aves muertas deben incluir el contenido intestinal (heces) o hisopos cloacales y orofaríngeos. También deben obtenerse y procesarse muestras de la tráquea, pulmones, sacos aéreos, intestino, bazo, riñón, encéfalo, hígado y corazón, bien separada o conjuntamente.

Las muestras de aves vivas deben incluir hisopos orofaríngeos y cloacales. En el caso de las aves pequeñas y frágiles, para evitar dañarlas los hisopos pueden tomarse mediante torundas pequeñas, que suelen comercializarse para su uso en pediatría. Si no se dispone de ellas, la obtención de heces puede ser una alternativa adecuada. Las muestras de hisopos del mismo tipo pueden ponerse en común (es decir, los hisopos cloacales, con los cloacales, los orofaríngeos, con los orofaríngeos), y lo más habitual es juntar 5 o 11 muestras, aunque deben utilizarse unos hisopos específicos (Spackman *et al.*, 2013).

1 Se recomienda aplicar una combinación de los métodos de identificación del agente a la misma muestra clínica.

2 Es suficiente con una de las pruebas serológicas de la lista.

Las muestras deben introducirse en solución salina isotónica tamponada con fosfato (PBS), a pH 7,0–7,4, con antibióticos o con una solución que contenga proteína y antibióticos. Los antibióticos pueden modificarse de acuerdo con los condicionantes locales, pero podrían ser, por ejemplo, penicilina (2.000 unidades/ml), estreptomina (2 mg/ml), gentamicina (50 µg/ml) y micostatina (1.000 unidades/ml) para los tejidos y los hisopos orofaríngeos, pero a una concentración cinco veces mayor para las heces y los hisopos cloacales. Es importante reajustar el pH de la solución hasta 7,0–7,4 después de añadir los antibióticos. Se recomienda que la solución en la que se transporten los hisopos contenga proteína para estabilizar el virus (por ejemplo, infusión de encéfalo-corazón, hasta un 5% [v/v] de suero bovino, un 0,5% [p/v] de albúmina bovina o un medio comercial de transporte similar). Deben prepararse las heces y los tejidos finamente picados como suspensiones del 10–20% (p/v) en la solución de antibióticos. Las suspensiones deben procesarse lo antes posible después de la incubación durante 1–2 horas a temperatura ambiente. Cuando no se pueda realizar el procesado inmediato, pueden guardarse las muestras a 4°C hasta 4 días. Si se precisa un almacenamiento prolongado, las muestras de diagnóstico y las cepas deben guardarse a –80°C. Debe evitarse una congelación y descongelación reiteradas.

El método de elección para el cultivo de los virus de la influenza A es la inoculación de huevos de gallina embrionados libres de patógenos específicos (SPF), o huevos libres de anticuerpos específicos (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 3 a 5 embriones de gallina embrionados SPF o SAN que lleven 9–11 días de incubación. Se inoculan los huevos a 37°C (intervalo de 35°C a 39°C) durante 2-7 días. Los huevos que contienen embriones muertos o moribundos al eclosionar, y todos los huevos que queden al final del periodo de incubación, inicialmente deben refrigerarse a 4°C durante 4 horas o durante toda la noche, y a continuación deben tomarse y analizarse los líquidos alantoideos con una prueba de cribado (como la prueba de la hemaglutinación [HA]), una prueba específica de la influenza tipo A (como la prueba de la inmunodifusión en gel de agar [AGID] o enzimoimmunoanálisis [ELISA] de captura de antígeno en fase sólida) o una prueba específica del subtipo de la influenza tipo A (como las pruebas de inhibición de la hemaglutinina [HI] o inhibición de la neuraminidasa [NI]), o una prueba molecular para detectar la presencia de ácido nucleico específico de la influenza A (como la reacción en cadena de la polimerasa con transcripción inversa en tiempo real [rRT-PCR]) como se describe más adelante (véase el apartado B.3.2). La detección de la actividad HA en los líquidos amino-alantoideos libres de bacterias verificada mediante pruebas microbiológicas indica una alta probabilidad de la presencia de un virus de la influenza tipo A o de un paramixovirus aviar. Los líquidos que dan una reacción negativa deben pasarse por, al menos, un lote más de huevos.

Puede confirmarse la presencia del virus de la influenza tipo A mediante pruebas de AGID, comprobando la presencia de los antígenos de la nucleocápsida o la matriz, ambos comunes a todos los virus de la influenza tipo A (véase el apartado B.3.1). Los antígenos pueden prepararse concentrando el virus a partir del líquido alantoideo infectivo o extrayendo las membranas corioalantoideas infectadas; los antígenos se comprueban frente a antisueros que se sabe que son positivos. 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 alcance aproximadamente un pH de 4,0. La mezcla se coloca en un baño con hielo durante 1 hora y a continuación se clarifica mediante centrifugación a 1.000 *g* a 4°C. Se desecha el líquido sobrenadante. Los concentrados víricos se resuspenden en tampón glicina/sarcosil: este consiste en un 1% (p/v) de lauril sarcosinato sódico tamponado hasta pH 9,0 con glicina 0,5 M. Estos concentrados contienen polipéptidos de la nucleocápsida y de la matriz.

También pueden obtenerse preparaciones del antígeno enriquecidas en nucleocápsida a partir de las membranas corioalantoideas para su uso en la prueba de la AGID (Beard, 1970). Este método implica retirar las membranas corioalantoideas de los huevos infectados que presentan líquidos alantoideos con actividad de HA. A continuación, se homogeneizan las membranas o se trituran hasta obtener una pasta. Esta se somete a tres ciclos de congelación–descongelación, seguidos de una centrifugación a 1.000 *g* durante 10 minutos. Se desecha el precipitado y se emplea el sobrenadante como antígeno después de un tratamiento con formalina al 0,1%.

La utilización de la prueba de la AGID para poner de manifiesto antígenos de nucleocápsida o matriz es una forma satisfactoria de indicar la presencia de virus de la influenza A en líquido amnioalantoideo, pero existen distintos ELISA de captura de antígeno en fase sólida (AC-ELISA) rápidos, tanto experimentales como comerciales, que constituyen una eficaz alternativa (Swayne *et al.*, 2013). La mayoría de AC-ELISA se han autorizado y comercializado para detectar el virus de la influenza tipo A humano en muestras clínicas. Algunos han demostrado eficacia en la detección de influenza A, pero muchas de estas pruebas comerciales son poco sensibles (Woolcock & Cardona, 2005). Los preferidos son los que están validados para uso veterinario.

Cuando se observa actividad HA en líquidos estériles tomados de huevos inoculados, lo más probable es que esté causada por un virus de la influenza tipo A o un paramixovirus aviar, pero algunas cepas de reovirus aviar, así como el líquido no estéril que contiene HA de origen bacteriano pueden causar la aglutinación de eritrocitos. Actualmente existen 12 serotipos reconocidos de paramixovirus aviarios (Miller *et al.*, 2010). La mayoría de los laboratorios dispondrán de antisuero específico contra el virus de la enfermedad de Newcastle (paramixovirus aviar tipo 1), y en vista de la generalizada aparición de casos y de un uso casi universal como vacuna viva en las aves de corral, es mejor determinar su presencia mediante pruebas de inhibición de la hemaglutinación (HI) (véase el capítulo 2.3.14. *Enfermedad de Newcastle*).

Alternativamente, la presencia del virus de la influenza puede confirmarse mediante el empleo de RT-PCR o RT-PCR en tiempo real empleando cebadores conservados específicos de la nucleoproteína o específicos de la matriz (Altmüller *et al.*, 1991; Spackman *et al.*, 2002). La presencia de los subtipos H5 o H7 del virus de la influenza también puede confirmarse utilizando cebadores específicos de los subtipos H5 o H7 (Monne *et al.*, 2008; Slomka *et al.*, 2007; Spackman *et al.*, 2002).

La subtipificación antigénica se puede llevar a cabo mediante antisueros monoespecíficos preparados contra proteínas específicas del subtipo H y N purificadas o recombinantes, que pueden utilizarse en pruebas de HI y de NI, o bien antisueros policlonales generados contra una batería de virus influenza intactos y utilizados en pruebas de HI y de NI. La genotipificación se puede llevar a cabo utilizando cebadores específicos de los subtipos H y N en RT-PCR y en RT-PCR en tiempo real, o bien utilizando análisis de la secuencia de los genes H y N. La identificación del subtipo mediante estas técnicas se encuentra fuera del alcance de la mayoría de los laboratorios de diagnóstico no especializados en virus influenza. Existe ayuda disponible por parte de los Laboratorios de Referencia de la OIE (véase la tabla que de la Parte 4 de este *Manual Terrestre*).

#### 1.1.1. Evaluación de la patogenicidad

La expresión IAAP indica la patogenicidad en los pollos e implica la intervención de cepas del virus altamente patógenas. Se utiliza para describir una enfermedad de las aves plenamente susceptibles con signos clínicos que pueden consistir en uno o más de los siguientes: secreciones oculares y nasales, tos, sonidos respiratorios y disnea, hinchazón de los senos y/o de la cabeza, languidez, disminución de la vocalización, una disminución considerable de la ingesta de alimento y agua, cianosis de la piel desprovista de plumas, de las barbas y de la cresta, falta de coordinación de movimientos, signos nerviosos y diarrea. En las aves de puesta, otros signos clínicos son un acusado descenso de la producción de huevos que suele cursar con un aumento de los de mala calidad. Lo normal es que la alta morbilidad curse con una alta mortalidad inexplicable y que se intensifica rápidamente. Sin embargo, ninguno de estos signos puede considerarse patognomónico y puede producirse una alta mortalidad sin que dichos signos estén presentes. Además, los virus de la influenza A levemente patógenos, que normalmente no causan enfermedad o causan una enfermedad leve, pueden causar una enfermedad mucho más grave si se hallan presentes infecciones exacerbantes o factores ambientales adversos y, en algunas circunstancias, la gama de signos clínicos puede ser idéntica a la de la IAAP.

La expresión utilizada clásicamente “peste aviar” se ha abandonado para dar paso a la expresión más exacta de IAAP. Dado que todos los virus naturales de la IAAP conocidos hasta hoy han sido de los subtipos H5 y H7, y que estudios genómicos han determinado que los virus de la IAAP derivan de una mutación de los virus de la IALP H5/H7, todos los virus de la IALP H5/H7 se han reconocido como potencialmente patógenos. Los cambios de patogenicidad se han asociado a cambios en el punto de corte proteolítico de la hemaglutinina, como los siguientes: 1) sustituciones de aminoácidos no básicos por aminoácidos básicos (arginina o lisina); 2) inserciones de múltiples aminoácidos básicos de codones duplicados del punto de escisión de la hemaglutinina; 3) insertos cortos de aminoácidos básicos y no básicos de origen desconocido; 4) recombinación con insertos de otros segmentos génicos que alarguen el punto de escisión proteolítica; y 5) pérdida del punto de glucosilación protectora en el residuo 13 en combinación con múltiples aminoácidos básicos en el punto de escisión. La secuenciación de aminoácidos de los puntos de escisión de las cepas de influenza subtipos H5 y H7 levemente patógenas en las aves permitiría identificar los virus que tienen la capacidad de convertirse en muy patógenos para las aves de corral después de sufrir una mutación puntual.

La OIE ha adoptado los siguientes criterios para determinar la patogenicidad de virus de la influenza tipo A:

- a) Se utiliza uno de los dos métodos siguientes para determinar la patogenicidad en los pollos. Un virus influenza tipo A de alta patogenicidad es:

- i) Cualquier virus influenza tipo A que sea letal<sup>3</sup> para seis, siete u ocho pollos susceptibles de 4–8 semanas de edad dentro de los 10 días posteriores a la inoculación intravenosa de 0,2 ml de una dilución a 1/10 de líquido alantoideo infectivo libre de bacterias
- o
- ii) Cualquier virus que tenga un índice de patogenicidad intravenosa (IPIV) de 1,2 o superior. El procedimiento de cálculo del IPIV es el siguiente:
- Se diluye a 1/10 en solución salina estéril isotónica el líquido alantoideo infectivo fresco con un título de HA >1/16 (>2<sup>4</sup> o > log<sub>2</sub> 4 expresado como el inverso).
  - Se inyectan por vía intravenosa 0,1 ml del virus diluido a diez pollos susceptibles SAN de 6 semanas de edad; siempre que sea posible deben utilizarse pollos SPF.
  - 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, y 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 signos, 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, signos nerviosos. Las aves muertas deben puntuarse como 3 en cada uno de los días siguientes de observación después de la muerte<sup>4</sup>.)
  - El IPIV es la puntuación media por ave por observación calculada según las puntuaciones anotadas a lo largo de 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 ningún ave mostró signo clínico alguno durante los 10 días del periodo de observación.
- b) Para todos los virus H5 y H7 levemente patógenos en pollos, debe determinarse la secuencia de aminoácidos del péptido de conexión de la hemaglutinina. Si la secuencia es similar a la observada para otras cepas de la IAAP, la cepa analizada se considerará IAAP (véase la tabla con la lista de todos los puntos de escisión proteolítica de la proteína HA0 para virus IALP H5 y H7 e IAAP basados en la secuencia de aminoácidos deducida, que puede encontrarse en la página de la OFFLU con el siguiente enlace:

[http://www.offlu.net/fileadmin/home/en/resource-centre/pdf/Influenza\\_A\\_Cleavage\\_Sites.pdf](http://www.offlu.net/fileadmin/home/en/resource-centre/pdf/Influenza_A_Cleavage_Sites.pdf) ).

La OIE tiene el siguiente sistema de clasificación para identificar los virus influenza A respecto a los cuales se deberán tomar medidas relativas a la notificación y control de la enfermedad:

- a) Todas las cepas de la influenza tipo A de las aves de corral que cumplan los criterios anteriores se calificarán como cepas IAAP y serán de declaración obligatoria.
- b) Las cepas H5 y H7 de las aves de corral que no sean altamente patógenas en los pollos y que no tengan una secuencia de aminoácidos del punto de escisión de la HA0 similar a cualquiera de las que se han observado en virus IAAP se calificarán como IALP H5/H7 y serán de declaración obligatoria.
- c) A los efectos del Código Terrestre, la IAAP y la IALP H5/H7 en aves de corral se denominan “influenza aviar” y son de declaración obligatoria. Las influencias de tipo A de subtipos distintos de H5/H7 (es decir, de los subtipos H1–4, H6 y H8–16) no se consideran “influenza aviar” y no son de declaración obligatoria.
- d) Los virus de la influenza A de alta patogenicidad en aves no de corral, incluidas las aves salvajes, son de declaración obligatoria.

Se han empleado con éxito varias técnicas y estrategias para secuenciar los nucleótidos de la región del gen HA que codifica la región del punto de escisión de la hemaglutinina de los subtipos H5 y H7

---

3 Cuando las aves están demasiado enfermas para comer o beber, deben sacrificarse de forma humanitaria.

4 Cuando las aves están demasiado enfermas para comer o beber, deben sacrificarse de forma humanitaria y computarse como muertas en la siguiente observación.

del virus de la influenza aviar, lo que permite deducir los aminoácidos presentes. Esto se puede llevar a cabo mediante la extracción de la muestra y la secuenciación directa del punto de escisión proteolítica de la hemaglutinina, o clonando primero la hemaglutinina y secuenciando después el ADNc. Pueden facilitarse varias fases del protocolo empleando sistemas comerciales y secuenciadores automáticos.

La determinación del punto de escisión mediante secuenciación u otros métodos se ha convertido en el método de elección para la evaluación inicial de la patogenicidad de estos virus, y se ha incorporado a las definiciones acordadas. Ello ha reducido el número de pruebas *in vivo*, aunque actualmente todavía se requiere la inoculación de aves para confirmar un resultado negativo, ya que no puede descartarse la posibilidad de que existan poblaciones de virus que contengan mezclas de virus de alta patogenicidad y de baja patogenicidad.

Aunque todos los verdaderos virus de la IAAP aislados hasta la fecha han pertenecido a los subtipos H5 o H7, se ha descrito que al menos dos cepas, ambas del subtipo H10 (H10N4 y H10N5), habrían cumplido las definiciones *in vivo* de la OIE y la UE para los virus de la IAAP (Wood *et al.*, 1996), ya que mataron 7/10 y 8/10 pollos con valores del IPIV >1,2 cuando las aves se inocularon por vía intravenosa. Sin embargo, estos virus no produjeron muertes ni signos de la enfermedad cuando se inocularon por vía intranasal, y no presentaron una secuencia del sitio de escisión de la hemaglutinina compatible con virus de IAAP. De forma similar, otros virus de la influenza A inoculados por vía intravenosa son nefrotóxicos y las aves que mueren tienen altos títulos de virus en los riñones, lo cual indica una patogenicidad renal (Slemons & Swayne, 1990), pero esta biopatología inducida en el laboratorio no iguala a la infección multiorgánica ni a la enfermedad sistémica causadas por los virus IAAP. Por el contrario, se han descrito cuatro virus que tienen puntos de escisión de la HA0 que contienen múltiples aminoácidos básicos, pero que muestran una baja patogenicidad (IPIV <1,2) cuando se inyectan por vía intravenosa a pollos de 6 semanas (Londt *et al.*, 2007). Otras anomalías son las representadas por los virus de la IAAP H7N3 de Chile 2002 (Suárez *et al.*, 2004) y de Canadá 2004 (Pasick *et al.*, 2005), que muestran secuencias distintas e inusuales de aminoácidos en el sitio de corte de PEKPKTCSPLSRCRETR\*GLF y PENPKQAYRKRMTTR\*GLF, respectivamente. Estos virus parecen ser el resultado de una recombinación entre los genes de la HA, la nucleoproteína y la matriz, respectivamente, dando lugar a una inserción en el punto de escisión de la HA0 de 11 aminoácidos en el caso del virus de Chile y de 7 aminoácidos en el caso del virus de Canadá. Los dos son extremadamente patógenos cuando se inyectan por vía intravenosa a pollos de 6 semanas de edad.

En la página web de la OFFLU se puede consultar una tabla con la lista de todos los puntos de escisión proteolítica de la proteína HA0 precursora de la hemaglutinina para virus IAAP H5 y H7 e IAAP en base a una secuencia de aminoácidos deducida. Esta tabla se actualizará a medida que se caractericen nuevos virus; el link a la página web de la OFFLU es el siguiente:

[http://www.offlu.net/fileadmin/home/en/resource-centre/pdf/Influenza\\_A\\_Cleavage\\_Sites.pdf](http://www.offlu.net/fileadmin/home/en/resource-centre/pdf/Influenza_A_Cleavage_Sites.pdf)

## 1.2. Técnicas de captura de antígeno y moleculares

En la actualidad, las técnicas convencionales de aislamiento y caracterización para el diagnóstico de la influenza A continúan siendo los métodos de elección, al menos para el diagnóstico inicial de las infecciones por influenza A. Sin embargo, los métodos convencionales tienden a ser costosos, emplean numerosa mano de obra y son lentos. Ha tenido lugar una gran evolución y mejora de las técnicas moleculares y de otras técnicas diagnósticas, muchas de las cuales se han aplicado al diagnóstico de las infecciones por influenza A.

### 1.2.1. Detección del antígeno

Existen varios kits comerciales de AC-ELISA (de captura de antígeno) para la detección de los virus de la influenza tipo A en las aves de corral (Swayne *et al.*, 2013; Woolcock & Cardona, 2005). La mayoría de estos kits son enzimoimmunoanálisis o se basan en la inmunocromatografía (dispositivos de flujo lateral) y utilizan un anticuerpo monoclonal frente a la nucleoproteína; deben ser capaces de detectar cualquier virus de la influenza del tipo A. La principal ventaja de estas pruebas consiste en que pueden poner de manifiesto la presencia de influenza A en 15 minutos. Las desventajas son que pueden carecer de sensibilidad, que pueden no haber sido validadas para diferentes especies de aves, que no se consigue la identificación del subtipo vírico y que son caras. Las pruebas deben interpretarse solo en la parvada como un colectivo y no como prueba individual. Las muestras orofaríngeas o traqueales de aves clínicamente infectadas o muertas proporcionan la mejor sensibilidad. Sin embargo, la falta de sensibilidad constituye una importante desventaja para la utilización de las pruebas de detección de antígeno disponibles. Chua *et al.* (Chua *et al.*, 2007) evaluaron cinco pruebas de detección y mostraron sensibilidades globales que oscilaron entre el 36,3% y el

51,4%; los mencionados autores señalaron que, en términos de la sensibilidad obtenida mediante el uso de hisopos cloacales o traqueales, las pruebas dieron peores resultados con aves acuáticas o salvajes que con muestras procedentes de pollos. Woolcock & Cardonna (Woolcock & Cardonna, 2005) examinaron cinco pruebas comerciales autorizadas para su uso clínico en humanos y observaron una amplia variación en la capacidad de detectar virus de la influenza A en muestras de aves de corral, con límites de detección de un mínimo  $10^{4,7}$  DIH<sub>50</sub> (dosis infectiva en el 50% de huevos expuestos) de virus por ml con la mejor prueba, y un mínimo de  $10^{5,7}$  DIH<sub>50</sub> por ml para las otras pruebas. Dada la baja sensibilidad, la detección de antígeno se utiliza principalmente para determinar, en condiciones de campo, si un caso clínico con alta mortalidad se debe a influenza A, lo cual, a continuación, se confirma mediante una prueba de laboratorio más sensible.

### 1.2.2. Detección directa del ARN

Como se ha indicado en las definiciones actuales de la IAAP, se han utilizado técnicas moleculares en el diagnóstico de la IA durante cierto tiempo. Además, recientemente ha habido desarrollos para su aplicación a la detección y caracterización del virus de la influenza A directamente a partir de muestras clínicas de aves infectadas. Es obligatorio el uso de protocolos estrictos para evitar el riesgo de contaminación cruzada entre las muestras clínicas cuando se utilicen métodos de detección molecular muy sensibles que permiten una rápida detección del ARN vírico para el diagnóstico de laboratorio confirmativo de las infecciones por influenza aviar. Además, los métodos analíticos de detección de ARN deben validarse de acuerdo con respecto al estándar de la OIE (véase el capítulo 1.1.6 *Principios y métodos de validación de las pruebas de diagnóstico de las enfermedades infecciosas*) utilizando materiales clínicos para demostrar que las pruebas son “adecuadas para el fin” y pueden aplicarse en el diagnóstico de campo, el cual puede incluir el uso de estándares internos para la prueba. Las reacciones control propician una mayor confianza en la integridad de las reacciones moleculares, en las muestras clínicas y en los resultados.

Con la definición de los cebadores adecuados, las técnicas de RT-PCR con muestras clínicas podrían conllevar una detección rápida e identificación del subtipo (al menos de H5 y H7), incluido un producto de ADNc que puede emplearse para la secuenciación de nucleótidos (Suarez, 2007). Esta técnica se utilizó con éxito durante los brotes de IAAP de 2003 en los Países Bajos. Gall *et al.* (2008; 2009) han desarrollado cebadores degenerados para la detección y secuenciación de fragmentos génicos cortos de HA (punto de escisión) y NA que permiten la amplificación de todos los subtipos HA (1-16) y NA (1-9). Sin embargo, la prueba de detección molecular preferida para los virus de la influenza A es la RT-PCR en tiempo real, una modificación de la RT-PCR que reduce el tiempo de identificación del subtipo vírico y la secuenciación. Por ejemplo, Spackman *et al.* (2002) emplearon un sistema de sonda de hidrólisis de cebador/fluorogénica por RT-PCR en tiempo real de un solo paso, para permitir la detección de virus de la influenza A y la determinación del subtipo, H5 o H7. La prueba 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. En estudios posteriores se ha observado que la rRT-PCR en tiempo real tiene una sensibilidad y una especificidad equivalentes a las del aislamiento del virus, según la validación en el campo en el programa de control del mercado de aves de corral vivas de Nueva York y de Nueva Jersey realizado durante el invierno de 2002, y durante el brote de IALP por H7N2, y el programa de erradicación aplicado a Virginia durante el 2002 (Elvingeret *et al.*, 2007; Spackman *et al.*, 2003). La prueba proporciona una sensibilidad y especificidad altas semejantes a las del aislamiento de virus a partir de hisopos orofaríngeos y traqueales de pollos y pavos, pero es posible que carezca de sensibilidad para la detección del virus de la influenza A en los hisopos fecales, las heces y los tejidos de algunas especies de aves, debido a que la presencia de inhibidores de la PCR da lugar a falsos negativos (Das *et al.*, 2006). La incorporación de un control positivo interno en la prueba servirá para verificar la ejecución adecuada de la misma. Además, se han desarrollado métodos mejorados de extracción del ARN para eliminar la mayoría de inhibidores de la PCR de las muestras analizadas.

La RT-PCR en tiempo real, normalmente basada en la sonda de hidrólisis o método TaqMan® para la generación de la señal de fluorescencia específica de la diana, se ha convertido en el método de referencia de muchos laboratorios para el diagnóstico, al menos parcial, directamente a partir de muestras clínicas. Este método ofrece resultados rápidos, con sensibilidad y especificidad comparables a las del aislamiento del virus. Estas cualidades son ideales para la gestión de un brote de la influenza A, en que el periodo de tiempo durante el cual puede obtenerse un diagnóstico fiable es crucial para la toma de decisiones por parte de las autoridades veterinarias correspondientes. Además, se pueden diseñar sistemas de RT-PCR en tiempo real para trabajar con un formato de 96 pocillos en combinación con la

extracción robotizada del ARN de alto rendimiento a partir de las muestras (Agüero *et al.*, 2007).

El enfoque del diagnóstico mediante la RT-PCR en tiempo real adoptado por la mayor parte de los laboratorios se ha basado en la detección genérica inicial de virus de la influenza A en muestras clínicas, en primer lugar estableciendo como diana el gen de la matriz (M), que se conserva mucho en todos los virus de la influenza A, y utilizando a continuación pruebas de RT-PCR en tiempo real específicas para los virus de los subtipos H5 y H7. Para la identificación de los subtipos, los cebadores utilizados en la rRT-PCR en tiempo real de Taqman van dirigidos a la región HA2, ya que esta está relativamente bien conservada dentro de los genes de la hemaglutinina de los subtipos H5 y H7 (Spackman *et al.*, 2008; Spackman & Suárez, 2008). Por tanto, ha servido como región diana para estos subtipos. Spackman *et al.* (2002) pusieron de manifiesto la detección específica de estos subtipos, pero advirtieron que sus secuencias de cebadores/sondas para el H5 y el H7 se habían diseñado para la detección de H5 y H7 de Norteamérica y podrían no ser útiles para todas las cepas H5 y H7. Resultó que tenían razón. Slomka *et al.* (Slomka *et al.*, 2007) describieron una modificación de las secuencias de oligonucleótidos de la H5 utilizadas por Spackman *et al.* (2002) para propiciar la detección del subtipo H5N1 de linaje asiático y de otros subtipos H5 euroasiáticos que se aislaron durante la pasada década tanto en aves de corral como en aves salvajes. Se han desarrollado protocolos validados de RT-PCR en tiempo real en tiempo real para la detección simultánea y tipificación de ARN de H5, H7 y H9 (Monne *et al.*, 2008). Estas RT-PCR en tiempo real euroasiáticas validadas ha resultado útiles para la investigación de muchas muestras clínicas de H5N1 de la IAAP y otros subtipos enviadas a los Laboratorios de Referencia Internacional de Europa, África y Asia desde el otoño del año 2005 (Monne *et al.*, 2008; Slomka *et al.*, 2007). Cada conjunto de cebadores y sondas tiene que validarse contra un conjunto diverso de virus para que la prueba sea aplicable a diversas especies animales, así como a virus de amplias zonas geográficas y durante largos periodos de tiempo.

Uno de los problemas derivados de la rapidez con que van apareciendo nuevas pruebas es que se están elaborando y describiendo métodos y protocolos sin una validación adecuada de las pruebas. Este problema se ha intentado resolver en relación con algunos de los protocolos de la RT-PCR en tiempo real (Slomka *et al.*, 2007b; Suarez *et al.*, 2007). En la Unión Europea, los Laboratorios de Referencia nacionales han colaborado para definir y validar los protocolos que se puedan recomendar para el uso dentro de la UE (Monne *et al.*, 2008; Slomka *et al.* 2007b).

Se han descrito protocolos de la RT-PCR en tiempo real que amplifican regiones de la totalidad del punto de escisión del gen de la HA0. Esto puede proporcionar pruebas que sean útiles para virus específicos. Por ejemplo, Hoffman *et al.* (2007) han descrito una prueba RT-PCR en tiempo real específica para los virus asiáticos de IAAP H5N1 tipo Quinghai del clado 2.2 que constituye un medio rápido para determinar el patotipo para este subgrupo de virus H5N1 de la IAAP sin secuenciación. Fereidouni *et al.* (2008) han desarrollado una prueba basada en el polimorfismo de los fragmentos de restricción, que permite la patotipificación del subtipo H5 del virus de la influenza A sin necesidad de secuenciación ni de experimentos con animales tras la RT-PCR, y en la digestión del fragmento amplificado con enzima de restricción.

Se han diseñado modificaciones del método de la RT-PCR directa para la detección de ARN vírico con el fin de reducir el efecto de sustancias inhibitoras presentes en la muestra obtenida, 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 isotérmica continua en la que no se necesita un equipamiento especializado tipo termociclador. Se han desarrollado pruebas NASBA para la detección, en 6 horas, de virus de la influenza A de los subtipos H5 y H7 en muestras clínicas (Ko *et al.*, 2004). Parece que el sistema de amplificación isotérmica mediada por bucle (LAMP) para la detección del H5 mostró una sensibilidad alta y una especificidad fiable (Imai *et al.*, 2006), pero puede tener una aplicación limitada por la susceptibilidad a las mutaciones víricas que afectan a regiones diana, reduciendo así la detección de virus (Postel *et al.*, 2010).

Parece muy probable que en muy poco tiempo la tecnología basada en métodos moleculares y en el antígeno mejorado se habrá desarrollado lo suficiente como para poder realizar pruebas rápidas a pie de granja para la detección de la presencia de subtipos específicos y marcadores de patogenicidad de virus de la influenza A. El grado en que se empleen tales pruebas en el diagnóstico de la influenza aviar dependerá mucho del acuerdo relativo a la definición legal de lo que constituye una infección, así como de su adopción a efectos de control y de comercio. Actualmente, la RT-PCR en tiempo real es el método de elección para la vigilancia del virus,

porque es una prueba que aporta un diagnóstico rápido y sensible de los subtipos H5 y H7 de la influenza A, y permite un alto rendimiento.

## 2. Pruebas serológicas

### 2.1. Enzimoimmunoanálisis (ELISA)

Existen kits comerciales de ELISA que permiten detectar anticuerpos frente a la proteína de la nucleocápsida. Se han desarrollado y validado kits con un formato de ELISA indirecto y de competición/bloqueo, que ahora se están utilizando para detectar anticuerpos específicos contra virus de la influenza A. se han desarrollado y validado varios ELISA de competición (AIV C-ELISA IA) o de bloqueo (AIV B-ELISA) para influenza aviar como alternativa más sensible que la AGID para la detección de anticuerpos reactivos del grupo de la influenza A en sueros de pollos y de otras especies aviares (SCAHL, 2009). Esta plataforma ELISA AIV, tanto en formato “de competición” como “de bloqueo”, detecta anticuerpos contra virus de la influenza A al permitir que estos anticuerpos compitan por los puntos de unión al antígeno con un anticuerpo monoclonal contra un epítipo situado en la superficie de la nucleoproteína que está conservado en todos los virus de influenza A.

Estos kits deben validarse para la especie concreta de interés y para el objetivo/s concreto/s de uso. Se utilizan varias pruebas y métodos distintos de preparación del antígeno. Normalmente, tales pruebas han sido evaluadas y validadas por el fabricante, y es por tanto importante que se sigan cuidadosamente las instrucciones específicas para su empleo. Por favor, consulte el Registro de la OIE de kits certificados por la Organización (<http://www.oie.int/en/our-scientific-expertise/registration-of-diagnostic-kits/background-information/>). Los kits de ELISA tienen un coste moderado y están preparados para aportar un alto rendimiento en la detección de infecciones por virus influenza A, pero todos los resultados positivos deben ir seguidos de una prueba HI de subtipificación, en la que se determinará si el subtipo es H5 o H7. Se empieza a disponer de algunos kits de ELISA específicos de subtipo, por ejemplo para la detección de anticuerpos contra H5, H7 y N1.

### 2.2. Inmunodifusión en gel de agar

Todos los virus influenza tipo A poseen antígenos de la nucleocápsida antigénicamente similares y antígenos de la matriz antigénicamente similares. Debido a ello, las pruebas de AGID permiten detectar la presencia o ausencia de anticuerpos contra cualquier virus influenza tipo A. Las preparaciones concentradas de virus, como se ha descrito anteriormente, contienen antígenos tanto de la matriz como de la nucleocápsida; el antígeno de la matriz difunde más rápidamente que el antígeno de la nucleocápsida. Las pruebas de AGID se han empleado extensa y sistemáticamente para detectar anticuerpos específicos en parvadas de pollos o pavos como un indicador de la existencia de la infección, pero las pruebas de AGID son menos fiables para detectar anticuerpos tras la infección por virus de la influenza tipo A en otras especies aviares. Generalmente, en estas pruebas se han utilizado preparaciones enriquecidas en nucleocápsida obtenidas a partir de las membranas corioalantoideas de huevos de gallina embrionados (Beard, 1970) que han sido infectados a los 10 días de edad, se han homogeneizado, congelado y descongelado tres veces, y centrifugado a 1.000 g. Los líquidos sobrenadantes se inactivan añadiendo formalina al 0,1% o beta-propiolactona al 1%, se vuelven a centrifugar y se utilizan como antígeno. Es posible que no todas las especies de aves produzcan anticuerpos precipitantes después de la infección por el virus de la influenza, por ejemplo los patos. La AGID es una prueba de cribado serológico de bajo coste útil para detectar infecciones genéricas por virus de influenza A, pero debe ir seguida de una HI para subtipificar los resultados positivos a influenza A y determinar si son H5 o H7.

Normalmente, las pruebas se realizan empleando geles de agarosa al 1% (p/v) o agar de tipo II purificado con un 8% (p/v) de NaCl en tampón fosfato 0,1 M, pH 7,2, que se vierten en placas de Petri o en portaobjetos hasta obtener un grosor de 2–3 mm y se incuban en una cámara humidificada. Mediante un molde y un cúter, se excavan pocillos de unos 5 mm de diámetro en el agar. Usando un patrón para los pocillos, debe colocarse cada suero sospechoso al lado de un suero que se sepa que es positivo y un antígeno. Ello creará una línea continua de identidad entre el control positivo, el suero sospechoso y el antígeno de la nucleocápsida. A cada pocillo debe añadirse reactivo suficiente como para llenarlo, de tal modo que la parte superior del menisco corresponda con la parte superior del gel, pero sin pasarse de ese punto. En cada pocillo se precisan alrededor de 50 µl de reactivo, aunque la cantidad dependerá del espesor del gel, ya que en el caso de los más espesos se requiere más volumen.

Debe comprobarse en cada pocillo si aparecen líneas de precipitina a las 24–48 horas, y las muestras positivas débiles o aquellas en las que no se hayan formado líneas específicas deberán volver a incubarse y examinarse de nuevo pasadas 48 horas. El tiempo necesario para la formación de líneas

visibles de precipitina depende de las concentraciones del anticuerpo y del antígeno. Las líneas de precipitina se observan mejor sobre un fondo oscuro iluminando por detrás. Se considera que se ha obtenido un resultado específico positivo cuando la línea de precipitina situada entre los pocillos del control positivo es continua con la línea situada entre el antígeno y el pocillo problema. Las líneas cruzadas se interpretan como causadas por un suero problema que carece de identidad con los anticuerpos del pocillo del control positivo.

### 2.3. Pruebas de hemaglutinación y de inhibición de la hemaglutinación

En diferentes laboratorios se realizan distintas variantes de los protocolos de las pruebas de HA y de 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 ambas pruebas es de 0,075 ml. Los reactivos necesarios para realizar estas pruebas son PBS isotónico 0,01 M, pH 7,0–7,2, y eritrocitos obtenidos a partir de un mínimo de tres pollos SPF o SAN y combinados en un volumen igual de solución de Alsever. Las células deben lavarse tres veces en PBS antes de emplearse como una suspensión al 1% (concentrado de células v/v). Deben utilizarse en cada prueba antígenos y antisueros control positivos y negativos, según corresponda.

#### 2.3.1. Prueba de la hemaglutinación

- i) Se depositan 0,025 ml de PBS en cada pocillo de una placa de microtitulación de plástico con fondo en V.
- ii) Se depositan 0,025 ml de la suspensión vírica (es decir, líquido alantoideo infectivo) en el primer pocillo. Para una determinación precisa del contenido de HA, esta prueba debe realizarse a partir de un intervalo estrecho de una serie inicial de diluciones, es decir, 1/3, 1/4, 1/5, 1/6, etc.
- iii) Se preparan y depositan en toda la placa diluciones a la mitad de volúmenes de 0,025 ml de la suspensión vírica.
- iv) Se depositan 0,025 ml más de PBS en cada pocillo.
- v) Se depositan 0,025 ml de eritrocitos de pollo al 1% (v/v) en cada pocillo.
- vi) Se mezcla cuidadosamente sellando la placa con cinta y se dejan sedimentar los eritrocitos durante 40 minutos a temperatura ambiente, es decir, a unos 20°C, o durante 60 minutos a 4°C si la temperatura ambiente es elevada; en este tiempo los eritrocitos control deben haber formado un botón nítido.
- vii) La HA se determina inclinando la placa y observando la presencia o ausencia de arrastre de los eritrocitos con forma de gota. La titulación debe leerse a 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 intervalo inicial de diluciones.

#### 2.3.2. Prueba de inhibición de la hemaglutinación

- i) Se depositan 0,025 ml de PBS en cada pocillo de una placa de microtitulación de plástico con fondo en V.
- ii) Se depositan 0,025 ml de suero en el primer pocillo de la placa.
- iii) Se preparan diluciones a la mitad de volúmenes de 0,025 ml del suero en toda la placa.
- iv) Se añaden 4 UHA de virus/antígeno en volúmenes de 0,025 ml a cada pocillo y se dejan durante un mínimo de 30 minutos a temperatura ambiente (es decir, a unos 20°C) o 60 minutos a 4°C.
- v) Se añaden 0,025 ml de eritrocitos de pollo al 1% (v/v) en cada pocillo y se mezcla cuidadosamente, se dejan sedimentar los eritrocitos durante unos 40 minutos a temperatura ambiente, es decir, a unos 20°C, o durante 60 minutos a 4°C si la temperatura ambiente es elevada; en este tiempo los eritrocitos control deben haber formado un botón nítido.
- vi) El título de HI es la dilución más alta de suero que ocasiona la inhibición completa de 4 UHA de antígeno. La aglutinación se valora inclinando las placas. Solamente debe considerarse que presentan inhibición aquellos pocillos en los que los eritrocitos se arrastran en la misma proporción que los pocillos control (que contienen solo 0,025 ml de eritrocitos y 0,05 ml de PBS).

- vii) La validez de los resultados debe evaluarse frente a un suero control negativo, el cual no debe producir un título  $>1/4$  ( $>2^2$  o  $>\log_2 2$  expresado como el inverso), y un suero control positivo en el que el título debe encontrarse dentro de una dilución del título conocido.

La prueba de la HI se utiliza principalmente para determinar si los anticuerpos que indican infecciones por virus de influenza A son de subtipo H5 o H7. Los títulos determinados por 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 4UHA de antígeno. Algunos laboratorios prefieren emplear 8 UHA en las pruebas 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 muy bajo no debe ser malinterpretado; no implica, por ejemplo, que las aves inmunizadas con ese título estarán protegidas contra el desafío ni que las aves con títulos inferiores serán susceptibles a la exposición. En cada lote de pruebas de HI debe incluirse un control del virus y del antígeno, suero control positivo y eritrocitos control.

En esta prueba los sueros de pollos casi nunca dan lugar a reacciones de aglutinación positivas inespecíficas, y por lo tanto no es necesario pre-tratar los sueros. Los sueros de especies distintas del pollo a veces pueden causar aglutinación de eritrocitos de pollo, dando así lugar a una aglutinación inespecífica. Por tanto, inicialmente debe comprobarse si el suero presenta esta idiosincrasia y, si lo hace, debe inhibirse mediante adsorción con eritrocitos de pollo. Se realiza añadiendo 0,025 ml de eritrocitos concentrados de pollo a cada 0,5 ml de antisuero, agitando cuidadosamente y dejando reposar durante al menos 30 minutos; a continuación, los eritrocitos se precipitan mediante centrifugación a 800 **g** durante 2–5 minutos y se decantan los sueros adsorbidos. Como alternativa, pueden usarse los eritrocitos de las especies aviares estudiadas. Puede producirse inhibición inespecífica de la aglutinación derivada de una inhibición estérica cuando el antígeno H y el suero de la prueba de la HI tienen el mismo subtipo N. La reacción de inhibición estérica puede dar lugar a la formación de un botón de eritrocitos en el fondo de la placa o una corriente a con la misma velocidad que el control. Para evitar la inhibición inespecífica estérica, el antígeno H utilizado para analizar el suero problema debe ser de un subtipo N diferente al del suero problema, o bien el antígeno H utilizado puede ser proteína H recombinante o purificada que carezca de proteína N. La prueba de HI se basa en la unión antigénica entre el antígeno H y antisueros y, por tanto, otros factores pueden hacer que la unión inespecífica del antígeno H y los sueros conlleve una reacción de inhibición inespecífica. Hasta ahora no se han documentado reacciones cruzadas ni reacciones de inhibición inespecífica entre los distintos subtipos de hemaglutininas de influenza A.

La prueba de inhibición de la neuraminidasa se ha utilizado para identificar el tipo de neuraminidasa de la influenza A de las cepas, y para caracterizar los anticuerpos en las aves infectadas. El procedimiento requiere unos conocimientos y reactivos especializados; en consecuencia, esta prueba se realiza normalmente en un Laboratorio de Referencia de la OIE. La estrategia DIVA (distinción de los animales infectados de los vacunados) utilizada en Italia también se basa en el empleo de una prueba serológica para detectar anticuerpos específicos anti-N; se ha descrito el procedimiento de la prueba (Capua *et al.*, 2003).

## C. REQUISITOS PARA LAS VACUNAS

### 1. Antecedentes

Es importante que la mera vacunación no se considere la solución para el control de los subtipos de la IAAP o la IALP H5/H7 si lo que se persigue es su erradicación. Sin la aplicación de sistemas de control, bioseguridad y despoblación estrictas ante la infección, cabe la posibilidad de que virus de IAAP e IALP H5/H7 se vuelvan 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, China (Rep. Pop. de), Egipto, Indonesia y otros países (Grund *et al.*, 2011; Lee *et al.*, 2004; Smith *et al.*, 2006; Swayne & Kapczynski, 2008b). Se ha realizado una revisión sobre las vacunas actualmente utilizadas y el uso de la vacunación (Capua & Alexander, 2008; Swayne, 2003, 2004; 2012b; Swayne *et al.*, 2011).

En este capítulo, las vacunas convencionales se limitan a vacunas inactivadas contra el virus de la influenza A. Estas vacunas se han utilizado contra virus de IAAP e IALP H5/H7 o virus de influenza A distintos de H5/H7, y se han preparado a partir de líquido alantoideo infeccioso inactivado mediante beta-propiolactona o formalina y emulsionado con aceite mineral. No se recomienda utilizar vacunas vivas convencionales contra ningún subtipo de influenza.

La existencia de una gran cantidad de subtipos víricos, junto con la conocida variación de distintas cepas dentro de un subtipo determinado, supone graves problemas a la hora de escoger las cepas con las que producir vacunas inactivadas contra la influenza A. Además, algunas cepas no crecen hasta un título lo bastante alto

como para producir vacunas suficientemente potentes sin una costosa pre-concentración. Aunque en algunas estrategias de vacunación se utilizan vacunas autógenas, es decir, vacunas preparadas a partir de cepas específicamente involucradas en una epizootia, otras se basan en vacunas preparadas a partir de virus que poseen el mismo subtipo de hemaglutinina que el virus natural y capaces de dar altas concentraciones de antígeno.

Desde los años 1970, en EE.UU. se han utilizado vacunas inactivadas contra la influenza A principalmente en pavos contra virus de la influenza A levemente patógenos H5/H7 y distintos de los subtipos H5/H7. Estos virus pueden causar signos clínicos graves, sobre todo en circunstancias que favorezcan la exacerbación. Se han utilizado cantidades importantes de esta vacuna (Swayne *et al.*, 2013). Durante los últimos años, en EE.UU. la mayoría de las vacunas inactivadas contra la IA se han utilizado en pavos reproductores para protegerlos contra virus de la gripe porcina H1 y H3. La vacunación contra virus de la influenza A H9N2 se ha utilizado mucho en Asia y en Oriente Medio (Swayne & Kapczynski, 2008a). En México se ha utilizado vacunación contra la IAAP del subtipo H5N2 tras los brotes de los años 1994-1995 (Villareal, 2007), y en Pakistán contra el subtipo H7N3 (Naeem, 1998) tras los brotes de 1995. En México, el virus de la IAAP parece se ha erradicado, pero el virus de la IALP del subtipo H5N2 sigue circulando, mientras que en Pakistán, en 2004 todavía se estaban aislando virus de la IAAP genéticamente cercanos al virus de la IAAP original. Tras los brotes de IAAP causados por el virus H5N1 en Hong Kong en 2002 (Sims, 2003), se ha adoptado una política de vacunación con una vacuna contra el H5N2, posteriormente se ha sustituido por una vacuna con el H5N1. Tras su inicio en 2004, la propagación de brotes de IAAP por el virus H5N1 en varios países del sureste asiático y de África comportó la aplicación de vacunación de emergencia y profiláctica en China (Rep. Pop. De), Indonesia, Vietnam y Egipto. Se utilizó una vacuna inactivada contra el subtipo H7N7 de la influenza A en Corea (Rep. Dem. de) durante el año 2005 para controlar un brote de IAAP. De forma similar, durante los últimos años se ha permitido la vacunación preventiva contra el subtipo H5N1 de la IAAP en aves de corral de exterior y en aves de zoológico en varios países de la Unión Europea. En Italia se ha utilizado mucho la herramienta de la DIVA (neuraminidasa heteróloga) serológica con vacunación para controlar epidemias recurrentes de IALP de subtipo H7. También se ha desarrollado un programa de vacunación profiláctica bivalente con H5/H7 como consecuencia de una situación epidemiológica progresiva (Capua y Marangon, 2008).

Desde 1997, en unos pocos países se han autorizado y utilizado vacunas vectorizadas con virus vivo recombinante con insertos del gen de la hemaglutinina del virus de la influenza A subtipo H5, principalmente en pollos, entre ellas, vacunas contra el virus de la viruela aviar recombinante, el virus de la enfermedad de Newcastle recombinante y vacunas para pavos contra herpesvirus recombinantes. Se está estudiando un virus recombinante de la enteritis del pato en patos domésticos para una posible autorización y uso en China (Rep. Pop. de) (Liu *et al.*, 2011).

### 1.1. Fundamento y uso previsto del producto

Se ha demostrado empíricamente, tanto para la IAAP como para la IALP H5/H7, que las vacunas administradas adecuadamente protegen contra los signos clínicos y la mortalidad, reducen la diseminación del virus y aumentan la resistencia a la infección, protegen contra diversos virus naturales dentro del mismo subtipo de hemaglutinina, protegen contra el desafío con niveles del virus tanto bajos como altos y reducen la excreción y, como consecuencia, la transmisión por contacto del virus de desafío (Capua *et al.*, 2004; Swayne, 2003; Swayne & Suarez, 2000). Sin embargo, aun así el virus es capaz de infectar y replicarse en aves SPF vacunadas clínicamente sanas cuando se administra a dosis de desafío altas. La mayor parte de los trabajos en los que se evalúan las vacunas se han realizado con pollos y pavos, y debe procederse con cautela al extrapolar los resultados obtenidos a otras especies. Por ejemplo, en un sistema experimental en el que se utilizó el IAAP H7N7 como virus de desafío, se observó que en pollos y en patos de collar, *Callonetta leucophrys*, la mera vacunación reducía de forma suficiente la excreción y aumentaba la dosis infectiva necesaria, y que la transmisión entre aves se reducía drásticamente. Sin embargo, en el caso del faisán dorado, *Chrysolophus pictus*, aunque una sola vacunación proporcionó protección clínica, no hubo efecto en la excreción del virus de desafío y no se observó que redujera la transmisión (Van der Goot *et al.*, 2007). En algunos países, las vacunas diseñadas para prevenir la IAAP y la IALP H5/H7 están prohibidas de forma explícita o no recomendadas por las agencias gubernamentales porque se ha considerado que pueden interferir con las políticas de control mediante sacrificio sanitario. No obstante, la mayoría de las normas de control de la IAAP y la IALP H5/H7 incluyen el derecho a utilizar vacunas en casos de emergencia.

## 2. Resumen de la producción y requisitos mínimos para las vacunas convencionales

La información que se ofrece a continuación se basa principalmente en las experiencias de EE.UU. y en las directrices y política de autorización de vacunas contra la influenza A en ese país (Departamento de Agricultura de EE.UU., 1995 [actualizado en 2006]). Los principios básicos de producción de vacunas, en concreto vacunas inactivadas, son los mismos para varios virus, como el de la enfermedad de Newcastle (Capítulo 2.3.14).

Las directrices para la producción de vacunas veterinarias se indican en el Capítulo 1.1.8 *Principios de producción de vacunas veterinarias*. Las directrices aquí indicadas y en el Capítulo 1.1.8 son de carácter general y pueden completarse con requisitos nacionales o regionales.

Las instalaciones donde se produzcan vacunas deben funcionar mediante procedimientos y prácticas de seguridad humana adecuados. Si va a utilizarse virus de IAAP en estudios de desafío, las instalaciones que se utilicen para estos estudios deben cumplir los requisitos del nivel de contención para el Grupo 4 de agentes patógenos, como se indica en el Capítulo 1.1.4.

## 2.1. Características del inóculo

### 2.1.1. Características biológicas

Sea cual sea el subtipo, para establecer un inóculo primario para vacunas inactivadas solo deben utilizarse virus de la influenza A bien caracterizados y de probada baja patogenicidad, preferiblemente obtenidos en un almacén internacional o nacional. No deben utilizarse virus IAAP como virus inóculo para la producción de vacunas contra la IA. Para la IAAP, son preferibles las cepas de inóculo vacunal producidas mediante genética inversa, basadas en el gen de la hemaglutinina del virus de la IAAP, pero deben tener una secuencia del punto de escisión alterada respecto de la de un virus IALP H5/H7.

Se establece un inóculo primario, a partir del cual se obtiene un inóculo de trabajo. El inóculo primario y el inóculo de trabajo se producen en huevos embrionados SPF o SAN. Es posible que el establecimiento de un cultivo primario solo requiera producir un gran volumen de líquido alantoideo infectivo (mínimo de 100 ml), que puede almacenarse en forma de alícuotas liofilizadas (0,5 ml).

### 2.1.2. Criterios de calidad (esterilidad, pureza, ausencia de agentes extraños)

En el inóculo primario establecido debe realizarse un seguimiento o comprobarse la esterilidad, la seguridad, la potencia y la ausencia de agentes extraños específicos.

## 2.2. Método de fabricación

### 2.2.1. Procedimiento

Para la producción de vacuna, en primer lugar se establece un inóculo de trabajo en huevos embrionados SPF o SAN mediante expansión de una alícuota de inóculo primario a un volumen suficiente como para poder producir vacuna durante 12-18 meses, a partir del cual se producirán los lotes de vacuna. Es mejor guardar el inóculo de trabajo en forma líquida a temperaturas inferiores a los -60°C, ya que el virus liofilizado no siempre se multiplica hasta un título alto en el siguiente primer paso.

El procedimiento sistemático es diluir el inóculo de trabajo en tampón isotónico estéril (por ejemplo, PBS, a pH 7,2), para poder inocular alrededor de  $10^3$ – $10^4$  DIH<sub>50</sub> en 0,1 ml en cada cavidad alantoidea de huevos embrionados SPF o SAN de entre 9 y 11 días de edad. A continuación, estos huevos se incuban a 37°C. Los huevos con embriones que mueran en un plazo de 24 horas deben desecharse. El tiempo de incubación dependerá de la cepa vírica utilizada y se determinará para garantizar la máxima producción con el mínimo número de muertes embrionarias.

Los huevos infectados deben refrigerarse a 4°C antes de recogerlos. Las partes superiores de los huevos se eliminan y se extraen los líquidos alantoideos por succión. Debe evitarse por completo la succión de yema o albúmina. Todos los líquidos deben guardarse de inmediato a 4°C y analizarse para comprobar si presentan contaminación bacteriana.

En la fabricación de vacunas inactivadas, el líquido alantoideo obtenido se trata con formaldehído (una concentración final habitual es la de 1/1000, es decir, un 0,1% de formalina) o bien con beta-propiolactona (BPL) (una concentración final habitual es la de 1/1000–1/4000, es decir, un 0,1–0,025% de BPL de una pureza del 99%). El tiempo exigido debe ser suficiente para garantizar la ausencia de virus vivo. La mayoría de vacunas inactivadas se formulan con líquido alantoideo inactivado no concentrado (principio activo). No obstante, pueden concentrarse los principios activos para facilitar el almacenaje del antígeno. El principio activo se suele emulsionar con aceite mineral o vegetal. Las formulaciones exactas suelen ser secreto comercial.

### 2.2.2. Requisitos para los sustratos y los medios

Las vacunas inactivadas contra influenza A preparadas a partir de virus convencionales se producen en huevos embrionados de gallina SPF o SAN de entre 9 y 11 días de edad. El método de producción es básicamente el mismo que para la propagación de virus de forma aséptica; todos los procedimientos se llevan a cabo en condiciones de esterilidad.

### 2.2.3. Controles durante el proceso

En el caso de las vacunas inactivadas, en huevos embrionados debe comprobarse si el proceso de inactivación se ha completado, tomando al menos 10 alícuotas de 0,2 ml de cada lote y pasando cada alícuota al menos dos veces por embriones SPF o SAN. No debe quedar infectividad vírica.

### 2.2.4. Pruebas en lotes de producto final

La mayoría de países ha publicado especificaciones para el control de la producción y el análisis de vacunas, que incluyen la definición de las pruebas obligatorias en vacunas durante y después de la fabricación.

i) Esterilidad y pureza

Las pruebas de esterilidad y ausencia de contaminación por sustancias biológicas pueden hallarse en el Capítulo 1.1.9.

ii) Seguridad

En el caso de las vacunas inactivadas, se administra una dosis doble por la vía recomendada a diez aves de 3 semanas de edad, y durante 2 semanas se comprueba si estas presentan signos clínicos o lesiones locales propios de la enfermedad.

iii) Potencia del lote

La potencia de una vacuna contra la influenza A en general se evalúa comprobando la capacidad de la vacuna de inducir un título de HI importante en aves SPF o SAN. En el caso de las vacunas preparadas para conferir protección contra subtipos de la IAAP o de la IALP H5/H7, también pueden aplicarse pruebas convencionales de determinación de la potencia que incluyan el uso de tres dosis diluidas y exposición a virus virulentos (se ofrece un ejemplo en el Capítulo 2.3.14). En el caso de las vacunas inactivadas contra otros subtipos, cuando no se disponga de virus IAAP las pruebas de potencia pueden basarse en la medición de la respuesta inmunitaria o en el desafío y posterior evaluación de la morbilidad y de la reducción cuantitativa en la replicación del virus de desafío en los tractos respiratorio (orofaríngeo o traqueal) e intestinal (cloaca). La evaluación del contenido en antígeno hemaglutinina (Wood *et al.*, 1985) podría permitir la extrapolación *in vitro* de la potencia en los siguientes lotes de vacuna.

iv) Conservantes

Puede utilizarse un conservante para los recipientes de vacuna multidosis.

## 2.3. Requisitos para la autorización

### 2.3.1. Requisitos de seguridad

i) Seguridad en especies de destino y no de destino

La mayoría de vacunas inactivadas contra la influenza A están autorizadas para su uso en pollos y pavos. Deben llevarse a cabo ensayos de campo en las especies de destino para determinar la tolerancia y la seguridad de la vacuna a dosis completas. Recientemente, el uso de vacunas inactivadas contra la influenza A se ha ampliado a los patos, las ocas y otras aves de corral y de zoológico. Toda utilización de las vacunas para fines distintos de los autorizados en la ficha técnica debe realizarse con mucha cautela y bajo la supervisión de un veterinario con experiencia en el control de enfermedades durante la vacunación de la especie en cuestión. Debe tenerse cuidado de evitar la auto-inyección con vacunas de emulsión oleosa.

ii) Reversión a la virulencia en vacunas atenuadas/vivas

Contra el virus de la influenza A solo se recomiendan las vacunas inactivadas. No se recomienda utilizar vacunas vivas contra la influenza A de cualquier subtipo por el riesgo de recombinación de segmentos génicos del virus de la vacuna con el virus natural, que podría crear virus naturales más patógenos.

iii) Consideraciones ambientales

Ninguna.

### 2.3.2. Requisitos de eficacia

i) Para la producción animal

A efectos de autorización, las vacunas contra la influenza A deben pasar una prueba de eficacia en la que debe utilizarse un número estadísticamente significativo de pollos SPF o SAN por grupo. El desafío debe producirse un mínimo de tres semanas post-vacunación, utilizando una dosis de virus de la IAAP que cause un 90% o más de mortalidad en la población simulada. Lo más habitual es utilizar una dosis de desafío estandarizada de  $10^6$  dosis infecciosas medias en embrión de pollo. La protección contra la mortalidad en el grupo vacunado debe ser de al menos un 80%. En el caso de la IALP H5/H7, no se da mortalidad en los modelos de desafío, y por tanto debe observarse una reducción estadísticamente significativa en el título de excreción de virus y/o en el número de aves que excretan virus por la orofaringe o la cloaca entre la población simulada y la vacunada.

Al establecer los requisitos mínimos de antígeno, se han sugerido 50 PD<sub>50</sub> o 3 µg de hemaglutinina por dosis (Swayne y Kapczynski, 2008a). Los títulos serológicos mínimos obtenidos mediante HI en aves salvajes deben ser de 1:32 para proteger contra la mortalidad o superiores a 1:128 para proporcionar una reducción de la replicación y excreción del virus de desafío.

ii) Para el control y la erradicación

La eficacia debe ser la misma que para la producción animal.

### 2.3.3. Estabilidad

Cuando se almacenan en las condiciones recomendadas, la vacuna final debe mantener su potencia durante al menos 1 año. Las vacunas inactivadas no se pueden congelar.

## 3. Vacunas desarrolladas mediante ingeniería genética

### 3.1. Vacunas existentes y sus ventajas

Se han fabricado vacunas recombinantes contra virus de la influenza A mediante la inserción del gen codificador de la hemaglutinina del virus de la influenza A en un virus vivo no de influenza A que actúa como vector, y la utilización de ese virus recombinante para vacunar aves de corral contra la influenza A (Swayne, 2004). Las vacunas con virus vector vivo recombinante tienen varias ventajas: 1) se trata de vacunas vivas capaces de proporcionar inmunidad mucosa, humoral y celular; 2) se pueden administrar a aves jóvenes e inducen una protección inicial; así, por ejemplo el virus de la viruela aviar puede administrarse a 1 día de edad, es compatible con la vacuna de la enfermedad de Marek 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 a todos virus de la influenza A. Por tanto, solo en las aves infectadas de forma natural se detectarán anticuerpos en la prueba de la AGID o en las pruebas ELISA utilizadas para la detección de anticuerpos de la influenza 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 expuestas de forma natural al virus vector o hayan sido vacunadas con dicho virus, es decir, con el virus de la viruela aviar o virus de la enfermedad de Newcastle utilizados en las vacunas recombinantes actualmente existentes (Swayne y Kapczynski, 2008a; b). Si se utiliza 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 virus de la viruela aviar, se ha informado de que se consiguió una inmunización eficaz cuando se administró a pollos de 1 día con varios niveles de inmunidad materna (Arriola *et al.*, 1999). No obstante, cuando se

esperan niveles muy altos de anticuerpos maternos debido a una infección o vacunación previas, se deberá confirmar la eficacia de la vacuna con el vector virus de la viruela aviar en estos pollos de un día de edad, y puede requerir una primera aplicación de la revacunación con vacuna recombinante seguida, pasadas 2–3 semanas, de una revacunación con vacuna inactivada contra la influenza A. Además, puesto que los vectores son virus vivos que pueden tener pocos hospedadores (el virus de la laringotraqueítis infecciosa, por ejemplo, no se replica en los pavos), debe restringirse el uso de estas vacunas a las especies en las que se haya demostrado su eficacia.

El uso de vacunas recombinantes está restringido a países en los que están autorizadas y legalizadas. La vacuna recombinante preparada con virus de la viruela aviar y virus de la influenza A subtipo H5 se ha autorizado en El Salvador, Guatemala, México, China (República Popular de) y EE.UU. (Swayne y Kapczynski, 2008a). Se han elaborado vacunas recombinantes con el virus de la viruela aviar que contienen HA subtipo H5 y se han evaluado mediante ensayos de campo, pero la únicas experiencias de campo con esta vacuna han tenido lugar en México, El Salvador, Guatemala y China (Rep. Pop. de), países en los que se utilizó durante la campaña de vacunación contra los virus IALP H5N2 e IAAP H5N1.

También se puede utilizar el virus de la enfermedad de Newcastle como vector para expresar los genes de la hemaglutinina HA de la influenza. Se ha observado que un virus de la vacuna recombinante contra la enfermedad de Newcastle que expresa un gen de HA subtipo H5 protege a los pollos contra el desafío tanto con virus virulento de la enfermedad de Newcastle o como con virus IAAP H5N2 (Veits *et al.*, 2006). En China (Rep. Pop. De) (Ge *et al.*, 2007), se produjo una vacuna similar de virus recombinante basada en la cepa La Sota del virus de la enfermedad de Newcastle en la que se expresaba el gen de la HA del subtipo H5 asiático y se observó que era eficaz en estudios de protección con cualquier virus. Este último virus se ha autorizado en China (Rep. Pop. De) y se ha utilizado mucho. Las vacunas recombinantes con el virus de la enfermedad de Newcastle (VENr) son eficaces en aves de corral que carecen de inmunidad contra el vector del virus de la enfermedad de Newcastle, pero las vacunas con el VENr son en gran medida ineficaces cuando se utilizan a modo de vacuna principal de dosis única en aves de corral que tienen inmunidad materna o que están bien inmunizadas contra la enfermedad de Newcastle. Las vacunas con el VENr son eficaces si se utilizan como vacuna principal seguida de una revacunación con una vacuna inactivada contra la influenza A.

Recientemente, se han desarrollado otras dos vacunas vectorizadas con virus que contienen insertos del gen de la influenza A que codifica H5: 1: un herpesvirus del pavo recombinante (rHVT), y 2: un virus de la enteritis del pato recombinante (rDEV) (Swayne & Spackman, 2013). La primera se ha autorizado en Egipto y en EE.UU., mientras que la segunda está en proceso de autorización en China (Rep. Pop. de). Ambas han demostrado eficacia en el laboratorio para la protección contra el desafío de pollos y patos domésticos con IAAP H5N1, respectivamente (Liu *et al.*, 2011; Rauw *et al.*, 2011). No obstante, los informes de campo de protección con vacunas de la influenza A vectorizadas y convencionales sugieren que la protección mediante una dosis única de las vacunas vectorizadas no es factible, y que la protección en condiciones de campo requiere una vacunación inicial con la vacuna vectorizada y una segunda vacunación con una vacuna inactivada contra la influenza A o con la vacuna vectorizada (Swayne, 2012a).

Además de estas vacunas autorizadas, se han descrito vacunas contra la influenza A H5 y H7 basadas en la hemaglutinina en las que se utilizan sistemas de expresión *in vivo* o *in vitro*, como adenovirus recombinantes, salmonella, baculovirus, vaccinia, virus de la leucosis aviar, alfavirus y virus de la laringotraqueítis infecciosa (Swayne y Kapczynski, 2008a). Se ha evaluado ADN que codifica la hemaglutinina H5 como posible vacuna para aves de corral (Rao *et al.*, 2008).

### 3.2. Requisitos especiales para vacunas desarrolladas mediante ingeniería genética, si las hay

En el caso de las vacunas vivas recombinantes vectorizadas con insertos de genes de la influenza A H5 y H7 deben someterse a una evaluación del impacto medioambiental para determinar el riesgo de que la vacuna resulte virulenta en especies aviares no de destino, y para saber si aumentará la virulencia en las especies aviares de destino.

## 4. Métodos de vigilancia para detectar infección en parvadas y aves vacunadas

Se ha propuesto una estrategia para la “diferenciación entre animales infectados y animales vacunados” (DIVA) como posible solución para lograr la erradicación de la IAAP y la IALP H5/H7 sin necesidad de sacrificar aves de forma masiva y sin el consiguiente perjuicio económico que esto conllevaría, especialmente en países en vías de desarrollo (FAO, 2004). Esta estrategia proporciona las ventajas de la vacunación (menos virus en el medio ambiente), pero además la capacidad para identificar parvadas infectadas permitiría la puesta en práctica de otras medidas de control, como el sacrificio sanitario. En las estrategias DIVA, se utilizan uno de los dos

siguientes mecanismos de detección en la población vacunada: 1) detección del virus de la influenza A (“DIVA vírica”), o 2) detección de anticuerpos contra la infección por el virus de la influenza A (“DIVA serológica”). En las parvadas, un método sencillo consiste en el seguimiento regular de aves centinela sin vacunar dentro de cada parvada vacunada, pero este método conlleva algunos problemas de gestión, en concreto el relativo a la identificación de las aves centinela dentro de grandes parvadas. Como sistema alternativo o secundario, se pueden realizar pruebas de infección natural de aves vacunadas mediante la detección del virus natural o de anticuerpos contra el virus. Para detectar el virus natural, se pueden analizar hisopos orofaríngeos o cloacales de aves muertas el día de la toma de muestras o enfermas, de forma individual o combinada, mediante métodos moleculares, tales como la RT-PCR en tiempo real o mediante AC-ELISA en las poblaciones vacunadas (Swayne y Kapczynski, 2008a).

Para el empleo de la DIVA serológica, deben utilizarse sistemas de vacunación que faciliten la detección de la infección natural en poblaciones vacunadas. En los últimos años se han desarrollado varios sistemas. 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 IALP H7N1. Para complementar las medidas directas de control, se aplicó una estrategia de “DIVA” basada en el uso de una vacuna que contenía H7N3 para combatir una infección natural por H7N1. Las aves vacunadas se diferenciaron de las infectadas naturalmente empleando una prueba serológica para detectar anticuerpos específicos anti-N (Capua *et al.*, 2003). La misma estrategia se utilizó para controlar la IALP H7N3 en Italia en 2002–2003 (Capua y Alexander, 2004), en este caso con una vacuna de H7N1. En los dos casos, la combinación de la vacunación con el sacrificio sanitario, utilizando la estrategia DIVA descrita, conllevó la erradicación del virus natural. Puede haber problemas con este sistema en caso de que surja un virus natural con un antígeno N diferente del propio del virus natural o si en el campo ya están circulando subtipos con antígenos N distintos.

Como alternativa, el uso de vacunas que solo tengan HA, por ejemplo, vacunas recombinantes, permite la utilización de la clásica AGID y de ELISA basados en la proteína de la nucleocápsida (NP) o de la 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 (Tumpey *et al.*, 2005). Este sistema todavía tiene que ser validado en condiciones de campo.

## 5. Evaluación y actualización continuas de las cepas de los inóculos vacunales para proteger contra variantes emergentes de cepas víricas naturales

Históricamente, las cepas de inóculo de vacuna inactivada contra el subtipo IALP H5 y los virus de la viruela recombinantes de aves de corral con insertos de gen de H5 han mostrado una amplia protección cruzada en pollos contra el desafío con diversos virus de la IAAP H5 de Eurasia y Norteamérica (Swayne y Kapczynski, 2008a). No obstante, las vacunas contra la influenza A para aves de corral han tenido poca utilidad en el campo hasta 1995, cuando tuvo lugar el brote de IAAP por virus H5N2 en México y se implementó el uso de vacunas como parte del programa de control (Villareal 2007). Las cepas de IAAP se erradicaron hacia el mes de junio de 1995, pero como siguieron circulando virus de la IALP H5N2, la vacunación se mantuvo como una de las herramientas de control de estas cepas de IALP H5N2. Al cabo de unos pocos años emergieron múltiples linajes de virus naturales de la IALP H5N2 antigénicamente variantes que escaparon a la inmunidad inducida por la cepa original de inóculo vacunal de 1994 utilizada en la vacuna inactivada convencional (Lee *et al.*, 2004). De forma similar, han surgido virus naturales emergentes de IAAP H5N1 en China (Rep. Pop. De), Indonesia y Egipto desde 2005 que han escapado a la inmunidad inducida por las cepas de inóculo vacunal clásicas inactivadas contra H5 utilizadas en vacunas comerciales (Chen & Bu, 2009; Grund *et al.*, 2011; Swayne & Kapczynski, 2008b). No está claro si el surgimiento de estas variantes antigénicas está relacionado con el uso de vacunas o con un uso indebido de vacunas.

Todos los programas de vacunación contra la influenza A deben contar con un programa de vigilancia epidemiológicamente adecuado para comprobar las variantes emergentes, y debe comprobarse si las cepas representativas presentan variación genética o antigénica. Puede realizarse un cribado mediante HI utilizando variantes genéticas de virus de campo y cepas de inóculo vacunal a modo de antígeno, y a continuación deben analizarse cepas sospechosas de ser variantes antigénicas mediante métodos que permitan cuantificar alteraciones antigénicas, como por ejemplo la cartografía antigénica (Fouchier & Smith, 2010). Las cepas de inóculo vacunal de IAAP e IALP H5/H7 utilizadas en vacunas inactivadas y los virus de vacunas recombinantes con insertos de gen de la hemaglutinina de H5 o H7 deben reevaluarse, de tal forma que las cepas de inóculo que no resulten protectoras deben dejar de utilizarse: a) siempre que haya indicios de surgimiento de variantes antigénicas o fracaso de la vacuna (enfermedad clínica en parvadas vacunadas con una respuesta inmunitaria consistente al antígeno vacunal); o b) cada 2-3 años para conseguir eficacia contra los virus naturales circulantes, y debe interrumpirse el uso de las cepas de inóculo que no confieran protección. La evaluación de la cepa del inóculo vacunal debe incluir virus naturales de todas las zonas geográficas relevantes y sectores de producción, y análisis de la secuencia de estos virus para identificar variantes genéticas que puedan volver a evaluarse para comprobar si presentan cambios antigénicos que pudieran reducir la eficacia de la vacuna(s) que se está utilizando. En las pruebas de desafío contra cepas de inóculo vacunal actualmente autorizadas deben

utilizarse cepas representativas del principal linaje(s) antigénico circulante y de variantes antigénicas seleccionadas, así como posibles futuras cepas de inóculo. En base a esta información científica, la autoridad veterinaria competente de cada país deberá establecer, consultando a los científicos especialistas en vacunas veterinarias de máximo reconocimiento mundial y a organizaciones internacionales, cuáles son las cepas de inóculo para la vacuna contra la IALP, aisladas de forma natural u obtenidas mediante genética inversa, que deben utilizarse en vacunas inactivadas convencionales, y cuáles son los insertos de genes de hemaglutinina H5 y H7 que debe utilizarse en las vacunas recombinantes. En algunos casos, puede ser necesaria más de una cepa de inóculo para cubrir todos los sectores de producción de un país. Solo deben autorizarse vacunas potentes y de gran calidad, y solo deben utilizarse en los programas de control de la IA. Para inducir una inmunidad protectora en poblaciones de aves de corral es fundamental llevar a cabo una administración adecuada de vacunas potentes y de gran calidad.

## BIBLIOGRAFÍA

- AGÜERO M., SAN MIGUEL E., SÁNCHEZ A., GÓMEZ-TEJEDOR C. & JIMÉNEZ-CLAVERO M.A. (2007). A fully automated procedure for the high-throughput detection of avian influenza virus by real-time reverse transcription–polymerase chain reaction. *Avian Dis.*, **51**, 235–241.
- 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.
- 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.
- BEARD C.W. (1970). Demonstration of type-specific influenza antibody in mammalian and avian sera by immunodiffusion. *Bull. WHO*, **42**, 779–785.
- CAPUA I. & ALEXANDER D.J. (2004). Avian influenza: recent developments. *Avian Pathol.*, **33**, 393–404.
- 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.
- 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.
- CAPUA I. & ALEXANDER D.J. (2008). Avian influenza vaccines and vaccination in birds. *Vaccine*, **26S**, D70–D73.
- CHEN H. & BU Z. (2009). Development and application of avian influenza vaccines in China. *Curr. Top. Microbiol. Immunol.*, **333**, 153–162.
- CHUA T-H., ELLIS T.M., WONG C.W., GUAN Y., GE S.X., PENG G., LAMICHHANE C., MALIADIS C., TAN S-W., SELLECK P. & PARKINSON J. (2007). Performance evaluation of five detection tests for avian influenza antigen with various avian samples. *Avian Dis.*, **51**, 96–105.
- DAS A., SPACKMAN E., SENNE D., PEDERSEN J. & SUAREZ D.L. (2006). Development of an internal positive control for rapid diagnosis of avian influenza virus infections by real-time reverse transcription-PCR with lyophilized reagents. *J. Clin. Microbiol.*, **44** (9), 3065–3073.
- ELVINGER F., AKEY B.L., SENNE D.A., PIERSON F.W., PORTER-SPALDING B.A., SPACKMAN E. & SUAREZ D.L. (2007). Characteristics of diagnostic tests used in the 2002 low-pathogenicity avian influenza H7N2 outbreak in Virginia. *J. Vet. Diagn. Invest.*, **19**, 341–348.
- FEREIDOUNI S.R., HARDER T.C. & STARICK E. (2008). Rapid pathotyping of recent H5N1 highly pathogenic avian influenza viruses and of H5 viruses with low pathogenicity by RT-PCR and restriction enzyme cleavage pattern (RECP). *J. Virol. Methods*, **154**, 14–19.
- FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION OF THE UNITED (FAO) (2004). FAO, OIE & WHO Technical consultation on the Control of Avian Influenza. Animal health special report.
- FOUCHIER R.A.M. & SMITH D.J. (2010). Use of antigenic cartography in vaccine seed strain selection. *Avian Dis.*, **54**, 220–223.

- GALL A., HOFFMANN B., HARDER T.C., GRUND C. & BEER M. (2008). Universal primer set for amplification and sequencing of HA0 cleavage sites of all influenza A viruses. *J. Clin. Microbiol.*, **46**, 2561–2567.
- GALL A., HOFFMANN B., HARDER T.C., GRUND C., EHRLICH R. & BEER M. (2009). Rapid and highly sensitive neuraminidase subtyping of avian influenza viruses by use of a diagnostic DNA microarray. *J. Clin. Microbiol.*, **47**, 2985–2988.
- 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 avian influenza viruses. *J. Virol.*, **81**, 150–158.
- GRUND C., ABDELWHAB E.S., ARAFA A.S., ZILLER M., HASSAN M.K., ALY M.M., HAFEZ H.M., HARDER T.C. & BEER M. (2011). Highly pathogenic avian influenza virus H5N1 from Egypt escapes vaccine-induced immunity but confers clinical protection against a heterologous clade 2.2.1 Egyptian isolate. *Vaccine*. [Epub ahead of print] PubMed PMID: 21244859.
- HOFFMANN B., HARDER T., STARICK E., DEPNER K., WERNER O. & BEER M. (2007). Rapid and highly sensitive pathotyping of avian influenza A H5N1 virus by using real-time reverse transcription-PCR. *J. Clin. Microbiol.*, **45**, 600–603.
- IMAI M., NINOMIYA A., MINEKAWA H., NOTOMI T., ISHIZAKI T., TASHIRO M. & ODAGIRI T. (2006). Development of H5-RT-LAMP (loop-mediated isothermal amplification) system for rapid diagnosis of H5 avian influenza virus infection. *Vaccine*, **24**, 6679–6682.
- 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.
- 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.
- LIU J., CHEN P., JIANG Y., WU L., ZENG X., TIAN G., GE J., KAWAOKA Y., BU Z. & CHEN H. (2011). A duck enteritis virus-vectored bivalent live vaccine provides fast and complete protection against H5N1 avian influenza virus infection in ducks. *J. Virol.*, **85** (21), 10989–10998.
- LONDT B.Z., BANKS J. & ALEXANDER D.J. (2007). Highly pathogenic avian influenza viruses with low virulence for chickens in *in vivo* tests. *Avian Pathol.*, **36**, 347–350.
- MILLER P.J., AFONSO C.L., SPACKMAN E., SCOTT M.A., PEDERSEN J.C., SENNE D.A., BROWN J.D., FULLER C.M., UHART M.M., KARESH W.B., BROWN I.H., ALEXANDER D.J. & SWAYNE D.E. (2010). Evidence for a new avian paramyxovirus serotype-10 detected in Rockhopper Penguins from the Falkland Islands. *J. Virol.*, **84**, 11496–11504.
- MONNE I., ORMELLI S., SALVIATO A., DE BATTISTI C., BETTINI F., SALOMONI A., DRAGO A., ZECCHIN B., CAPUA I. & CATTOLI G. (2008). Development and validation of a one-step real-time PCR assay for simultaneous detection of subtype H5, H7, and H9 avian influenza viruses. *J. Clin. Microbiol.*, **46**, 1769–1773.
- 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.
- PASICK J., HANDEL K., ROBINSON J., COPPS J., RIDD D., HILLS K., KEHLER H., COTTAM-BIRT C., NEUFELD J., BERHANE Y. & CZUB S. (2005). Intersegmental recombination between the haemagglutinin and matrix genes was responsible for the emergence of a highly pathogenic H7N3 avian influenza virus in British Columbia. *J. Gen. Virol.*, **86**, 727–731.
- POSTEL A., LETZEL T., FRISCHMANN S., GRUND C., BEER M. & HARDER T. (2010). Evaluation of two commercial loop-mediated isothermal amplification assays for detection of avian influenza H5 and H7 hemagglutinin genes. *J. Vet. Diagn. Invest.*, **22**, 61–66.
- RAUW F., PALYA V., VAN B.S., WELBY S., TATAR-KIS T., GARDIN Y., DORSEY K.M., ALY M.M., HASSAN M.K., SOLIMAN M.A., LAMBRECHT B. & VAN DEN BERG T. (2011). Further evidence of antigenic drift and protective efficacy afforded by a recombinant HVT-H5 vaccine against challenge with two antigenically divergent Egyptian clade 2.2.1 HPAI H5N1 strains. *Vaccine*, **29** (14), 2590–2600.
- RAO S., KONG W.P., WEI C.J., YANG Z.Y., NASON M., STYLES D., DETOLLA L.J., PANDA A., SORRELL E.M., SONG H., WAN H., RAMIREZ-NIETO G.C., PEREZ D. & NABEL G.J. (2008). Multivalent HA DNA vaccination protects against highly pathogenic H5N1 avian influenza infection in chickens and mice. *PLoS One*, **3** (6).

- SCAHLs (SUB-COMMITTEE ON ANIMAL HEALTH LABORATORY STANDARDS [AUSTRALIA/NEW ZEALAND]) (2009) SCAHLs Approved Tests. Avian Influenza b-ELISA. [http://www.scahls.org.au/new\\_tests/scahls\\_approved\\_tests](http://www.scahls.org.au/new_tests/scahls_approved_tests)
- 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.
- SLEMONS R.D. & D.E. SWAYNE (1990). Replication of a waterfowl-origin influenza virus in the kidney and intestine of chickens. *Avian Dis.*, **34**, 277–284.
- SLOMKA M.J., PAVLIDIS T., BANKS J., SHELL W., McNALLY A., ESSEN S. & BROWN I.H. (2007b). Validated H5 Eurasian real-time reverse transcriptase–polymerase chain reaction and its application in H5N1 outbreaks in 2005–2006. *Avian Dis.*, **51**, 373–377.
- SMITH G.J., FAN X.H., WANG J., LI K.S., QIN K., ZHANG J.X., VIJAYKRISHNA D., CHEUNG C.L., HUANG K., RAYNER J.M., PEIRIS J.S., CHEN H., WEBSTER R.G. & GUAN Y. (2006). Emergence and predominance of an H5N1 influenza variant in China. *Proc. Natl Acad. Sci. USA*, **103**, 16936–16941.
- SPACKMAN E., IP HS, SUAREZ D.L., SLEMONS R.D. & STALLKNECHT D.E. (2008). Analytical validation of a real-time reverse transcription polymerase chain reaction test for Pan-American lineage H7 subtype Avian influenza viruses. *J. Vet. Diagn. Invest.*, **20**, 612–616.
- SPACKMAN E., PEDERSEN J.C., MCKINLEY E.T. & GELB J. (2013). Optimal specimen collection and transport methods for the detection of avian influenza virus and Newcastle disease virus. *BMC Vet. Res.*, **9**, 35.
- 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.
- SPACKMAN E. & SUAREZ D.L. (2008). Detection and identification of the H5 hemagglutinin subtype by real-time RT-PCR. *Methods Mol. Biol.*, **436**, 27–33.
- SUAREZ D.L., DAS A., ELLIS E. (2007). Review of rapid molecular diagnostic tools for avian influenza virus. *Avian Dis.*, **51**, 201–208.
- SUAREZ D.L., SENNE D.A., BANKS J., BROWN I.H., ESSEN S.C., LEE C.W., MANVELL R.J., MATHIEU-BENSON C., MARENO V., PEDERSEN J., PANIGRAHY B., ROJAS H., SPACKMAN E. & ALEXANDER D.J. (2004). Recombination resulting in virulence shift in avian influenza outbreak, Chile. *Emerg. Infect. Dis.*, **10**, 693–699.
- SWAYNE D.E. (2003). Vaccines for list A poultry diseases; emphasis on avian influenza. *Dev. Biol. (Basel)*, **114**, 201–212.
- SWAYNE D.E. (2004). Application of new vaccine technologies for the control of transboundary diseases. *Dev. Biol. (Basel)*, **119**, 219–228.
- Swayne D.E. (2012a). Impact of vaccines and vaccination on global control of avian influenza. *Avian Dis.*, **56** (4), 818–828.
- Swayne D.E. (2012b). The role of vaccines and vaccination in high pathogenicity avian influenza control and eradication. *Exp. Rev. Vaccines*, **11** (8), 877–880.
- SWAYNE D.E. & KAPCZYNSKI D. (2008a). Vaccines, vaccination, and immunology for avian influenza viruses in poultry. *In: Avian Influenza*. Swayne D.E. ed., Wiley-Blackwell, Ames, Iowa, USA, 407–451.
- SWAYNE D.E. & KAPCZYNSKI D. (2008b). Strategies and challenges for eliciting immunity against avian influenza virus in birds. *Immuno. Rev.*, **225**, 314–331.
- SWAYNE D.E., PAVADE G., HAMILTON K., VALLAT B. & MIYAGISHIMA K. (2011). Assessment of national strategies for control of high pathogenicity avian influenza and low pathogenicity notifiable avian influenza in poultry, with emphasis on vaccines and vaccination. *Rev. sci. tech. Off. Int. Epiz.*, **30** (3), 839–870.
- SWAYNE D.E. & SPACKMAN E. (2013). Current status and future needs in diagnostics and vaccines for high pathogenicity avian influenza. *Dev. Biol. (Basel)*, **135**, 79–94.
- SWAYNE D.E. & SUAREZ D.L. (2000). Highly pathogenic avian influenza. *Rev. sci. tech. Off. Int. Epiz.*, **19**, 463–482.

SWAYNE D.E., SUAREZ D.L. & SIMS L.D. (2013). Influenza. *In: Diseases of Poultry*, Thirteenth Edition. Swayne D.E., Glisson J.R., McDougald L.R., Nair, V., Nolan L.K. & Suarez D.L., eds. Wiley-Blackwell, Ames, Iowa, USA, 181–218.

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.

TONG S., LI Y., RIVAILLER P., CONRARDY C., CASTILLO D.A., CHEN L.M., RECUENCO S., ELLISON J.A., DAVIS C.T., YORK I.A., TURMELLE A.S., MORAN D., ROGERS S., SHI M., TAO Y., WEIL M.R., TANG K., ROWE L.A., SAMMONS S., XU X., FRACE M., LINDBLADE K.A., COX N.J., ANDERSON L.J., RUPPRECHT C.E. & DONIS R.O. (2012). A distinct lineage of influenza A virus from bats. *Proc. Natl Acad. Sci. USA*, **109**, 4269–4274.

TONG S., ZHU X., LI Y., SHI M., ZHANG J., BOURGEOIS M., YANG H., CHEN X., RECUENCO S., GOMEZ J., CHEN L.M., JOHNSON A., TAO Y., DREYFUS C., YU W., MCBRIDE R., CARNEY P.J., GILBERT A.T., CHANG J., GUO Z., DAVIS C.T., PAULSON J.C., STEVENS J., RUPPRECHT C.E., HOLMES E.C., WILSON I.A. & DONIS R.O. (2013). New world bats harbor diverse influenza A viruses. *PLoS Pathog.*, **9**, e1003657.

UNITED STATES DEPARTMENT OF AGRICULTURE (USDA) (1995, updated 2006). Memorandum No. 800.85. Avian influenza vaccines. USDA, Veterinary Biologics, Animal and Plant Health Inspection Services.

VAN DER GOOT, J.A., VAN BOVEN, M., KOCH, G. & DE JONG M.C.M. (2007). Variable effect of vaccination against highly pathogenic avian influenza (H7N7) virus on disease and transmission in pheasants and teals. *Vaccine*, **25**, 8318–8325.

VEITS J., WIESNER D., FUCHS W., HOFFMANN B., GRNZOW H., STARICK E., MUNDT E., SCHIRRMIEIER 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.

VILLARREAL-CHAVEZ C. (2007). Experiences in control of avian influenza in the Americas. *Dev. Biol.*, **130**, 53–60.

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.

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.

WOOLCOCK P.R. & CARDONA C.J. (2005) Commercial immunoassay kits for the detection of influenza virus type A: evaluation of their use with poultry. *Avian Dis.*, **49**, 477–481.

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

\*

\* \*

**NB:** Existen Laboratorios de Referencia de la OIE para la influenza aviar (puede consultarse la lista actualizada en la tabla de la Parte 4 de este *Manual Terrestre* y en la página web de la OIE, <http://www.oie.int/esp/our-scientific-expertise/reference-laboratories/list-of-laboratories/>).

Por favor, contacte con los Laboratorios de Referencia de la OIE para información adicional sobre las pruebas de diagnóstico, los reactivos y las vacunas para la influenza aviar

## ANEXO 2.3.4.1.

# DIRECTRICES RELATIVAS A LA BIOPROTECCIÓN DURANTE LA MANIPULACIÓN DE VIRUS DE INFLUENZA AVIAR ALTAMENTE PATÓGENOS EN LABORATORIOS VETERINARIOS DE DIAGNÓSTICO

---

## INTRODUCCIÓN

La diseminación de virus de la influenza aviar del subtipo H5N1 altamente patógeno por Asia, África y Europa ha conllevado un aumento del número de laboratorios que realizan diagnósticos de este agente patógeno. Los virus de la influenza aviar altamente patógena (IAAP), en general suponen una grave amenaza para las aves, y la mortalidad suele alcanzar el 100% en los pollos susceptibles. Además, estos agentes también pueden constituir una grave amenaza zoonótica, puesto que en humanos infectados por el virus de la IAAP H5N1 se han notificado mortalidades de más del 50%. En reconocimiento de la necesidad de una norma relativa a cómo manipular de forma segura estos virus, la OIE ha establecido las siguientes directrices de biocontención para la manipulación de muestras que puedan contener virus de la IAAP. Se basan en las directrices sobre bioprotección publicadas en este *Manual Terrestre* de la OIE (2012) y por la Organización Mundial de la Salud (2005).

## NIVELES DE BIOCONTENCIÓN

Las muestras que vayan a someterse a pruebas de diagnóstico para detectar la influenza A de alta patogenicidad mediante las siguientes técnicas pueden procesarse utilizando los requisitos de contención de los agentes patógenos del grupo 2:

- Reacción en cadena de la polimerasa con transcripción inversa (RT-PCR) y reacción en cadena de la polimerasa con transcripción inversa en tiempo real (RT-PCR en tiempo real)
- Pruebas de captura de antígeno
- Serología

Los procedimientos de aislamiento e identificación del virus en los que se manipulen muestras que pudieran contener altos títulos de virus de la IAAP de replicación competente deben llevarse a cabo según los requisitos de la OIE para la contención de los agentes patógenos del grupo 3 o del grupo 4, que consistirían en lo siguiente:

- Se debe utilizar equipo de protección personal, que incluirá batas de laboratorio con la parte delantera de una sola pieza, guantes, gafas de seguridad y máscaras de oxígeno de una eficiencia del 95% o superior.
- Las muestras procedentes de aves o animales potencialmente infectados solo pueden procesarse en cabinas de seguridad biológica (CSB) de tipo II o III.
- Las necropsias de aves deben llevarse a cabo en una CSB de Tipo II utilizando protección respiratoria, como una máscara de oxígeno N95, o en una cabina de seguridad biológica Tipo III, u otro dispositivo de contención primaria con una filtración de aire de un 95% de eficiencia o superior.
- Debe llevarse a cabo una centrifugación en recipientes de centrífuga sellados.
- Los rotores de centrifugación deben abrirse y descargarse en una CSB.
- Tras el procesado de las muestras deben descontaminarse superficies y equipos de trabajo.
- Todo material contaminado debe descontaminarse esterilizando por autoclave o desinfectando antes de desecharlo, o bien debe incinerarse.

Si se inoculan pollos u otras aves o mamíferos con virus IAAP, la inoculación debe llevarse a cabo según los requisitos de la OIE para la contención de los agentes patógenos del grupo 4, y del siguiente modo:

- Los pollos inoculados deben mantenerse en jaulas de aislamiento u otros dispositivos de contención primaria, o bien en jaulas no de aislamiento/compartimientos en el suelo en salas especialmente diseñadas, como las de nivel 3 de bioseguridad agrícola (BSL-3Ag) diseñadas por el Departamento de Agricultura de EE.UU.
- Las jaulas deben estar en una instalación independiente que vaya equipada según los requisitos de la OIE para la contención de los agentes patógenos del grupo 3.
- En las salas debe haber presión negativa respecto al exterior, y las jaulas debe haber presión negativa respecto a la sala.
- Las jaulas deben disponer de filtro HEPA en las entradas y salidas de aire.
- En las instalaciones para los animales debe disponerse de una cabina de bioseguridad u otros dispositivos de contención primaria para llevar a cabo exámenes post-mortem y para obtener muestras.

### **BIBLIOGRAFÍA**

WORLD ORGANISATION FOR ANIMAL HEALTH (OIE) (2012). *Manual of Diagnostic Tests and Vaccines for Terrestrial Animals*. [www.oie.int](http://www.oie.int)

WORLD HEALTH ORGANISATION (WHO) (2005). WHO laboratory biosafety guidelines for handling specimens suspected of containing avian influenza A virus, 12 January 2005.

\*  
\* \*