

LARINGOTRAQUEÍTIS INFECCIOSA AVIAR

RESUMEN

La laringotraqueítis infecciosa aviar (LTI) es una enfermedad respiratoria causada por el herpesvirus tipo 1 de las gallináceas, que es un alfaherpesvirus. Es, sobre todo, una enfermedad de los pollos, aunque también puede afectar a los faisanes, las perdices y los pavos reales. Los signos clínicos y las reacciones patológicas que se han observado pueden variar desde una gravedad extrema, con muertes de aves por asfixia, hasta una muy leve, no diferenciable de otras enfermedades respiratorias leves de los pollos. La lesión más importante es la traqueítis. En aves infectadas, el virus puede convertirse en latente y ser re-excretado en fecha posterior sin signos clínicos

El diagnóstico de laboratorio se basa en el aislamiento del virus, la detección de la presencia del virus o de antígenos víricos y la detección de anticuerpos específicos en el suero. Puede ser valioso el examen histopatológico de la tráquea para comprobar si presenta inclusiones intranucleares características y formación de sincitios, pues ambos hallazgos tienen valor diagnóstico.

Identificación del agente: *El aislamiento del virus puede hacerse por inoculación de material sospechoso en la membrana corioalantoidea desprendida de huevos de gallina embrionados o en cultivos de células embrionarias de aves. Estos métodos requieren mucho tiempo, pero son sensibles. Entre los métodos rápidos, están la inmunofluorescencia del exudado traqueal o de cortes congelados y el enzoinmunoanálisis (ELISA) para detectar el antígeno vírico en los raspados de mucosa. Se ha comprobado que para el examen del material clínico, la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) es más sensible que el aislamiento del virus y actualmente se utiliza mucho. Es posible la caracterización y diferenciación de la vacuna y los virus de tipo silvestre utilizando la PCR seguida de la prueba del polimorfismo en la longitud de los fragmentos de restricción o la secuenciación.*

Pruebas serológicas: *Los anticuerpos contra el virus de la LTI (VLTI) pueden detectarse mediante pruebas de neutralización vírica (NV) realizadas en huevos o en cultivos celulares, por reacciones mediante la utilización de la IGDA, por inmunofluorescencia indirecta o por ELISA. Esta última es la preferida para el examen de parvadas.*

Requisitos para las vacunas: *Generalmente, las vacunas contra el virus de la LTI se preparan a partir de virus vivos atenuados. Los virus de los que se dispone actualmente proporcionan cierto grado de protección pero no son completamente satisfactorios. También se están comercializando varias vacunas recombinantes con distintos grados de eficacia en cuanto a protección.*

A. INTRODUCCIÓN

La laringotraqueítis infecciosa aviar (LTI) es una enfermedad respiratoria de los pollos causada por un alfa-herpesvirus, *gallid herpesvirus 1*. Tal enfermedad puede afectar también a los faisanes, las perdices y los pavos reales. Las principales características de la enfermedad en su forma virulenta son los antecedentes, los signos clínicos y las lesiones traqueales graves, pero en la forma leve puede no distinguirse de otras enfermedades respiratorias leves. El diagnóstico de laboratorio se basa en la detección de la presencia del virus o componentes víricos (Guy & Bagust, 2003; Scholz *et al.*, 1994; Williams *et al.*, 1994) o en anticuerpos específicos en el suero (Adair *et al.*, 1985; Meulemans & Halen, 1978).

Desde el punto de vista clínico, la enfermedad puede aparecer en tres formas: la hiperaguda, la subaguda y la crónica o leve. En la forma hiperaguda, el inicio de la enfermedad es repentino, con una propagación rápida. La

morbilidad es alta y la mortalidad puede superar el 50%. Algunas aves pueden morir en buenas condiciones corporales antes de que aparezcan signos característicos que conllevan una dificultad respiratoria, con extensión del cuello y jadeos en un intento por respirar. También se producen gorgoteos, crepitaciones y tos cuando las aves tratan de expulsar las obstrucciones de la tráquea. También es posible observar conjuntivitis. La tos puede producir la expulsión de coágulos de sangre que pueden encontrarse en el suelo y en las paredes. Son también características las alteraciones post mórtem, que están limitadas al tracto respiratorio superior y consisten en traqueítis hemorrágica con coágulos de sangre, rinitis mucoide y mucosidad sanguinolenta a lo largo de la tráquea.

En la forma subaguda, el comienzo de la enfermedad es más lento, y los signos respiratorios se pueden prolongar durante algunos días antes de que se produzca la muerte. La morbilidad es alta pero la mortalidad es menor que la de la forma hiperaguda, de entre un 10% y un 30%. Los hallazgos post mórtem son menos severos y consisten en exudado mucoide con o sin sangre, en la tráquea. Se pueden encontrar membranas diftéricas caseosas amarillentas adheridas a la laringe y a la mucosa traqueal superior.

La forma crónica o leve de la LTI se puede observar entre los supervivientes de cualquiera de las formas de la enfermedad mencionadas anteriormente, aunque es posible que en algunos de los brotes todos los casos sean leves. La incidencia de la LTI crónica dentro de una parvada puede ser de solo un 1–2%, y la mayoría de las aves afectadas mueren asfixiadas. Los signos son accesos de tos y jadeos con secreciones nasales y orales y disminución de la producción de huevos. La infección se contrae a través de las vías respiratorias altas y el contagio se produce a partir de aves con la infección en fase aguda, pero la infección sin signos clínicos puede persistir durante largos periodos de tiempo, con la re-excreción intermitente del virus, y estas aves portadoras recuperadas también constituyen una forma potencial de contagio de la enfermedad (Hughes *et al.*, 1987). En el examen post mórtem, se encuentran placas y tapones necróticos, caseosos y diftéricos en la tráquea, laringe y boca. Los brotes de la forma leve de LTI pueden afectar a gran número de aves de forma simultánea, en cuyo caso las lesiones macroscópicas pueden consistir tan solo en conjuntivitis, sinusitis y traqueítis mucoide. Dado que la transmisión de la LTI tiene lugar por contacto directo, la transmisión es más lenta cuando las aves están enjauladas que cuando se crían sueltas al aire libre, y la vía de infección puede ser visible cuando se utilizan jaulas. Trabajos recientes han confirmado la existencia de una variación considerable entre las cepas del VLTI en su tropismo por la tráquea o la conjuntiva, y aquellas con afinidad por esta última pueden afectar seriamente a la ganancia de peso (Kirkpatrick *et al.*, 2006a).

No existe riesgo conocido de infección humana por el VLTI. Las medidas de biocontención deben determinarse en función de un análisis del riesgo, como se describe 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*.

Tabla 1. Métodos analíticos disponibles para el diagnóstico de la laringotraqueítis infecciosa 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 |
| Identificación del agente¹ | | | | | | |
| Aislamiento vírico | – | – | – | ++ | – | – |
| Inmunofluorescencia para la detección de antígeno | – | + | – | ++ | – | – |
| ELISA – detección de antígeno | + | ++ | + | +++ | + | – |
| PCR | ++ | +++ | ++ | +++ | ++ | – |
| Histopatología | – | – | – | ++ | – | – |

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

| 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 |
| Detección de respuesta inmunitaria | | | | | | |
| NV | + | – | + | – | – | + |
| ELISA – detección de anticuerpo | ++ | + | +++ | + | +++ | +++ |

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.

ELISA = enzimoimmunoanálisis; PCR = reacción en cadena de la polimerasa; VN = neutralización vírica.

B. TÉCNICAS DE DIAGNÓSTICO

1. Identificación del agente

El virus puede aislarse en hígado de embrión de pollo (McNulty *et al.*, 1985), en riñón de embrión de pollo (Chang *et al.*, 1960) o en cultivo de células renales de pollo (Van Kammen & Spadbrow, 1976). Se ha encontrado que la forma más sensible de aislamiento es la utilización de monocapas de las células de hígado de embrión de pollo (Hughes & Jones, 1988). El virus también puede crecer en la membrana corioalantoidea (CAM) desprendida de huevos embrionados de pollo que estén libres de patógenos específicos (SPF), y que tengan entre 10 y 12 días (Jordan, 1964).

El herpesvirus causante se puede detectar directamente en el exudado traqueal mediante microscopía electrónica (Van Kammen & Spadbrow, 1976). Los antígenos víricos pueden detectarse mediante inmunofluorescencia (Braune & Gentry, 1985; Wilks & Kogan, 1979) o enzimoimmunoanálisis (ELISA), utilizando raspados de la mucosa traqueal (York & Fahey, 1988). También puede ser útil el examen histopatológico de la tráquea para detectar inclusiones intranucleares típicas del herpesvirus y formación de sincitios (Armstrong, 1959; Pirozok *et al.*, 1957). Se han descrito métodos de detección del VLTi en los que se utiliza la reacción en cadena de la polimerasa (PCR), y se ha observado que la PCR es generalmente más sensible que el aislamiento del virus (Alexander & Nagy, 1997; Keam *et al.*, 1991; McNulty *et al.*, 1985; Williams *et al.*, 1994).

1.1. Aislamiento del virus

Cuando se toman muestras de aves vivas para el aislamiento del virus, los hisopos traqueales son mejores que los hisopos orofaríngeos o conjuntivales. Estos se colocan en un medio de transporte que contenga antibióticos. Cuando se selecciona el material para el aislamiento del virus a partir brotes crónicos, es más productivo sacrificar un ave en las primeras etapas de la infección que intentar aislar el virus de un ave que haya muerto por asfixia después de una enfermedad prolongada. La calidad de la muestra puede mejorarse aún más si se sacrifica el ave con barbitúricos u otra inyección en vez de por dislocación cervical. Se pueden enviar la cabeza y el cuello completos de las aves muertas, o solo la tráquea y la laringe después de separarlas con la menor contaminación posible. Las tráqueas deben transportarse en caldo de antibiótico para el aislamiento del virus, pero envueltas en papel absorbente húmedo si se van a someter a microscopía electrónica. Todo almacenamiento prolongado de tejidos infectados debe hacerse a –70°C o menos para minimizar la pérdida del título del virus. Debe evitarse la repetición de congelaciones y descongelaciones, pues disminuirían la infectividad del virus.

El exudado y las células epiteliales se raspan de la tráquea y se diluyen aproximadamente a 1/5 en caldo nutritivo que contenga penicilina y estreptomina, que se agita vigorosamente. La suspensión resultante se centrifuga a baja velocidad para retirar los residuos y se inoculan 0,1 ml del líquido sobrenadante en la CAM desprendida de al menos 3 de los huevos de pollo embrionados que lleven entre 10–12 días de incubación. Los huevos se sellan con parafina y se incuban a 37°C durante un máximo de 7 días. Se examinan al trasluz diariamente, y las CAM de los embriones muertos o de aquellos que sobrevivan 7 días se examinan para ver si tienen las típicas postillas. Alternativamente,

se inoculan al menos dos monocapas celulares confluentes de hígado de embrión de pollo o de riñón de embrión de pollo, a los que se les ha retirado el medio, y se permite la adsorción durante 1–2 horas. Los cultivos se cubren con medio fresco, se incuban durante 7 días y se examinan diariamente con el microscopio para comprobar si presentan el efecto citopático (ECP) característico de las células sincitiales.

En cada caso pueden ser necesarios hasta tres pases de material antes de que una muestra pueda considerarse como negativa. El aislamiento del virus puede confirmarse como un VLTI mediante una prueba de neutralización en huevos o en cultivo celular utilizando un antisuero hiperinmune contra el VLTI. De forma alternativa, las partículas del virus se pueden identificar rápidamente en el fluido de cultivo celular o en las postillas sobre las CAM mediante microscopía electrónica, en antígenos víricos por inmunofluorescencia en cultivos de células infectadas por el virus de la LTI fijados en acetona o en cortes congelados de CAM y en el ácido nucleico por la PCR.

1.2. Inmunofluorescencia

En las pruebas de inmunofluorescencia para antígenos víricos, se prepara un frotis a partir de los raspados de las células epiteliales de la tráquea, sobre un portaobjetos. Alternativamente, se pueden utilizar cortes criostáticos de tráquea de 5 µm de grosor ultracongelados en nitrógeno líquido. Las preparaciones se fijan en acetona a temperatura ambiente durante 10 minutos. Estas se pueden teñir directamente aplicando inmunoglobulina anti-VLTI de pollo marcada con isotiocianato de fluoresceína (FITC) durante 1 hora, seguido de un aclarado en un baño de solución salina tamponada con fosfato (PBS), pH 7,2, durante 15 minutos, agitando con un agitador mecánico. Otra opción es utilizar la tinción indirecta, aplicando una dilución apropiada de suero anti-LTI de pollo durante 1 hora. El porta se enjuaga cuidadosamente con PBS durante 15 minutos como se indicó anteriormente y se aplica durante 30 minutos un suero anti- inmunoglobulina de pollo marcado con FITC. Después de un aclarado final, se aplican los cubres sobre el líquido de montaje permanente. Se examinan los preparados para comprobar si presentan fluorescencia intranuclear específica en las células epiteliales, utilizando un microscopio con iluminación ultravioleta epifluorescente. Los controles consisten en la utilización de muestras que se sepa que no están infectadas y, para el método indirecto, en la aplicación de un suero de pollo no inmune. Debe tenerse especial cuidado en la lectura de los preparados de inmunofluorescencia indirecta, ya que la existencia de IgG endógena de pollo en la tráquea puede causar una reacción no deseada con el suero anti IgG de pollo marcado con FITC.

1.3. Enzimoimmunoanálisis

Se dispone de varios kits de ELISA comerciales, y el procedimiento analítico puede variar en función de cada kit; siempre deben seguirse las instrucciones del fabricante. Cuando se utiliza un ELISA de anticuerpo monoclonal (MAb) para detectar antígenos víricos (McNulty *et al.*, 1985), se mezcla el exudado traqueal con un volumen igual de PBS que contiene 1% (v/v) de un detergente, como por ejemplo, Nonidet P40 (BDH Chemicals, Poole, Reino Unido); luego se pasa por el vórtex durante 30 segundos y se centrifuga a 10,000 *g* durante un minuto. El líquido sobrenadante se vierte en volúmenes de 50 µl en los pocillos de las placas de microtitulación, previamente recubiertos con IgG de conejo contra el VLTI, diluido a 1/200 en tampón carbonato/bicarbonato 0.05 M, pH 9,0, y se incuba durante 1 hora. Luego se añade a cada pocillo 50 µl de MAb contra las glucoproteínas principales del VLTI, diluido a 1/50 en PBS, y a continuación se añaden 50 µl de una dilución a 1/1.000 de conjugado anti IgG de ratón generado en cabra conjugado a peroxidasa de rábano y purificado por cromatografía de afinidad. El sustrato, es decir, el ácido aminosalicílico-5 6,5 mM, se añade a los pocillos en volúmenes de 100 µl. Después de 30 minutos, se leen las placas en un espectrofotómetro a 450 nm y se corrige la lectura de absorbancia para cada uno de los pocillos restando la lectura obtenida para los pocillos que contengan tampón diluyente en lugar de exudado traqueal. El punto de corte que permitirá decidir si el resultado es positivo o negativo se toma como el valor medio de absorbancia para varias muestras negativas (es decir, material traqueal sin VLTI), más 3 desviaciones estándar.

1.4. Histopatología

Las aves escogidas para el examen post-mortem deben hallarse en la fase aguda de la enfermedad. La eutanasia debe realizarse por inyección intravenosa de ácido barbitúrico o exposición a halotano, para evitar dañar la tráquea. Las tráqueas a utilizar en el examen histopatológico deben sumergirse en formol tamponado neutro al 10% o fijador Bouin (es preferible para la detección de cuerpos de inclusión intranucleares) inmediatamente después de ser extraídas de las aves, y tras la fijación deben incluirse en parafina. A veces, se examinan los párpados y el pulmón. En las células epiteliales de la tráquea pueden verse inclusiones intranucleares tras la tinción con hematoxilina y eosina. A menudo hay formación de sincitios dentro de los exudados y con frecuencia contienen cuerpos de inclusión intranucleares. Los cuerpos de inclusión son las típicas inclusiones Cowdry de tipo A del herpesvirus,

pero pueden estar presentes durante solo 3–5 días después de la infección. En los casos graves en que la mayoría de las células infectadas se han desprendido del revestimiento de la tráquea, pueden verse inclusiones en células sanas entre los restos celulares del lumen de la tráquea. Para examinar el órgano en toda su longitud, es preferible la utilización de cortes de tráquea longitudinales que transversales.

1.5. Métodos moleculares

Se ha informado sobre varios métodos moleculares para la identificación del ADN del VLTi en muestras clínicas, pero se ha comprobado que la PCR es el método más útil. Se ha observado que las pruebas de hibridación por transferencia puntual (*dot-blot*) y los fragmentos de ADN vírico clonados son muy sensibles para la detección del virus en casos en que el aislamiento y el ELISA dan negativo (Keam *et al.*, 1991; Key *et al.*, 1994). Humbert *et al.* (2002), mediante la utilización de la PCR, mostraron que el ADN del VLTi puede detectarse en tejidos fijados con formalina e incluidos en parafina, independientemente de la presencia de células sincitiales, de inclusiones sincitiales o de ambas.

Se ha demostrado que, cuando se trata de muestras clínicas, la PCR es más sensible que el aislamiento del virus, especialmente, cuando están presentes otros virus contaminantes tales como adenovirus (Williams *et al.*, 1994). Alexander & Nagy (1997) encontraron que, desde la fase media hasta la fase final de la infección, la PCR y el aislamiento del virus eran similares en sensibilidad, pero la PCR fue superior en la fase de recuperación.

Mediante el uso combinado de la PCR y el análisis del polimorfismo en la longitud de los fragmentos de restricción (RFLP) de una o varias regiones genómicas víricas o genes víricos ha hecho posible la caracterización de diferentes cepas dentro de un país o región (Chang *et al.*, 1997). Varios informes han puesto de manifiesto que mientras que algunas cepas naturales están estrechamente relacionadas con los virus vacunales, de los que probablemente derivan, otras conforman auténticos “tipos silvestres” (Ojkic *et al.*, 2006). Los genes frecuentemente estudiados por diversos autores incluyen el ICP4, el de la TK (timidina quinasa), el de la glucoproteína G (gG), el de la glucoproteína E (gE) y UL47. Oldoni & Garcia (2007) utilizaron 36 enzimas de restricción, mientras que otros han utilizado tan solo cuatro. Hasta ahora no existe ninguna prueba molecular totalmente aceptada que permita distinguir entre cepas naturales y vacunales. Conocer con detalle el historial de vacunaciones de la parvada puede ayudar a interpretar los resultados, aunque es importante destacar que puede producirse infección por cepa natural en aves vacunadas. En aves no vacunadas en ocasiones también pueden aislarse cepas vacunales.

1.5.1. Procedimientos analíticos

i) PCR convencional

En el protocolo típico de la PCR para el VLTi, se extrae el ADN vírico de muestras clínicas (hisopos, tejidos), placas de membrana corioalantoidea, sobrenadantes del cultivo celular o vacunas, utilizando kits de extracción de ADN. Los cebadores utilizados pueden obtenerse de trabajos publicados previamente o se pueden diseñar utilizando secuencias del VLTi de la base de datos internacional Genbank.

El siguiente protocolo es el que se utiliza por rutina en varios laboratorios veterinarios de diagnóstico para la detección del VTLi en muestras clínicas, y permite una tipificación preliminar del virus mediante un análisis del polimorfismo en la longitud de los fragmentos de restricción de los amplicones obtenidos mediante PCR. Kirkpatrick *et al.* (2006b) proporcionan toda la información acerca de esta PCR. De forma resumida, se amplifica una región de 1.480 pb del gen de la timidina quinasa del VTLi empleando un cebador directo (5'-CTG-GGC-TAA-ATC-ATC-CAA-GAC-ATC-A-3') y uno inverso (5'-GCT-CTC-TCG-AGT-AAG-AAT-GAG-TAC-A-3'), y los amplicones resultantes se separan mediante electroforesis en gel de agarosa al 0,8%, se tiñen con una tinción para ácido nucleico adecuada y se exponen a luz UV para poder visualizarlos. Los 50 µl de la mezcla de reacción de amplificación contienen dATP, dCTP, dGTP y dTTP, cada cual a una concentración de 200 µM, MgCl₂ 1 mM, cada uno de los cebadores a 250 µM, 1 µl (2,5 unidades) de ADN polimerasa Taq, 5 µl de tampón para ADN polimerasa Taq 10x y 5 µl de ADN extraído como molde. La mezcla de reacción debe incubarse a 94°C durante 3 minutos, y a continuación deben someterse a 35 ciclos de 94°C durante 15 segundos, 60°C durante 45 segundos y 72°C durante 150 segundos, y por último incubarse a 72°C durante 3 minutos. En cada serie de PCR, debe incluirse como control negativo un tubo control que contenga agua destilada estéril en lugar de ADN extraído.

Otro protocolo que se ha utilizado en laboratorios veterinarios de diagnóstico de todo el mundo para la detección y tipificación preliminar del virus consiste en la amplificación de dos regiones del gen ICP4. Los cebadores ICP4-1F (5'-ACT-GAT-AGC-TTT-TCG-TAC-AGC-ACG-3') y ICP4-1R (5'-CAT-CGG-GAC-ATT-CTC-CAG-GTA-GCA-3') amplifican un fragmento de 688 pb situado en la posición 181 a 869²; ICP4-2F (5'-CTT-CAG-ACT-CCA-GCT-CAT-CTG-3') y ICP4-2R (5'-AGT-CAT-GCG-TCT-ATG-GCG-TTG-AC-3') amplifican un fragmento de 635 pb situado en la posición 3804 to 4440³. Chacon & Ferreira (2009) aportan todos los detalles de estas PCR.

Un protocolo de PCR en tiempo real descrito por Mahmoudian *et al.* (2011) también puede utilizarse como PCR convencional y los productos finales pueden examinarse mediante electroforesis en gel de agarosa al 2%.

ii) PCR en tiempo real

Se han descrito varias PCR en tiempo real para el VTLI (Creelan *et al.*, 2006; Mahmoudian *et al.*, 2011). Dichas pruebas tienen la ventaja de que pueden realizarse en menos de 2 horas. Por tanto, se trata de métodos de detección de la LTI muy rápidos en comparación con el tradicional aislamiento vírico e incluso con la PCR estándar seguida de electroforesis en gel. El siguiente protocolo se puede utilizar para la detección rápida del VTLI en muestras clínicas. Callison *et al.* (2007) aportan todos los detalles sobre la metodología. De forma resumida, se utilizan dos cebadores oligonucleotídicos, ILTVgCU771 (5'-CCT-TGC-GTT-TGA-ATT-TTT-CTG-T-3') y ILTVgCL873 (5'-TTC-GTG-GGT-TAG-AGG-TCT-GT-3'), para amplificar un producto de 103 pb del gen gC del VTLI. También se utiliza una sonda Taqman marcada dual, la sonda 817 para el VTLI (5'-FAM-CAG-CTC-GGT-GAC-CCC-ATT-CTA-BHQ1-3'). La reacción se lleva a cabo con los kits de PCR adecuados, por ejemplo, empleando 25 µl de volumen total que contengan 10 µl de la mezcla primaria 2x, los cebadores directo e inverso 0,5 µM, la sonda 0,1 µM, 1 µl de HK-UNG, y 5 µl de ADN molde. La incubación y la obtención de datos se llevan a cabo utilizando un termociclador en tiempo real, aunque los protocolos de PCR tendrán que optimizarse en función de la máquina empleada. Las mezclas de reacción se incuban durante 2 minutos a 50°C y 15 minutos a 95°C, y después se someten a 40 ciclos de 15 segundos a 94°C y 1 minuto a 60°C. Para cada prueba, el ciclo umbral (valor CT) es el número de ciclos de la PCR al cual la fluorescencia de la reacción supera las 30 unidades.

iii) Análisis de la secuencia de nucleótidos

Existen varios genes del VTLI que pueden amplificarse mediante PCR, y analizarse a continuación mediante secuenciación de nucleótidos de los amplicones resultantes, con el fin de identificar las cepas en estudio. Por ejemplo, ICP4 puede amplificarse mediante PCR empleando los cebadores que describen Chacon & Ferreira (2009), y los amplicones obtenidos pueden purificarse mediante un método de mini-columna desechable y enviarse a secuenciación de ADN bi-direccional, en la cual se utilizarán los cebadores de la PCR como cebadores de secuenciación. Para el análisis de las secuencias y la comparación con las secuencias existentes en GenBank, pueden usarse varios programas informáticos, como Clustal W. Es importante destacar que para identificar correctamente las cepas del VTLI puede ser necesario analizar la secuencia de múltiples genes.

iv) Análisis del polimorfismo en la longitud de los fragmentos de restricción (RFLP)

Se ha descrito una gama de endonucleasas de restricción (ER) para el RFLP de los productos de del VTLI obtenidos mediante PCR y varios genes han sido dianas de la digestión. Entre ellos está el gen ICP4, el TK, el UL15, el UL47 de la glucoproteína G y los genes ORF-BTK. Creelan *et al.* (2006), Han & Sim (2001), Kirkpatrick *et al.* (2006a), Ojkic *et al.*, (2006) y Oldoni & Garcia (2007) aportan una descripción detallada de la metodología. A continuación, se facilita una breve descripción de la metodología para la PCR-RFLP de TK, ICP4, ICP18.5 y ORFB-TK, aportada por Kirkpatrick *et al.* (2006a) con algunas modificaciones.

Para la amplificación de TK, se lleva a cabo una PCR en una mezcla de reacción de 50 µl que contiene dATP, dCTP, dGTP, y dTTP, cada cual a una concentración de 200 µM, MgCl₂ 1 mM, cada cebador a 250 µM (TK directo: CTG-GGC-TAA-ATC-ATC-CAA-GAC-ATC-A; y TK inverso: GCT-CTC-TCG-AGT-AAG-AAT-GAG-TAC-A), 1,25 U de ADN

2 Número de acceso a GenBank NC 006623

3 Número de acceso a GenBank NC 006623

polimerasa Taq (Promega), 5 µl de tampón para ADN polimerasa Taq 10x, y 2 µl de ADN extraído. La mezcla de reacción se incuba a 94°C durante 3 minutos, y después se somete a 35 ciclos de 94°C durante 15 segundos, 60°C durante 45 segundos y 72°C durante 60 segundos, y por último se incuba a 72°C durante 3 minutos.

La amplificación mediante PCR de ICP4, ICP18.5 y ORFB-TK se realiza en tubos independientes empleando los siguientes cebadores: ICP4 directo AAA-CCT-GTA-GAG-ACA-GTA-CCG-TGA-C e ICP4 inverso: ATT-ACT-ACG-TGA-CCT-ACA-TTG-AGC-C; ICP18.5 directo: TCG-CTT-GCA-AGG-TCT-TCT-GAT-GG e ICP18.5 inverso: AGA-AGA-TGT-TAA-TTC-ACA-CGG-ACA-C; y ORFB-TK directo: TCT-GCG-ATC-TTC-GCA-GTG-GTC-AG y ORFB-TK inverso: TGA-CGA-GGA-GAG-CGA-ACT-TTA-ATC-C. Una mezcla de reacción de 50 µl contiene dATP, dCTP, dGTP, y dTTP cada una a una concentración de 200 µM, MgSO₄ 2 mM, cada cebador a 250 µM, 1 U de ADN polimerasa Platinum Taq de alta fidelidad (Invitrogen), 5 µl de tampón para ADN polimerasa Platinum Taq de alta fidelidad 10x, y 2 µl de ADN extraído. La mezcla de reacción se incuba a 94°C durante 1 minuto, después se somete a 35 ciclos de 94°C durante 1 minuto, 68°C durante 7 minutos, y por último se incuba a 68°C durante 10 minutos.

Volúmenes de 10 µl de productos de la PCR de TK, ICP4, ICP18.5 y ORFB-TK se digieren por separado con las endonucleasas de restricción *MspI*, *HaeIII*, *HaeIII* y *FokI*, respectivamente, a 37°C durante 1 hora. Tras la digestión, los fragmentos de ADN resultantes se separan en un gel de poliacrilamida al 15% y los fragmentos de ADN de restricción se visualizan mediante una tinción de ácido nucleico adecuada y se exponen a luz UV para ser visualizados. Se registran diferencias de patrones para cada enzima y los resultados se pueden desarrollar en dendogramas. El uso combinado de la PCR y el RFLP ha hecho posible la diferenciación entre las cepas naturales del VLTI y las cepas vacunales (Creelan *et al.*, 2006; Han & Sim, 2001; Kirkpatrick *et al.*, 2006a; Ojkic *et al.*, 2006; Oldoni & Garcia 2007).

2. Pruebas serológicas

El método de elección para la detección de anticuerpos contra el VLTI en suero de pollo es el ELISA. También puede utilizarse la neutralización del virus (NV) (Adair *et al.*, 1985). En cuanto a la AGID y a las pruebas de inmunofluorescencia indirecta, hoy en día se utilizan poco.

2.1. Enzimoimmunoanálisis

Existen varios kits de ELISA comerciales, y la prueba puede variar función de cada uno; siempre deben seguirse las instrucciones del fabricante. El antígeno para ELISA se obtiene por sonicación de cultivos celulares muy infectados cuando el efecto citopático es más patente, que a continuación se centrifuga y cuyo sobrenadante se adsorbe a los pocillos de las placas de microtitulación. El antígeno negativo se obtiene a partir de material de cultivo celular no infectado y tratado de la misma forma. La prueba consiste fundamentalmente en la adición de 0,1 ml de diluciones al 1/10 de los sueros problema para duplicar los pocillos recubiertos con antígeno positivo o negativo. Después de la incubación a 37°C durante dos horas, las placas se lavan cuatro veces y se añade una dilución al 1/4.000 anti IgG de pollo generada en conejo y conjugada con peroxidasa. Después de la incubación a 37°C durante una hora, las placas se lavan de nuevo 4 veces. Finalmente, se añade a cada pocillo un sustrato consistente en ácido-5 aminosalicílico, y a continuación peróxido de hidrógeno a una concentración final del 0,0005% y la absorbancia del líquido de cada pocillo se lee en un espectrofotómetro a 450 nm. El resultado de cada suero se expresa como la diferencia entre la absorbancia media producida con los antígenos positivo y negativo. El punto de corte positivo/negativo se toma como el valor de absorbancia media para numerosos sueros negativos más 3 desviaciones estándar. La prueba es muy sensible y posiblemente es la mejor de las disponibles a efectos de vigilancia. Las respuestas de anticuerpos medidas mediante el ELISA son detectables 7–10 días después de la infección y alcanzan el máximo en torno a dos semanas después. La respuesta a las vacunas contra la LTI pueden variar y no merece la pena realizar pruebas antes de que transcurran 14 días desde la vacunación.

2.2. Neutralización vírica

Las pruebas de neutralización vírica pueden realizarse con las CAM desprendidas de huevos de pollo embrionarios que hayan sido incubados durante 9–11 días, en las que el anticuerpo neutraliza específicamente la formación de pústulas causadas por el VLTI. Alternativamente, las pruebas pueden llevarse a cabo en cultivos celulares en los que el anticuerpo neutraliza específicamente al VLTI y de este modo se previene el ECP. Se añaden diluciones de suero a la mitad a volúmenes iguales de una concentración constante de virus. Esta concentración puede ser o bien 100 dosis que resultan

infecciosas en un 50% de los huevos expuestos (EID₅₀) en el caso de inoculaciones de huevos, o 100 dosis que resultan infecciosas en un 50% de los cultivos expuestos (TCID₅₀), en el caso de inoculaciones de cultivos. Las mezclas se incuban a 37°C durante una hora para permitir cualquier neutralización.

Cuando la prueba se realiza en huevos, las mezclas de virus/suero se inoculan en las CAM desprendidas, utilizando al menos 5 huevos por dilución. Los huevos se sellan e incuban a 37°C durante 6–7 días. El punto final se registra como la dilución más alta del suero en las que no aparecen pústulas en las CAM. Cuando las pruebas se realizan en cultivos celulares, las diluciones de suero se preparan en placas de microtitulación de 96 pocillos y a continuación se añade el virus. Después del período de neutralización, se añaden a cada pocillo células de hígado o riñón de embrión de pollo recién preparadas. Las placas se incuban a 37°C en una atmósfera de CO₂ al 5% y se examinan diariamente para comprobar si presentan ECP; después de unos 4 días se lee el 50% de los puntos finales cuando el título control del virus indica que se han utilizado en la prueba 30–300 DICT₅₀ de virus. Para el método analítico en cultivo celular, la neutralización vírica a una dilución 1/8 (dilución inicial) o mayor, se considera positiva.

C. REQUISITOS PARA LAS VACUNAS

1. Antecedentes

La LTI se controla generalmente con vacunas vivas. Pueden usarse vacunas como respuesta a brotes de la enfermedad, o bien por rutina en zonas endémicas. Pueden ser necesarias dosis repetidas para alcanzar una buena protección. Las vacunas contra la LTI más utilizadas son las atenuadas vivas producidas en cultivos celulares o en huevos de gallina embrionados. Durante los últimos años, se han producido vacunas recombinantes (vectorizadas) empleando herpesvirus de pavos o virus de aves acuáticas para expresar las glucoproteínas del VLTI. También se ha realizado algún estudio reciente con vacunas modificadas genéticamente que incluyen una delección, y los primeros resultados son prometedores (Coppo *et al.*, 2013). En el caso de las vacunas contra la LTI atenuadas, pueden administrarse mediante gota ocular, spray o en el agua de bebida. Las vacunas recombinantes pueden administrarse por punción en la membrana del ala, por inyección subcutánea o por inoculación *in-ovo*. Cada tipo de vacuna y cada vía de administración tiene sus ventajas y sus inconvenientes (Coppo *et al.*, 2013). Por ejemplo, las vacunas vectorizadas pueden resultar solo parcialmente protectoras, y las vacunas contra la TLI vivas atenuadas pueden tener una virulencia residual que puede causar enfermedad clínica, sobre todo si se administran mediante spray y se produce e inhala una pequeña gotita. Las vacunas contra la TLI vivas atenuadas también puede revertir a niveles más altos de virulencia tras el pase de ave a ave, y persistir en las condiciones de campo (Coppo *et al.*, 2013). Por ello, puede resultar difícil interrumpir la vacunación una vez iniciada. Las infecciones subclínicas mixtas por virus vacunal y natural, en aves vacunadas, pueden causar una enfermedad grave cuando entran en contacto con aves no vacunadas. Se ha observado una recombinación natural entre cepas naturales de vacuna contra la TLI que producen virus virulentos, y también existe riesgo en otras vacunas vivas. Por lo tanto, debe evitarse el uso de múltiples vacunas diferentes contra la TLI en una misma población (Coppo *et al.*, 2013).

En el capítulo 1.1.8. *Principios para la producción de vacunas veterinarias*, se dan las directrices para la producción de dichas vacunas. Las directrices dadas en el presente capítulo y en el capítulo 1.1.8, son de carácter general y se pueden complementar con requisitos nacionales o regionales (como el Código de Reglamentos Federales de EE.UU., 2000 o la Farmacopea Europea, 2010).

2. Descripción de la producción y requisitos mínimos para las vacunas

2.1. Características del inóculo

2.1.1. Características biológicas del inóculo primario

El virus del inóculo para vacunas contra la TLI vivas atenuadas es una cepa avirulenta natural o adecuadamente atenuada del VLTI. La atenuación se logra mediante pases seriados del virus por huevos embrionados o cultivos celulares. Las vacunas recombinantes vectorizadas se crean empleando metodologías de ADN recombinante. El virus del inóculo primario (MSV) se puede propagar en embriones de pollo SPF o en cultivos de tejido derivados de tales embriones. Inicialmente se realizan pruebas para comprobar la seguridad y la eficacia del inóculo primario escogido, y en dicho inóculo primario debe comprobarse la pureza, la identidad del virus y si contiene agentes patógenos extraños. El MSV se almacena en alícuotas a –70°C. Los virus utilizados en la fabricación no deben tener más de cinco pases desde el MSV.

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

Deben registrarse los datos sobre el origen del inóculo vírico, incluido el historial de pases y todas las manipulaciones genéticas a las que ha sido sometido. En embriones de pollo o pollos se realizan pruebas de esterilidad y ausencia de agentes extraños en el MSV (véase el capítulo 1.1.9). El contenido en virus se determina mediante titulación vírica en embriones de pollo o en cultivos celulares.

2.1.3. Validación como cepa vacunal

Las vacunas contra la TLI ofrecen protección cruzada contra varias cepas del VTLLI. La infección de especies no de destino por cepas vacunales del VTLLI no es demasiado preocupante porque este virus tiene muy pocos tipos de hospedador.

2.2. Método de fabricación

2.2.1. Procedimiento

En la producción de vacunas a gran escala, el virus se propaga en embriones de pollo SPF o en cultivos de tejido derivados de tales embriones hasta el quinto pase contado desde el MSV. El nivel de pases aceptable se justifica experimentalmente en función del nivel de pases utilizados para preparar el producto experimental que se emplea en la prueba de eficacia. La vacuna se prepara mediante inoculación del virus del inóculo de producción a embriones de pollo de entre 9 y 11 días de vida o a cultivos celulares preparados a partir de embriones de pollo procedentes de parvadas SPF. Los huevos son inoculados a través de un agujero que se practica en la cáscara, en la CAM desprendida o en el saco alantoideo. Se sellan y se incuban a 37°C durante 4-6 días. Todos los huevos pueden visualizarse al trasluz antes de continuar, y se utilizarán solo los que contengan embriones vivos. Para recolectar el virus, los huevos se enfrían y a continuación se limpian y abren de forma aséptica. Se combinan las CAM o líquidos alantoideos transfiriéndolos a recipientes estériles y enfriados. Las CAM deben presentar las placas grises gruesas características del crecimiento del VTLLI. El producto derivado de cultivo tisular debería prepararse a partir de líquidos de cultivo celular que contengan el virus, que a continuación también serían puestos en común y analizados.

2.2.2. Requisitos para los ingredientes

El suero bovino que se utiliza en la producción de vacuna debe proceder de un país con riesgo insignificante de encefalopatías espongiiformes transmisibles [EET]. Debe comprobarse el origen de la tripsina pancreática animal para el cultivo celular. Véase el capítulo 1.1.8, en particular lo relativo a los productos de origen biológico que proceden de un país con riesgo insignificante de EET.

2.2.3. Controles durante el proceso

En los homogenados de tejido o cultivo celular infectado pueden realizarse pruebas de pureza, potencia, contenido vírico y seguridad.

2.2.3. Pruebas en lotes de producto final

i) Esterilidad

En el capítulo 1.1.9 se describen las pruebas de esterilidad y de ausencia de contaminación en los materiales biológicos de uso veterinario.

ii) Identidad

La presencia del VTLLI se puede confirmar mezclando la vacuna con antisuero anti VTLLI y comprobando que ya no es capaz de infectar a huevos de gallina embrionados de una parvada SPF, o a líneas celulares susceptibles a las cuales se haya inoculado.

iii) Seguridad

Cada lote de vacunas se administra mediante gota ocular (10 dosis por ave) o por inyección intratraqueal a pollos SPF u otras especies de destino. Las aves se han de observar durante 14–21 días para comprobar si presentan efectos adversos atribuibles a la vacuna.

iv) Potencia del lote

Una vez establecida la eficacia de la vacuna *in-vivo*, puede determinarse la potencia del lote midiendo el contenido vírico, lo cual se lleva a cabo mediante titulación vírica empleando diluciones seriadas de la vacuna inoculada a la CAM desprendida de huevos de gallina embrionados o mediante la inoculación de cultivos celulares adecuados. El contenido vírico (determinado en cualquier momento antes de que la vacuna caduque) debe equivaler, como mínimo, al título indicado en la ficha técnica. Los títulos fijados para el momento de liberación del lote y para la fecha de caducidad vienen determinados por la dosis protectora mínima de la vacuna. Aunque puede no ser necesario realizar pruebas de eficacia en cada lote de vacuna, tal vez sí lo sea el realizarlas en un lote representativo (utilizando una dosis de vacunación que contenga como máximo el título vírico indicado en la ficha técnica).

2.3. Requisitos para la autorización/registro/licencia

2.3.1. Proceso de fabricación

Para el registro de la vacuna, todos los datos relevantes relativos a la fabricación de la vacuna y a las pruebas de control de calidad (véanse los apartados C.2.1 y C.2.2) deben presentarse a las autoridades. Esta información será proporcionada para tres lotes consecutivos de vacuna con un volumen no inferior a 1/3 del volumen habitual de un lote industrial.

2.3.2. Requisitos de seguridad

En EE.UU., se inyectan por vía intratraqueal 25 pollos susceptibles de 3-4 semanas de edad, y se observan durante 14 días. Las muertes cuentan como fracasos. Para que la prueba se considere satisfactoria, pueden producirse como máximo 4 fracasos. En la Unión Europea (UE), las pruebas de seguridad iniciales emplean el virus vacunal al nivel mínimo de pases atenuados entre el MSV y un lote de la vacuna. Se inocula a 20 pollos SPF una cantidad equivalente a 10 dosis vacunales y se observan durante 21 días. Cada vía y método de administración que se recomiendan para la vacunación deben evaluarse en pollos de la edad mínima recomendada para la vacunación. No se permite la aparición de signos clínicos destacables ni muertes atribuibles a la TLI. Las pruebas de seguridad en lotes requieren en la UE la inoculación de una gota ocular a 10 pollos SPF de la edad mínima recomendada para la vacunación, que contenga el equivalente a 10 dosis vacunales. Los pollos se observan durante 21 días. No se permite la aparición de signos clínicos destacables ni muertes atribuibles a la TLI.

i) Reversión a la virulencia

La UE exige cinco pases secuenciales del virus de la vacuna *in-vivo*. Cada pase se realiza en grupos de 5 pollos SPF. Pueden lograrse pases secuenciales mediante la transmisión natural, o recogiendo y poniendo en común material infeccioso del tracto respiratorio de un grupo de aves y empleando este material para infectar el siguiente grupo de aves vía inoculación con gota ocular. El virus pasado y recuperado tras cinco pases secuenciales (o antes si no se toleran más pases) se compara con el virus no pasado empleando un índice de la prueba de la virulencia respiratoria. El virus sometido al máximo número de pases no debe presentar un aumento de la virulencia. El índice de la prueba de virulencia respiratoria requiere la inoculación intratraqueal de 0,2 ml de vacuna a tres dosis distintas, empezando con la solución primaria, que tiene un título de 10^5 EID₅₀ o 10^5 CCID₅₀ por cada 0,2 ml (o el máximo título que se pueda obtener) y utilizando a continuación dos diluciones decimales seriadas de esa solución primaria. Por cada dosis se inoculan al menos 20 pollos SPF. Los pollos se observan durante 10 días y se registran las muertes. El índice de virulencia respiratoria es el número total de muertes observadas en los tres grupos dividido por el número total de pollos.

ii) Precauciones (peligros)

Es importante tener cuidado al diluir y administrar la vacuna, y debe desecharse adecuadamente la que no se haya utilizado.

2.3.3. Requisitos de eficacia

Debe llevarse a cabo una prueba para establecer la eficacia de la vacuna en grupos de aves de la edad mínima recomendada para el producto y también para cada especie aviar. Debe evaluarse cada vía y método de administración recomendados para la vacunación. Se vacunan 20 (EE.UU.) o 30 (UE) pollos con virus vacunal al nivel de pases más atenuado. Se mantienen diez pollos más como controles. Pasados 10–14 días (EE.UU.) o 21 días (UE), se expone a los

pollos vacunados y controles a VTLI virulento por vía intratraqueal o por el seno orbitario. Al menos un 89% (EE.UU.) o un 90% (UE) de los controles no vacunados debe morir o presentar signos clínicos graves de la TLI, o presentar lesiones macroscópicas destacables. Para que sea satisfactoria, solo un 5% o un 10% de las aves vacunadas puede morir o presentar signos clínicos graves de la TLI, o presentar lesiones macroscópicas destacables.

2.3.4. Vacunas que permiten una estrategia DIVA (detección de infección en animales vacunados)

Con la aparición de las vacunas contra la TLI recombinantes (vectorizadas), ahora se puede diferenciar serológicamente entre aves infectadas y vacunadas, y se pueden aplicar estrategias de control DIVA. Muchas de las vacunas contra la TLI con eliminación de genes que actualmente están en desarrollo ofrecen las mismas posibilidades. En varios estudios se han aplicado métodos de cribado serológico para detectar anticuerpos contra glucoproteínas específicas del VTLI (Coppo *et al.*, 2013).

2.3.5. Duración de la inmunidad

Los resultados de la vacunación dependerán de varios factores, como el programa vacunal y la vía de administración. Debería proveerse cierto grado de protección durante un período de varios meses.

2.3.6. Estabilidad

La estabilidad se comprueba tomando muestras de vacunas correctamente almacenadas a intervalos y midiendo el contenido vírico. Las pruebas deben realizarse con al menos 6 lotes de la vacuna o hasta que se haya evaluado un número de pases seriados estadísticamente válido, y se deben seguir realizando durante 3 meses a partir de la fecha de caducidad aducida.

BIBLIOGRAFÍA

- ADAIR B.M., TODD D., MCKILLOP E.R. & BURNS K. (1985). Comparison of serological tests for the detection of antibodies to infectious laryngotracheitis virus. *Avian Pathol.*, **14**, 461–469.
- ALEXANDER H.S. & NAGY E. (1997). Polymerase chain reaction to detect infectious laryngotracheitis virus in conjunctival swabs from experimentally infected chickens. *Avian Dis.*, **41**, 646–653.
- ARMSTRONG W.H. (1959). A slide smear technique for the diagnosis of laryngotracheitis. *Avian Dis.*, **3**, 80–84.
- BRAUNE M.O. & GENTRY R.F. (1985). Standardization of the fluorescent antibody technique for the detection of avian respiratory viruses. *Avian Dis.*, **9**, 535–545.
- CALLISON S.A., RIBLET S.M., OLDONI I., SUN S., ZAVALA G., WILLIAMS S., RESURRECCION R.S., SPACKMAN E. & GARCIA M. (2007). Development and validation of a real-time Taqman® PCR assay for the detection and quantitation of infectious laryngotracheitis virus in poultry. *J. Virol. Methods*, **139**, 31–38.
- CHACON J.L. & FERREIRA A.J. (2009). Differentiation of field isolates and vaccine strains of infectious laryngotracheitis virus by DNA sequencing. *Vaccine*, **27**, 6731–6738.
- CHANG P.C., LEE Y.L., SHIEN J.H. & SHIEH H.K. (1997). Rapid differentiation of vaccine strains and field isolates of infectious laryngotracheitis virus by restriction fragment length polymorphism of PCR products. *J. Virol. Methods*, **66**, 179–186.
- CHANG P.W., YATES V.J., DARDIRI A.H. & FRY D.E. (1960). Some observations of the propagation of infectious laryngotracheitis virus in tissue culture. *Avian Dis.*, **4**, 484–490.
- CODE OF FEDERAL REGULATIONS (OF THE UNITED STATES OF AMERICA) (CFR) (2000). Part 9, Section 113.328, Fowl Laryngotracheitis Vaccine. US Government Printing Office. Washington DC, USA.
- COPPO M.J.C., NOORMOHAMMADI A.H., BROWNING G.F. & DEVLIN J.M. (2013). Challenges and recent advances in infectious laryngotracheitis virus vaccines. *Avian Pathol.*, **42**, 195–205.
- CREELAN J.L., CALVERT V.M., GRAHAM D.A. & MCCULLOCH J. (2006). Rapid detection and characterisation from field cases of infectious laryngotracheitis by real-time polymerase chain reaction and restriction fragment length. *Avian Pathol.*, **35**, 173–179.

EUROPEAN PHARMACOPOEIA 6.0 (2010). Avian infectious laryngotracheitis vaccine (live) European Directorate for the Quality of Medicines and HealthCare (EDQM), Council of Europe, Strasbourg, France, 872–873.

GUY J.S. & BAGUST T.J. (2003) Laryngotracheitis. *In: Diseases of Poultry*, Eleventh Edition, Saif Y.M., Barnes H.J., Glisson J.R., Fadly A.M., McDougald L.R. & Swayne D., eds. Iowa State University Press, USA, 124–134.

HAN M.G. & SIM S.J. (2001). Analysis of Korean strains of infectious laryngotracheitis virus by nucleotide sequences and restriction fragment length polymorphism. *Vet. Microbiol.*, **83**, 321–331.

HUGHES C.S. & JONES R.C. (1988). Comparison of methods of isolation of infectious laryngotracheitis from field material. *Avian Pathol.*, **17**, 295–303.

HUGHES C.S., JONES R.C., GASKELL R.M., JORDAN F.T.W. & BRADBURY J.M. (1987). Demonstration in live chickens of the carrier state in infectious laryngotracheitis virus. *Res. Vet. Sci.*, **42**, 407–410.

HUMBERD J., GARCIA M., RIBLET S.M., RESURECCION R.S. & BROWN T.P. (2002). Detection of infectious laryngotracheitis virus in formalin-fixed, paraffin-embedded tissues by nested polymerase chain reaction. *Avian Dis.*, **46**, 64–74.

JORDAN F.T.W. (1964). Diagnosis of infectious laryngotracheitis by chick embryo inoculation. *J. Comp. Pathol.*, **74**, 119–128.

KEAM L., YORK J.J., SHEPPARD M. & FAHEY K.J. (1991). Detection of infectious laryngotracheitis virus in chickens using a non-radioactive DNA probe. *Avian Dis.*, **35**, 257–262.

KEY D.W., GOUGH B.C., DERBYSHIRE J.B. & NAGY E. (1994). Development and evaluation of a non-isotypically labeled DNA probe for the diagnosis of infectious laryngotracheitis. *Avian Dis.*, **38**, 467–474.

KIRKPATRICK N.C., MAHMOUDIAN A., COLSON C.A., DEVLIN J.M. & NOORMOHAMMADI A.H. (2006a). Relationship between mortality, clinical signs and tracheal pathology in infectious laryngotracheitis. *Avian Pathol.*, **35**, 449–453.

KIRKPATRICK N.C., MAHMOUDIAN A., O'ROURKE D. & NOORMOHAMMADI A.H. (2006b). Differentiation of infectious laryngotracheitis virus isolates by restriction fragment length polymorphic analysis of polymerase chain reaction products amplified from multiple genes. *Avian Dis.*, **50**, 28–34.

MAHMOUDIAN A., KIRKPATRICK N.C., COPPO M., LEE S.W., DEVLIN J.M., MARKHAM P.F., BROWNING G.F. & NOORMOHAMMADI A.H. (2011). Development of a SYBR green quantitative polymerase chain reaction assay for rapid detection and quantification of infectious laryngotracheitis virus. *Avian Pathol.*, **3**, 237–242.

MCNULTY M.S., ALLAN G.M. & MCCracken R.M. (1985). Infectious laryngotracheitis in Ireland. *Irish Vet. J.*, **39**, 124–125.

MEULEMANS G. & HALEN P. (1978). A comparison of three methods of diagnosis of infectious laryngotracheitis. *Avian Pathol.*, **7**, 433–436.

OJKIC D., SWINTON J., VALLIERES M., MARTIN E., SHAPIRO J., SANEI B. & BINNINGTON B. (2006). Characterisation of field isolates of infectious laryngotracheitis virus from Ontario. *Avian Pathol.*, **35**, 286–292.

OLDONI I. & GARCIA M. (2007). Characterisation of infectious laryngotracheitis virus isolates from the United States by polymerase chain reaction and restriction fragment length polymorphism of multiple genome regions. *Avian Pathol.*, **36**, 167–176.

PIROZOK R.P., HELMBOLDT C.F. & JUNGHERR E.L. (1957). A rapid histological technique for the diagnosis of avian infectious laryngotracheitis. *J. Am. Vet. Med. Assoc.*, **130**, 406–407.

SCHOLZ E., PORTER R.E. & GUO P.X. (1994). Differential diagnosis of infectious laryngotracheitis from other avian respiratory diseases by a simplified PCR procedure. *J. Virol. Methods*, **50**, 313–321.

VAN KAMMEN A. & SPADBROW P.B. (1976). Rapid diagnosis of some avian virus diseases. *Avian Dis.*, **20**, 748–751.

WILKS C.R. & KOGAN V.G. (1979). An immunofluorescence diagnostic test for avian infectious laryngotracheitis. *Aust. Vet. J.*, **55**, 385–388.

WILLIAMS R.A., SAVAGE C.E. & JONES R.C. (1994). A comparison of direct electron microscopy, virus isolation and a DNA amplification method for the detection of avian infectious laryngotracheitis virus in field material. *Avian Pathol.*, **23**, 709–720.

YORK J.J. & FAHEY K.J. (1988). Diagnosis of infectious laryngotracheitis using a monoclonal antibody ELISA. *Avian Pathol.*, **17**, 173–182.

*
* *

NB: ADOPTADO POR PRIMERA VEZ EN 1989; ÚLTIMAS ACTUALIZACIONES ADOPTADAS EN 2014.