

ENTERITIS VIRAL DEL PATO

RESUMEN

Descripción e importancia de la enfermedad: La enteritis viral del pato (EVP), o peste de los patos, es una infección aguda contagiosa de los patos, gansos y cisnes (orden Anseriformes), causada por un alfa herpesvirus. El diagnóstico se basa en una combinación de la evaluación de los signos clínicos, la anatomopatología macroscópica y la histopatología respaldadas por la identificación del virus mediante su aislamiento o la reacción en cadena de la polimerasa.

Identificación del agente: El virus se puede aislar a partir del hígado, el bazo y los riñones de las aves muertas por esta infección. El virus se puede recuperar inoculando la membrana corioalantoidea (MCA) de huevos de pato de *Moscovia* embrionados, o inoculando cultivos celulares primarios de embrión de pato o embrión de pato *Moscovia*. La identidad del virus puede confirmarse mediante pruebas de neutralización, utilizando un antisuero específico para inhibir las alteraciones anatomopatológicas en los embriones de pato o los efectos citopatológicos en cultivos celulares, o mediante pruebas de inmunofluorescencia directa o indirecta en los cultivos celulares infectados. Como alternativa, se puede detectar el ADN vírico mediante la reacción en cadena de la polimerasa a partir del esófago, el hígado y el bazo de las aves infectadas por el virus de la EVP, así como a partir de embriones de pato *Moscovia* o células utilizadas para el aislamiento del virus.

Pruebas serológicas: Las pruebas inmunológicas tienen poco valor en el diagnóstico de la infección aguda. Se han utilizado pruebas de neutralización in ovo e in vitro para realizar un seguimiento de la exposición de las aves salvajes al virus.

Requisitos para las vacunas: Existe una vacuna vírica viva atenuada para el control de la EVP en las aves de más de 2 semanas de edad. Los patos se vacunan por vía subcutánea o intramuscular para obtener una inmunidad activa. Se cree que el virus de la vacuna no se transmite de aves vacunadas a no vacunadas. Se ha descrito una vacuna inactivada eficaz en pruebas de laboratorio, pero no ha sido desarrollada ni autorizada para su uso a gran escala.

A. INTRODUCCIÓN

La enteritis viral del pato (EVP) es una infección vírica aguda contagiosa, a veces crónica, que aparece de manera natural solamente en los patos, los gansos y los cisnes, todos ellos miembros de la familia Anatidae, del orden Anseriformes. La enfermedad comporta un posible riesgo en las aves acuáticas comerciales, domésticas y salvajes. El agente etiológico, *Anatid alphaherpesvirus-1*, el alfa herpesvirus de las anátidas o virus de la EVP (VEVP), es miembro de la subfamilia *alphaherpesvirinae*, que pertenece a la subfamilia *Herpesviridae*, género *Mardivirus*. La EVP también puede denominarse peste del pato, herpes de las anátidas, "eendenpest", "entenpest", y "peste du canard". No se ha descrito la infección en otras especies de aves ni en los mamíferos ni en el hombre.

En los patos y patitos domésticos, la EVP se ha descrito en aves de entre 7 días y la edad de los reproductores adultos. En las parvadas susceptibles, los primeros signos son a menudo repentinos, con una mortalidad elevada y persistente y una disminución considerable de la producción de huevos en parvadas de ponedoras. En patos domésticos, el periodo de incubación oscila entre los 3 y los 7 días. Suele aparecer mortalidad a los 1-5 días del inicio de los signos clínicos y a menudo es más intensa en patos reproductores adultos susceptibles. En las parvadas infectadas crónicamente y parcialmente inmunes solamente tienen lugar muertes ocasionales. Las aves que se recuperan pueden quedar como portadores infectados de forma latente y excretar el virus en las heces o sobre la superficie de los huevos durante años (Richter & Horzinek, 1993; Shawky & Schat, 2002). En EE.UU. se ha observado una EVP limitada exclusivamente a los patos *Moscovia* (Campagnolo *et al.*, 2001; Davison *et al.*, 1993).

Los signos clínicos y la anatomopatología macroscópica asociados a un brote de EVP dependen de la especie, el estado inmunitario, la edad y el sexo de las aves afectadas, así como de la virulencia del virus. De forma similar, a medida que la infección avanza en una parvada, se observan signos clínicos más típicos. Los distintos signos en los patos reproductores son “muertes súbitas”, fotofobia asociada a párpados pegados parcialmente cerrados, polidipsia, pérdida del apetito, ataxia y secreción nasal. A menudo las aves tienen las plumas erizadas, diarrea acuosa y la cloaca sucia. Las aves enfermas pueden mantener la posición erecta utilizando sus alas como soporte, aunque el aspecto general es de debilidad y depresión. En los patitos de 2–7 semanas de edad, las pérdidas pueden ser menores que en las aves más viejas, y los signos asociados a la EVP consisten en deshidratación, pérdida de peso, conjuntivitis y secreción ocular serosa, coloración azul de los picos, y cloacas manchadas de sangre.

En la necropsia, los patos adultos que han muerto suelen estar en buen estado corporal. En los machos adultos puede aparecer prolapso del pene, mientras que en las hembras adultas se pueden observar hemorragias en los folículos ováricos. Las lesiones macroscópicas se caracterizan por lesión vascular, con hemorragias tisulares, sangre sin coagular en las cavidades corporales y en el lumen intestinal, y varias lesiones que afectan a la mucosa del tracto digestivo. Pueden hallarse lesiones específicas de la mucosa digestiva en la cavidad oral, el esófago, los ciegos, el recto y la cloaca. Estas lesiones pasan por alteraciones a medida que la enfermedad avanza, desde una hemorragia superficial macular en la fase inicial, hasta placas costrosas de un color blanco amarillento, que después se vuelven costras superficiales de color verdoso. Las lesiones pueden coalescer y recubrirse de una membrana difterítica. Estas últimas lesiones avanzan a medida que lo hace la enfermedad y consisten en hemorragias y erupciones en la mucosa inicialmente y una intensa congestión anular, que comporta lesiones pseudomembranosas o difteríticas en la mucosa. Se observan alteraciones degenerativas necróticas en los órganos linfoides y parenquimatosos. En el hígado esto se manifiesta en forma de hemorragias petequiales distribuidas de forma irregular y focos blancos que dan un aspecto moteado. En los patitos, las lesiones de los tejidos linfoides tienden a ser más destacadas que las hemorragias viscerales. En conjunto, estas lesiones son patognomónicas de la EVP. Se ha revisado la anatomopatología e histopatología de la EVP en patos blancos de Pekín (Sandhu & Metwally, 2008). Las lesiones microscópicas se caracterizan por la lesión vascular y sus consecuencias en los órganos viscerales. Generalmente se encuentran presentes inclusiones eosinofílicas intranucleares e inclusiones citoplasmáticas en las células epiteliales del tracto digestivo. Se ha sugerido que las aves que se recuperan de una infección natural son inmunes a la re-infección, pero se ha observado latencia (en el ganglio trigémino) y reactivación del virus.

B. TÉCNICAS DE DIAGNÓSTICO

Tabla 1. Métodos analíticos disponibles para el diagnóstico de la enteritis viral del pato 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	Demostrar ausencia de infección en la población	Determinar el estado inmunitario en animales o poblaciones tras la vacunación
Identificación del agente¹						
Aislamiento del virus	+	–	++	+++	+	–
Detección de antígeno	+	+	++	++	+	–
PCR en tiempo real	++	++	++	+++	++	–
PCR convencional	++	++	++	+++	++	–
LAMP	++	++	++	+++	++	–

1 Se recomienda aplicar varios métodos de identificación del agente a una 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	Demostrar ausencia de infección en la población	Determinar el estado inmunitario en animales o poblaciones tras la vacunación
Detección de respuesta inmunitaria²						
VN en placa de microtitulación	+++	+++	+++	+	+++	+++
VN en embriones de pavo	+++	+++	+++	++	+++	+++
ELISA	+	+	+	+	++	+

Clave: +++= método recomendado, validado para el propósito indicado; ++=método adecuado, pero puede precisar validación; +=puede utilizarse en algunas situaciones, pero el coste, la fiabilidad u otros factores limitan en gran medida su aplicación; -=no adecuado para este fin; n/a= no aplicable.

PCR = reacción en cadena de la polimerasa; LAMP = amplificación isotérmica mediada por bucle;
ELISA = enzimoimmunoanálisis; VN = neutralización vírica.

1. Identificación del agente

El aislamiento primario del virus se consigue mejor a partir de las muestras de hígado, bazo o tejido renal, los cuales habrán sido homogeneizados en un tampón salino que contenga antibióticos, y clarificados mediante centrifugación a baja velocidad (1.800 g). Se puede intentar el aislamiento inoculando dichos homogenados en cultivos celulares o embriones de pato.

1.1. Cultivos celulares

El cultivo celular está descrito como el método de elección para el aislamiento del VEVP, aunque es posible que no siempre tenga éxito. Si se intenta, los aislamientos pueden ser realizados en fibroblastos primarios de embrión de pato (DEF) (Wolf *et al.*, 1976), o preferiblemente en fibroblastos primarios de embrión de pato Moscovia (MDEF) (Gough & Alexander, 1990; Kocan, 1976). Se cree que las células embrionarias de hígado de pato Moscovia (MDEL) son más sensibles. Las monocapas celulares cultivadas en medio mínimo esencial de Eagle (MEM) que contiene suero bovino fetal al 10% (FBS), glutamina 2 mM, bicarbonato sódico al 0,17% y gentamicina se lavan con medio MEM libre de suero y se inoculan con la muestra homogeneizada y clarificada sospechosa de contener el VEVP. Después de incubarse durante 1 hora a 37°C para permitir la adsorción del virus, los cultivos se mantienen en medio MEM que contenga FBS al 2%, glutamina 2 mM, bicarbonato sódico al 0,17% y gentamicina, y se incuban en una atmósfera con CO₂ al 5%. El efecto citopático (ECP) se caracteriza por la aparición de células redondeadas y agrupadas que se dilatan y se vuelven necróticas entre 2 y 4 días más tarde. Para identificar el virus, los cultivos se deben teñir con un conjugado de anticuerpos marcados utilizando un método directo o indirecto (véase la sección B. 1. d.) Las células también se pueden fijar y teñir con hematoxilina y eosina para poner de manifiesto la formación de sincitios, las inclusiones intranucleares, y la granulación citoplasmática acusada. Se ha descrito (Burgess & Yuill, 1981) que el aislamiento del VEVP en células MDEF se favorece mediante la incubación a temperaturas de entre 39,5 y 41,5°C. Sin embargo, la temperatura elevada no parece esencial para el aislamiento, el cual se consigue con frecuencia a 37°C. Puede ser necesario más de un pase en cultivo celular para aislar el virus. El método de aislamiento del virus en cultivos celulares puede ser modificado por una prueba en placa, recubriendo la monocapa celular con un medio de mantenimiento que contenga agarosa al 1%. Como el virus puede asociarse a las células, se puede llevar a cabo el pase secuencial tripsinizando las células potencialmente infectadas y resembrándolas, así como inoculando células frescas con el sobrenadante del cultivo infectado del pase anterior.

² La respuesta de anticuerpos es de poca utilidad en la infección aguda por el VEVP. La respuesta humoral puede ser baja en las infecciones naturales y los anticuerpos pueden durar poco tiempo.

1.2. Embriones de pato

Los aislamientos primarios del virus pueden realizarse mediante inoculación en la membrana corioalantoidea de huevos embrionados de pato *Moscovia* de 9–14 días. Debe realizarse un seguimiento diario de los embriones inoculados, y los que mueran en un plazo máximo de 72 horas deben eliminarse. Se puede recolectar el virus de los embriones que sobrevivan 72–120 horas. Antes de la recogida, los huevos embrionados inoculados deben refrigerarse a 4°C durante 4 horas o durante toda la noche para matar los embriones antes de posteriores manipulaciones. Los embriones pueden morir, presentando extensas hemorragias características 4 a 10 días después de la inoculación. Pueden ser necesarios de dos a cuatro pases seriados de las MCA homogeneizadas antes de que se pueda lograr el aislamiento.

Los huevos embrionados de pollo no son muy susceptibles a la infección con cepas naturales del VEVP. No obstante, el virus puede adaptarse a los embriones de pollo mediante pases seriados. Los embriones del pato de Pekín varían en cuanto a susceptibilidad frente a las cepas del VEVP.

1.3. Métodos inmunológicos

Las pruebas serológicas utilizadas para confirmar la identidad de los virus recién aislados son las pruebas de neutralización practicadas en huevos embrionados o bien en cultivos celulares. Se ha descrito una prueba de placa para la detección del VEVP en cultivos celulares de embrión de pato (Dardiri & Hess, 1968). Se puede usar una prueba de microtitulación empleando células primarias MDEF o MDEL. Con tal de que se emplee un antisuero hiperinmune de título suficientemente alto, la prueba de la inmunofluorescencia (directa o indirecta) para el VEVP en células DEF, MDEF o MDEL es la prueba más sensible después del aislamiento en patitos de 1–9 días de edad (Erickson *et al.*, 1974). Se ha descrito una prueba de hemaglutinación pasiva inversa para el VEVP (Deng *et al.*, 1984), pero se ha observado que es menos sensible que las pruebas en placa y la inmunofluorescencia. Se ha descrito un método de tinción de inmunoperoxidasa con avidina-biotina-peroxidasa para detectar el antígeno del VEVP en cortes de hígado y bazo fijados con formol e incluidos en parafina, a partir de aves infectadas experimentalmente (Islam *et al.*, 1983). La identidad del virus también se puede confirmar mediante la microscopía electrónica de tinción negativa, aunque no aporta una confirmación positiva de que el herpesvirus observado sea el VEVP. Recientemente, se ha desarrollado una microscopía inmunoelectrónica utilizando un suero hiperinmune frente a la EVP (Pearson & Cassidy, 1997).

1.4. Métodos de reconocimiento de ácidos nucleicos: reacción en cadena de la polimerasa

Se han descrito varios protocolos para la detección del VEVP mediante la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) convencional (Hansen *et al.*, 1999; 2000; Plummer *et al.*, 1998; Pritchard *et al.*, 1999). También se han descrito protocolos de PCR cuantitativa en tiempo real para la detección del VEVP (Qi *et al.*, 2009; Wu *et al.*, 2011a, Yang *et al.*, 2005).

Se ha publicado un método basado en la amplificación isotérmica mediada por bucle (LAMP) para la detección de ADN del VEVP (Ji *et al.*, 2009; Woźniakowski & Samorek-Salamonowicz, 2014). Se han identificado cebadores que pueden amplificar el ADN del VEVP presente en diversos tejidos, incluidos el esófago, el hígado y el bazo, a partir de un brote original y después del pase por embriones de patos de *Moscovia*. Se prefieren los tejidos a los hisopos cloacales, ya que el desprendimiento de VEVP puede ser intermitente en las aves acuáticas infectadas.

El siguiente es un protocolo de ejemplo para la PCR convencional para la detección del VEVP (Hansen *et al.*, 2000); existen otros.

1.4.1. Extracción del ADN vírico

Este procedimiento de extracción del ADN se puede usar en suspensiones celulares perturbadas de cultivo de tejido infectado por el VEVP, suspensiones de tejido triturado al 10% o material de hisopo cloacal en medio de transporte. Este método se usa para preparar ADN del VEVP para los controles de PCR positivos.

Nota: Todas las transferencias de producto de los pasos (i) a (v) se realizan en una cabina de seguridad biológica.

- i) Para una suspensión homogeneizada de tejido al 10%, se añaden 400 µl a un tubo de microcentrífuga de 1,5 ml y se microcentrífuga a 16.000 **g** durante 5 minutos. Se transfiere el sobrenadante a un tubo nuevo y se aplica el paso (ii).

- ii) Para suspensiones de cultivos celulares y material de hisopo de la cloaca, se añaden 400 µ de la muestra, o el sobrenadante del paso (i) anterior, a un tubo de 1,5 ml y se microcentrifuga a 16.000–20.000 **g** durante 45 minutos para sedimentar el virus.
- iii) Se descarta el sobrenadante y se resuspende el sedimento con 200 µl de tampón Tris/ácido etilendiaminotetraacético (EDTA) (Tris/HCl 10 mM, pH 8,0, EDTA 1mM).
- iv) Se añaden 10 µl de una solución de proteinasa K a 5 µg/µl para obtener una concentración final de 0,2 µg/µl, se mezcla bien y se incuba a 56°C durante 1 hora.
- v) Se añaden 25 µl de solución de dodecilsulfato sódico (SDS) al 10% para obtener una concentración final de SDS del 1%, se mezcla bien y se incuba a 37°C durante 1 hora.
- vi) Se añaden 15 µl de NaCl 5M para obtener una concentración final de 0,3 M y se mezcla bien.
- vii) Se añaden al tubo 300 µl de fenol fresco tamponado con Tris/HCl, pH 8,0, y se mezcla invirtiendo 50 veces.
- viii) Se microcentrifuga el tubo a 16.000 **g** durante 5 minutos y se transfiere la fase acuosa superior (muestra) a un tubo nuevo.
- ix) Se repiten las fases de extracción (vii) y (viii) con fenol una vez más.
- x) Se añaden 500 µl de éter al tubo, se mezcla bien, y se microcentrifuga a 16.000 **g** durante 1 minuto.
- xi) Se descarta la fase acuosa superior (éter) y se repite el paso de extracción con éter (paso x) una vez más.
- xii) Se calienta el tubo con la tapa abierta a 56°C durante unos 15 minutos o hasta que haya desaparecido el olor a éter.
- xiii) Se divide el contenido del tubo en dos y se añade a cada tubo 2,25 veces el volumen de la muestra en etanol, se mezcla el contenido del tubo invirtiéndolo varias veces y se deja a temperatura ambiente (22°C) durante 30 minutos.
- xiv) Se microcentrifuga el tubo a 16.000 **g** durante 45 minutos y se descarta el sobrenadante.
- xv) Se añaden 200 µl de etanol al 70% para lavar cuidadosamente el tubo y se centrifuga a 16.000 **g** durante 15 minutos.
- xvi) Se descarta el sobrenadante y se seca el sedimento a 56°C durante 30–45 minutos con la tapa del tubo abierta.
- xvii) Se resuspende el ADN en 30 µl de agua destilada libre de ARNsas y ADNsas.
- xviii) Se conserva la muestra a 4°C hasta que se analice (si se trata de pocos días) o a –20°C en el caso de una conservación a largo plazo.

1.4.2. Método analítico

Las mezclas de reacción primarias para la PCR del VEVP y el control de lambda se preparan por adelantado en una cabina de seguridad biológica utilizando los métodos recomendados por el fabricante del producto para una PCR “hot start”. La mezcla de la reacción primaria se reparte en tubos, se sellan con cera a 80°C como recomienda el fabricante, y se conservan a 4°C durante 1–2 meses.

Cebadores de la PCR para el gen de la ADN polimerasa dirigida por ADN del VEVP:

Secuencia del cebador 1: 5'-GAA-GGC-GGG-TAT-GTA-ATG-TA-3' (cebador directo)

Secuencia del cebador 2: 5'-CAA-GGC-TCT-ATT-CGG-TAA-TG-3' (cebador inverso)

- i) La mezcla de la reacción secundaria se prepara el día de la prueba de acuerdo con las recomendaciones del fabricante del producto y se distribuye en cada tubo problema incluyendo los tubos control de lambda y del VEVP.
- ii) Se añaden 10 µl de la suspensión de ADN de los tubos problema conservados a los tubos de reacción primaria de PCR con las correspondientes etiquetas.
- iii) Se coloca ADN del VEVP conocido diluido hasta 1 pg/10 µl en un tubo control, y 10 µl de agua destilada en el tubo control sin ADN. Se añaden 10 µl de ADN de lambda proporcionado con el kit, y 10 µl de agua a los tubos control de lambda correspondientes.

iv) Se colocan los tubos en un termociclador que esté programado como se indica:

Un ciclo: Mantener a 94°C durante 2 minutos
Mantener a 37°C durante 1 minuto
Mantener a 72°C durante 3 minutos

35 ciclos: Mantener a 94°C durante 1 minuto
Mantener a 55°C durante 1 minuto
Mantener a 72°C durante 2 minutos

Un ciclo: Mantener a 72°C durante 7 minutos
Mantener a 4°C hasta su almacenamiento

Los tubos de PCR se conservan a 4°C hasta que se compruebe si las muestras contienen los productos resultantes de la amplificación.

1.4.3. Análisis electroforético de los productos de reacción

- i) Se prepara tampón TAE fresco (Tris acetato 40 mM, EDTA 1 mM, pH 8,3) 1x a partir de una reserva 10x para la preparación de la agarosa y su uso en la cubeta de electroforesis.
- ii) Se prepara una solución de agarosa al 1% en tampón TAE, se calienta para disolver la agarosa y, cuando se enfríe, se vierte en un formador de geles con un peine.
- iii) El gel solidificado se coloca en la cubeta de electroforesis y se añade el tampón TAE.
- iv) Las muestras problema de PCR, incluyendo los controles para el VEVP y el lambda, se mezclan a una proporción de 1/10 con 1 µl de tampón de carga (azul de bromofenol al 0,25% [p/v], xilen cianol al 0,25% [p/v], Tris/HCl 0,01 M, pH 8,0, y glicerol al 50% [v/v]), y se añaden 10 µl de cada una a pocillos individuales del gel. A cada lado del gel se añaden marcadores de un tamaño molecular de 100 pb.
- v) Se ejecuta el gel durante 1 hora a 120 voltios y se tiñe en solución de bromuro de etidio al 1% durante 20 minutos (es preferible utilizar tinciones más seguras para visualizar productos de la PCR). Se decolora el gel durante 45 minutos en agua desionizada y se observa en un transiluminador de luz UV. Se fotografía el gel para registrar los resultados.

1.4.4. Interpretación de los resultados

La amplificación de una banda de 500 pb en la muestra control de lambda indica que la PCR se ha desarrollado con éxito. Una banda de 446 pb en el control conocido de ADN del VEVP indica que los cebadores del VEVP están funcionando. Una banda de 446 pb en la muestra problema desconocida indica la presencia de ADN vírico del VEVP. No existirán productos de amplificación en los controles del VEVP ni del lambda sin ADN. Si aparecen bandas en los productos de los controles negativos, significará que ha tenido lugar una contaminación cruzada durante el ajuste de la prueba y esta debe repetirse.

1.4.5. PCR en tiempo real

El siguiente es un protocolo de ejemplo para una PCR en tiempo real para la detección del VEVP (Yang *et al*, 2005); existen otros.

Cebadores de PCR dirigidos a un fragmento de 124 pb del gen de la ADN polimerasa del VEVP

Secuencia del cebador 1: 5'-CTC-TAC-GCA-GCT-TTT-GAC-GAT-TT-3' (adelante)

Secuencia del cebador 2: 5'-AGA-AAC-ATA-CTG-TGA-GAG-TGA-CGA-3' (reverso)

La sonda marcada (5'-CCT-CCT-CCT-CGC-TGA-GTG-GCA-TCC-3') es complementaria a una región de 24 pb entre el par de cebadores 3' a 5' y 5' a 3' marcados con 6-carboxi-fluoresceína en el extremo 5' y 6-carboxi-tetrametil-rodamina en el extremo 3'.

- i) La extracción de ADN del VEVP se puede realizar utilizando un kit de extracción de ADN de tejido/célula adecuado o el procedimiento de extracción descrito en la Sección B.1.4.1. La PCR se puede realizar usando un kit de PCR en tiempo real adecuado y un sistema y software de detección de PCR.

- ii) La amplificación se realiza en un total de 25 µl de mezcla de PCR que contenga 1 µl de solución de ADN, tampón 13PCR, MgCl₂ 10 mM, dNTP 0,4 mM, cada cebador a una concentración 0,2 µM, sonda fluorogénica 0,24 µM y 1,25 U de polimerasa Taq .
- iii) Las condiciones de PCR consistieron en:
 - a) un ciclo de 5 minutos a 95°C
 - b) 40 ciclos de dos pasos de 5 segundos a 94°C y 20 segundos a 65°C.
- iv) Si se desea la cuantificación, el número de copias diana en la reacción puede deducirse a partir de los valores del ciclo umbral (CT) correspondientes al número de ciclo fraccional en el que la fluorescencia liberada excede 15 veces la desviación estándar de la emisión media inicial.

1.5. Variación entre cepas

Aunque las cepas de VEVP varían considerablemente en cuanto a la virulencia, se dispone de pocas pruebas escritas sobre variación serológica.

2. Pruebas serológicas

Las pruebas serológicas tienen poca utilidad para el diagnóstico de las infecciones agudas por el VEVP, aunque se han empleado pruebas basadas en la neutralización del suero en huevos embrionados y cultivos celulares, con el fin de realizar un seguimiento de los anticuerpos en las aves acuáticas salvajes después de su exposición al VEVP. La respuesta humoral a la infección natural por el virus de la EVP es a menudo baja y los anticuerpos pueden tener una vida corta (Docherty & Franson, 1992); se asume que la inmunidad mediada por células también interviene en la infección (Richter & Horzinek, 1993). Sin embargo, es posible la detección de anticuerpos neutralizantes frente al VEVP en suero. Utilizando virus adaptados al embrión, o en cultivos celulares, en embriones de pollo o patos pueden llevarse a cabo pruebas de neutralización vírica (VN) (Thayer & Beard, 1998) en las que se utiliza un método de suero constante/virus variable. En el caso de los laboratorios que carecen de embriones de pato, se puede establecer el diagnóstico serológico mediante la neutralización vírica, empleando una cepa de VEVP adaptada a fibroblasto de embrión de pollo y fibroblastos primarios de embrión de pollo (CEF). En las aves acuáticas salvajes y domésticas que no habían sido expuestas al VEVP se detectaron índices de neutralización (IN) (Thayer & Beard, 1998) de entre 0 y 1,5; un IN igual o superior a 1,75 se consideró prueba de una exposición anterior al VEVP (Dardiri & Hess, 1967). Alternativamente, los sueros pueden analizarse utilizando un método de suero constante/virus variable. En el laboratorio del autor se emplea una prueba de neutralización por microtitulación usando MEDF o DEF primarios. Se preparan diluciones seriadas a la mitad de cada muestra de suero (inactivada por calor a 56°C) en 50 µl de MEM libre de suero en placas de microtitulación. Se añaden aproximadamente 10^{2,0} DICT₅₀ (dosis infectiva 50% en cultivo de tejidos) de VEVP en 50 µl de MEM a cada pocillo, y las muestras se dejan reaccionar a 37°C durante 1 hora. Se ajusta una suspensión de MDEF primarios o DEF en MEM suplementado con L-glutamina 2 mM, bicarbonato sódico al 0,17% y FBS al 10% para que contenga 3 × 10⁵ células por ml. A continuación, las células se añaden a las placas a razón de 100 µl por pocillo y se incuban hasta 96 horas a 37°C en una atmósfera húmeda con un 5% de CO₂. Después de la incubación, las células se observan diariamente mediante microscopía de luz visible y se fijan finalmente con tampón salino con formol y se tiñen con cristal violeta al 1%. Las placas se leen macroscópicamente. La titulación de la actividad neutralizante del virus se expresa como el inverso de la dilución más alta del suero a la que creció la monocapa, es decir, a la que no existe evidencia de ECP y, por tanto, a la que ha tenido lugar la neutralización completa del virus. Normalmente, un título menor de log₂ 3 se considera negativo. Un título de VN de 8 o superior se considera significativo y constituye una prueba de exposición al VEVP (Docherty & Franson, 1992). También puede detectarse el anticuerpo neutralizante mediante la utilización de cultivos celulares mezclando sueros a una sola dilución, por ejemplo a 1/10, con 100–200 DICT₅₀ de virus y determinando si los cultivos celulares inoculados mediante inmunofluorescencia presentan el virus no neutralizado. Aunque este método no es cuantitativo, puede ser útil para analizar gran cantidad de sueros. Estos últimos métodos, en los que se utiliza virus constante/suero variable, son mucho más económicos en suero que los métodos de IN.

Se han desarrollado pruebas de tira inmunocromatográfica (ICS) para la detección de anticuerpos contra el VEVP y pueden ser prometedoras para el uso en condiciones de campo (Shen *et al.*, 2010). La prueba de tiras ICS se basa en la cromatografía de membrana y usa proteína UL51 recombinante como antígeno de captura. Se ha descrito que esta prueba tiene una sensibilidad comparable a la del ELISA y mucho más alta que la de las pruebas de NV. Se han descrito ELISA de puntos y hemoaglutinación pasiva para la detección de anticuerpos contra el VEVP, pero la sensibilidad y especificidad de estas pruebas son moderadas (Malmarugan y Sulochana, 2002). Se han descrito varios ELISA indirectos (Wu *et al.*, 2011b) para la detección serológica del VEVP. Se ha descrito un ELISA indirecto que utiliza el virión VEVP completo como antígeno recubierto para la detección de anticuerpos contra el VEVP y está a la venta (Xuefeng *et al.*, 2007). También se han desarrollado varios ELISA indirectos que usan proteínas del VEVP recombinantes que actúan como antígeno de recubrimiento. Wu *et al.*

describieron un ELISA indirecto en el que se utiliza una proteína UL55 recombinante del VEVP expresada en *E. coli* (UL55-ELISA). Comparado con un ELISA comercial indirecto basado en viriones VEVP completos y pruebas de NV, el UL55-ELISA resultó ser intermedio en cuanto a sensibilidad y especificidad (Wu *et al.*, 2011b). Otro ELISA indirecto que usa la expresión de la proteína de fusión de la timidina quinasa en *E. coli* como antígeno de recubrimiento detectó anticuerpos contra el VEVP post-vacunación 5 días antes que las pruebas convencionales (Wen *et al.*, 2010). Aunque se ha descrito que los ELISA basados en proteínas del VEVP recombinantes son alternativas rápidas, simples y más económicas para la detección serológica del VEVP, es necesario realizar más pruebas de su estabilidad antes de poder utilizarlos de forma generalizada.

C. REQUISITOS PARA LAS VACUNAS

1. Antecedentes

En el capítulo 1.1.8. *Principios de producción de vacunas veterinarias* se dan las directrices para la producción de vacunas veterinarias. Las directrices dadas aquí y en el capítulo 1.1.8 son de carácter genérico y pueden ser complementadas con los requisitos nacionales o regionales.

1.1. Fundamentos y uso previsto del producto

Se puede utilizar una vacuna viva atenuada para controlar la EVP en aves de más de 2 semanas de edad (Richter & Horzinek, 1993). Se considera que el virus de la vacuna viva no se transmite por contacto de patitos vacunados a no vacunados. Los patos de engorde o reproductores se pueden vacunar por vía subcutánea o intramuscular para producir una inmunidad activa. Se ha descrito que la inmunidad materna en patitos desciende rápidamente y que la descendencia de reproductores vacunados con una vacuna viva atenuada es totalmente susceptible.

Se ha documentado una vacuna viva atenuada propagada en una línea celular de fibroblastos de embrión de pato que ha funcionado (Mondal *et al.*, 2010).

Se ha descrito una vacuna inactivada que es tan eficaz como una vacuna viva modificada (Shawky & Sandhu, 1997). Esta vacuna se ha probado únicamente en condiciones de laboratorio; no se ha probado a gran escala y no está autorizada.

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

2.1. Características del inóculo

2.1.1. Características biológicas

La vacuna contra la EVP se puede preparar a partir de una cepa del virus que haya sido atenuada mediante pase seriado en huevos de pollo embrionados. En EE.UU. el inóculo de la cepa de la vacuna fue importado originalmente desde Holanda y ha sido reinoculada 41–46 veces.

El inóculo vírico debe prepararse en huevos embrionados de pollo libres del patógeno específicos (SPC) de 8–11 días de edad, mediante la inoculación en la MCA seguida de incubación a 37°C. El inóculo debe conservarse a –70°C o a menor temperatura en tampón salino en forma de homogenado de la MCA del embrión.

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

El inóculo vírico debe encontrarse libre de virus exógenos patógenos para patos, pollos y pavos. También debe encontrarse libre de contaminación por bacterias, hongos o micoplasmas.

Debe confirmarse la identidad del virus mediante una prueba de VN realizada con antisuero específico usado en el método de suero constante/virus variable. Esta prueba debe realizarse en huevos embrionados de pollo. El antisuero debe reducir el título vírico hasta $10^{1.75}$ DLE₅₀ (dosis que resulta letal en el 50% de los embriones expuestos).

2.2. Método de fabricación

2.2.1. Procedimiento

La vacuna se produce en huevos de pollo embrionados de 8–11 días de edad inoculados en la MCA e incubados a 37°C. La mayoría de las muertes embrionarias tienen lugar entre las 48 y 96 horas tras de la inoculación. Se centrifugan los embriones, sus MCA y los líquidos corioalantoideos se combinan y se homogenizan en tampón salino, y se clarifican mediante centrifugación a baja velocidad (1.800 **g**). La preparación se diluye apropiadamente y se incorpora un estabilizante. Entonces se reparte en viales y, preferiblemente, se congelan rápidamente a –70°C o a menor temperatura.

2.2.2. Requisitos para los sustratos y los medios

Todos los reactivos deben ser estériles y los huevos deben obtenerse de fuentes libres de patógenos específicos.

2.2.3. Controles durante el proceso

Todo embrión que muera en el plazo de las primeras 24 horas tras la incubación debe desecharse como muerte inespecífica.

2.2.4. Pruebas en lotes del producto final

i) Esterilidad y pureza

Las pruebas de esterilidad y ausencia de contaminación de los materiales biológicos destinados a uso veterinario se puede encontrar en el capítulo 1.1.9.

ii) Inocuidad

Las autoridades reguladoras no exigen pruebas de inocuidad en los animales de destino para la puesta en circulación de los lotes. Cuando son necesarias, generalmente se llevan a cabo procedimientos estándar utilizando menos animales que los utilizados en las pruebas de inocuidad requeridas para la aprobación por parte de las autoridades reguladoras correspondientes.

Se debe inocular subcutáneamente o intramuscularmente un grupo de patitos de 1 día susceptibles al VEP con 10 veces la dosis de vacuna recomendada, y observarlos durante 7–14 días para comprobar si presentan signos de reacciones adversas.

iii) Potencia del lote

El título vírico de la vacuna debe determinarse en huevos embrionados de pollo de 9–11 días de edad inoculados en la MCA e incubados a 37°C. La vacuna debe contener un mínimo de $10^{3,0}$ DLE₅₀ por dosis en el momento de su uso.

La inmunogenicidad de la vacuna se puede evaluar en patos o patitos susceptibles a la VEP inoculando la dosis vacunal recomendada por vía intramuscular y exponiendo a los animales 21 días después por vía intramuscular al VEP virulento. Las aves vacunadas deben sobrevivir a este desafío, mientras que las aves control no vacunadas deben morir. Esta prueba debe llevarse a cabo con el inóculo inicial de siembra, pero no puede realizarse sistemáticamente para cada lote de vacuna producido. Para la aprobación de los demás lotes, el título vírico debe ser un indicativo suficiente de la potencia de la vacuna.

2.3. Requisitos para la autorización

2.3.1. Requisitos de inocuidad

Debe inocularse por vía subcutánea o intramuscular un grupo de patitos de 1 día de edad susceptibles al VEP con la vacuna a una dosis 10 veces la recomendada, y observar durante 7–14 días si presentan algún signo de reacciones adversas.

i) Inocuidad en las especies de destino y no de destino

La vacuna va destinada exclusivamente a proteger patitos y patos contra el VEP.

- ii) Reversión a la virulencia en vacunas atenuadas/vivas
No hay informes de reversión a la virulencia en vacunas contra el VEP.
- iii) Consideraciones medioambientales
Ninguna.

2.3.2. Requisitos de eficacia

- i) Para la producción animal
En los patos vacunados, la inmunidad debe durar toda la época reproductiva. Se recomienda la revacunación anual (Sandhu & Metwally, 2008).
- ii) Para el control y la erradicación
Se considera que el virus vacunal no se transmite por contacto entre patos vacunados y no vacunados, puesto que las aves no vacunadas siguen siendo susceptibles a la infección.

2.3.3. Estabilidad

Cuando se conserva a -70°C o menos, la vacuna es estable durante al menos 1 año. Pasado este tiempo, deben repetirse las pruebas de potencia en una alícuota de vacuna, con el fin de determinar si el título vírico se ha mantenido. Una vez descongelada, la vacuna no puede volver a congelarse, y debe mantenerse a 4°C en una nevera, pero durante no más de 1 semana. La vacuna liofilizada debe guardarse a $4-8^{\circ}\text{C}$ y emplearse antes de la fecha de caducidad indicada.

3. Vacunas basadas en la ingeniería genética

3.1. Vacunas existentes y sus ventajas

Se han publicado investigaciones sobre el desarrollo y la eficacia de vacunas contra el VEVP recombinantes en patos SPF. En 2011, Liu *et al.* describieron el uso de una vacuna bivalente viva vectorizada por VEVP en la que se insertó el gen de la hemaglutinina del virus de la influenza aviar H5N1 entre los genes cortos US7 y US8 del genoma del VEVP. Se describió que esta vacuna bivalente es eficaz contra la infección tanto por el VEVP como por el virus de la influenza aviar H5N1 en patos SPF en condiciones experimentales (Liu *et al.*, 2011). Las vacunas contra el VEVP basadas en biotecnología resultan prometedoras en condiciones experimentales, pero actualmente no se venden para un uso generalizado.

3.2. Requisitos especiales para las vacunas basadas en la ingeniería genética, si las hay

Ninguno.

BIBLIOGRAFÍA

- BURGESS E.C. & YUILL T.M. (1981). Increased cell culture incubation temperatures for duck plague virus isolation. *Avian Dis.*, **25**, 222–224.
- CAMPAGNOLO E.R., BANERJEE M., PANIGRAHY B. & JONES R.L. (2001). An outbreak of duck viral enteritis (duck plague) in domestic Muscovy ducks (*Cairina moschata domesticus*) in Illinois. *Avian Dis.*, **45**, 522–528.
- DARDIRI A.H. & HESS W.R. (1967). The incidence of neutralizing antibodies to duck plague virus in serums from domestic ducks and wild waterfowl in the United States of America. Proceedings of the Annual Meeting of the United States Animal Health Association, 225–237.
- DARDIRI A.H. & HESS W.R. (1968). A plaque assay for duck plague virus. *Can. J. Comp. Med.*, **32**, 505–510.
- DAVISON S., CONVERSE K.A., HAMIR A.N. & ECKROADE R.J. (1993). Duck viral enteritis in domestic Muscovy ducks in Pennsylvania. *Avian Dis.*, **37**, 1142–1146.

- DENG M.Y., BURGESS E.C. & YUILL T.M. (1984). Detection of duck plague virus by reverse passive hemagglutination test. *Avian Dis.*, **28**, 616–628.
- DOCHERTY D.E. & FRANSON C.J. (1992). Duck Virus Enteritis. *In: Veterinary Diagnostic Virology*, Castro A.E. & Heuschele W.P., eds. Mosby Year Book, St Louis, Missouri, USA, 25–28.
- ERICKSON G.A., PROCTOR S.J., PEARSON J.E. & GUSTAFSON G.A. (1974). Diagnosis of duck virus enteritis (duck plague). 17th Annual Proceedings of the American Association of Veterinary Laboratory Diagnosticians, Roanoke, Virginia, USA, 85–90.
- GOUGH R.E. & ALEXANDER D.J. (1990). Duck virus enteritis in Great-Britain, 1980 to 1989. *Vet. Rec.*, **126**, 595–597.
- HANSEN W.R., BROWN S.E., NASHOLD S.W. & KNUDSON D.L. (1999). Identification of duck plague virus by polymerase chain reaction. *Avian Dis.*, **43**, 106–115.
- HANSEN W.R., NASHOLD S.W., DOCHERTY D., E., BROWN S.E. & KNUDSON D.L. (2000). Diagnosis of Duck Plague in Waterfowl by Polymerase Chain Reaction. *Avian Dis.*, **44**, 266–274.
- ISLAM M.R., NESSA J. & HALDER K.M. (1993). Detection of duck plague virus antigen in tissues by immunoperoxidase staining. *Avian Path.*, **22**, 389–393.
- Ji J., DU L.Q., XIE Q.M., CAO Y.C., ZUO K.J., XUE C.Y., MA J.Y., CHEN F. & BEE Y.Z. (2009). Rapid diagnosis of duck plagues virus infection by loop-mediated isothermal amplification. *Res. Vet. Sci.*, **87**, 53–58.
- KOCAN R.M. (1976). Duck plague virus replication in Muscovy duck fibroblast cells. *Avian Dis.*, **20**, 574–580.
- 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**, 10989–10998.
- MALMARUGAN S., & SULOCHANA S. (2002). Comparison of dot-ELISA pasive haemagglutination test for the detection of antibodies to duck plague. *Indian Vet. J.*, **79**, 648–651.
- MONDAL B., RASOOL T.J., RAM H. & MALLANNA S. (2010). Propagation of vaccine strain of duck enteritis virus in a cell line of duck origin as an alternative production system to propagation in embryonated egg. *Biologicals*, **38**, 401–406.
- PEARSON G.L. & CASSIDY D.R. (1997). Perspectives on the diagnosis, epizootiology, and control of the 1973 duck plague epizootic in wild waterfowl at Lake Andes, South Dakota. *J. Wildl. Dis.*, **33**, 681–705.
- PLUMMER P.J., ALEFANTIS T., KAPLAN S., O'CONNELL P., SHAWKY S. & SCHAT K.A. (1998). Detection of duck enteritis virus by polymerase chain reaction. *Avian Dis.*, **42**, 554–564.
- PRITCHARD L.I., MORRISSY C., VAN PHUC K., DANIELS P.W. & WESTBURY H.A. (1999). Development of a polymerase chain reaction to detect Vietnamese isolates of duck virus enteritis. *Vet. Microbiol.*, **68**, 149–156.
- QI X., YANG X., CHENG A., WANG M., GUO Y. & JIA R. (2009). Replication kinetics of duck virus enteritis vaccine virus in ducklings immunized by the mucosal or systemic route using real-time quantitative PCR. *Res. Vet. Sci.*, **86**, 63–67.
- RICHTER J.H.M. & HORZINEK M.C. (1993). Duck Plague. *In: Virus Infections of Birds*, McFerran J.B. & McNulty M.S., eds. Elsevier Science Publishers B.V., Amsterdam, the Netherlands, 77–90.
- SANDHU T.S. & METWALLY S.A. (2008). Duck Virus Enteritis (Duck Plague). *In: Diseases of Poultry*, 12 th Edition, Saif Y.M., Fadly A.M., Glisson J.R., McDougald L.R., Nolan L.K. & Swayne D.E., eds. Blackwell Publishing, 384–393.
- SHAWKY S. & SCHAT K.A. (2002). Latency sites and reactivation of duck enteritis virus. *Avian Dis*, **46**, 308–313.
- SHAWKY S.A. & SANDHU T.S. (1997). Inactivated vaccine for protection against duck virus enteritis. *Avian Dis.*, **41**, 461–468.

SHEN C., CHENG A., WANG M., SUN K., JIA R., SUN T., ZHANG N., ZHU D., LUO Q., ZHOU Y. & CHEN X. (2010). Development and evaluation of an immunochromatographic strip test based on the recombinant UL51 protein for detecting antibody against duck enteritis virus. *Virologica Sinica*, **7**, 268–275.

THAYER S.G. & BEARD C.W. (1998). Serologic procedures. *In: A Laboratory Manual for the Isolation, Identification and Characterization of Avian Pathogens*, 4th Edition. , Fourth Edition, Swayne D.E., Glisson J.R., Jackwood M.W., Pearson J.E. & Reed W.M., eds. American Association of Avian Pathologists, Philadelphia, Pennsylvania, 255–266.

WOLF K., BURKE C.N. & QUIMBY M.C. (1976). Duck viral enteritis: a comparison of replication by CCL-141 and primary cultures of duck embryo fibroblasts. *Avian Diseases*, **20**, 447–454.

WEN Y., CHENG A., WANG M., GE H., SHEN C., LIU S., XIANG J., JIA R., ZHU D., CHEN X., LIAN B., CHANG H. & ZHOU Y. (2010). A thymidine kinase recombinant protein-based ELISA for detecting antibodies to duck plague Virus. *Virologica Sinica*, **7**, 77–85.

WOŹNIAKOWSK G. & SAMOREK-SALAMONOWICZ E. (2014). First survey of the occurrence of duck enteritis virus (DEV) in free-ranging Polish water birds. *Arch. Virol.*, **159**, 1439–1444.

WU Y., CHENG A., WANG M., ZHANG S., ZHU D., JIA R., LU Q., CHEN Z. & CHEN X. (2011a). Establishment of real-time quantitative reverse transcription polymerase chain reaction assay for transcriptional analysis of duck enteritis virus UL55 gene. *Virologica Sinica*, **8**, 266.

WU Y., CHENG A., WANG M., ZHANG S., ZHU D., JIA R., LU Q., CHEN Z. & CHEN X. (2011b). Serologic detection of duck enteritis virus using an indirect ELISA based on recombinant UL55 protein. *Avian Diseases*, **55**, 626–632.

XUEFENG, Q., ANCHUN C., MINGSHU W., XIAOYAN Y., RENYONG J. & XIAOYUE C. (2007). Development of an indirect-ELISA kit for detection of antibodies against duck plague virus. *Vet. Sci. China*, **37**, 690–694.

YANG F.L., JIA W.-X., YUE H., LUO W., CHEN X., XIE Y., ZEN W. & YANG W.Q. (2005). Development of quantitative real-time polymerase chain reaction for Duck Enteritis Virus DNA. *Avian Diseases*, **49**, 397–400.

*
* *

NB: ADOPTADO POR PRIMERA VEZ EN 1989; ÚLTIMAS ACTUALIZACIONES ADOPTADAS EN 2018.