

HEPATITIS VIRAL DEL PATO

RESUMEN

La hepatitis viral del pato (HVP) se suele asociar a una infección aguda y contagiosa de patitos susceptibles de menos de 6 semanas de edad y, con frecuencia, de patitos de menos de 3 semanas. No tiene lugar en aves de más edad. Esta enfermedad, la HVP, se suele clasificar en los tipos I, II y III.

La HVP de tipo I puede estar causada por al menos tres genotipos distintos del virus de la hepatitis A del pato (VHPA), un miembro del género Avihepatovirus, de la familia Picornaviridae. El más patógeno y diseminado es el VHPA de tipo I (VHPA-1), que inicialmente se denominaba virus de la hepatitis del pato-1. Los virus VHPA-2 y VHPA-3 son dos genotipos del género Avihepatovirus que posteriormente se han identificado como agentes etiológicos adicionales del VHP en los patitos.

El VHP tipo II solo está causado por un astrovirus del pato de tipo 1 (AstVP-1), un miembro de la familia Astroviridae.

El AstVP-1 se ha observado principalmente en el Reino Unido. Se ha observado en patitos de entre 10 días y 6 semanas, y causa alteraciones anatomopatológicas similares a las del VHPA-1.

El VHP tipo III está causado por un astrovirus del pato de tipo 2 (AstVP-2), un miembro de la familia Astroviridae. Se considera distinto del AstVP-1 y se ha notificado solamente en Estados Unidos. Causa lesiones hepáticas similares en patitos de corta edad, pero es menos virulento que el VHPA.

El diagnóstico de la hepatitis en patitos se basa en el patrón característico de la enfermedad en la parvada, las lesiones macroscópicas, la presencia del virus en muestras de patitos muertos y la reproducción de la enfermedad en patitos susceptibles.

Los virus causales de la HVP no se consideran zoonóticos.

Identificación del agente: *No se puede diferenciar entre los VHP tipo I, II y III según los hallazgos clínicos y las lesiones, pero sí pueden diferenciarse según las respuestas observadas en los patitos, los huevos embrionados y los cultivos celulares a los virus aislados. Como alternativa, puede detectarse ARN de VHPA mediante una reacción en cadena de la polimerasa simple con transcripción inversa (RT-PCR) en muestras de hígado de patito, en líquido alantoideo y en hígado embrionario de huevos de pato inoculados. También se han descrito pruebas moleculares para la detección de AstVP-1 y AstVP-2.*

Pruebas serológicas: *Las pruebas serológicas tienen poco valor en el diagnóstico de las infecciones agudas causadas por los VHPA, AstVP-1 y AstVP-2.*

Se han utilizado pruebas de neutralización de suero in ovo con los tres virus y se han desarrollado ensayos in-vitro para el VHPA-1. Estas pruebas han sido utilizadas para la identificación del virus, el ensayo de las respuestas inmunes frente a la vacunación y estudios epidemiológicos.

Requisitos para las vacunas: *Las infecciones por el VHPA-1 se pueden controlar mediante el uso de vacunas víricas vivas atenuadas y una vacuna vírica inactivada. Se administran a patos reproductores para conferir inmunidad pasiva en los patitos. Las vacunas de virus vivos atenuados también pueden inmunizar activamente a patitos de un día de edad susceptibles al VHPA-1.*

Los patitos susceptibles al VHPA-1 pueden protegerse pasivamente con una preparación de anticuerpo en yema de huevo de gallina.

Las infecciones por AstVP-2 se pueden controlar mediante el uso de una vacuna vírica viva atenuada administrada a los patos reproductores para conferir inmunidad pasiva a los patitos.

A. INTRODUCCIÓN

La enfermedad, la hepatitis viral del pato (HVP) se suele clasificar en los tipos I, II o III. Está causada por al menos tres virus de ARN pequeños distintos que, por lo que se sabe, no tienen importancia desde el punto de vista de la salud pública.

1. VHP tipo I (HHPA-1, HHPA-2, HHPA-3)

El VHP de tipo I está causado por el *virus de la hepatitis A del pato* (VHPA), un *Avihepatovirus* de la familia *Picornaviridae*. El Comité Internacional para la Taxonomía de los Virus estableció el nuevo género *Avihepatovirus*¹. Este género contiene la especie del *virus de la hepatitis A del pato* (VHPA). Se han identificado tres genotipos antigénicamente no relacionados entre ellos: VHPA-1, VHPA-2 y VHPA-3 (Kim *et al.*, 2006; Tseng & Tsai, 2007; Wang *et al.*, 2008). El más prevalente y diseminado a nivel internacional es el VHPA-1. Hasta hace poco, el VHPA-1 solo se había asociado a enfermedad en patitos de ánade real y de Pekín, pero actualmente se sabe que causa pancreatitis y encefalitis en patos criollos (Guerin *et al.*, 2007). El VHPA-2 también se ha documentado como VHP-N (Tseng & Tsai, 2007). El VHPA-2 se aisló por primera vez de un patito mulard y de una cría de ganso en Taipei Chino (Tseng y Tsai, 2007). Las infecciones mixtas por VHPA-1 y VHPA-2 son frecuentes en Taipei Chino (Tseng y Tsai, 2007). Se ha aislado VHPA-3 en Corea (Rep. de) (Kim *et al.*, 2007a) y en China (Rep. Pop de) (Fu *et al.*, 2008). La escasez de información sobre la patogenicidad de VHPA-2 y de VHPA-3 indica que la presentación clínica es similar a la de VHPA-1.

El VHPA causa una infección muy contagiosa en los patitos. Esta enfermedad es una infección vírica aguda y de propagación rápida, a menudo mortal, que afecta a los patitos de corta edad. Suele afectar a patitos de menos de 6 semanas y a menudo mucho más jóvenes. La enfermedad clínica se caracteriza por letargo y ataxia seguidos de opistótonos y de la muerte. Los patitos pierden el equilibrio, se caen de lado y patalean de forma espasmódica antes de morir. El conjunto de acontecimientos propios de la enfermedad tiene lugar de forma rápida y puede durar apenas 1 o 2 horas. En un plazo máximo de 3-4 días morirá prácticamente toda la parvada, y la mayoría de muertes se producirán el segundo día. Aparecen lesiones macroscópicas principalmente en el hígado, que presenta un aumento de tamaño y hemorragias petequiales y equimóticas claramente identificables. También puede aparecer esplenomegalia y tumefacción renal con cierta congestión de los vasos sanguíneos renales. Las lesiones microscópicas del hígado consisten en una necrosis hepatocitaria extensa y en hiperplasia del conducto biliar, junto con grados variables de respuesta inflamatoria celular y hemorragia.

2. VHP tipo II (astrovirus del pato 1 [AstVP-1])

El VHP de tipo II está causado por el astrovirus del pato-1 (AstVP-1), que pertenece a la familia *Astroviridae* (Gough *et al.*, 1985; Koci & Schultz-Cherry, 2002). Los viriones tienen la morfología clásica de los astrovirus y miden 28-30 nm de diámetro.

La infección de patitos por AstVP-1 solo se ha documentado en el Reino Unido (Asplin, 1965; Gough *et al.*, 1985). Se trata de una infección aguda y mortal de los patitos que da lugar a signos clínicos y anatomopatológicos similares a los del VHPA. Las aves afectadas pueden presentar signos de polidipsia y normalmente mueren en un plazo máximo de 1-2 horas tras la aparición de los signos clínicos.

Las lesiones anatomopatológicas macroscópicas consisten en hemorragias con bandas punteadas y confluentes en el hígado, tumefacción y palidez renal con vasos sanguíneos renales congestionados y esplenomegalia. El tracto digestivo suele estar vacío, aunque el intestino delgado puede contener mucosidad y en ocasiones presenta zonas hemorrágicas. A veces, también se observan hemorragias petequiales en el corazón. Histológicamente, las lesiones hepáticas son similares a las que se observan en las infecciones por VHPA; la hiperplasia del conducto biliar puede ser algo más intensa que en las infecciones por VHPA.

3. VHP tipo III (astrovirus del pato 2 [AstVP-2])

El virus causal de la HVP tipo III se clasifica como astrovirus del pato-2 (AstVP-2), que está claramente diferenciado del AstVP-1 (Todd *et al.*, 2009). El AstVP-2 solo se ha reportado en EE.UU. En patitos inmunes al VHPA-1, tiene lugar hasta un 20% de pérdidas (Haider & Calnek, 1979; Toth, 1969). El AstVP-2 causa una

1 http://www.ictvonline.org/taxonomyHistory.asp?taxnode_id=20140971&taxa_name=Avihepatovirus

infección aguda de los patitos de corta edad con signos clínicos similares a los que se observan en las infecciones de tipo I.

Las lesiones anatomopatológicas macroscópicas causadas por el AstVP-2 también son similares a las de la infección por VHPA. La superficie hepática palidece y presenta un moteado con muchas bandas rojas y algunas hemorragias petequiales. El bazo también palidece, pero no está demasiado agrandado, y los riñones pueden presentar congestión por zonas.

B. TÉCNICAS DE DIAGNÓSTICO

Tabla 1. Métodos analíticos disponibles para el diagnóstico de la hepatitis viral del pato A (HHPA) 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 agente²						
Aislamiento del virus	+	++	+	++	++	–
Detección de antígeno	+	++	+	++	++	–
RT-PCR ^a	++	+++	+++	+++	++	–
Detección de respuesta inmunitaria						
ELISA	++	++	++	–	+	++
VN	+++	+++	+++	–	+	+++

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

^aLa RT-PCR (reacción en cadena de la polimerasa con transcripción inversa) se usa principalmente en el análisis de muestras clínicas sospechosas, generalmente de hígado. El uso de la RT-PCR para la detección del VHPA con muestras fecales requiere una validación posterior. ELISA = enzimoimmunoanálisis; VN = neutralización del virus.

Tabla 2. Métodos analíticos disponibles para el diagnóstico del astrovirus del pato tipo 1 (AstVP-1) 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 agente						
Aislamiento del virus	+	++	+	++	++	–
Detección de antígeno	++	++	++	++	++	–

2 Se recomienda aplicar una combinación de 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	Determinar la prevalencia de la infección – vigilancia	Determinar el estado inmunitario en animales o poblaciones tras la vacunación
RT-PCR	+++	+++	+++	+++	+++	–
Detección de respuesta inmunitaria						
ELISA	++	+	++	–	+	++

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

RT-PCR = reacción en cadena de la polimerasa con transcripción inversa; ELISA = enzimoimmunoanálisis.

Tabla 3. Métodos analíticos disponibles para el diagnóstico del astrovirus del pato tipo 2 (AstVP-2) 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 agente						
Aislamiento del virus	+	++	+	++	++	–
Detección de antígeno	++	++	++	++	++	–
RT-PCR	+++	+++	+++	+++	+++	–
Detección de respuesta inmunitaria						
ELISA	++	+	++	–	+	++

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

RT-PCR = reacción en cadena de la polimerasa con transcripción inversa; ELISA = enzimoimmunoanálisis.

1. Identificación del agente

1.1. HVP tipo I (HVPA-1, HVPA-2, HVPA-3)

Las observaciones clínicas y anatomopatológicas en patitos pueden ser muy indicativas de una infección por el VHPA. El VHPA puede aislarse fácilmente de tejido hepático mediante homogeneización en forma de suspensión al 20% (p/v) en solución salina tamponada. Se clarifica la suspensión y a continuación puede tratarse (si se desea) con cloroformo al 5% (v/v) durante 10–15 minutos a temperatura ambiente. El VHPA es resistente a este tratamiento.

La presencia de VHPA se confirma generalmente mediante uno o varios de los procedimientos indicados en apartado B.1.1.1.

1.1.1. Pruebas confirmativas

- i) Mediante de cultivos primarios de células embrionarias de hígado de pato (DEL), que son particularmente sensibles (Woolcock, 1986). Las diluciones del homogeneizado hepático que contiene VHPA tipo 1 causan un efecto citopático (CPE), que se caracteriza por el redondeo celular y la necrosis. Cuando se superpone con un medio de mantenimiento que contiene 1% de agarosa (p / v), el CPE da lugar a placas de aproximadamente 1 mm de diámetro.
- ii) Mediante inoculación de diluciones seriadas del homogenado de hígado en el saco alantoideo de huevos embrionados de pato (10–14 días) o de pollo (8–10 días). Los embriones de pato mueren entre 24 y 72 horas post-inoculación, mientras que los embriones de pollo son más variables y erráticos en su respuesta, y normalmente mueren 5–8 días post-inoculación. Las lesiones macroscópicas de los embriones consisten en retraso en el crecimiento y hemorragias subcutáneas por todo el cuerpo, con edema en concreto en la región abdominal y extremidades posteriores. Los hígados de los embriones pueden estar rojos y amarillentos, hinchados y presentar algunos focos necróticos. En los embriones que tardan más tiempo en morir, es más pronunciado el color amarillo-verdoso del alantoide, y se hacen más evidentes las lesiones hepáticas y el retraso en el crecimiento.

1.1.2. Pruebas inmunológicas

Existe variación antigénica entre las cepas del VHPA que inducen hepatitis en patitos. Desde el punto de vista serológico, no existe neutralización cruzada entre el VHPA-1 y el VHPA-2 (Tseng & Tsai, 2007) y muy poca neutralización cruzada entre el VHPA -1 y el VHPA -3 (Kim *et al.*, 2007a). Una variante, la VHPA-1a, aislada en EE.UU., reacciona solo parcialmente con el virus VHPA-1 clásico en pruebas de neutralización sérica cruzada (Sandhu *et al.*, 1992; Woolcock, 2008b). Se han reportado otras variantes en India y Egipto, pero no se sabe nada más sobre ellas. Notificaciones de la enfermedad en patos criollos de Francia (Guerin *et al.*, 2007; Sandhu *et al.*, 1992; Woolcock, 2008b) también indican una mayor diversidad del VHPA de la que se suponía.

Estas pruebas inmunológicas no se han utilizado ampliamente para la identificación sistemática de la infección por el VHPA. Se han descrito varios ensayos de neutralización vírica (NV), que pueden tener una mayor importancia si se propagan más las infecciones por los VHP de tipo II y III. Las pruebas que se han descrito para el VHPA-1 (Chalmers & Woolcock, 1987; Woolcock, 1986; 1991; 2008a) son las siguientes:

- i) Se mezclan diluciones seriadas decimales de la cepa vírica con volúmenes iguales de suero hiperinmune específico contra el VHPA diluido a 1/5 y a 1/10. Las mezclas se dejan reaccionar a temperatura ambiente durante 1 hora, y después se inoculan (0,2 ml) por vía subcutánea a patitos susceptibles, y también en la cavidad alantoidea (0,2 ml) de huevos de pato embrionados, y en cultivos primarios de monocapas de células DEL. En cada caso los controles consisten en la cepa vírica mezclada con el suero control.

1.1.3. Métodos de reconocimiento de ácido nucleico

Se han publicado varios estudios sobre la estructura molecular del VHPA que destacan la variación genotípica entre cepas (Tseng *et al.*, 2007; Wang *et al.*, 2008). Según los análisis filogenéticos, las cepas del VHPA se subclasifican en 3 genotipos (Wang *et al.*, 2008). VHPA-1 es el genotipo más prevalente (Asplin, 1965; Ding & Zhang, 2007; Jin *et al.*, 2008; Kim *et al.*, 2006; Liu *et al.*, 2008). VHPA-2 se ha reportado en Taipei Chino (Tseng & Tsai, 2007). DHAV-3 se ha reportado en Corea del Sur (Kim *et al.*, 2007a; 2008) y en China (Fu *et al.*, 2008).

Se ha descrito una PCR simple con transcriptasa inversa utilizando cebadores para el gen 3D conservado, para detectar el VHPA-1 (Kim *et al.*, 2007b). Anchun *et al.* En 2009 también se informó de una RT-PCR para la detección de cepas chinas, pero no está claro si estas son VHPA-1 o VHPA-2. Se ha documentado el desarrollo de una prueba de RT-PCR simple Taqman en tiempo real basada en cebadores para una región conservada del gen 3D (Yang *et al.*, 2008) pero no está claro si es para el VHPA-1 o para el VHPA-2; este informe no aporta un protocolo claro paso a paso del método que desarrollaron. Se han creado varias RT-PCR múltiples para la detección simultánea y la diferenciación entre genotipos del VHPA.

i) Reacción en cadena de la polimerasa

Este método se ha extraído de Kim *et al.*, (2007b). Está basado en cebadores específicos para amplificar una región del gen 3D del VHPA-1.

ii) Detección del VHPA en órganos embrionarios de pato y pollo y extracción de ácido nucleico

Se recogen y filtran (0,2 µm) sobrenadantes preparados a partir de hígados de patitos infectados con VHPA-1. Se inoculan con 0,2 ml de sobrenadante vírico cada una de las cavidades alantoideas de cinco huevos embrionados de patos de 11 días y de pollos de 9 días. Se recogen líquido alantoideo y muestras de hígado de embriones inoculados con dos cepas de referencia y se tritura cada muestra de hígado en un triturador de tejidos, y se añade solución salina tamponada con fosfato para hacer suspensiones al 10%. Se centrifugan suspensiones de muestras hepáticas y líquido alantoideo a 2.000 **g** durante 30 minutos; los sobrenadantes se tratan con un kit de extracción de ADN/ARN vírico adecuado siguiendo las instrucciones del fabricante. Los ácidos nucleicos se utilizan para la RT-PCR simple. Después de medir el ARN, las muestras se conservan a -20°C.

iii) Cebadores oligonucleotídicos

VHPA-1 ComF (5'-AAG-AAG-GAG-AAA-ATY-[C o T]-AAG-GAA-GG-3') y

VHPA-1 ComR (5'-TTG-ATG-TCA-TAG-CCC-AAS- [C o G]-ACA-GC-3')

Flanqueado por una secuencia de ADN de 467 pb en el gen 3D.

Los cebadores alternativos propuestos por Fu *et al.* (2008) son los siguientes:

Inverso: 501-519: 5'-CCT-CAG-GAA-CTA-GTC-TGG-A-3'

Directo: 270-285: 5'-GGA-GGT-GGT-GCT-GAA-A-3'

iv) RT-PCR simple

Los tiempos y las temperaturas deben optimizarse según los reactivos y los kits que se utilicen. Los siguientes son solo ejemplos. La RT-PCR simple se lleva a cabo utilizando un kit adecuado que contenga 1 U de transcriptasa inversa, dNTP, cada una a una concentración de 2,5 mM, 2,5 U de ADN polimerasa y tampón de RT-PCR (Tris/HCl 50 mM y KCl 75 mM). Además, se incluirán en la reacción los siguientes componentes: 4 µl (50 ng) de ARN o ADN molde, 1 µl (10 pmoles/µl) de cada cebador específico (VHPA-1 ComF y VHPA-1 ComR), y dH₂O tratado con DEPC hasta un volumen total de reacción de 20 µl.

Se utiliza un termociclador de gradiente T para la RT-PCR simple. La transcripción inversa se lleva a cabo a 45°C durante 30 minutos, y a continuación se inactiva la enzima a 94°C durante 5 minutos. La amplificación por PCR se realiza utilizando una desnaturalización inicial de 20 segundos a 94°C; a continuación, 40 ciclos de hibridación durante 30 segundos a 52°C, una extensión durante 30 segundos a 72°C, y una desnaturalización durante 20 segundos a 94°C; y una extensión final durante 5 minutos a 72°C. Los productos de la reacción se conservan a 4°C.

v) Detección de los productos de la RT-PCR simple

Los productos de la PCR (10 µl) se separan por electroforesis (100 V) en geles horizontales de agarosa al 1,5% y tampón Tris-acetato (Tris-acetato 40 mM, ácido etilendiaminotetraacético 1 mM). Los geles se tiñen con una tinción para ácido nucleico (0,5 µg/ml), se observan con luz ultravioleta o luz azul y se fotografían.

vi) Interpretación de los resultados

Se amplifica un fragmento de ADN de 467 pb mediante una RT-PCR simple utilizando ARN extraído de los hígados de patitos infectados con cepas de referencia del VHPA-1. El control negativo de ARN se obtiene de un hígado de patito no infectado y no se amplifica en las mismas condiciones.

1.2. VHP tipo II (AstVP-1)

Para la detección del AstVP-1, se pueden evaluar suspensiones de hígado homogenizado mediante microscopía electrónica para observar las partículas características del AstVP-1.

El AstVP-1 se puede recuperar de suspensiones de hígado homogenizadas en solución salina tamponada al 20% (p/v). Estas se pueden emplear para inocular:

- i) Huevos de pollo o pato embrionados, bien por la cavidad amniótica o en el saco vitelino. Pueden responder de manera imprevisible después de cuatro pases, pero pueden no observarse muertes durante los pases más tempranos. Los embriones tardan 6–10 días en presentar los signos de la infección; cuando esto ocurre se observa retraso en el crecimiento con hígados verdes necróticos.

Se ha observado crecimiento del AstVP-1 en cultivos celulares primarios de hígado de embrión de pollo (Baxendale & Mebatsion, 2004); se detectó formación de placas a los 5 días post-infección tras 4 o 5 pases seriados. No se suelen utilizar técnicas de cultivo celular porque la propagación del AstVP-1 en cultivo tisular no suele dar lugar a una propagación vírica suficiente para las pruebas de diagnóstico.

1.2.1. Pruebas inmunológicas

No se han utilizado pruebas inmunológicas de forma sistemática para la detección de antígenos del AstVP-1. Sin embargo, se ha aplicado una prueba de neutralización (Gough *et al.*, 1985) para la identificación del AstVP-1 inoculando embriones de pollos por la cavidad amniótica con mezclas de cantidades constantes de suero y variables de virus.

1.2.2. Caracterización molecular

El genoma completo de AstVP-1 consiste en 7752 nucleótidos y 3 ORF, ORF1a, ORF 1b y ORF2 (Chen *et al.*, 2012).

La identidad de las posibles cepas de AstVP-1 se puede confirmar mediante una RT-PCR seguida de la secuenciación del ácido nucleico y de un análisis del fragmento amplificado (Todd *et al.*, 2009). Esta RT-PCR, basada en un cebador degenerado, amplifica 434 nt en ORF 1b. Dado que este método de RT-PCR puede amplificar otros astrovirus del pato que se encuentren presentes en la muestra, se precisa un análisis de la secuencia del producto amplificado.

- i) Detección del AstVP-1 mediante RT-PCR (método extraído de Todd *et al.*, 2009)

Se extrae el ARN vírico de muestras de 200 µl empleando un kit de extracción de ARN adecuado. Se utilizan cebadores oligonucleótidos degenerados con un kit de RT-PCR simple adecuado. El cebador directo 5'-GAY-TGG-ACI-MGI-TAY-GAY-GGI-ACI-ATI-CC-3' y el cebador inverso 5'-YTT-IAC-CCA-CAT-ICC-RAA-3' amplifican un fragmento de unos 434 nt, que corresponde a los nucleótidos 3799 a 4233 del genoma G4260 (número de acceso: AB033998). Las condiciones para la RT-PCR fueron una desnaturalización inicial, 94°C durante 5 minutos, y después 45 ciclos de desnaturalización, 94°C durante 1 minuto; hibridación, 45°C durante 1 minuto; y extensión, 72°C durante 90 segundos seguidos de un paso de extensión final, 72°C durante 5 minutos. Se examina el producto amplificado mediante electroforesis en un gel de agarosa al 1%, se trata con tinción para ácido nucleico y se visualiza mediante transiluminación con luz ultravioleta o azul. Debe realizarse una secuenciación y una comparación de la secuencia con secuencias de ORF1b de otros astrovirus.

1.3. VHP tipo III (AstVP-2)

El AstVP-2 se puede aislar a partir de suspensiones homogeneizadas de hígado y es resistente al tratamiento con cloroformo al 5%. El virus se puede aislar:

- i) Inoculando la cepa en la membrana corioalantoidea (CAM) de huevos embrionados de pato de 10 días de edad. La respuesta es imprevisible, pero siempre se dan algunas muertes de embriones a los 7–10 días. Las membranas adoptan un aspecto seco y crujiente, debajo del cual son edematosas. Los embriones pueden presentar un retraso del crecimiento y edema con hemorragias en la piel. El hígado, riñones y bazo están aumentados de tamaño.

Los intentos para cultivar el virus en huevos de gallina no han tenido éxito.

Los intentos de inducir un ECP con el virus en cultivos de tejidos no han tenido éxito, pero el virus ha sido detectado mediante inmunofluorescencia directa en cultivos de monocapa de células DEL y riñón de embrión de pato (DEK) infectadas experimentalmente (1979).

1.3.1. Caracterización molecular

Ahora se ha identificado el VHP tipo III como astrovirus (AstVP-2) mediante datos de la secuencia del ácido nucleico. Se considera claramente distinto del VHP tipo II (AstVP-1) (Todd *et al.*, 2009). Para identificar el AstVP-2 se puede emplear tanto la RT-PCR como el método de molecular de secuenciación descritos para la detección del AstVP-1 (Todd *et al.*, 2009).

2. Pruebas serológicas

Estas pruebas de detección de anticuerpos no resultan útiles para el diagnóstico, puesto que la enfermedad es demasiado aguda como para que pueda detectarse a tiempo. Las pruebas serológicas sí resultan útiles para la identificación del virus, los estudios epidemiológicos y la titulación de la respuesta de anticuerpos frente a la vacunación. Un estudio comparativo en el que se ha evaluado la neutralización del virus, el enzoinmunoanálisis (ELISA) y la inmunodifusión en gel de agar (AGID) para la detección del VHPA-1 indica que la VN y el ELISA tiene una sensibilidad comparable, pero que la sensibilidad de la AGID es muy baja (Zhao *et al.*, 1991). Se ha descrito un VP1-ELISA en el que se utiliza la VP1 del VHPA-1 como antígeno de recubrimiento para la detección de anticuerpos contra el VHPA-1 en el suero. En comparación con la VN, el VP1-ELISA presentó una especificidad y una sensibilidad del 92,5% y del 96,7%, respectivamente (Liu *et al.*, 2010). El nivel de anticuerpos detectables tras una exposición al AstVP-1 fue bajo. Aunque se ha creado un ELISA indirecto en el que se expresa la proteína C-terminal del ORF2 del AstVP-1, no se conocen exactamente ni la sensibilidad ni la especificidad de esta prueba.

2.1. ELISA para la detección del VHPA-1 (procedimiento extraído de Zhao et al. 1991)

Se añaden 100 µl de antígeno de recubrimiento diluido en solución salina tamponada con ácido carbónico (0,5 M, pH 9,6) a cada pocillo de una placa de ELISA. Se incuba la placa durante una noche a 4°C. Se lava la placa tres veces con PBS 0,01 M (pH 7,4) que contenga Tween-20 (PBST) al 0,05%. Se añaden 100 µl de cada suero problema diluido en PBST que contenga albúmina sérica bovina (PBST-BSA) al 0,1% a pocillos por duplicado de la placa sensibilizada. Se incuba durante 2 horas a 37°C en una cámara húmeda. Se lava la placa como se ha descrito arriba. Se añaden a cada pocillo 100 µl de anticuerpos anti IgG de pato generados en conejo, conjugados a HRP y diluidos en PBST-BSA. Se incuba durante 2 horas a 37°C. Se lava la placa como se ha descrito arriba. A cada pocillo se añaden 100 µl de solución sustrato (24,3 ml de ácido cítrico 0,1 M + 25,7 ml de fosfato 0,2 M + 50 ml de agua destilada, se mezcla y se añaden 40 mg de base sin o-fenilendiamina o dihidrocloruro, así como 40 µl de H₂O₂ al 30%, y se usa de inmediato). Pasados 30 minutos, se añaden 25 µl de H₂SO₄ 2,5 M a cada pocillo. Pueden emplearse otros cromógenos si se utiliza el diluyente adecuado y los sistemas de detección apropiados.

2.2. Neutralización del virus

Tanto el VHPA como los AstVP-1 y AstVP-2 se han utilizado en pruebas de VN *in ovo*, pero su éxito depende de la expresión del virus en el sistema analítico utilizado; con AstVP-1 y AstVP-2 esto puede ser un problema. Se han desarrollado pruebas *in-vitro* para el VHPA-1; incluyen una prueba de reducción de placa y una prueba de microtitulación (Woolcock, 1986; 1991). La prueba de reducción de placa se puede realizar utilizando cultivos primarios de células DEK o bien DEL. Se preparan cultivos monocapa de células primarias en medio mínimo esencial de Eagle (MEM) que contenga suero bovino fetal (FCS) al 5–10%, glutamina 2mM, 0.17% de bicarbonato sódico y gentamicina. Se siembran células tripsinizadas en placas de Petri de 5 cm de diámetro, y a continuación se incuban a 37°C en una atmósfera de CO₂ al 5%. Las monocapas deben estar casi confluentes a las 24–48 horas post-siembra. Las monocapas se lavan dos veces con MEM libre de suero o solución salina equilibrada de Hank para eliminar todo residuo de FCS antes de infectar con el VHPA-1. Se mezclan volúmenes iguales de VHPA-1 suspendido en MEM libre de suero y ajustado a 200 unidades formadoras de placa (UFP) por 0,1 ml con volúmenes iguales de diluciones seriadas de sueros de pato (diluciones a la mitad en MEM). Las muestras de suero deben inactivarse a 56°C durante 30 minutos antes de analizarse. Las mezclas de virus/suero se incuban a 37°C durante 1 hora; a continuación, se añaden alícuotas de 0,1 ml a las monocapas de células confluentes, a razón de tres placas por dilución. Las placas se dejan durante 30 minutos a temperatura ambiente (20–22°C), y entonces se recubren con medio de mantenimiento con agarosa (MEM que contiene suero de pollo al 2% y 0,1–0,2% de FCS al que se ha añadido agarosa hasta una concentración final del 1% p/v). Después, las placas se incuban a 37°C en una atmósfera de CO₂ al 5%. Se registra el número de

placas que hayan aparecido después de una incubación de 48 horas. Las placas pueden observarse utilizando una fuente de luz indirecta, o bien pueden fijarse las monocapas con solución salina tamponada con formol al 10% y teñida con violeta cristal al 1%. Los títulos séricos del anticuerpo se expresan como el inverso de la dilución más alta de suero que reduce el recuento de placas en un 50%.

Se puede llevar a cabo un ensayo de neutralización por microtitulación empleando cultivos primarios de células DEK. De cada muestra de suero (inactivado por calor) se preparan diluciones seriadas a la mitad en 50 µl de medio basal de Eagle (BME) libre de suero en placas de microtitulación. Se añaden a cada pocillo aproximadamente $10^{2,0 \text{ DIC}}_{50}$ (dosis infectiva 50% en cultivo celular) de VHPA-1 en 50 µl de BME, y se deja que reaccionen las mezclas a 37°C durante 1 hora. Se resuspenden las células del cultivo primario de DEK en BME suplementado con un 10% de caldo de triptosa fosfato, 2 mM de glutamina, un 0,17% de bicarbonato sódico y un 2–4% de suero de pollo, y se ajustan para contener 3×10^5 células/ml. Se añaden las células a las placas a razón de 100 µl por pocillo, y las placas se incuban hasta 96 horas a 37°C en una atmósfera humidificada con un 5% de CO₂. Después de la incubación, se fijan las células con solución salina tamponada con formol al 10% y se tiñen con cristal violeta al 1%. A continuación, se leen las placas macroscópicamente. El título de actividad neutralizante del virus se expresa como el inverso de la dilución más alta del suero a la cual crece una monocapa, es decir, a la que no hay indicios de ECP y, por tanto, ha tenido lugar una neutralización completa del virus. Un título de menos de log₂4 se considera negativo.

Estas pruebas de neutralización se han usado para comprobar las respuestas inmunitarias humorales frente a la vacunación y para estudios epidemiológicos, así como para la identificación del virus.

C. REQUISITOS PARA LAS VACUNAS

1. Antecedentes

Las directrices de producción de vacunas veterinarias se describen en el capítulo 1.1.8. *Principios de producción de vacunas veterinarias*. Las directrices que se muestran aquí y en el capítulo 1.1.8. pretenden ser de carácter general y pueden completarse mediante requisitos nacionales o regionales.

1.1. Fundamentos y uso previsto del producto

El VHPA-1 puede controlarse mediante el uso de una vacuna vírica viva atenuada. Se administra a los patos reproductores de manera que la inmunidad se transmite a través de la yema a las aves recién salidas del huevo. Para inmunizar activamente patitos recién salidos del huevo susceptibles al VHPA-1 también puede utilizarse vacuna vírica viva (Crighton & Woolcock, 1978). También es eficaz una vacuna inactivada de VHPA-1 cuando se administra a patos reproductores que han sido sensibilizados con la vacuna viva o expuestos previamente en el ambiente al VHPA-1; la descendencia de estos reproductores recibe inmunidad por vía materna (Woolcock, 1991). Los patos también pueden ser protegidos pasivamente mediante la inoculación de anticuerpos en yema de huevo de pollo.

Se ha descrito el desarrollo y evaluación de una vacuna para la protección de patitos contra el VHPA-3, en Corea (Kim *et al.*, 2009). Los métodos que se utilizan son comparables a los descritos en este texto para el VHPA-1.

Se ha utilizado una vacuna viva de virus VHP de tipo II (AstVP-1) para proteger a los patitos únicamente en condiciones experimentales (Gough *et al.*, 1985).

Se han controlado infecciones por AstVP-2 mediante el uso de vacunas de virus vivos atenuados administradas a patos reproductores, de forma que la inmunidad se transfiere a través de la yema a los patitos que salen del huevo.

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

2.1. Características del inóculo

2.1.1. Características biológicas

El inóculo para la vacuna VHPA-1 más utilizado en Europa deriva de una cepa que se ha pasado por huevos embrionados de pollo 53 a 55 veces; el inóculo vacunal a base de VHPA-1 empleado en EE.UU. para vacunas vivas e inactivadas se ha pasado 84 a 89 veces.

El inóculo para vacuna AstVP-1 se originó a partir de una cepa atenuada mediante 25 pases seriados por huevos de pollo embrionados (Asplin, 1965), y ha sido utilizado experimentalmente sólo en condiciones de campo (R.E. Gough, comunicación personal).

El inóculo para vacuna AstVP-2 ha sido atenuado mediante 30 pases seriados por huevos embrionados de pato inoculados vía CAM.

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

Todos los virus utilizados como inóculo deben encontrarse libres de virus externos que sean patógenos para los patos, pollos o pavos. Los inóculos deben encontrarse libres de toda contaminación microbiológica y fúngica

La identidad del tipo de virus debe ser confirmada mediante prueba de NV realizada con antisuero específico mediante método de suero constante y virus variable. En el caso de los VHPA-1 y AstVP-1, la prueba se realiza en huevos embrionados de pollo; con AstVP-2, la prueba se realiza con huevos embrionados de pato. El antisuero debe reducir el título de virus en cuestión en por lo menos $10^{2,0}$ DLE₅₀ (dosis letal 50% en embrión).

2.2. Método de producción

2.2.1. Procedimiento

El VHPA-1 y el AstVP-1 se manejan de forma similar. La vacuna se produce en huevos embrionados de pollo SPF de 9–10 días de edad inoculados a través de la vía alantoidea e incubados a 37°C. La mayoría de las muertes de los embriones tienen lugar en un plazo de 2 a 3 días en el caso del VHPA-1, pero con el AstVP-1, las muertes no tienen lugar hasta 6–10 días después de la inoculación, aunque se recogen a los 3–5 días para obtener un máximo rendimiento de virus. Los embriones recogidos se homogeneizan en solución salina tamponada y se clarifican mediante una centrifugación a baja velocidad. La preparación se diluye adecuadamente y se dispensa en viales que preferiblemente se congelan rápidamente a –70°C o a menor temperatura. Posteriormente se pueden almacenar de manera satisfactoria a entre –20 y –40 °C. La vacuna atenuada de VHPA-1 también se encuentra disponible como una preparación liofilizada que puede almacenarse a 2–8°C. La vacuna reconstituida se puede utilizar con o sin la incorporación de hidróxido de aluminio en el diluyente.

En el caso de la vacuna inactivada de VHPA-1, los embriones recogidos se homogeneizan y clarifican mediante centrifugación a baja velocidad y posteriormente se purifican mediante tratamiento con cloroformo (concentración final del 10% [v/v]). A continuación, esta preparación se inactiva con etilenimina binaria (BEI) recién preparada. Después, el virus inactivado se mezcla con un adyuvante adecuado; y como conservante, se añade un 0,2% (v/v) de formalina (Woolcock, 1991).

La vacuna de AstVP-2 se prepara en huevos de pato SPF de 10 días de edad inoculados a través de la CAM con AstVP-2 atenuado, e incubados a 37°C. La mayoría de las muertes de los embriones tienen lugar en un plazo de entre 6 y 10 días. Los huevos que contienen los embriones muertos junto con sus CAM se recogen y homogeneizan en solución salina tamponada y se clarifican mediante centrifugación a baja velocidad. La preparación se diluye adecuadamente y se dispensa en viales que preferiblemente se congelan rápidamente a –70°C o a menor temperatura.

2.2.2. Anticuerpo en yema de huevo

El VHPA-1 virulento preparado a partir de hígados de patitos o el virus atenuado se puede utilizar para hiperinmunizar pollos SPF con vistas a la producción de anticuerpo en yema de huevo. Se recogen huevos de las aves hiperinmunizadas y se guardan a 4°C hasta el momento

de la producción. Se separan las yemas, se juntan y se mezclan con un agente antiespumante. La mezcla se diluye con solución salina tamponada que contenga no más de un 0,2% (v/v) de formalina como conservante. El producto dispensado se guarda a 4°C y tiene un periodo de validez de 1 año. Las pruebas de esterilidad se llevan a cabo de forma habitual para garantizar la ausencia de contaminantes.

2.2.3. Requisitos para los sustratos y los medios

Todos los reactivos deben ser estériles y los huevos deben proceder de una fuente libre de patógenos específicos

2.2.4. Controles durante el proceso

Todo embrión muerto en un plazo de 24 horas tras la inoculación debe ser desechado por muerte inespecífica.

2.2.5. Pruebas en los lotes de producto final

i) Esterilidad y pureza

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

ii) Inocuidad

Se debe inocular un grupo de patitos de 1–3 días de edad susceptibles al virus en cuestión por vía subcutánea o intramuscular (en el caso de VHPA-1 y de AstVP-1), o por vía subcutánea (en el caso de AstVP-2) con la vacuna atenuada a diez veces la dosis recomendada, y a continuación se deben mantener en observación durante 10 a 21 días por si apareciese alguna reacción adversa. Las vacunas vivas atenuadas deben ser estables y no revertir a virulentas en pases inversos en patitos susceptibles.

Se realiza una prueba de inocuidad con la vacuna inactivada de VHPA-1 inoculando la dosis recomendada (0,5 ml) por vía intramuscular a un grupo de patitos de un día de edad; durante el periodo de comprobación no deberían observarse efectos adversos.

Las pruebas de inocuidad con anticuerpos en yema de huevo se realizan inoculando por vía subcutánea 1 ml en cada uno de los patitos de un grupo, los cuales se mantienen en observación durante 3 días para comprobar si presentan signos de efectos adversos.

iii) Potencia del lote

Para los virus VHPA-1 y AstVP-1, el título vírico de la vacuna debe determinarse en huevos embrionados de pollo de 9–10 días de edad inoculados en la cavidad alantoidea e incubados a 37°C. La inmunogenicidad de la vacuna para los patitos susceptibles a los virus VHPA-1 y AstVP-1 se puede valorar inoculando por vía subcutánea un mínimo de $10^{3.3}$ DL₅₀ de virus vacunal por patito y exponiendo las aves por vía subcutánea 72 horas después a $10^{3.0}$ DL₅₀ por patito de virus virulento VHPA-1 y AstVP-1 (Crighton & Woolcock, 1978). Al menos debería sobrevivir un 80% de las aves vacunadas y, en el caso del VHPA-1, deberían morir al menos un 80% de los controles; en el caso del AstVP-1, es más realista una mortalidad del 20% de los controles.

La inmunogenicidad de la vacuna inactivada se considera satisfactoria si se puede demostrar un incremento de cuatro veces o más en el título de anticuerpos neutralizantes después de la administración a patitos que han sido previamente sensibilizados con el VHPA-1 vivo y atenuado.

Para AstVP-2, el título de la vacuna debe determinarse en huevos embrionados de pato de 10 días de edad inoculados en la CAM. La pruebas de inmunogenicidad en patitos han mostrado ser difíciles debido a la patogenicidad variable del virus de desafío administrado a los patitos.

Los ensayos de potencia con anticuerpos en yema de huevo se realizan determinando el índice de neutralización (IN) para el producto en huevos embrionados de gallina utilizando el método yema de huevo constante/ virus variable. Se considera satisfactorio un IN mínimo de $10^{3.0}$. La eficacia del producto se determina inoculando un grupo de patitos susceptibles con la dosis recomendada de anticuerpo en yema de huevo. Se deja un segundo grupo sin tratar. Después de 24 horas, se inocula cada grupo con virus VHPA-1

virulento. El producto se declara eficaz si al menos sobreviven un 80% de los patitos tratados y mueren al menos un 80% de los controles.

2.3. Requisitos para la autorización

2.3.1. Requisitos de inocuidad

Se debe inocular un grupo de patitos de 1–3 días de edad susceptibles al virus en cuestión por vía subcutánea o intramuscular (en el caso de VHPA-1 y AstVP-1), o por vía subcutánea (en el caso de AstVP-2), con la vacuna atenuada a diez veces la dosis recomendada, y a continuación se deben mantener en observación durante 10 a 21 días por si apareciese alguna reacción adversa. Las vacunas vivas atenuadas deben ser estables y no revertir a virulentas en pases inversos en patitos susceptibles.

Se realiza una prueba de inocuidad con la vacuna inactivada de VHPA-1 inoculando la dosis recomendada (0,5 ml) por vía intramuscular a un grupo de patitos de un día de edad; durante el periodo de comprobación no deberían observarse efectos adversos.

Las pruebas de inocuidad con anticuerpos en yema de huevo se realizan inoculando por vía subcutánea 1 ml en cada uno de los patitos de un grupo, los cuales se mantienen en observación durante 3 días para comprobar si presentan signos de efectos adversos.

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

Las vacunas y la yema de huevo están destinadas solo a ser utilizadas para proteger patitos contra el VHP y para inmunizar patos reproductores para que los anticuerpos maternos puedan ser transferidos a la descendencia.

ii) Reversión a la virulencia en vacunas atenuadas/vivas

Se ha notificado reversión a la virulencia en pases seriados en patitos (Woolcock & Crighton, 1979; 1981).

iii) Consideraciones medioambientales

Ninguna.

2.3.2. Requisitos de eficacia

i) Para la producción animal

En el caso de patitos recién eclosionados, el VHPA-1 vivo atenuado se replica rápidamente y da lugar a inmunidad en un plazo de entre 48 y 72 horas tras la vacunación. Esta inmunidad persiste durante todo el periodo de validez (Crighton & Woolcock, 1978). Sin embargo, en patitos protegidos mediante vacunación de sus padres, el nivel de inmunidad derivada a través de la madre disminuye durante las 2 primeras semanas de vida, aunque dichos patitos pueden ser reinmunizados activamente con virus atenuado administrado subcutáneamente u oralmente alrededor de los 7–10 días de edad (Hanson & Tripathy, 1976; Tripathy & Hanson, 1986). Como alternativa, se puede potenciar la inmunidad administrando o bien suero hiperinmune específico o bien anticuerpos en yema de huevo preparados a partir de huevos puestos por gallinas hiperinmunizadas activamente contra el VHPA-1.

Los patos reproductores expuestos a VHPA-1 vivo a las 12 semanas de edad y a continuación vacunados por vía intramuscular con una dosis única de vacuna inactivada de VHPA-1 a las 18 semanas de edad deben producir descendencia con inmunidad materna a lo largo de todo un ciclo de puesta (Woolcock, 1991).

ii) Para el control y la erradicación

Los patos reproductores inoculados con una vacuna viva atenuada de VHPA-1 dos o tres veces cuando quedan 12, 8 y 4 semanas para entrar en puesta, y los patos reproductores inoculados con una vacuna viva atenuada del AstVP-2 dos veces cuando quedan 12 y 4 para entrar puesta, deben producir una descendencia que goce de inmunidad pasiva a lo largo de toda la estación reproductiva. Sin embargo, por lo general se recomienda revacunar cada 3 meses con la vacuna VHPA-1 y cada 6 meses con la vacuna AstVP-2 después del comienzo de la puesta. La vacuna atenuada de VHPA-1 también puede suministrarse como una preparación liofilizada que, justo antes de la administración, se

mezcla con un diluyente que contiene hidróxido de aluminio. Esta se administra a las 7 semanas de edad, y le sigue una segunda dosis 2 semanas antes del comienzo de la puesta. Este método debería proporcionar inmunidad materna a la descendencia a lo largo de un ciclo completo de puesta. No se dispone de información sobre el uso de la vacuna de AstVP-1 en los patos reproductores.

La vacuna viva atenuada de VHPA-1 o de AstVP-1 administrada por vía subcutánea o intramuscular a patitos de 1 día de edad protege frente a la enfermedad mientras dura la susceptibilidad. No se dispone de información sobre el uso de la vacuna de VHP de tipo III para inmunizar activamente patitos de 1 día de edad.

Los patos reproductores expuestos a VHPA-1 vivo a las 12 semanas de edad y a continuación vacunados por vía intramuscular con una dosis única de vacuna inactivada de VHPA-1 a las 18 semanas de edad deben producir descendencia con inmunidad materna a lo largo de todo un ciclo de puesta (Woolcock, 1991).

El anticuerpo en yema de huevo ofrece inmunización pasiva frente a un brote. La duración de su eficacia es efímera.

2.3.3. Estabilidad

Las preparaciones acuosas de las vacunas vivas atenuadas de VHPA-1, AstVP-1 y AstVP-2 deben permanecer estables durante al menos 1 año cuando se almacenan congeladas a -70°C o a menor temperatura. Una vez descongeladas, estas vacunas deben mantenerse a 4°C y usarse en una semana. Las vacunas vivas liofilizadas pueden almacenarse a $2-8^{\circ}\text{C}$ y deben retener su potencia durante al menos 1 año.

La vacuna inactivada de VHPA-1 se mezcla con un adyuvante y puede conservarse a 4°C durante al menos 20 meses sin pérdida de inmunogenicidad.

Los anticuerpos en yema de huevo pueden guardarse durante 1 año a 4°C .

3. Vacunas desarrolladas mediante ingeniería genética

En la actualidad, no es aplicable.

BIBLIOGRAFÍA

- ANCHUN C., MINGSHU W., HONGYI X., DEKANG Z., XINRAN L., HAIJUN C., RENYONG J. & MIAO Y. (2009). Development and application of a reverse transcriptase polymerase chain reaction to detect chinese isolates of duck hepatitis virus type 1. *J. Microbiol. Methods*, **77**, 332–336.
- ASPLIN F.D. (1965). Duck hepatitis. Vaccination against two serological types. *Vet. Rec.*, **77**, 1529–1530.
- BAXENDALE W. & MEBATSION T. (2004). The isolation and characterization of Astroviruses from chickens. *Avian Pathol.*, **33**, 364–370.
- CHALMERS W.S. & WOOLCOCK P.R. (1984). The effect of animal sera on duck hepatitis virus. *Avian Pathol.*, **13**, 727–732.
- CHEN L., XU Q., ZHANG R., LI J., XIE Z., WANG Y., ZHU Y. & JIANG S. (2012). Complete genome sequence of a duck Astrovirus discovered in eastern China. *J. Virol.*, **86**, 13833–13834.
- CRIGHTON G.W. & WOOLCOCK P.R. (1978). Active immunisation of ducklings against duck virus hepatitis. *Vet. Rec.*, **102**, 358–361.
- DING C. & ZHANG D. (2007). Molecular analysis of duck hepatitis virus type 1. *Virology*, **361**, 9–17.
- FU Y., PAN M., WANG X., XU Y., YANG H. & ZHANG D. (2008). Molecular detection and typing of duck hepatitis A virus directly from clinical specimens. *Vet. Microbiol.*, **131**, 247–257.
- GOUGH R.E., BORLAND E.D., KEYMER I.F. & STUART J.C. (1985). An outbreak of duck hepatitis type II in commercial ducks. *Avian Pathol.*, **14**, 227–236.

- GUERIN J.-L., ALBARIC O., NOUTARY V. & BOISSIEU C. (2007). A duck hepatitis virus type I is agent of pancreatitis and encephalitis in Muscovy duckling. *In: Proceedings of the 147th American Veterinary Medicine Association/50th American Association of Avian Pathologists Conference*, 14–18 July 2007, Washington, DC, USA, Abs 4585.
- HAIDER S.A. & CALNEK B.W. (1979). *In-vitro* isolation, propagation and characterisation of duck hepatitis virus type III. *Avian Dis.*, **23**, 715–729.
- HANSON L.E. & TRIPATHY D.N. (1976). Oral immunisation of ducklings with an attenuated hepatitis virus. *Dev. Biol. Stand.*, **33**, 357–363.
- JIN X., ZHANG W., ZHANG W., GU C., CHENG G. & HU X. (2008). Identification and molecular analysis of the highly pathogenic duck hepatitis virus type 1 in Hubei Province of China. *Res. Vet. Sci.*, **85**, 595–598.
- KIM M.-C., KIM M.-J., KWON Y.-K., LINDBERG A.M., JOH S.J., KWON H.-M., LEE Y.-J. & KWON J.H. (2009). Development of duck hepatitis A virus type 3 vaccine and its use to protect ducklings against infections. *Vaccine*, **27**, 6688–6694.
- KIM M.C., KWON Y.K., JOH S.J., KIM S.J., TOLF C., KIM J.H., SUNG H.W., LINDBERG A.M. & KWON J.H. (2007a). Recent Korean isolates of duck hepatitis virus reveal the presence of a new geno- and serotype when compared to duck hepatitis virus type 1 type strains. *Arch. Virol.*, **152**, 2059–2072.
- KIM M.C., KWON Y.K., JOH S.J., KWON J.H., KIM J.H. & KIM S.J. (2007b). Development of one-step reverse transcriptase-polymerase chain reaction to detect duck hepatitis virus type 1. *Avian Dis.*, **51**, 540–545.
- KIM M.C., KWON Y.K., JOH S.J., KWON J.H. & LINDBERG A.M. (2008). Differential diagnosis between type-specific duck hepatitis virus type 1 (DHV-1) and Korean DHV-1-like isolates using a multiplex polymerase chain reaction. *Avian Pathol.*, **37**, 171–177.
- KIM M.C., KWON Y.K., JOH S.J., LINDBERG A.M., KWON J.H., KIM J.H. & KIM S.J. (2006). Molecular analysis of duck hepatitis virus type 1 reveals a novel lineage close to the genus *Parechovirus* in the family *Picornaviridae*. *J. Gen. Virol.*, **87**, 3307–3316.
- KOCI M.D. & SCHULTZ-CHERRY S. (2002). Avian astroviruses. *Avian Pathol.*, **31**, 213–227.
- LIU G., WANG F., NI Z., YUN T., YU B., HUANG J. & CHEN J. (2008). Genetic diversity of the VP1 gene of duck hepatitis virus type I (DHV-I) isolates from Southeast China is related to isolate attenuation. *Virus Res.*, **137**, 137–141.
- LIU M., ZHANG T., ZHANG Y., MENG F., LI X., HOU Z., FENG X. & KONG X. (2010). Development and evaluation of a VP1-ELISA for detection of antibodies to duck hepatitis type 1 virus. *J. Virol. Methods*, **169**, 66–69.
- SANDHU T.S., CALNEK B.W. & ZEMAN L. (1992). Pathologic and serologic characterisation of a variant of duck hepatitis type I virus. *Avian Dis.*, **36**, 932–936.
- TODD D., SMYTH V.J., BALL N.W., DONNELLY B.M., WYLIE M., KNOWLES N.J. & ADAIR B.M. (2009). Identification of chicken enterovirus-like viruses, duck hepatitis virus type 2 and duck hepatitis virus type 3 as Astroviruses. *Avian Pathol.*, **38**, 21–30.
- TOTH T.E. (1969). Studies of an agent causing mortality among ducklings immune to duck virus hepatitis. *Avian Dis.*, **13**, 834–846.
- TRIPATHY D.N. & HANSON L.E. (1986). Impact of oral immunisation against duck viral hepatitis in passively immune ducklings. *Prev. Vet. Med.*, **4**, 355–360.
- TSENG C.H. & TSAI H.J. (2007). Molecular characterization of a new serotype of duck hepatitis virus. *Virus Res.*, **126**, 19–31.
- WANG L., PAN M., FU Y. & ZHANG D. (2008). Classification of duck hepatitis virus into three genotypes based on molecular evolutionary analysis. *Virus Genes*, **37**, 52–59.
- WOOLCOCK P.R. (1986). An assay for duck hepatitis virus type I in duck embryo liver cells and a comparison with other assays. *Avian Pathol.*, **15**, 75–82.
- WOOLCOCK P.R. (1991). Duck hepatitis virus type I: Studies with inactivated vaccines in breeder ducks. *Avian Pathol.*, **20**, 509–522.

WOOLCOCK P.R. (2008a). Duck hepatitis. *In: Diseases of Poultry*, 12th Edition, Saif Y.M., Fadly A.M., Glisson J.R., Mcdougald L.R., Nolan L.K. & Swayne D.E., eds. Blackwell Publishing, 373–384.

WOOLCOCK P.R. (2008b). Duck hepatitis. *In: A Laboratory Manual for the Isolation, Identification and Characterization of Avian Pathogens*, 5th Edition, Dufour-Zavala L., Swayne D.E., Glisson J.R., Pearson J.E., Reed W.M., Jackwood M.W. & Woolcock P.R., eds. American Association of Avian Pathologists, Jacksonville, Florida, USA, 175-178.

WOOLCOCK P.R. & CRIGHTON G.W. (1979). Duck virus hepatitis: serial passage of attenuated virus in ducklings. *Vet. Rec.*, **105**, 30–32.

WOOLCOCK P.R. & CRIGHTON G.W. (1981). Duck virus hepatitis: the effect of attenuation on virus stability in ducklings. *Avian Pathol.*, **10**, 113–119.

YANG M., CHENG A., WANG M. & XING H. (2008). Development and application of a one-step real-time taqman RT-PCR assay for detection of Duck hepatitis virus type1. *J. Virol. Methods*, **153**, 55–60.

ZHAO X.L., PHILLIPS R.M., LI G.D. & ZHONG A.Q. (1991). Studies on the detection of antibody to duck hepatitis virus by enzyme-linked immunosorbent assay. *Avian Dis.*, **35**, 778–782.

*
* *

NB: ADOPTADO POR PRIMERA VEZ EN 1989: ÚLTIMAS ACTUALIZACIONES ADOPTADAS EN 2017.