

VIRUELA AVIAR

RESUMEN

Descripción de la enfermedad: La viruela aviar es una enfermedad de los pollos y los pavos causada por un virus con ADN del género *Avipoxvirus*, de la familia *Poxviridae*. Su distribución es mundial. Es una enfermedad de dispersión lenta que se caracteriza por formar lesiones proliferativas y costras en la piel, y lesiones de tipo diftérico en la porción superior de los tractos digestivo y respiratorio. Por lo general, en el caso de la forma cutánea, la tasa de mortalidad es baja y las aves afectadas tienen una mayor probabilidad de recuperarse que las afectadas por la forma diftérica. En la forma diftérica, las lesiones proliferativas en los conductos nasales, y en la laringe y la tráquea, pueden causar dificultades respiratorias y la muerte por asfixia.

La viruela aviar causa una disminución transitoria de la producción de huevos y una ralentización del crecimiento de los pollos jóvenes.

Identificación del agente: Cuando aparecen erupciones en la piel de zonas descubiertas, debe sospecharse que se trata de la viruela aviar. El examen histológico de las lesiones cutáneas o diftéricas revela una hiperplasia epitelial con inclusiones intracitoplásmicas en las células afectadas. En los frotis de las lesiones se pueden detectar cuerpos elementales utilizando el método de Giménez. Mediante la tinción negativa o los cortes ultrafinos de la lesión, en la microscopía electrónica, se detectan partículas víricas con la morfología característica de los *poxvirus*.

La forma diftérica de la viruela aviar, con efectos sobre la tráquea, debe diferenciarse de la laringotraqueítis, que está causada por un herpesvirus y que se caracteriza por la presencia de cuerpos de inclusión intranucleares.

El aislamiento del virus se realiza por inoculación en membranas corioalantoideas de embriones de pollo de 9–12 días de desarrollo, o en cultivo de células aviarias. Para el aislamiento del virus deben emplearse huevos de parradas libres de patógenos específicos.

Pruebas serológicas: Se pueden demostrar respuestas inmunitarias a la viruela aviar mediante pruebas de neutralización vírica, inmunodifusión en gel de agar, inmunofluorescencia, hemaglutinación pasiva, enzimoimmunoanálisis o inmunoelectrotransferencia.

Requisitos para las vacunas: Se han comercializado vacunas vivas modificadas de viruela aviar o viruela de las palomas obtenidas en embrión de pollo o en cultivo de células aviarias. El uso de las vacunas está recomendado en las áreas endémicas de la enfermedad o en los lugares en que se ha diagnosticado una infección.

A. INTRODUCCIÓN

La morfología del virus de la viruela aviar es idéntica a la de los otros virus de la familia *Poxviridae*. El virus maduro (cuerpo elemental) tiene forma de ladrillo y mide aproximadamente 330 × 280 × 200 nm. La cubierta externa consta de distribuciones aleatorias de túbulos superficiales. El virión consta de un centro o nucleóide bicóncavo centralizado y denso a los electrones con dos cuerpos laterales en cada concavidad y rodeados por una envuelta. El genoma del virus de la viruela aviar de 288 kpb codifica más de 250 genes.

La viruela aviar tiene una distribución mundial y está causada por un virus de ADN del género *Avipoxvirus* de la familia *Poxviridae* (Tripathy, 1993; Tripathy y Reed, 2013). Su incidencia es variable en áreas diferentes debido a las diferencias climáticas, de manejo y de higiene, o a la práctica de una vacunación regular. La enfermedad puede originar una disminución de la puesta de huevos o un retraso en el crecimiento de los pollos más jóvenes.

La viruela aviar es una enfermedad vírica de pollos y pavos de difusión lenta, que en la forma cutánea (viruela seca) se caracteriza por la aparición de lesiones proliferativas, que varían de pequeños nódulos a alteraciones rugosas sobre la piel de la cresta, barbillas y otras áreas sin plumas. En la forma diftérica (viruela húmeda), se desarrollan en las mucosas nódulos opacos blancos, ligeramente elevados, cuyo tamaño aumenta con rapidez hasta formar una membrana diftérica amarillenta. Las lesiones se presentan en las mucosas de la boca, esófago, laringe o tráquea. La tasa de mortalidad es mayor en la forma diftérica que en la cutánea, alcanzando a veces el 50% (19), sobre todo en las aves jóvenes. En el genoma del virus de la viruela aviar se ha observado la integración de secuencias del virus de la reticuloendoteliosis (REV) (Singh *et al.*, 2000; 2003b). Es interesante que este caso de inserción ocurriera hace más de 50 años (Kim y Tripathy, 2001). Mientras que la mayoría de las cepas naturales del virus de la viruela aviar contienen el provirus del REV, las cepas vacunales solo tienen residuos de las largas repeticiones terminales (Singh *et al.*, 2003b). La virulencia de las cepas naturales del virus de la viruela aviar aumenta con la presencia del provirus del REV en el genoma. Se ha secuenciado por completo el genoma de una cepa similar a la cepa vacunal del virus de la viruela aviar (Afonso *et al.*, 2000). Actualmente se ignora cuáles son las funciones de la mayor parte de los genes. Sin embargo resulta interesante el hecho de que el virus tiende a persistir durante largos periodos de tiempo en un entorno de aves en el que otros virus no pueden sobrevivir. Parece ser que el gen de la fotoliasa y el gen con cuerpos de inclusión de tipo A del genoma vírico protegen al virus de las agresiones ambientales (Srinivasan *et al.*, 2001; Srinivasan y Tripathy, 2005). Se observa una reacción cruzada antigénica entre los virus de la viruela aviar y parece que muchos genes son preservados. Están disponibles varios estudios breves sobre la comparación del virus de la viruela de las aves de corral con otros virus de la viruela aviar, sobre todo los que infectan a las aves silvestres. Desde hace poco tiempo está disponible la secuenciación completa del genoma del virus de la viruela de los canarios.

B. TÉCNICAS DE DIAGNÓSTICO

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

Método	Propósito					
	Demostrar ausencia de infección en la población	Demostrar ausencia de infección en animales individuales antes de los desplazamientos	Contribuir a las políticas de erradicación	Confirmar casos clínicos	Determinar la prevalencia de la infección – vigilancia	Determinar el estado inmunitario en animales o poblaciones tras la vacunación
Identificación del agente¹						
Aislamiento del virus	–	+	–	+	–	–
PCR en tiempo real	–	+	–	+	–	–
Detección de respuesta inmunitaria						
AGID	–	–	–	–	–	++
ELISA	–	+	–	–	+	++
IFAT	–	–	–	+	–	–

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

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

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

ELISA = enzimoimmunoanálisis; IFAT = inmunofluorescencia indirecta.

1. Identificación del agente

El virus de la viruela aviar se multiplica en el citoplasma de las células epiteliales formando grandes cuerpos de inclusión intracitoplásmica (cuerpos de Bollinger) que contienen cuerpos elementales más pequeños (cuerpos de Borrel). Las inclusiones se pueden demostrar en los cortes de lesiones cutáneas y diftéricas utilizando tinción con hematoxilina y eosina (H&E), con naranja de acridina o con Giemsa (Tripathy *et al.*, 1973). Los cuerpos

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

elementales se pueden detectar en los frotis de lesiones, por ejemplo, por el método de Giménez (Tripathy y Hanson, 1976) que se describe más adelante. Se puede utilizar la microscopía electrónica para demostrar las partículas víricas con morfología típica de los poxvirus, mediante la tinción negativa o en cortes ultrafinos de tejidos infectados (Doane y Anderson, 1987).

1.1. Técnica de frotis para la viruela aviar

1.1.1. Procedimiento analítico

- i) Se coloca en un porta limpio una gota de agua destilada y la lesión (cutánea o diftérica). Se prepara un frotis fino presionando la lesión con otro porta limpio y rotando varias veces el porta superior.
- ii) Se seca al aire y se fija el frotis con cuidado a la llama.
- iii) Se tiñe el frotis durante 5–10 minutos con un colorante recién preparado (8 ml de solución stock² de fucsina básica mezclada con 10 ml de tampón fosfato³, pH 7,5, y filtrado por papel de filtro Whatman número 1).
- iv) Se lava cuidadosamente con agua del grifo.
- v) Se colorea para tinción de contraste con verde malaquita (0,8% en agua destilada) durante 30–60 segundos.
- vi) Se lava el frotis con agua del grifo y se seca a continuación.
- vii) Se examina el frotis con aceite de inmersión. Los cuerpos elementales aparecen rojos y de un tamaño aproximado de 0,2–0,3 µm.

1.2. Aislamiento del virus

El virus de la viruela aviar se puede aislar inoculando el material sospechoso en huevos embrionados o en cultivos celulares de origen aviar. Se inoculan en las membranas corioalantoideas (MCA) de embriones de pollo de 9–12 días de desarrollo o en un cultivo celular alrededor de 0,1 ml de suspensión del tejido cutáneo o de la lesión diftérica tratada con la concentración adecuada de antibióticos. Es aconsejable comprobar si el inóculo presenta algún tipo de contaminación inoculándolo en una placa de agar sangre y McConkey y examinando este cultivo después de 24 horas de incubación. Tras la inoculación de los embriones con la muestra libre de contaminación, los huevos se incuban a 37°C durante 5–7 días y después se examinan para comprobar si aparecen focos blancos de lesiones o un engrosamiento generalizado de las MCA. El examen histológico de las lesiones en la MCA revelará cuerpos de inclusión intracitoplásmicos y eosinófilos tras la tinción con H&E (Tripathy *et al.*, 1973; Tripathy y Reed, 2013).

Para propagar el virus de la viruela aviar, también pueden utilizarse fibroblastos primarios de embrión de pollo, células renales de embrión de pollo, células dérmicas de embrión de pollo o la línea celular permanente QT-35 de codorniz (Ghildyal *et al.*, 1989; Schnitzlein *et al.*, 1988). La adaptación de las cepas de virus a los cultivos celulares es un requisito importante para la formación de placas o calvas, y no todas las cepas formarán placas inicialmente.

1.3. Métodos moleculares

El análisis del polimorfismo de la longitud de los fragmentos de restricción (RFLP) puede utilizarse para comparar las cepas de campo con las cepas vacunales del virus de la viruela aviar (Ghildyal *et al.*, 1989; Schnitzlein *et al.*, 1988). Sin embargo, este procedimiento no se utiliza para el diagnóstico rutinario.

Los fragmentos genómicos clonados del virus de la viruela aviar se pueden emplear con eficacia como sondas de ácido nucleico para el diagnóstico. El ADN vírico aislado de lesiones puede detectarse por hibridación con sondas genómicas, marcadas radioactivamente o sin marcar. Este método es especialmente útil para diferenciar entre infecciones de viruela aviar y de laringotraqueítis cuando se presentan lesiones traqueales (Fatunmbi *et al.*, 1995).

-
- 2 Solución stock: Se añade lentamente una solución de fucsina básica (5 g) en etanol al 95% (100 ml) a una segunda solución de fenol cristalino (10 g) en agua destilada (900 ml). Esta solución stock se mantiene en una botella de cristal con tapón de rosca bien cerrada y se incuba durante 48 horas a 37°C; luego se conserva a temperatura ambiente.
 - 3 Tampón fosfato, pH 7,5: A 1 000 ml de agua destilada se añade NaH₂PO₄H₂O (2,47g) y Na₂HPO₄ (11,65 g) y se conserva a 4°C.

Las secuencias genómicas de ADN de varios tamaños se pueden ampliar utilizando cebadores específicos (Fallavena *et al.*, 2002; Lee y Lee, 1997) mediante la reacción en cadena de la polimerasa (PCR). Esta técnica es útil cuando solo se dispone de una cantidad muy pequeña de ADN vírico en la muestra. El ADN genómico aislado a partir de cortes de tejido fijados con formalina correspondientes a casos que han dado positivo para la viruela aviar (presencia de inclusiones citoplasmáticas) se puede emplear para la amplificación por PCR de fragmentos genómicos de tamaño específico.

2. Pruebas serológicas

Aunque en las infecciones por poxvirus tanto la inmunidad celular (IMC) como la inmunidad humoral desempeñan un papel importante, no resulta cómodo utilizar rutinariamente las pruebas de IMC. Por lo tanto, para medir la respuesta humoral específica se usan pruebas serológicas, como la neutralización vírica (NV), la inmunodifusión en gel de agar (AGID), la hemaglutinación pasiva y la inmunofluorescencia, así como enzimoanálisis. La inmunización favorable a partir de la vacuna se puede demostrar examinando una parvada a los 7–10 días de la vacunación para comprobar si presentan “tomas”. Una toma consiste en un abultamiento de la piel o una costra en el sitio de inoculación de la vacuna, y su presencia denota una buena inmunización.

2.1. Neutralización vírica

Después de la interacción entre el virus y el suero, la actividad de los virus residuales puede comprobarse en huevos embrionados o en cultivos celulares (Morita, 1973). Esta prueba es técnicamente exigente y puede no resultar cómoda para el diagnóstico de rutina. Solo unas cuantas cepas de virus tienen capacidad para formar placas en células de embrión de pollo. Los anticuerpos neutralizantes aparecen a las 1–2 semanas de la infección.

2.2. Inmunodifusión en gel de agar

Los anticuerpos precipitantes se pueden detectar haciendo reaccionar los sueros con los antígenos víricos. El antígeno puede derivar de lesiones de piel infectada o de lesiones de MCA después de la sonicación y homogenización, así como de los cultivos celulares infectados tratados como se describe más adelante en el apartado B.2.6. Se centrifuga la suspensión lisada y el sobrenadante se utiliza como antígeno. El medio de difusión se prepara con agar al 1%, cloruro sódico al 8% y tiomersol al 0,01%. El antígeno vírico se coloca en el pocillo central y los sueros problema en los pocillos periféricos. Es importante incluir un control de suero negativo y otro de suero positivo. Las placas se incuban a temperatura ambiente y las líneas de precipitación aparecen a las 24–48 horas de la incubación del antígeno con el anticuerpo contra cepas homólogas o estrechamente relacionadas. La prueba es menos sensible que el ELISA (Buscaglia *et al.*, 1985) o que la prueba de la hemaglutinación pasiva (Winterfield y Hitchner, 1965).

2.3. Hemaglutinación pasiva

Los eritrocitos de oveja o de caballo se sensibilizan con un antígeno parcialmente purificado de la viruela aviar (Tripathy *et al.*, 1970). El antígeno se prepara de las MCA infectadas o de células como se describe más adelante en la sección B.2.6. La hemaglutinación pasiva es más sensible que la AGID. La prueba origina reacciones cruzadas entre los poxvirus aviares.

2.4. Pruebas de inmunofluorescencia

Las pruebas de inmunofluorescencia directa o indirecta revelan una fluorescencia intracitoplásmica específica en las células infectadas. La prueba indirecta es de uso común y consta de dos pasos: el anticuerpo contra el virus de la viruela aviar reacciona primero con el antígeno en las células infectadas y después con un anticuerpo secundario marcado con isotiocianato de fluoresceína contra la gammaglobulina de pollo (por ejemplo, suero anti gammaglobulina de pollo obtenido en cabra). Estos anticuerpos marcados están comercializados. A este respecto, para pruebas con anticuerpos fluorescentes se pueden utilizar con eficacia los cortes de tejidos fijados con formalina.

2.5. Inmunoperoxidasa

La tinción específica de las inclusiones citoplásmicas es el resultado de la reacción de un anticuerpo policlonal específico contra la viruela aviar, que está conjugado con peroxidasa de rábano, y los cortes hidratados de tejidos (MCA o piel) o de cultivos fijados e infectados por viruela aviar. Se obtienen resultados similares cuando se utilizan anticuerpos policlonales o monoclonales en una prueba

indirecta. Una ventaja de la técnica es que los cortes se pueden observar por microscopía óptica y se pueden conservar durante mucho tiempo sin pérdida de color (Tripathy *et al.*, 1973).

2.6. Enzimoimmunoanálisis

Se han elaborado pruebas de ELISA para detectar anticuerpos humorales contra el virus de la viruela aviar. Son capaces de detectar anticuerpos 7–10 días después de la infección (Buscaglia *et al.*, 1985), pero estas pruebas todavía no se han comercializado.

Los antígenos del virus de la viruela aviar se preparan a partir de monocapas de células QT-35 infectadas, o de lesiones de MAC. Las células QT-35 infectadas se precipitan (700 **g** durante 10 minutos a 4°C), se lavan con tampón isotónico (Tris 10 mM, pH 8,0, NaCl 150 mM, etilendiaminotetraacético [EDTA] 5 mM), y se lisan en tampón hipotónico (Tris 10 mM, pH 8,0, KCl 10 mM, EDTA 5 mM) con Triton X-100 al 0,1% y beta-mercaptoetanol al 0,025%. Los núcleos y los restos celulares se eliminan por centrifugación a baja velocidad (500 **g** durante 5 minutos a 4°C) y el sobrenadante se utiliza como fuente de antígenos del virus de la viruela aviar para la ELISA o para la inmunoelectrotransferencia. Para aislar antígeno vírico de las lesiones de MCA, se necesita una dispersión inicial de las lesiones mediante tratamiento con detergentes como se describió anteriormente. También se ha empleado como antígeno el virus propagado en fibroblastos o en células dérmicas de embrión de pollo. La preparación del antígeno es como la descrita para las células QT-35.

Los pocillos de la placa de microtitulación se antigenizan con 1 µg de antígeno soluble vírico de la viruela aviar en 100 µl de tampón de recubrimiento (Na₂CO₃ 15 mM, NaHCO₃ 35 mM, pH 9,6) y se incuban durante toda la noche a 4°C (Buscaglia *et al.*, 1985; Tripathy *et al.*, 1973). Cada pocillo se lava después una vez con solución de lavado (NaCl 0,29 M, Tween 20 al 0,05%) y se bloquea con una solución salina tamponada con fosfato (PBS, pH 7,4), que contenga 3% de seroalbúmina bovina (BSA), durante 1 hora a 37°C. Después de un lavado, se añaden a los pocillos diluciones seriadas de los sueros problema en PBS con 1% de BSA. Tras agitar durante 2 horas a 37°C, los pocillos se lavan tres veces antes de añadir 100 µl/pocillo de anticuerpos anti IgY de pollo obtenidos en cabra conjugados con peroxidasa de rábano (H+L), a una dilución recomendada en PBS. Después de 2 horas de incubación a 37°C y tres lavados posteriores, se añaden a cada pocillo 100 µl del sustrato de la peroxidasa TBM³. Las reacciones se terminan por adición de ácido fosfórico 1 M y se registra la absorbancia a 450 nm utilizando un lector de placas ELISA.

2.7. Inmunoelectrotransferencia

Las variaciones antigénicas que tienen lugar entre las cepas del virus de la viruela aviar pueden determinarse por medio de inmunoelectrotransferencia. En este método, los antígenos se separan por SDS-PAGE (electroforesis en gel de poliacrilamida con dodecil sulfato sódico) y reaccionan con anticuerpos policlonales o monoclonales contra el virus de la viruela aviar (Ghildyal *et al.*, 1989; Singh *et al.*, 2003a; Singh y Tripathy, 2000). Este método no es conveniente para el diagnóstico rutinario.

C. REQUISITOS PARA LAS VACUNAS Y EL MATERIAL DE DIAGNÓSTICO

1. Antecedentes

Las directrices para la producción de vacunas veterinarias se presentan en el capítulo 1.1.8. *Principios de producción de vacunas veterinarias*. Las normas dadas aquí y en el capítulo 1.1.8 son de carácter general y pueden complementarse con requisitos nacionales o regionales, como por ejemplo, las directrices que proporciona el *Veterinary Services Memorandum* nº 800.50 del Servicio de Inspección de Sanidad Animal y Vegetal del Departamento de Agricultura de los Estados Unidos.

En la mayoría de laboratorios de productos biológicos que fabrican vacunas para aves se producen vacunas contra los virus de la viruela aviar y de la viruela de la paloma. Estas vacunas se utilizan en parvadas susceptibles en las que la enfermedad ha sido endémica o se ha diagnosticado en parvadas previas.

Debe tenerse en cuenta la inmunidad adquirida pasivamente durante la vacunación de la descendencia de parvadas que han sufrido una infección natural reciente o que se han vacunado recientemente. Como la inmunidad pasiva (durante 2–3 semanas) puede interferir con la multiplicación del virus vacunal, la descendencia solo debe vacunarse tras la disminución de los anticuerpos de adquisición pasiva. La vacuna contra la viruela aviar se aplica por el método de la punción en la membrana del ala.

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

2.1. Características del inóculo

Debe seguirse rigurosamente los procedimientos que se describen en el Capítulo 1.1.8. *Principios de producción de vacunas veterinarias* y en el Capítulo 1.1.9. *Pruebas de esterilidad y ausencia de contaminación en los materiales biológicos de uso veterinario*.

2.1.1. Características biológicas del inóculo primario

Las vacunas vivas contra el virus de la viruela aviar, tanto las que contienen el virus de la viruela aviar como el de la viruela de la paloma, se utilizan para la prevención de la viruela aviar en las aves de corral. El virus se propaga o bien en embriones de pollo libres de patógenos específicos (SPF) o bien en un cultivo celular de origen aviar. Debe establecerse un inóculo vírico primario (MSV) y emplearse en base a un sistema de lotes de siembra. Deben registrarse bien su origen, historial de pases y características.

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

El MSV debe propagarse en instalaciones adecuadas con materiales que cumplan con las normas aprobadas, y debe comprobarse que esté libre de contaminación, así como su identidad y pureza.

2.1.3. Validación como vacuna

i) Pureza

Antes de comprobar su pureza, el MSV se puede neutralizar con un suero hiperinmune específico. Debido a la dificultad de neutralizar el poxvirus aviar, se acepta tratar el MSV mediante centrifugación a 1 000 *g* durante 20 minutos y después filtrarlo a través de un filtro de 0,2 μm . El MSV neutralizado o filtrado se usa luego en las pruebas para demostrar la ausencia de agentes extraños. Estas pruebas deben realizarse en huevos embrionados o en cultivos celulares aviarios para demostrar la inexistencia de replicación vírica y en pollos SPF para demostrar la ausencia de anticuerpos frente a agentes extraños.

ii) Inocuidad

Las vacunas solo deben prepararse a partir de una cepa de virus estable y atenuada o de cepas naturales de baja virulencia.

Se debe comprobar que la vacuna es inocua por la vía de administración recomendada, que es por punción en la membrana del ala a aves susceptibles de todas las edades. Una prueba adecuada consiste en tomar 10 pollos SPF e inocular a cada uno pinchando la membrana del ala con una aguja impregnada de la vacuna. Las aves se observan durante 7–10 días para comprobar si presentan “tomas” y la ausencia de efectos adversos atribuibles a la vacuna. Una “toma” es un abultamiento de la piel o una costra en el sitio de aplicación de la vacuna e indica una vacunación adecuada. La prueba de inocuidad debe repetirse después de al menos seis pases seriados del virus en pollos SPF, para comprobar que no ha habido reversión a la virulencia.

iii) Eficacia

Deben obtenerse datos utilizando el nivel de pases más alto (el quinto pase desde el inóculo original) y el título más bajo de virus que se va a utilizar en el producto final: se proporciona una dosis de vacuna por el método recomendado a 20 pollos SPF de la edad mínima indicada para la vacunación. Estos pollos, junto con otros 20 no vacunados de la misma edad y origen, son inoculados con un desafío 3 semanas después mediante escarificación con una cepa virulenta del virus de la viruela aviar. Las aves se observan durante 3 semanas. El noventa por ciento de las aves control deben presentar lesiones debidas al virus de desafío y al menos el 90% de las aves vacunadas deben estar libres de tales lesiones.

2.2. Método de fabricación

2.2.1. Procedimiento

La vacuna se fabrica mediante un sistema de lotes de siembra a partir del MSV validado. Esto debe realizarse en instalaciones aprobadas y diseñadas para evitar el riesgo de contaminación. Todos los medios y los cultivos celulares deben probarse para asegurar la ausencia de contaminación.

2.2.2. Requisitos para los ingredientes

El MSV puede propagarse en embriones de pollo SPF empleando las MAC o en cultivos celulares aviares, como fibroblastos de embrión de pollo primarios, riñón de embrión de pollo o dermis de embrión de pollo.

2.2.3. Control durante el proceso

Durante el proceso de validación como vacuna, se deben comparar los datos de eficacia con el contenido del virus de la vacuna. Se puede establecer así una potencia adecuada. La vacuna debe dispensarse en los recipientes finales para asegurar que cada recipiente contiene virus suficiente para alcanzar la potencia especificada.

2.2.4. Pruebas en lotes de producto final

i) Esterilidad

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

ii) Identidad

Las pruebas de identidad deben demostrar que, cuando en un laboratorio se propagan varias cepas para vacunas multivalentes, no se encuentra presente ninguna otra cepa vacunal.

iii) Inocuidad

En cada lote de vacuna se debe aplicar la prueba de inocuidad que se describe en el apartado C.2.1.3, arriba, exceptuando el requisito de seis pases en pollos SPF.

iv) Potencia

Deben realizarse pruebas sobre el contenido vírico en al menos tres recipientes. Las diluciones deben abarcar un rango de infectividad del 0–100%, usando saltos de dilución de 1/5 y siete réplicas por dilución. Si es posible, la prueba debe llevarse a cabo en paralelo con una vacuna estándar. Cada lote de vacuna se titula en el diluyente suministrado para dicho uso. Normalmente, el título de virus no debe ser mayor que 1/10 de la dosis a la que se ha demostrado que la vacuna es segura ni inferior al título determinado en la prueba de eficacia. Una potencia adecuada para una vacuna viva contra la viruela aviar suele estar en la zona de 10^5 DIE₅₀ (dosis infectiva en el 50% de los embriones expuestos) por ml. De acuerdo con los requisitos normativos de cada país, podrán emplearse otras pruebas de potencia.

2.3. Requisitos para la autorización/registro/licencia

Para el registro de la vacuna, deben enviarse a las autoridades correspondientes todos los datos relevantes relativos a la fabricación y a las pruebas de control de calidad. Estos datos deben obtenerse a partir de tres lotes consecutivos de la vacuna que tengan un volumen no inferior a 1/3 del volumen habitual de un lote industrial.

Los controles durante el proceso forman parte del proceso de fabricación.

2.3.1. Requisitos de inocuidad

En las pruebas se utiliza una sola dosis, una sobredosis (solo en el caso de las vacunas vivas) y dosis repetidas (teniendo en cuenta el número máximo de dosis en el caso de la vacunación primaria y, si corresponde, la primera revacunación/vacunación de recuerdo) que contengan el

máximo contenido antigénico permitido y, según el caso, el máximo número de cepas vacunales.

2.3.2. Precauciones (peligros)

Normalmente se recomienda no vacunas a las aves que estén en puesta, y debe evitarse el contacto humano con la vacuna viva. La vacuna estándar contra la viruela aviar no debe usarse en palomas, pero estas sí pueden vacunarse con la vacuna contra la viruela de la paloma. En muchos países, la vacuna contra la viruela de la paloma se ha reemplazado por una vacuna viva contra la viruela aviar diseñada para su uso en pollitos de un día. Cuando no se ha dispuesto de vacuna contra la viruela de la paloma, estos productos se han utilizado en palomas y no han generado problemas de inocuidad.

2.3.3. Requisitos de eficacia

Para registrar una vacuna comercial, se debe demostrar su eficacia (protección) a partir de uno más lotes producidos de acuerdo con el método estándar y que contengan la cantidad mínima de antígeno o el valor mínimo de potencia; todos los futuros lotes comerciales deberán analizarse antes de ser liberados para garantizar que tienen la potencia que se ha comprobado con los lotes empleados para las pruebas de eficacia.

Normalmente, la eficacia (protección) de la vacuna se valora en animales vacunados evaluando directamente su resistencia ante el agente patógeno vivo, es decir, comprobando la ausencia de lesión local en el punto de inoculación en animales vacunados y la aparición de lesión en animales control.

2.3.4. Duración de la inmunidad

La prueba de eficacia presentada en el apartado C.2.1.3 puede usarse para determinar la duración de la inmunidad (aproximadamente, 6–12 meses) mediante pruebas realizadas a intervalos después de la vacunación, usando grupos distintos de aves en cada prueba.

2.3.5. Estabilidad

Para justificar la caducidad, deben aportarse evidencias sobre la estabilidad. Dicha evidencia debe basarse en las titulaciones víricas obtenidas periódicamente hasta 3 meses más allá de la fecha de caducidad propuesta y verificadas en, por lo menos, seis lotes de vacuna mantenidos en las condiciones de conservación recomendadas.

BIBLIOGRAFÍA

AFONSO C.L., TULMAN E.R., LU Z., ZSAK L., KUTISH G.F. & ROCK D.L. (2000). The genome of fowlpox virus. *J. Virol.*, **74**, 3815–3831.

BUSCAGLIA C., BANKOWSKI R.A. & MIERS L. (1985). Cell-culture virus-neutralization test and enzyme-linked immunosorbent assay for evaluation of immunity in chickens against fowlpox. *Avian Dis.*, **29**, 672–680.

DOANE F.W. & ANDERSON N. (1987). *Electron Microscopy in Diagnostic Virology: A Practical Guide and Atlas*. Cambridge University Press, Cambridge, UK.

FALLAVENA L.C., CANAL C.W., SALLE C.T., MORAES H.L., ROCHA S.L., PEREIRA R.A. & DA SILVA A.B. (2002). Presence of avipoxvirus DNA in avian dermal squamous cell carcinoma. *Avian Pathol.*, **31**, 241–246.

FATUNMBI O.O., REED W.M., SCHWARTZ D.I. & TRIPATHY D.N. (1995). Dual infection of chickens with pox and infectious laryngotracheitis (ILT) confirmed with specific pox and ILT DNA dot-blot hybridization assays. *Avian Dis.*, **39**, 925–930.

GHILDYAL N., SCHNITZLEIN W.M. & TRIPATHY D.N. (1989). Genetic and antigenic differences between fowlpox and quailpox viruses. *Arch. Virol.*, **106**, 85–92.

KIM T.J. & TRIPATHY D.N. (2001). Reticuloendotheliosis virus integration in the fowlpox virus genome: not a recent event. *Avian Dis.*, **45**, 663–669.

LEE L.H. & LEE K.H. (1997). Application of the polymerase chain reaction for the diagnosis of fowl poxvirus infection. *J. Virol. Methods*, **63**, 113–119.

- MORITA C. (1973). Studies on fowlpox viruses. II. Plaque-neutralization test. *Avian Dis.*, **17**, 93–98.
- SCHNITZLEIN W.M., GHILDYAL N. & TRIPATHY D.N. (1988). Genomic and antigenic characterization of avipoxviruses. *Virus Res.*, **10**, 65–76.
- SINGH P., KIM T.J. & TRIPATHY D.N. (2000). Re-emerging fowlpox: evaluation of isolates from vaccinated flocks. *Avian Pathol.*, **29**, 449–455
- SINGH P., KIM T.-J. & TRIPATHY D.N. (2003a). Identification and characterisation of fowlpox virus strains using monoclonal antibodies. *J. Vet. Diagn. Invest.*, **15**, 50–54.
- SINGH P., SCHNITZLEIN W.M. & TRIPATHY D.N. (2003b). Reticuloendotheliosis virus sequences within the genomes of field strains of fowlpox virus display variability. *J. Virol.*, **77**, 5855–5862.
- SINGH P. & TRIPATHY D.N. (2000). Characterization of monoclonal antibodies against fowl poxvirus. *Avian Dis.*, **44**, 365–371.
- SRINIVASAN V., SCHNITZLEIN W.M. & TRIPATHY D.N. (2001). Fowlpox virus encodes a novel DNA repair enzyme, CPD-photolyase, that restores infectivity of UV light-damaged virus. *J. Virol.*, **75**, 1681–1688.
- SRINIVASAN V. & TRIPATHY D.N. (2005). The DNA repair enzyme, CPD-photolyase restores the infectivity of UV-damaged fowlpox virus isolated from infected scabs of chickens. *Vet. Microbiol.*, **108**, 215–223.
- TRIPATHY D.N. (1993). Avipoxviruses. *In: Virus Infections of Vertebrates – Virus Infections of Birds*, Vol. 4, McFerran J.B. & McNulty M.S., eds. Elsevier Science Publishers, Amsterdam, the Netherlands, 5–15.
- TRIPATHY D.N. & HANSON L.E. (1976). A smear technique for staining elementary bodies of fowlpox. *Avian Dis.*, **20**, 609–610
- TRIPATHY D.N., HANSON L.E. & KILLINGER A.H. (1973). Immunoperoxidase technique for detection of fowlpox antigen. *Avian Dis.*, **17**, 274–278.
- TRIPATHY D.N., HANSON L.E. & MYERS W.L. (1970). Passive hemagglutination test with fowlpox virus. *Avian Dis.*, **14**, 29–38.
- TRIPATHY D.N. & REED W.M. (2013). Pox. *In: Diseases of Poultry*, 13th edition, Swayne D.E., Glisson J.R., McDougald L.R., Nolan L.K., Suarez D.L. & Nair V. eds. Wiley-Blackwell, USA, pp 333–349.
- WINTERFIELD R.W. & HITCHNER S.B. (1965). The response of chickens to vaccination with different concentrations of pigeon pox and fowlpox viruses. *Avian Dis.*, **9**, 237–241.

*
* *

NB: ADOPTADO POR PRIMERA VEZ EN 1991: ÚLTIMAS ACTUALIZACIONES ADOPTADAS EN 2016.