

RINOTRAQUEÍTIS DEL PAVO (Infecciones por metapneumovirus aviaries)

RESUMEN

El metapneumovirus aviar (MPVa) causa una infección aguda muy contagiosa de las vías respiratorias altas, principalmente en pavos y pollos. Originalmente, a la enfermedad causada por el MPVa se la conocía como infección por pneumovirus aviar y como rinotraqueítis aviar; también se la ha denominado rinotraqueítis de los pavos y los pollos, y síndrome de la cabeza hinchada (SCH) de los pollos. El MPVa es un virus de ARN de sentido negativo no segmentado y monocatenario que pertenece a la familia Paramyxoviridae, en el género Metapneumovirus. La enfermedad puede causar importantes pérdidas económicas en parvadas de pavos y de pollos, en concreto cuando se exagera por la presencia de agentes patógenos secundarios. La única especie aviar en la que se sabe que el MPVa se replica, además de los pavos y los pollos, son los faisanes, los patos de Moscovia, los patos de Pekín y las pintadas. La enfermedad se distribuye de forma global por las regiones productoras de aves de corral, a excepción de Oceanía y Canadá, que están libres de infección por el MPVa. Se han identificado cuatro subtipos del MPVa antigénicamente bien diferenciados, A, B, C y D, mediante neutralización con anticuerpos monoclonales, posible reactividad cruzada escasa en el ensayo de inmunoenzimático (ELISA), y el análisis de la secuencia de la glucoproteína de inserción, G.

En pavos susceptibles, puede aparecer infección del tracto respiratorio a cualquier edad, aunque parece que los pavipollos de corta edad resultan afectados de forma más grave. La gravedad de la enfermedad y la mortalidad están influidas en gran parte por las infecciones bacterianas secundarias, aunque otros factores de manejo también pueden exagerar la gravedad de la enfermedad. También es posible observar variabilidad en la gravedad de los signos clínicos y la morbilidad entre las aves de una parvada y entre parvadas. La infección por el MPVa puede dar lugar a problemas graves en la producción de huevos en parvadas de reproductores tanto de pavos como de patos. Otros signos clínicos son estornudos, depresión, estertores traqueales, respiración entrecortada, jadeo, secreción nasal y ocular, hinchazón de senos infraorbitarios y conjuntivitis. La aparición de los signos y la propagación de la infección por una parvada pueden tener lugar en apenas 2–4 horas. En los pollos, las infecciones por el MPVa se comprenden menos y suelen asociarse a signos de las vías respiratorias altas con disminución de la producción de huevos en reproductoras y ponedoras. La enfermedad también se puede caracterizar por la aparición de hinchazones de los senos periorbitarios e infraorbitarios y de la cara, denominada SHS. A lo anterior puede seguir con frecuencia la desorientación cerebral, tortícolis y opistótono. En los pollos, el MPVa no se considera un agente patógeno que actúe solo ni que sea primario, sino asociado a otros agentes patógenos del SHS u otros complejos multifactoriales de enfermedad respiratoria.

Identificación del agente: *Para detectar el MPVa se han utilizado con éxito el aislamiento del virus en cultivos celulares, huevos de gallina en embrionaje y cultivos de órgano traqueal, así como métodos moleculares para la identificación del ácido nucleico. El grado de éxito depende de la cepa vírica, el tipo de muestra y el momento en el que se haya recogido, así como del almacenaje y la manipulación de las muestras. Para la identificación del virus, se utilizan mucho la microscopía electrónica, la neutralización vírica y las técnicas moleculares. La detección e identificación del virus puede resultar difícil si las muestras no se toman al inicio del curso de la enfermedad. Las cepas atenuadas y virulentas del MPVa se replican hasta el título más elevado en tejidos de las vías respiratorias altas de pavos de corta edad; el virus solo puede aislarse durante unos 10 días.*

Se han utilizado anticuerpos monoclonales frente a la glucoproteína de la espícula, G, en pruebas de neutralización vírica para diferenciar los subtipos A y B, mientras que se ha demostrado, mediante pruebas de neutralización en las que se utiliza antisuero policlonal, que los subtipos A y B pertenecen a un único serotipo. El subtipo C se neutraliza de forma deficiente por el antisuero mono-específico de los subtipos A o B, pero no por los anticuerpos monoclonales que diferencian los subtipos A y B. Estos datos sugieren que el subtipo C representa un segundo serotipo del MPVa. Se pueden utilizar un antisuero mono-específico y anticuerpos monoclonales para la identificación del agente mediante la neutralización vírica y la tinción por inmunofluorescencia de cultivos celulares infectados; no obstante, se han de considerar las características antigénicas. También se ha utilizado la prueba de inmunodifusión para confirmar las cepas de MPVa.

Se han utilizado procedimientos moleculares basados en los genes Fusion (F), G, Matrix (M) y Nucleoproteína (N) del MPVa para la detección y/o subtipificación genómica del MPVa. Las proteínas codificadas por los genes F y G son inmunógenos importantes y, como tales, presentan variabilidad en los nucleótidos. Se ha utilizado el análisis de secuencias de nucleótidos del gen G para confirmar estudios anteriores de neutralización vírica en los que se diferenciaban los subtipos A y B. También se pueden utilizar los procedimientos convencionales de la reacción en cadena de la polimerasa de transcriptasa inversa (RT-PCR) para la subtipificación genómica del MPVa A y B. Además, el análisis de la secuencia de nucleótidos del gen que codifica la proteína de la matriz (M), respalda aun más la división entre subtipos A y B. El análisis de secuencias del gen M del subtipo C de MPVa muestra que la cepa de EE.UU. se diferencia claramente de los subtipos A y B del virus. Las pruebas de RT-PCR orientadas a los genes F y M son específicas de subtipo y útiles para la detección del MPVa cuando se sabe cuál es el subtipo de virus. Sin embargo, se ha demostrado que un solo conjunto de cebadores para la RT-PCR dirigido al gen N detecta los subtipos A, B, C y D y es posible que se puedan utilizar como cebadores universales para la detección del MPVa.

Pruebas serológicas: Debido a las dificultades para el aislamiento y la detección del MPVa, a menudo se logra la confirmación de la infección mediante métodos serológicos, sobre todo en parvadas sin vacunar. El método más común es el ELISA. Otros métodos utilizados son la neutralización vírica (NV), la inmunofluorescencia y la inmunodifusión. La prueba de la NV puede llevarse a cabo en cultivos de órgano traqueal, fibroblastos de embrión de pollo (CEF) e hígado de embrión de pollo (CEL); también se han utilizado con éxito varias líneas celulares, como Vero, MA104 o QT35. Sin embargo, la NV y el ELISA muestran una sensibilidad semejante y el ELISA es la prueba más comúnmente utilizada. Se han creado numerosos kits comerciales de ELISA así como pruebas internas. Se han observado diferencias en la sensibilidad y especificidad entre pruebas en función del kit comercial utilizado. Debe utilizarse como antígeno una cepa homóloga del MPVa debido a la variabilidad en la antigenicidad. En muchos países en los que la enfermedad es endémica se utilizan también vacunas, complicando así la interpretación de los resultados. Lo ideal es que para las pruebas se obtengan muestras de suero de aves que se encuentren en la fase aguda de la enfermedad, y también de aves convalecientes. En los pollos, la respuesta serológica a la infección por el MPVa es débil en comparación con la respuesta en los pavos.

Requisitos para las vacunas y el material biológico de diagnóstico: Para el control de la RTP, se dispone de dos tipos de vacuna: vacunas vivas atenuadas y vacunas inactivadas adyuvantadas con emulsión oleosa.

A. INTRODUCCIÓN

El metapneumovirus aviar (MPVa), anteriormente denominado pneumovirus aviar (APV) y virus de la rinotraqueítis aviar (ARTV), causa una infección aguda muy contagiosa en las vías respiratorias altas de los pavos y los pollos. En los pavos, el virus causa una enfermedad conocida como rinotraqueítis del pavo (RTP). El agente etiológico es un virus con envoltura de ARN de sentido negativo monocatenario no segmentado, de unas 14 kilobases y situado dentro de una nucleocápsida con simetría helicoidal (Gough, 2003). El virus presenta ciertas características de pneumovirus, pero difiere molecularmente de los pneumovirus de los mamíferos y ha sido clasificado recientemente como la cepa tipo de un nuevo género, *Metapneumovirus*, en la familia Paramyxoviridae (Pedersen *et al.*, 2000). Se han detectado metapneumovirus en humanos y se asocian a infección de las vías respiratorias altas en niños (Naylor & Jones, 1993; Toquin *et al.*, 2003; Van Den Hoogen *et al.*, 2001). El metapneumovirus aviar no tiene proteínas no estructurales NS1 y NS2 y el orden de los genes (3'-N-P-M-F-M2-SH-G-L-5') es diferente del de los pneumovirus de los mamíferos (3'-NS1-NS2-N-P-M-SH-G-F-M2-

L-5') (Tanaka *et al.*, 1995). El metapneumovirus aviar se ha clasificado en cuatro subtipos: A, B, C y D, mediante el análisis de la secuencia de nucleótidos. Utilizando anticuerpos monoclonales, se ha observado escasa reactividad cruzada entre subtipos en el ensayo de inmunoenzimático (ELISA) y en la prueba de neutralización (Collins *et al.*, 1993; Cook *et al.*, 1993a). Puede que existan otros subtipos, pero aún no se han detectado ni identificado.

En los pavos puede tener lugar una infección con el MPVa desde que son muy jóvenes y se caracteriza por respiración entrecortada, estertores, estornudos, secreción nasal, conjuntivitis con formación de espuma, hinchazón de los senos infraorbitarios y edema submandibular (Pringle, 1998). La intervención de agentes patógenos secundarios puede exacerbar drásticamente los signos clínicos. En una infección sin complicaciones, la recuperación es rápida y las aves vuelven a la normalidad en unos 14 días. Cuando se aplica un mal manejo o se producen infecciones bacterianas secundarias, la aerosaculitis, la pericarditis, la neumonía y la perihepatitis pueden prolongar la enfermedad y puede haber un aumento de la morbilidad y la mortalidad (Cook *et al.*, 1991; Mekkes & De Wit, 1999). Los agentes patógenos secundarios que se ha observado que exacerban y prolongan la enfermedad clínica son *Bordetella avium*, microorganismos tipo *Pasteurella*, *Mycoplasma gallisepticum*, *Chlamydophila* y *Ornithobacterium rhinotracheale* (Alkhalaf *et al.*, 2002; Cook *et al.*, 1991; Jirjis *et al.*, 2004; Senne *et al.*, 1997; Van Looock *et al.*, 2006). La morbilidad puede llegar al 100%, y la mortalidad puede oscilar entre el 0,5% en los pavos adultos y el 80% en los pavipollos de corta edad (Buys *et al.*, 1989; Gough, 2003; Van De Zande *et al.*, 1999). Los signos clínicos de la infección en los pollos son menos característicos que los de los pavos. Pueden tener lugar problemas respiratorios graves en pollos, en concreto cuando se exacerban por agentes patógenos secundarios, como el virus de la bronquitis infecciosa, micoplasmas, y *Escherichia coli* (O'Brien, 1985; Pattison *et al.*, 1989). A diferencia de lo que ocurre con los subtipos A y B, no se ha observado que la cepa de EE.UU. -Colorado, o subtipo C- induzca de forma natural enfermedad en los pollos, aunque en pollos infectados de forma experimental se ha observado que son susceptibles a la cepa del MPVa del subtipo C del pavo (Shin *et al.*, 2000). Se ha demostrado que cada cepa de MPVa tiene un tropismo específico para pollos o para pavos (Cook *et al.*, 1993b). En otras especies de aves se ha observado que se infectan con el MPVa, pero casi nunca con signos clínicos (Gough *et al.*, 1988). Virus caracterizados como MPVa subtipo C y con un 75–83% de coincidencia de nucleótidos con el MPVa subtipo C Colorado de EE.UU. se han asociado a signos respiratorios y a disminución de la producción de huevos en patos de Francia (Toquin *et al.*, 1999; 2006). El análisis molecular retrospectivo de virus aislados en la década de los años 80 en pavos de Francia indica la presencia de un cuarto subtipo de MPVa denominado subtipo D (Bäyon-Auboyer *et al.*, 2000). Los resultados de algunos estudios experimentales sugieren que es necesario el contacto directo para la transmisión del virus de un ave a otra (Alkhalaf *et al.*, 2002; Cook *et al.*, 1991). En condiciones comerciales, la infección aerógena tras la transmisión por el aire también es probable, puesto que la enfermedad se limita al tracto respiratorio. Tras la infección experimental de pavos de 2 semanas de edad solo con el MPVa, el virus se detectó en el tracto respiratorio durante solo unos pocos días (Bäyon-Auboyer *et al.*, 1999). Sin embargo, en aves inoculadas con MPVa y *B. avium*, se detectó el virus hasta 7 días después de la inoculación (dpi) (Collins & Gough, 1988; Cook *et al.*, 1993b; Naylor & Jones, 1993). No existen pruebas de que el MPVa pueda producir infección latente ni se conoce la existencia de portadores asintomáticos. Aunque de forma esporádica pueden infectarse algunos pavos neonatos (Shin *et al.*, 2002a), no se ha informado de la existencia de transmisión vertical del MPVa.

En los pavos de engorde la replicación del virus se limita a las vías respiratorias altas con una corta viremia. La replicación de las cepas, tanto atenuadas como virulentas, de MPVa persiste durante aproximadamente 10 dpi (Cook *et al.*, 1991; Van De Zande *et al.*, 1999). Se produce una replicación escasa en la tráquea y el pulmón, pero no se ha observado la replicación en otros tejidos tras la infección natural (Cook, 2000a; 2000b). Estudios histopatológicos e inmunocitoquímicos secuenciales han mostrado una replicación vírica en los cornetes nasales que causa una intensa rinitis con gran actividad glandular, exfoliación epitelial, pérdida focal de cilios, hiperemia e infiltración mononuclear leve en la submucosa e inclusiones intracitoplasmáticas eosinofílicas en las células ciliadas de los cornetes nasales a los 2 dpi. Entre los 3 y 4 dpi se observó una rinitis catarral con exudado mucopurulento, lesión en la capa epitelial y una abundante infiltración inflamatoria mononuclear en la submucosa. Se observaron lesiones transitorias en la tráquea, con pocas o ninguna lesión en la conjuntiva y en otros tejidos (Giraud *et al.*, 1988; Majo *et al.*, 1995). La infección respiratoria es menos grave en las pavas ponedoras; sin embargo puede producirse una disminución de la producción de huevos de hasta el 70% (Stuart, 1989) y estos pueden ser de mala calidad durante el período de recuperación, que dura hasta 3 semanas. En pavas ponedoras infectadas experimentalmente, se ha observado replicación vírica tanto en el tracto respiratorio como en el genital hasta los 9 dpi (Jones *et al.*, 1988).

En pollos, existen claros indicios que sugieren que el MPVa es uno de los agentes etiológicos del síndrome de la cabeza hinchada (SCH). Este síndrome se caracteriza por una enfermedad respiratoria, apatía, hinchazón de los senos infraorbitarios e hinchazón periorbitaria unilateral o bilateral y facial, que se extiende por toda la cabeza. A estos signos les sigue con frecuencia la desorientación cerebral, tortícolis y opistótonos. Aunque la mortalidad no suele sobrepasar el 1–2%, la morbilidad puede alcanzar el 10%, y la producción de huevos se suele ver afectada (Gough *et al.*, 1994; Morley & Thomson, 1984; O'Brien, 1985; Pattison *et al.*, 1989; Picault *et al.*, 1987; Tanaka *et al.*, 1995).

La evidencia serológica sugiere que el MPVa está extendido por todo el mundo y tiene un impacto económico considerable, en concreto en la producción de pavos. Oceanía y Canadá son las únicas regiones en las que no se ha informado de la existencia del MPVa (Cook, 2000a; 2000b; Gough, 2003). Existe evidencia serológica y

molecular de que el MPVa infecta otras varias especies de aves, incluidos los faisanes, las pintadas, las avestruces, los gorriones y las aves acuáticas (Bennett *et al.*, 2004; Gough, 2003; Lee *et al.*, 2007; Shin *et al.*, 2002b), pero sin indicios de enfermedad.

B. TÉCNICAS DE DIAGNÓSTICO

1. Identificación del agente

A fin de optimizar las posibilidades de conseguir un aislamiento vírico eficaz, se recomienda un enfoque múltiple del diagnóstico. Esto es importante sobre todo al tratar con diferentes subtipos o genotipos que pueden requerir distintos métodos de aislamiento *in-vitro*. Esto se ilustró en EE.UU., donde los primeros intentos de aislar el subtipo C del MPVa fracasaron. El subtipo C de EE.UU. no se ha asociado a ciliostasis en los cultivos de órgano traqueal (Cook *et al.*, 1999; Senne *et al.*, 1997), y el agente solo se ha cultivado tras múltiples pases por embrión y cultivo celular. Este hecho contrastó con la experiencia en Europa y en otros lugares, donde se observó que los cultivos de órgano traqueal y/o células Vero constituían el método más fiable para el aislamiento primario de los subtipos A, B, C y D del MPVa (Cook & Cavanagh, 2002; Giraud *et al.*, 1988; Toquin *et al.*, 1999; 2000).

1.1. Recogida y selección de muestras para el diagnóstico

Es muy importante que las muestras para el aislamiento vírico se tomen en las primeras fases de la infección, ya que el virus puede estar en los senos y en los cornetes nasales solo durante un corto periodo de tiempo. Lo ideal es tomar muestras de las vías respiratorias altas de aves vivas durante el periodo agudo de la enfermedad utilizando hisopos estériles (Gough, 2003; Stuart, 1989). Las muestras más eficaces han sido los exudados nasales, hisopos de la hendidura coanal y raspados de tejido de los senos y los cornetes nasales. El virus también se ha aislado de la tráquea y los pulmones y, en ocasiones, de las vísceras de los pavipollos afectados (Buys *et al.*, 1989; Cook *et al.*, 1999). No suele ser eficaz el aislamiento vírico en pollos con signos crónicos graves, ya que los signos clínicos más graves se deben normalmente a agentes patógenos secundarios. Este es el caso de los pollos con el SCH, en los que los signos típicos se deben a la infección secundaria por *Escherichia coli*. Es más, por razones poco claras, el aislamiento del virus puede ser más difícil en los pollos que en los pavos.

Es fundamental que las muestras se envíen de inmediato sobre hielo al laboratorio de diagnóstico. Cuando se presume que el envío va a tardar en realizarse más de 3 días, deben congelarse antes del envío. Los hisopos para el aislamiento vírico deben enviarse en hielo y completamente sumergidos en medio de transporte de virus, pero los que se envíen para ser sometidos a la prueba de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) pueden enviarse secos, aunque sobre hielo o congelados.

Para el aislamiento vírico, se prepara una suspensión al 20% (v/v) del exudado nasal o tejido homogeneizado en solución salina tamponada con fosfato (PBS) o en caldo de infusión de corazón-cerebro (BHI) que contenga antibióticos, a un pH de 7,0–7,4. Esta suspensión se clarifica mediante centrifugación a 1.000 *g* durante 10 minutos y se pasa el sobrenadante por un filtro de membrana de 450 nm.

1.2. Cultivo e identificación del metapneumovirus aviar (MPVa)

El mejor método para el aislamiento primario del virus a partir de aves infectadas es un cultivo de tráquea o en huevos de pavo o pollo en embrionaje, y el cultivo posterior en cultivos celulares (Buys *et al.*, 1989; Cook *et al.*, 1999); el pase seriado por células Vero también se ha observado que es un método sensible para el aislamiento del MPVa (Giraud *et al.*, 1988). El aislamiento original del MPVa en Sudáfrica a finales de los años 70 y el del MPVa Colorado más reciente se llevaron a cabo en huevos en embrionaje; sin embargo, los aislamientos de los subtipos A y B del MPVa se han realizado de forma sistemática en cultivos de tráquea (Cook & Cavanagh, 2002). El subtipo C del MPVa, y tal vez otros APV no identificados, no causan ciliostasis en cultivos de órganos; por ello: el pase por huevos de gallina en embrionaje y pases posteriores por cultivo celular constituyen el método de elección para el aislamiento del virus (Gough, 2003; Senne *et al.*, 1997). Los cuatro subgrupos del MPVa pueden aislarse utilizando células Vero (Toquin *et al.*, 1999; 2000).

Se preparan cultivos de tráquea a partir de embriones de pavo o de pavos de muy corta edad procedentes de parvadas libres de anticuerpos específicos contra el MPVa. También se puede utilizar la tráquea de embriones de pollo, o de pollos de 1–2 días de edad. Se lavan cortes transversales de tráquea en PBS (pH 7,2), colocando un corte por tubo en medio Eagles con antibiótico, y se mantienen a 37°C. Tras la incubación, se retiran los medios de los cultivos y se añaden 0,1 ml de inóculo libre de

bacterias. Tras la incubación durante 1 hora a 37°C, se añade medio de crecimiento y se incuban los cultivos a 37°C en un aparato rotador a 30 revoluciones por hora. Los cultivos se examinan a diario después de agitarlos en un mezclador de laboratorio para separar los desechos del lumen. Puede presentarse ciliostasis en un plazo de 7 días tras la inoculación en pase primario, pero normalmente aquella se produce de forma rápida y consistente sólo después de varios pases ciegos (Gough, 2003).

Se inoculan por vía vitelina huevos de pollo o de pavo en embrionaje de entre 6 y 8 días procedentes de parvadas que se sepa que están libres de anticuerpos contra el MPVa con 0,2–0,3 ml de material libre de bacterias extraído de aves infectadas, y se incuban a 37°C. Si no hay indicios de infección (falta de crecimiento o mortalidad en los embriones) tras el primer pase, debe procesarse material de saco vitelino para un segundo pase ciego por embrión. En un plazo de 7–10 días, normalmente hay constancia del retraso en el crecimiento de los embriones, con algunas muertes. A menudo se requieren pases seriados antes de que el agente cause mortalidad continua en los embriones. El aislamiento en huevos en embrionaje es un proceso lento, caro y trabajoso, y requiere múltiples pases posteriores en cultivos celulares para la identificación (Gough, 2003).

Se han utilizado varios cultivos celulares para el aislamiento primario del MPVa, incluyendo células de embrión de pollo, células Vero y, más recientemente, las células QT-35, con diversos grados de éxito. El aislamiento primario del subtipo C de EE.UU. se ha llevado a cabo tras múltiples (5–6) pases seriados en cultivos de células Vero (Bennett *et al.*, 2004). Sin embargo, una vez que el virus se adapta al crecimiento en huevos en embrionaje o en cultivos de tráquea, en los que crece hasta alcanzar sólo títulos bajos, se replicará de inmediato hasta títulos moderados tras pases múltiples en distintos tipos de cultivos primarios de células de embrión de pavo o de pollo, células Vero y células QT-35 (Buys *et al.*, 1989; Cook, 2000a; 2000b; Goyal *et al.*, 2000). Se ha observado un aislamiento primario de los cuatro subgrupos del MPVa tras pases seriados en células Vero (Toquin *et al.*, 2000). El virus produce un efecto citopático (ECP) característico con formación de sincitios en un plazo de 7 días. La identificación de cultivos celulares infectados con el virus puede lograrse mediante tinción por inmunofluorescencia de células infectadas o por métodos moleculares.

Mediante microscopía electrónica de contraste negativo puede observarse una morfología del virus parecida a la de los paramixovirus. Se observan con frecuencia partículas con bordes pleomórficos, casi esféricas y con un diámetro de 80–200 nm. Ocasionalmente, hay formas filamentosas mucho más grandes, que pueden medir hasta 1.000 nm de longitud. Las proyecciones superficiales miden 13–14 nm de longitud y la nucleocápsida helicoidal, a la que a veces se ve sobresalir entre las partículas desorganizadas, mide 14 nm de diámetro con una inclinación estimada de 7 nm por cada giro (Collins & Gough, 1988; Giraud *et al.*, 1988).

1.3. Identificación molecular

La PCR con transcripción inversa (RT-PCR) es un método de detección del MPVa significativamente más sensible y rápido que los métodos estándares de aislamiento vírico, debido a que el MPVa es difícil de cultivar (Cook & Cavanagh, 2002; Gough, 2003). Para la detección del MPVa se utilizan procedimientos de la RT-PCR dirigidos a los genes F, M, N y G; sin embargo, debido a la heterogeneidad molecular de las cepas de MPVa, la mayoría de los métodos de la RT-PCR son específicos de subtipo o no sirven para detectar todos los subtipos (Bäyon-Auboyer *et al.*, 1999; Cook & Cavanagh, 2002; Pedersen *et al.*, 2000; 2001). Se utilizan con éxito pruebas específicas de subtipo para la detección y el diagnóstico de cepas endémicas (Bäyon-Auboyer *et al.*, 2000; Cook & Cavanagh, 2002; Mase *et al.*, 2003; Naylor *et al.*, 1997; Pedersen *et al.*, 2001). No obstante, deben reconocerse las limitaciones de las pruebas específicas de subtipo cuando se realizan pruebas de diagnóstico de enfermedad respiratoria. Se ha demostrado que los cebadores dirigidos a las regiones conservadas del gen N tienen una especificidad más amplia, y sirven para detectar cepas representativas de los subtipos A, B, C y D (Bäyon-Auboyer *et al.*, 1999). Para la identificación de los genotipos o subtipos también se han utilizado con éxito pruebas de la RT-PCR dirigidas al gen G (Bäyon-Auboyer *et al.*, 2000; Juhasz & Easton, 1994; Lwamba *et al.*, 2005; Mase *et al.*, 1996). Se ha elaborado y evaluado una gama de técnicas de RT-PCR que han sido ampliamente revisadas en otros trabajos (Cook & Cavanagh, 2002; Njenga *et al.*, 2003).

Las muestras preferidas son los exudados nasales, hisopos de la hendidura coanal, y las muestras de los cornetes nasales recogidas entre 2 y 7 días después de la exposición (Cook *et al.*, 1993b; Gough, 2003; Pedersen *et al.*, 2001; Stuart, 1989). Es preciso recoger las muestras en cuanto aparezcan los primeros signos clínicos, ya que en varios estudios recientes se ha observado que, a los 3 días de la post-inoculación, se encuentra en la tráquea y en los cornetes la mayor cantidad de virus, y el ARN vírico persiste durante 9 días en la tráquea y hasta 14 días en los cornetes nasales (Velayudhan *et al.*, 2005). Se ha observado que el MPVa puede detectarse en muestras recogidas entre 7 y 10 días después de la exposición; no obstante, la concentración del virus es considerablemente más baja, con lo que disminuye el éxito de la detección (Alkhalaf *et al.*, 2002; Pedersen *et al.*, 2001). Pueden

agruparse hisopos de una sola parvada en grupos de no más de cinco para poder procesar muestras de un gran número de aves y, por tanto, aumentar la probabilidad de detección.

Se puede extraer ARN molde para la RT-PCR a partir de un tejido homogeneizado, hisopos secos o grupos de hisopos húmedos con columna de sílice o con reactivos comerciales para la extracción del ARN mediante perlas magnéticas siguiendo las instrucciones del fabricante. Las muestras integradas por el sobrenadante del hisopo traqueal y líquido de seno (140 µl/600 µl de tampón de lisis) también se pueden procesar mediante el procedimiento RNeasy® (Qiagen, Valencia, CA).

Tabla 1. Ejemplo de cebadores que pueden utilizarse para la detección del gen N de los serogrupos A, B, C y D del MPVa (Bâyon-Auboyer *et al.*, 1999; Toquin *et al.*, 1999)

| Diana | Cebador ID | Secuencia 5'–3' | Posición | Tamaño del producto |
|-------|------------|-------------------------------------|----------|---------------------|
| Gen N | Nc | 5'–TTC-TTT-GAA-TTG-TTT-GAG-AAG-A–3' | 632–653 | Cebador RT |
| | Nx | 5'–CAT-GGC-CCA-ACA-TTA-TGT-T–3' | 830–812 | 115 |
| | Nd | 5'–AGC-AGG-ATG-GAG-AGC-CTC-TTT-G–3' | 716–737 | 115 |

1.3.1. Ejemplo de protocolo

- i) La síntesis del ADNc puede llevarse a cabo en un volumen de 20 µl con el cebador Nc para RT (o cualquier cebador adecuado, como un oligodT o el cebador inverso del par de cebadores que se utilizará en la PCR) y enzima SuperScript II® Rnase H-RT (Invitrogen, Carlsbad, CA). Se calienta 1 µl de cebador para RT (2 pmoles), 1 µl de mezcla de dNTP (10 mM de cada), con ARN extraído y agua destilada estéril (QS hasta 20 µl) hasta los 65°C durante 5 minutos.
- ii) Se enfría rápidamente y se centrifuga.
- iii) Se añaden 4 µl de tampón First-Strand 5x, 2 µl de DTT 0,1 M, y 1 µl de RNaseOUT® (Invitrogen, Carlsbad, CA).
- iv) Se calientan los contenidos hasta los 42°C durante 2 minutos y se añade 1 µl (200 unidades) de SuperScript II®, y se mezcla cuidadosamente.
- v) Se realiza la RT a 42°C durante 50 minutos, y a continuación se aplican 70°C durante 15 minutos para la inactivación del enzima para la RT.
- vi) La amplificación mediante PCR puede llevarse a cabo con polimerasa AmliTaq Gold® (Applied Biosystems, Foster City, CA) siguiendo las instrucciones del fabricante. Las condiciones de amplificación son las siguientes: 94°C durante 15 minutos y 30 ciclos de 94°C durante 20 segundos, 51,0°C durante 45 segundos (para el par de cebadores ND/Nx, pero si se utiliza otro par, la temperatura de hibridación debe ajustarse) y 72°C durante 45 segundos con una extensión final de 72°C durante 10 minutos.

Se han utilizado con éxito varias RT-PCR dirigidas a los genes F, G y M para la detección e identificación de los subtipos o para el diagnóstico del MPVa endémico (Goyzm *et al.*, 2000; Jirjis *et al.*, 2004; Majo *et al.*, 1995). Se ha utilizado la secuencia de nucleótidos y el análisis filogenético del gen G para genotipar los subtipos A, B y C del MPVa, y ese es el procedimiento recomendado para la identificación del subtipo de un virus no identificado. Se han descrito los procedimientos de la RT-PCR recomendados para el análisis de las secuencias del gen G (Bâyon-Auboyer *et al.*, 2000; Juhasz & Easton, 1994; Lwamba *et al.*, 2005; Toquin *et al.*, 2006). Recientemente se ha comprobado que la RT-PCR en tiempo real permite la detección específica, la identificación y la cuantificación de los subgrupos A, B, C y D del MPVa (Guonie *et al.*, 2007).

También se han descrito los procedimientos para la identificación del ARN de los subtipos A y B en muestras de diagnóstico (Naylor *et al.*, 1997), así como los procedimientos para la detección de los virus de los subtipos A y B (Pedersen *et al.*, 2001). El aislamiento del MPVa en los pollos es difícil y sólo ha funcionado en unos pocos casos; por esta razón, para la detección del MPVa en pollos se han utilizado principalmente pruebas moleculares (Cook & Cavanagh, 2002; Mase *et al.*, 1996). Es importante recordar que mediante la RT-PCR se detecta el ARN vírico, no el virus vivo, de modo que está aún por determinar la significación de un resultado positivo en la PCR en cuanto a la detección de una infección activa.

2. Pruebas serológicas

La serología es el método de diagnóstico de infecciones por el MPVa más frecuente, en concreto en parvadas no vacunadas, debido a las dificultades en el aislamiento y la identificación del MPVa. El método más común es el ELISA; sin embargo, se han utilizado las pruebas de neutralización vírica, la microinmunofluorescencia y la inmunodifusión. Existen varios kits de ELISA comerciales y del propio laboratorio que son útiles para analizar suero tanto de pavos como de pollos; sin embargo, se ha informado de la existencia de diferencias de sensibilidad y especificidad entre kits comerciales (Etteradossi *et al.*, 1995; McFarlane-Toms & Jackson, 1998; Mekkes & De Wit, 1999). Se han creado kits de ELISA de competición o de bloqueo que incorporan un anticuerpo monoclonal específico para el MPVa. Se afirma que estos kits tienen una sensibilidad y especificidad de amplio espectro para todos los subtipos del MPVa y pueden utilizarse para analizar sueros de varias especies aviares. Los antígenos para el ELISA interno, tal como se describen más adelante, se han preparado en varios sustratos, que incluyen distintos cultivos celulares y cultivos de tráquea (Chiang *et al.*, 2000; Cook & Cavanagh, 2002). Por lo general, los anticuerpos frente al MPVa se detectan con más dificultad cuando se utiliza como antígeno una cepa heteróloga del MPVa, a pesar de que las cepas parecen estar estrechamente relacionadas, según la prueba de neutralización (Cook & Cavanagh, 2002; Etteradossi *et al.*, 1995). La situación se complica aún más por las discrepancias relativas a la capacidad de los distintos ELISA de detectar anticuerpos vacunales cuando se utilizan diferentes cepas del MPVa como antígenos de revestimiento (Etteradossi *et al.*, 1995). Las pruebas internas en las que se emplea un antígeno homólogo se han utilizado mucho para la vigilancia de cepas del MPVa endémico. Lo ideal es que las muestras de suero para las pruebas se tomen durante la fase aguda y durante la convalecencia. En los pollos, la respuesta serológica a la infección por el MPVa es débil en comparación con la respuesta en los pavos (Cook *et al.*, 1991).

2.1. Enzimoimmunoensayo

Puede utilizarse el siguiente protocolo (Chiang *et al.*, 2000), o métodos alternativos con resultados bien documentados (Giraud *et al.*, 1987; Grant *et al.*, 1987).

El virus se propaga en fibroblastos de embrión de pollo (FEP) o en cultivos de células Vero hasta que se infecta entre el 70 y el 100% de la monocapa de forma simultánea (3 a 4 días). Se decanta el líquido del cultivo celular y se lava la monocapa con PBS (pH 7,2). Se lisa la monocapa con 0,5 ml (por cada frasco de 75 cm²) de una solución de un detergente no iónico (IGEPAL CA-630 o Nonidet P-40) al 0,5% mediante una placa de balanceo durante 1 hora a 4°C. Después de la perturbación física de las células lisadas, se clarifica todo el lisado del antígeno vírico a 3.000 *g* durante 15 minutos. Se tratan del mismo modo los cultivos de células no infectadas para obtener un antígeno control negativo. Se analizan las diluciones seriadas del antígeno frente a diluciones seriadas del conjugado de peroxidasa de rábano con IgG anti-especie por el sistema de doble entrada para establecer la dilución conjugado/antígeno óptima. Se recubren una dilución de trabajo de antígeno del MPVa y un antígeno normal (100 µl) en el fondo de las placas de microtitulación con un tampón de recubrimiento carbonato/bicarbonato (Chiang *et al.*, 2000). Se analiza cada suero frente al MPVa y al antígeno normal para determinar la proporción S/P. Las placas recubiertas se incuban a 4°C durante toda la noche y se lavan un total de cinco veces con solución de lavado Tween 20 (Chiang *et al.*, 2000) antes de usarlas o tres veces antes de almacenarlas durante un largo período de tiempo a -70°C. Al congelar las placas, queda solución de lavado residual en la placa. Después del almacenaje y la descongelación a temperatura ambiente, se lavan las placas dos veces y se secan con papel absorbente antes de su utilización.

2.1.1. Método de prueba

- i) Se diluyen los sueros de la prueba a 1/40 en tampón de disolución/bloqueo (Chiang *et al.*, 2000).
- ii) Se aplican 50 µl de los sueros problema y de las soluciones de trabajo de los sueros positivos y negativos al antígeno del MPVa y a los pocillos recubiertos de antígeno.
- iii) Se incuban a temperatura ambiente durante 1 hora.
- iv) Se lavan las placas cinco veces en solución de lavado Tween 20.
- v) Se aplican 50 µl de la solución de trabajo del conjugado de peroxidasa de rábano con IgG anti-especie a cada pocillo y se incuban durante 1 hora a temperatura ambiente.
- vi) Se lavan las placas cinco veces con solución de lavado Tween 20.
- vii) Se aplican 100 µl de la solución preparada con el sustrato ortofenilendiamina (OPD) a cada pocillo y se incuban durante 10 minutos a oscuras. Se mezclan los siguientes reactivos para la preparación del sustrato OPD: 243 ml de ácido cítrico 0,1 M y 257 ml de ortofosfato monosódico 0,2 M; se ajusta el pH a 5,0 y con QS hasta 1 litro de agua destilada.

- viii) Se interrumpe la reacción con 25 µl/pocillo de ácido sulfúrico 2,5 M.
- ix) Se lee la DO a 490/450 nm.

Los resultados se expresan como diferencias de OD entre los pocillos recubiertos de antígeno vírico y los recubiertos con el antígeno que actúa como control negativo. Se determina la media de OD₄₉₀ de cada conjunto duplicado de pocillos con el antígeno positivo y el negativo para cada suero. Los antígenos suelen calibrarse de modo que una muestra con una diferencia de OD₄₉₀ entre los pocillos recubiertos con antígeno y los pocillos recubiertos con antígeno control negativo de más de 0,2 se considera positiva (llevando a cabo el método en un laboratorio, este umbral podría tener que reevaluarse en las condiciones locales, evaluando un conjunto de sueros negativos con los antígenos recién preparados). Las reacciones positivas no específicas y esporádicas son inherentes a la prueba ELISA, especialmente las realizadas con sueros de pollo o pato, y se puede utilizar la inmunofluorescencia para las pruebas confirmativas.

C. REQUISITOS PARA LAS VACUNAS Y EL MATERIAL BIOLÓGICO DE DIAGNÓSTICO

Para el control de la RTP, se dispone de dos tipos de vacuna: vacunas vivas atenuadas y vacunas inactivadas adyuvantadas con emulsión oleosa (Cook, 2000a). Las vacunas están pensadas para ser utilizadas solo en pavos. Existe la posibilidad de desarrollar vacunas vivas recombinantes basadas en el virus de la viruela aviar actuando como vector que exprese la proteína F del MPVa (Stuart, 1989), vacunas de ADN que codifiquen distintas proteínas del MPVa (Tanaka *et al.*, 1995) y, más recientemente, MPVa genéticamente atenuado producido mediante genética inversa (Toquin *et al.*, 1999).

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. Vacunas vivas: métodos de utilización

Se producen vacunas vivas contra la RTP a partir de cepas víricas que se han atenuado mediante pases seriados en huevos en embrionaje, cultivos de tráquea o cultivo celular (distintas líneas celulares o fibroblastos de embrión de pollo), o mediante pases alternos utilizando una combinación de estos métodos. Ciertas vacunas vivas atenuadas contra la RTP comercialmente disponibles derivan de cepas europeas del subgrupo A o el subgrupo B del MPVa, y de una cepa americana del subgrupo C del MPVa. El subgrupo del MPVa al cual pertenece la vacuna debe mencionarse en la etiqueta de la vacuna, puesto que esta información es importante para el desarrollo de un seguimiento serológico post-vacunación eficiente. Las vacunas vivas contra la RTP están pensadas para ser utilizadas en aves de corta edad para inducir una respuesta inmunitaria activa que contribuya a prevenir la enfermedad respiratoria causada por el MPVa. Además, en pavos progenitores también se utilizan vacunas vivas contra la RTP para producir una respuesta primaria antes de la vacunación cerca del pico de puesta, utilizando vacuna inactivada (véase más adelante).

Se suelen aplicar vacunas vivas contra la RTP varias veces mediante spray de gota gruesa, en el agua de bebida o mediante administración oculonasal. Existe un informe publicado sobre la utilización de una inyección única *in-ovo* (Shin *et al.*, 2002b), pero es más habitual que la primera vacunación contra la RTP con vacuna viva se administre a los pavipollos durante su primera semana de vida. La segunda vacuna viva contra la RTP se aplica aproximadamente a las 6 semanas de edad (en cuyo caso solo se realizan dos aplicaciones), o a las 3 semanas de edad (en cuyo caso hay una tercera aplicación) o después de las 6 semanas de edad. El motivo de estas repetidas vacunaciones tiene que ver, en primer lugar, con las dificultades de inducir una respuesta de anticuerpos de larga duración durante toda la vida del pavo de carne, y en segundo lugar con la necesidad de evitar la vacunación contra la RTP en pavos de corta edad cuando han sido vacunados recientemente contra la enteritis hemorrágica (las vacunas contra el virus de la enteritis hemorrágica [VEH] se suelen administrar aproximadamente a los 28 días de edad para evitar la interferencia con los anticuerpos maternos [MDA] contra el VEH). Aunque se ha publicado que los MDA contra el TRTV no previenen la infección en pavipollos de un día de vida con cepas virulentas del MPVa (Toquin *et al.*, 2003), se ha observado que puede tener lugar cierta interferencia entre los MDA y algunas vacunas vivas contra la RTP y dar lugar a una menor captación de la vacuna en pavos de corta edad con niveles más altos de MDA. Se ha observado protección clínica cruzada entre vacunas vivas y virus de desafío pertenecientes a los subgrupos A o B (y *viceversa*) (Cook *et al.*, 1993b; Velayudhan *et al.*, 2005; Worthington *et al.*, 2003). También se ha observado inmunidad protectora cuando aves inmunizadas contra los serogrupos A o B del MPVa a continuación han sido expuestas a un virus virulento del subgrupo C, pero no en el experimento opuesto (Worthington *et al.*, 2003).

Los metapneumovirus aviares se neutralizan muy fácilmente en el ambiente mediante agentes físicos y químicos, y puede ser difícil garantizar una buena vacunación con vacuna viva contra estos virus. Si la vacuna se administra en el agua de bebida, debe utilizarse agua limpia de pH neutro, sin olor ni sabor a cloro ni metales. Puede añadirse leche desnatada en polvo a razón de 2 g por litro. Debe tenerse cuidado de garantizar que todas las aves reciban su dosis de vacuna. Para ello, todo el agua debe retirarse (cortarse) durante 2–3 horas antes de poner a disposición de las aves el agua medicada, y debe tenerse cuidado de que no quede nada de agua en las tuberías ni en los bebederos. Si la vacuna se administra mediante spray, debe utilizarse agua de calidad y de pH neutro sin residuos desinfectantes. Debe utilizarse un nebulizador concreto, que no se aplicará a ningún otro fin más que a la vacunación. Lo ideal es que este aparato permita una presión constante a lo largo de todo el proceso de vacunación (y, por tanto, un tamaño constante de las gotitas de vacuna). Los pavos a vacunar deben agruparse antes de la vacunación y debe llevarse a cabo varios pases con el nebulizador para garantizar que todas las aves quedan verdaderamente expuestas al spray. La ventilación y la calefacción de la nave deben bajarse todo lo posible, de modo que la vacuna nebulizada no se elimine por la ventilación, ni quede inactivada por el sobrecalentamiento (el calor, además, favorece la evaporación, que disminuye el tamaño de las gotitas de vacuna nebulizada y causa un aumento de la proporción de vacuna que llega a las vías respiratorias bajas, un fenómeno que se ha sospechado que contribuye a las reacciones adversas a la vacunación con vacuna viva). Es importante dejar que las aves se tranquilicen inmediatamente después de aplicar el spray, puesto que cuando las aves se arreglan las plumas tras ser expuestas al spray vacunal, pueden absorber una cantidad no desdeñable de la vacuna.

Se ha observado que las vacunas del MPVa no interfieren con las vacunas contra la enfermedad Newcastle en pollos (Van De Zande *et al.*, 1999; Yu *et al.*, 1992); sin embargo, en pavos no está documentada la compatibilidad de las vacunas contra la RTP. Como ocurre con otras vacunas, solo deben vacunarse aves sanas. Los viales de vacuna liofilizada deben mantenerse a temperaturas de entre 2°C y 8°C hasta el momento de utilizarlos.

2 Vacunas inactivadas: Método de utilización

Las vacunas contra el MPVa inactivadas se utilizan principalmente para producir niveles altos, duraderos y uniformes de anticuerpos en pavos reproductores que han sido previamente vacunados con vacuna viva o expuestos de forma natural al virus natural durante el crecimiento. Dado que el motivo por el que se utilizan vacunas inactivadas en los reproductores es mejorar su protección no solo contra los signos respiratorios de la RTP sino también contra los signos reproductivos (caídas de la puesta) asociados a la infección por el MPVa, no es infrecuente que las vacunas inactivadas contra el MPVa también asocien este virus a otros varios virus también involucrados en trastornos respiratorios y/o reproductivos. El programa habitual consiste en administrar la vacuna inactivada al menos 4–6 semanas después de la última vacuna viva, hasta las 28 semanas de edad en pavos, evitando las 4 semanas previas a la entrada en puesta. La vacuna inactivada se fabrica como emulsión agua-en-aceite, y tiene que inyectarse en cada una de las aves. Las vías preferidas de administración son la intramuscular en el músculo del muslo, evitando la proximidad a las articulaciones, tendones o vasos sanguíneos grandes, o la vía subcutánea. Puede utilizarse una jeringa multidosis, sujeta al aparato en pleno funcionamiento y según las instrucciones del fabricante y las prácticas de higiene recomendadas. Todo el equipamiento debe limpiarse y esterilizarse entre parvadas, y los equipos de vacunación deben cumplir estrictamente las normas de higiene al pasar de una parvada a otra. La vacuna no debe congelarse; en lugar de ello, debe guardarse a 4–8°C (pero debe dejarse que alcance la temperatura ambiente antes de inyectarla). Las vacunas inactivadas no deben exponerse a la luz directa ni a altas temperaturas.

Solo deben vacunarse aves sanas, que se sepa que están sensibilizadas por exposición previa al MPVa. Utilizada de este modo, la vacuna inactivada debe inducir una buena respuesta de anticuerpos que protegerá a los reproductores contra los signos respiratorios y reproductivos durante todo el ciclo de puesta (Van De Zande *et al.*, 2000). El nivel concreto y la duración de la inmunidad que confieren las vacunas inactivadas dependerán principalmente de la concentración de antígeno por dosis. El objetivo de la fabricación debe ser obtener una alta concentración de antígeno y, por tanto, una vacuna muy potente.

3. Control del inóculo

3.1. Características del inóculo

3.1.1. Vacuna viva

Debe demostrarse que el virus del inóculo está libre de virus extraños, bacterias, micoplasmas u hongos, en concreto agentes patógenos para las aves.

Debe demostrarse que el virus del inóculo es estable, y que no presenta tendencia a revertir a la virulencia. Esto se puede confirmar llevando a cabo al menos cinco pases consecutivos pavo a pavo a intervalos de 2–6 días. Se utilizan pavos de no más de 3 semanas y libres de MDA contra el MPVa. El pase se puede lograr mediante la propagación natural o inoculando una

suspensión preparada a partir de la mucosa de los cornetes nasales y la parte alta de la tráquea de aves previamente inoculadas, o de hisopos traqueales. Debe tenerse cuidado de evitar la contaminación por virus de pases previos. Debe demostrarse que el virus se ha transmitido. Debe evaluarse la estabilidad demostrando que no hay indicios de aumento de la gravedad de los signos clínicos al comparar el virus de más pases con la vacuna sin pases. Puede utilizarse un sistema de puntuación para cuantificar la gravedad de los signos.

3.1.2. Vacuna muerta (inactivada)

En el caso de las vacunas inactivadas (con virus muerto), las características más importantes son un alto rendimiento y una buena antigenicidad. Debe demostrarse que el virus del inóculo está libre de virus extraños, bacterias, micoplasmas u hongos, en concreto, de agentes patógenos para las aves.

3.2. Método de cultivo

El virus del inóculo de *metapneumovirus aviar* puede propagarse en distintos sistemas de cultivo celular. La vacuna a granel se distribuye en alícuotas y se liofiliza en recipientes sellados.

3.3. Validación como vacuna

Deben obtenerse datos sobre la eficacia antes de que empiece la fabricación de la vacuna a granel. La vacuna debe administrarse a aves del mismo modo en que se utilizará en el campo. Puede administrarse vacuna viva a aves de corta edad y la respuesta puede medirse serológicamente y mediante la resistencia al desafío experimental. En el caso de las vacunas muertas, debe llevarse a cabo una prueba en aves de mayor edad que sigan poniendo, utilizando el programa de vacunación recomendado, de modo que pueda demostrarse la prolongación de la seroconversión. Puede utilizarse un sistema de puntuación para cuantificar la gravedad de los signos.

3.3.1. Vacuna viva (atenuada)

Prueba de eficacia: Debe comprobarse la eficacia de cada una de las vías de administración recomendadas. Se utilizan pavos que tengan como máximo la edad mínima recomendada para la vacunación y estén libres de anticuerpos contra el MPVa. Se administra una dosis de campo de la vacuna del título mínimo recomendado por una de las vías recomendadas a cada uno de 20 pavos, manteniendo 10 pavos como controles no vacunados. Pasados 21 días, se expone a todos los pavos mediante la administración oculonasal de una dosis adecuada de una cepa virulenta del MPVa (en el Laboratorio de Referencia de la OIE para la RTP se pueden adquirir virus de desafío adecuados; véase la Tabla de la Parte 4 de este *Manual sobre Animales Terrestres*). Se observan los pavos a diario durante 10 días y se registran sus signos clínicos individualmente. La vacuna no supera la prueba a no ser que al menos el 90% de los pavos vacunados sobreviva sin presentar signos clínicos ni lesiones atribuibles a una infección por el MPVa. Puede utilizarse un sistema de puntuación para cuantificar la gravedad de los signos. Si menos de un 80% de los pavos no vacunados presenta signos clínicos tras el desafío, o más de un 10% de las aves control o inoculadas muere por causas no atribuibles a la prueba, la prueba no es válida. En el caso de que los resultados sean satisfactorios, esta prueba tiene que llevarse a cabo solo con uno de los lotes de entre todos los preparados a partir del mismo inóculo.

3.3.2. Vacuna muerta (inactivada)

Prueba de eficacia: Dado que las caídas de la puesta no son fáciles de reproducir experimentalmente, la protección inducida por la vacuna frente a la caída de la puesta tras una exposición a un MPVa virulento puede ser difícil de documentar y, por tanto, también son aceptables protocolos destinados a demostrar la reducción en los niveles de excreción. Como alternativa, también puede utilizarse la inducción de una respuesta inmunitaria duradera tras la inyección de la vacuna inactivada. Para el último experimento, se administra a un mínimo de 20 pavos no inmunizados una dosis de vacuna a la edad recomendada (cerca del pico de puesta) por una de las vías recomendadas, y la respuesta de anticuerpos se mide 4 a 6 semanas después de la vacunación, mediante ELISA o neutralización sérica. Si se recomienda una vacunación primaria con una vacuna viva, a otro grupo de pavos se administra solo la vacunación primaria, de modo que el efecto real de la vacuna inactivada pueda evaluarse individualmente.

4. Método de fabricación

La vacuna debe fabricarse en instalaciones adecuadas limpias y seguras, totalmente independientes de las instalaciones de diagnóstico y de las que albergan aves de corral comerciales.

La producción de la vacuna debe llevarse a cabo mediante un sistema de lotes de inóculo utilizando una cepa vírica adecuada de la cual se conozca el origen y el historial de pases. Deben utilizarse huevos libres de patógenos específicos para todos los materiales utilizados en la propagación y análisis de la vacuna. Las vacunas vivas se preparan mediante el crecimiento en huevos o cultivos celulares. Las vacunas inactivadas pueden prepararse utilizando virus virulentos cultivados en cultivo celular o en huevos en embrionaje. Es necesaria una alta concentración vírica. Estas vacunas se preparan como emulsiones agua-en-aceite. Una formulación habitual es utilizar un 80% de aceite mineral con un 20% de suspensión vírica, con agentes emulsionantes y conservantes adecuados.

5. Control durante el proceso

Contenido en antígeno: tras haber cultivado el virus hasta una concentración alta, su título debe determinarse mediante un cultivo de tráquea o cultivos celulares, según convenga, para la cepa vírica utilizada. El contenido en antígeno necesario para producir lotes satisfactorios de la vacuna dependerá de las determinaciones realizadas en la vacuna problema, que se ha demostrado que es eficaz en pruebas de laboratorio y en ensayos de campo.

Inactivación de vacunas muertas: esto a menudo se realiza con β -propiolactona o bien con formalina. El agente inactivante y el procedimiento de inactivación deben demostrarse en las condiciones de fabricación de la vacuna para inactivar el virus de la vacuna y cualquier posible agente contaminante, como bacterias que pueden surgir a partir de las materias primas.

Antes de la inactivación, debe tenerse cuidado de asegurar una suspensión homogénea libre de partículas que podrían no ser penetradas por el agente inactivante. Debe llevarse a cabo una prueba para la inactivación de la vacuna en cada lote tanto de la vacuna a granel tras la inactivación, como del producto final. La prueba escogida debe ser adecuada para el virus vacunal utilizado y debe consistir en al menos dos pases en cultivos celulares susceptibles, embriones o pavos, con diez réplicas por pase. No debe observarse ningún indicio de la presencia de ningún virus ni microorganismo vivo.

Esterilidad de las vacunas muertas: El aceite utilizado en la vacuna debe esterilizarse por calor a 160°C durante 1 hora, o por filtración, y debe demostrarse que el procedimiento es eficaz. Se llevan a cabo pruebas adecuadas para las vacunas basadas en una emulsión oleosa en cada uno de los lotes de vacuna final, como se ha descrito, por ejemplo, en la Farmacopea Europea.

6. Control de lotes

6.1. Esterilidad

Las pruebas de esterilidad y ausencia de contaminación en los materiales biológicos de uso veterinario se detallan en el Capítulo 1.1.9.

6.2. Inocuidad

6.2.1. Prueba de inocuidad en las vacunas vivas

Se administran diez dosis de campo de la vacuna por vía oculonasal a 10 pavos de la edad mínima recomendada para la vacunación y libres de anticuerpos contra el MPVa. Se observan los pavos a diario al menos durante 21 días. La vacuna no supera la prueba si alguno de los pavos muere o presenta signos de enfermedad atribuible a la vacuna. Si más de dos pavos presentan signos clínicos anómalos o mueren debido a causas no relacionadas con la vacuna, la prueba debe repetirse. Esta prueba se lleva a cabo en cada lote de la vacuna final.

6.2.2. Prueba de inocuidad en las vacunas vivas

Se inoculan diez pavos, libres de anticuerpos maternos contra el MPVa, y de 14–28 días de edad, por las vías recomendadas con el doble de la dosis de campo. Las aves se observan durante 3 semanas. No deben aparecer reacciones anómalas locales ni sistémicas. Esta prueba se lleva a cabo en cada lote de la vacuna final.

6.3. Potencia

6.3.1. Prueba de potencia en las vacunas vivas

En cada lote de vacuna producido debe llevarse a cabo una prueba de potencia (titulación del virus) en huevos en embrionaje, cultivos de tráquea o cultivos celulares adecuados, según convenga para el virus vacunal. En el momento de la expedición, el título de la vacuna debe ser lo bastante alto como para garantizar que el título vírico mínimo por dosis se mantendrá al menos hasta la fecha de caducidad. Además, el método descrito en el apartado C.3.3.1 Vacuna viva (prueba de eficacia) debe utilizarse en un lote representativo de todos los lotes preparados a partir del mismo lote de inóculo.

6.3.2. Prueba de potencia en las vacunas vivas

La prueba de potencia para vacunas inactivadas se lleva a cabo a partir de los resultados de la prueba de eficacia en un lote representativo de virus de inóculo primario de la vacuna, midiendo la producción de anticuerpos.

6.4. Estabilidad

Deben aportarse pruebas para al menos un lote representativo de la vacuna para demostrar que la vacuna supera la prueba de potencia del lote 3 meses después de la fecha de caducidad indicada.

6.5. Conservantes

En el caso de las vacunas que se presentan en recipientes multidosis, normalmente se requiere un conservante. Debe comprobarse la concentración del conservante en la vacuna final y su persistencia a lo largo de todo el periodo de validez. Debe utilizarse un conservante adecuado ya establecido para este fin. Existen requisitos de niveles máximos de antibióticos, conservantes y agentes inactivantes residuales.

6.6. Precauciones (riesgos)

El metapneumovirus aviar no está reconocido como agente zoonótico, pero deben aplicarse precauciones a los pasos de fabricación y durante la vacunación, con el fin de minimizar la exposición del personal a aerosoles de vacuna.

Las vacunas en emulsión oleosa causan graves lesiones a la persona que administra la vacuna si se inyectan accidentalmente en la mano u otros tejidos. En caso de que suceda un accidente de este tipo, la persona debe acudir de inmediato a un hospital, llevando consigo el envase de la vacuna y el prospecto del fabricante. Cada frasco de vacuna y envase deben mostrar una advertencia clara de las graves consecuencias de una auto-lesión accidental.

7. Pruebas en el producto final

7.1. Inocuidad

Véase el apartado C.6.3.

7.2. Potencia

Véase el apartado C.6.3.

BIBLIOGRAFÍA

ALKHALAF A.N., WARD L.A., DEARTH R.N. & SAIF Y.M. (2002). Pathogenicity, transmissibility and tissue distribution of avian pneumovirus in turkey poult. *Avian Dis.*, **46**, 650–659.

BĀYON-AUBOYER M.H., ARNAULD C., TOQUIN D. & ETERRADOSSI N. (2000). Nucleotide sequences of the F, L and G protein genes of two non-A/non-B avian pneumoviruses (APV) reveal a novel APV subgroup. *J. Gen. Virol.*, **81**, 2723–2733.

- BÄYON-AUBOYER M.H., JESTIN V., TOQUIN D., CHERBONNEL M. & ETERRADOSSI N. (1999). Comparison of F-, G- and N-based RT-PCR protocols with conventional virological procedures for the detection and typing of turkey rhinotracheitis virus. *Arch. Virol.*, **144**, 1091–1109.
- Bennett R.S., Nezworski J., Velayudhan B.T., Nagaraja K.V., Zeman D.H., Dyer N. Graham T., Lauer D.C., Njenga M.K. & Halvorson D.A. (2004). Evidence of avian pneumovirus spread beyond Minnesota among wild and domestic birds in central North America. *Avian Dis.*, **48**, 902–908.
- BUYS S.B., DU PREEZ J.H. & ELS H.J. (1989). The isolation and attenuation of a virus causing rhinotracheitis in turkeys in South Africa. *Onderstepoort J. Vet. Res.*, **56**, 87–98.
- CHIANG S., DAR A.M., GOYAL S.M., SHEIKH M.A., PEDERSEN J.C., PANIGRAHY B., SENNE D., HALVORSON D.A., NAGARAJA K.V. & KAPUR V. (2000). A modified enzyme-linked immunosorbent assay for the detection of avian pneumovirus antibodies. *J. Vet. Diagn. Invest.*, **12**, 381–384.
- COLLINS M.S. & GOUGH R.E. (1988). Characterization of a virus associated with turkey rhinotracheitis. *J. Gen. Virol.*, **69**, 909–916.
- COLLINS M.S., GOUGH R.E. & ALEXANDER D.J. (1993). Antigenic differentiation of avian pneumovirus isolates using polyclonal antibody and mouse monoclonal antibodies. *Avian Pathol.*, **22**, 469–479.
- COOK J.K.A. (2000a). Avian rhinotracheitis. *Rev. Sci. Tech. Off. Int. Epiz.*, **19**, 602–613.
- COOK J.K.A. (2000b). Avian pneumovirus infections of turkey and chickens. *Vet. J.* **160**, 118–125.
- COOK J.K.A. & CAVANAGH D. (2002). Detection and differentiation of avian pneumoviruses (metapneumoviruses). *Avian Pathol.*, **31**, 117–132.
- COOK J.K.A., ELLIS M.M. & HUGGINS M.B. (1991). The pathogenesis of turkey rhinotracheitis virus in turkey poultlets inoculated with the virus alone or together with two strains of bacteria. *Avian Pathol.*, **20**, 155–166.
- COOK J.K.A., HUGGINS M.B., ORVELL S.J. & SENNE D.A. (1999). Preliminary antigenic characterization of an avian pneumovirus isolated from commercial turkeys in Colorado, USA. *Avian Pathol.*, **28**, 607–617.
- COOK J.K.A., JONES B. V., ELLIS M. M., LI J. & CAVANAGH D. (1993a). Antigenic differentiation of strains of turkey rhinotracheitis virus using monoclonal antibodies. *Avian Pathol.*, **22**, 257–273.
- COOK J.K.A., KINLOCH S., & ELLIS M.M. (1993b). *In vitro* and *in vivo* studies in chickens and turkeys on strains of turkey rhinotracheitis virus isolated from the two species. *Avian Pathol.*, **22**, 157–170.
- ETERRADOSSI N., TOQUIN D., GUITTET M. & BENEJEAN G. (1995). Evaluation of different turkey rhinotracheitis viruses used as antigens for serological testing following live vaccination and challenge. *J. Vet Med. [B]*, **42**, 175–186.
- GIRAUD P., GUITTET M., TOQUIN D. & BENEJEAN G. (1988). La rhinotrachéite infectieuse de la dinde: description et rôle d'un nouvel agent viral. *Rec. Med. Vet.*, **164**, 1, 39–44.
- GIRAUD P., TOQUIN D., PICAULT J.P., GUITTET M. & BENEJEAN G. (1987). Utilisation de la méthode ELISA pour le sérodiagnostic de l'infection par le virus de la rhinotrachéite infectieuse chez la dinde la poule et la pintade. *Bull. Lab. Vet.*, **27–28**, 71–75.
- GOUGH R.E. (2003). Avian pneumoviruses. *In: Diseases of Poultry*, eleventh edition, Saif Y.M., Barnes H.J., Glisson J.R., Fadly A.M., McDougald L.R. & Swayne D., eds. Blackwell Publishing, 92–99.
- GOUGH R.E., COLLINS M.S., COX W.J. & CHETTLE N.J. (1988). Experimental infection of turkeys, chickens, ducks, guinea fowl, pheasants and pigeons with turkey rhinotracheitis virus. *Vet. Rec.*, **123**, 58–59.
- GOUGH R.E., MANVELL R.J., DRURY S.E.N. & PEARSON D.B. (1994). Isolation of an avian pneumovirus from broiler chickens. *Vet. Rec.*, **134**, 353–354.

- GOYAL S.M., CHIANG S.J., DAR A.M., NAGARAJA K.V., SHAW D.P., HALVORSON D.A. & KAPUR V. (2000). Isolation of avian pneumovirus from an outbreak of respiratory illness in Minnesota turkeys. *J. Vet. Diagn. Invest.*, **12**, 166–168.
- GRANT M., BAXTER-JONES C. & WILDING G.P. (1987). An enzyme-linked immunosorbent assay for the serodiagnosis of turkey rhinotracheitis infection. *Vet. Rec.*, **120**, 279–280.
- GUIONIE O., TOQUIN D., ZWINGELSTEIN F., ALLEE C., SELLAL E., LEMIERE S. & ETERRADOSSI N. (2007). A laboratory evaluation of a quantitative real-time RT-PCR for the detection and identification of the four subgroups of avian metapneumoviruses. *J. Virol. Methods*, **139**, 150–158.
- JIRJIS F.F., NOLL S.L., HALVORSON D.A., NAGARAJA K.V., MARTIN F. & SHAW D.P. (2004). Effects of bacterial coinfection on the pathogenesis of avian pneumovirus infection in turkeys. *Avian Dis.*, **48**, 34–49.
- JONES R.C., WILLIAMS R.A., BAXTER-JONES C., SAVAGE C.E. & WILDING P. (1988). Experimental infection of laying turkeys with rhinotracheitis virus: distribution of virus in the tissues and serological response. *Avian Pathol.*, **17**, 841–850.
- JUHASZ K. & EASTON A. J. (1994). Extensive sequence variation in the attachment (G) protein gene of avian pneumovirus: evidence for two distinct subgroups. *J. Gen. Virol.*, **75**, 2873–2880.
- LEE E.H., SONG M.S., SHIN J.Y., LEE Y.M., KIM C.J., LEE Y.S., KIM H. & CHOI Y.K. (2007). Genetic characterization of avian metapneumovirus subtype C from pheasants in a live bird market. *Virus Res.*, **128**, 18–25.
- LWAMBA H.C.M., ALVAREZ R., WISE M.G., YU Q. HALVORSON D., NJENGA M.K. & SEAL B.S. (2005). Comparison of full-length genome sequence of avian metapneumovirus subtype C with other paramyxoviruses. *Virus Res.*, **107**, 83–92.
- MAJO N., ALLAN G.M., O'LOAN C.J., PAGES A. & RAMIS A.J. (1995). A sequential histopathologic and immunocytochemical study of chickens, turkey poults and broiler breeders experimentally infected with turkey rhinotracheitis virus. *Avian Dis.*, **39**, 887–896.
- MASE M.S., ASAH I S., IMARI K. NAKAMURA K & YAMAGUCHI S. (1996). Detection of turkey rhinotracheitis virus from chickens with swollen head syndrome by reverse transcriptase-polymerase chain reaction (RT-PCR). *J. Vet. Med. Sci.*, **58**, 359–361.
- MASE M., YAMAGUCHI S., TSUKAMOTO K., IMADA T., IMAI K. & NAKAMURA K. (2003). Presence of avian pneumovirus subtypes A and B in Japan. *Avian Dis.*, **47**, 481–484.
- McFARLANE-TOMS I.P. & JACKSON R.J.H. (1998). A comparison of three commercially available ELISAs for detecting antibodies to turkey rhinotracheitis virus (TRTV). *Proceedings of the International Symposium on Infectious Bronchitis and Pneumovirus infections in Poultry*, Rauschholzhausen, Germany, 15–18 June, 26–37.
- MEKKES D.R. & DE WIT J.J. (1999). Comparison of three commercial ELISA kits for the detection of turkey rhinotracheitis virus antibodies. *Avian Pathol.*, **27**, 301–305.
- MORLEY A.J. & THOMSON D.K. (1984). Swollen-head syndrome in broiler chickens. *Avian Dis.*, **28**, 238–243.
- NAYLOR C.J. & JONES R.C. (1993). Turkey rhinotracheitis: a review. *Vet. Bull.*, **63**, 439–449.
- NAYLOR C., SHAW K., BRITTON P. & CAVANAGH D. (1997). Appearance of type B avian pneumovirus in Great Britain. *Avian Pathol.*, **26**, 327–338.
- NJENGA M.K., LWAMBA H.M. & SEAL B.S. (2003). Metapneumoviruses in birds and humans. *Virus Res.*, **91**, 163–169.
- O'BRIEN J.D.P. (1985). Swollen head syndrome in broiler breeders. *Vet. Rec.*, **117**, 619–620.
- PATTISON M., CHETTLE N., RANDALL C.J. & WYETH P.J. (1989). Observations on swollen head syndrome in broiler and broiler breeder chickens. *Vet. Rec.*, **125**, 229–231.

- PEDERSEN J.C., REYNOLDS D.L. & ALI A. (2000). The sensitivity and specificity of a reverse transcriptase-polymerase chain reaction assay for the avian pneumovirus (Colorado strain). *Avian Dis.*, **44**, 681–685.
- PEDERSEN J.C., SENNE D.A., PANIGRAHY B. & REYNOLDS D.L. (2001). Detection of avian pneumovirus in tissue and swab specimens from infected turkeys. *Avian Dis.*, **45**, 581–592.
- PICAULT J.P., GIRAUD P., DROUIN P., GUITTET M., BENNEJEAN G., LAMANDE J., TOQUIN D. & GUEGUEN C. (1987). Isolation of a TRTV-like virus from chickens with swollen-head syndrome. *Vet. Rec.*, **121**, 135.
- PRINGLE C.R. (1998). Virus Taxonomy-San Diego. *Arch. Virol.*, **143**, 1449–1459.
- SENNE D.A., EDSON R.K., PEDERSEN J.C. & PANIGRAHY B. (1997). Avian pneumovirus update. *In: Proceedings of the American Veterinary Medical Association, 134th Annual Congress, Reno, Nevada, July 1997*, p.190.
- SHIN H.J., JIRJIS F.F., KUMAR M.C., NJENGA M.K., SHAW D.P., NOLL S.L., NAGARAJA K.V. & HALVORSON D.A. (2002a). Neonatal avian pneumovirus infection in commercial turkeys. *Avian Dis.*, **46**, 239–244.
- SHIN H.J., MCCOMB B., BACK A., SHAW D.P., HALVORSON D.A. & NAGARAJA K. (2000). Susceptibility of broiler chicks to infection by avian pneumovirus of turkey origin. *Avian Dis.*, **44**, 797–802.
- SHIN H.J., NAGARAJA K.V., MCCOMB B., HALVORSON D.A., JIRJIS F.F., SHAW D.P., SEAL B.S. & NJENGA M.K. (2002b). Isolation of avian pneumovirus from mallard ducks that is genetically similar to viruses isolated from neighbouring commercial turkeys. *Virus Res.*, **83**, 207–212.
- STUART J.C. (1989). Rhinotracheitis: turkey rhinotracheitis (TRT) in Great Britain. *Recent Advances in Turkey Science. Poultry Science Symposium*, **21**, 217–224.
- TANAKA M., TAKUMA H., KOKUMAI N., OISHI E., OBI T., HIRAMATSU K. & SHIMIZU Y. (1995). Turkey rhinotracheitis virus isolated from broiler chicken with swollen head syndrome in Japan. *J. Vet. Med. Sci.*, **57**, 939–945.
- TOQUIN D., BAYON-AUBOYER M.H., ETERRADOSSI N., MORIN H. & JESTIN V. (1999). Isolation of a pneumovirus from a Muscovy duck. *Vet. Rec.*, **145**, 680.
- TOQUIN D., BAYON-AUBOYER M.H., SENNE D. & ETERRADOSSI N. (2000). Lack of antigenic relationship between early French and recent North-American non-A non-B turkey rhinotracheitis viruses. *Avian Dis.*, **44**, 977–982.
- TOQUIN D., DE BOISSESON C., BEVEN V., SENNE D.A. & ETERRADOSSI N. (2003). Subgroup C avian metapneumovirus (MPV) and the recently isolated human MPV exhibit a common organization but have extensive sequence divergence in their putative SH and G genes. *J. Gen. Virol.*, **84**, 2169–2178.
- TOQUIN D., GUIONIE O., JESTIN V., ZWINGELSTEIN F., ALLEE C. & ETERRADOSSI N. (2006) European and American subgroup C isolates of avian metapneumovirus belong to different genetic lineages. *Virus Genes*, **32**, 97–103.
- VAN DEN HOOGEN B.G., DE JONG J.C., GROEN J., KUIKEN T., DE GROOT R., FOUCHIER R.A.M. & OSTERHAUS A.D.M.E. (2001) A newly discovered human pneumovirus isolated from young children with respiratory tract disease. *Nature Med.*, **7**, 719–724.
- VAN DE ZANDE S., NAUWYNCK H., DE JONGHE S. & PENSART M. (1999). Comparative pathogenesis of a subtype A with a subtype B avian pneumovirus in turkeys. *Avian Pathol.*, **28**, 239–244.
- VAN DE ZANDE S., NAUWYNCK H., NAYLOR C. & PENSART M. (2000). Duration of cross-protection between subtypes A and B avian pneumovirus in turkeys. *Vet. Rec.*, **147**, 132–134.
- VAN LOOCK M., LOOTS K., ZANDE SV, HEERDEN MV, NAUWYNCK H, GODDEERIS BM, VANROMPAY D. (2006) Pathogenic interactions between *Chlamydophila psittaci* and avian pneumovirus infections in turkeys. *Vet. Microbiol.*, **10**, 53–63.
- VELAYUDHAN B.T., MCCOMB B., BENNETT R.S., LOPES V.C., SHAW D., HALVORSON D.A., NAGARAJA K.V. (2005). Emergence of a virulent type C avian metapneumovirus in turkeys in Minnesota. *Avian Dis.*, **49**, 520–526.

WORTHINGTON K.J., SARGENT B.A., DAVELAAR F.G. & JONES R.C. (2003). Immunity to avian pneumovirus infection in turkeys following *in ovo* vaccination with an attenuated vaccine. *Vaccine*, **21**, 1355–1362.

YU Q., DAVIS P.J., LI J. & CAVANAGH D. (1992). Cloning and sequencing of the matrix protein (M) gene of turkey rhinotracheitis virus reveals a gene order different from that of respiratory syncytial virus. *Virology*, **186**, 426–434.

*

* *

NB: Existe un Laboratorio de Referencia de la OIE para la rinotraqueítis del pavo (puede consultarse la lista actualizada en la Tabla de la Parte 4 de este *Manual Terrestre* o en la página web de la OIE:

<http://www.oie.int/es/nuestra-experiencia-cientifica/laboratorios-de-referencia/lista-des-laboratorios/>).

Por favor, contacte el Laboratorio de Referencia de la OIE para cualquier otro dato sobre las pruebas de diagnóstico, los reactivos y las vacunas para la rinotraqueítis del pavo

NB: ADOPTADO POR PRIMERA VEZ EN 2008; ÚLTIMAS ACTUALIZACIONES ADOPTADAS EN 2009.