

ENFERMEDAD DE NEWCASTLE (INFECCIÓN POR EL VIRUS DE LA ENFERMEDAD DE NEWCASTLE)

RESUMEN

La enfermedad de Newcastle (EN) está causada por cepas virulentas de paramixovirus tipo 1 (PMVA-1), del género Avulavirus, perteneciente a la familia Paramyxoviridae. Existen diez serotipos de paramixovirus aviares, denominados PMVA-1 a PMVA-10.

Se ha demostrado que el virus de la EN (VEN) es capaz de infectar más de 200 especies de aves, pero la gravedad de la enfermedad causada depende de cuál sea el hospedador y la cepa del virus. Incluso las cepas de PMVA-1 de baja virulencia pueden inducir una enfermedad respiratoria grave si se exacerban por la presencia de otros microorganismos o por condiciones ambientales adversas. El método preferido de diagnóstico es el aislamiento del virus y su subsiguiente caracterización.

Identificación del agente: Se preparan suspensiones en solución antibiótica a partir de hisopos traqueales u orofaríngeos y cloacales (o heces) obtenidos de aves vivas o de heces y muestras combinadas de órganos tomadas de aves muertas que se inoculan en la cavidad alantoidea de huevos de aves de corral con 9-11 días de embrionaje. Los huevos se incuban a 37°C durante 4–7 días. El líquido alantoideo de cualquier huevo que contenga embriones muertos o moribundos al eclosionar, así como todos los huevos al final del periodo de incubación se analizan para comprobar si presentan actividad hemoaglutinante y/o empleando métodos moleculares específicos validados.

En cualquiera de los agentes hemoaglutinantes debe comprobarse si presenta inhibición específica con un antisuero monoespecífico frente al PMVA-1. El PMVA-1 puede mostrar cierta relación antigénica cruzada con algunos de los demás serotipos del paramixovirus aviar, en concreto el PMVA-3 y el PMVA-7.

El índice de patogenicidad intracerebral (ICPI) puede emplearse para determinar la virulencia de cualquier PMVA-1 que se acabe de aislar. Como alternativa, la virulencia también se puede evaluar empleando técnicas moleculares, p. ej. la reacción en cadena de la polimerasa con transcripción inversa y la secuenciación. La EN está sometida a un control oficial en la mayoría de países y es un virus muy fácil de propagar desde el laboratorio; de ahí la necesidad de mantener las medidas adecuadas de bioseguridad y seguridad humana; para determinar el grado necesario de tales medidas es preciso llevar a cabo una evaluación de riesgo.

Pruebas serológicas: La prueba de inhibición de la hemoaglutinación (HI) es la más ampliamente utilizada en la serología de la EN; su relevancia en el diagnóstico depende del estado inmunitario vacunal de las aves a analizar y de las condiciones predominantes de la enfermedad.

Requisitos para las vacunas: Dependiendo de la situación de la enfermedad y de los requisitos nacionales, se emplean virus vivos de baja virulencia (lentogénicos) o de virulencia moderada (mesogénicos) para la vacunación de aves de corral. También se utilizan vacunas inactivadas.

Las vacunas vivas se pueden administrar a las aves por diversas vías. Normalmente se preparan mediante la extracción de líquidos alantoideos/amnióticos infectados procedentes de huevos embrionarios inoculados; algunas se preparan a partir de cultivos celulares infectados. El producto final debe derivar de la propagación de los inóculos original y de trabajo.

Las vacunas inactivadas se administran por vía intramuscular o subcutánea. Habitualmente se obtienen mediante la adición de formaldehído a preparaciones víricas infectivas o mediante

tratamiento con beta-propiolactona. La mayoría de vacunas inactivadas se preparan para ser utilizadas mediante una emulsión con aceite vegetal o mineral.

Recientemente se han desarrollado y autorizado vacunas recombinantes contra la enfermedad de Newcastle empleando vectores víricos como el herpesvirus del pavo o el virus de la viruela aviar, en los que se expresa el gen HN, el F o ambos.

Si se emplean formas virulentas del VEN para la producción de vacunas o en estudios de desafío, la instalación debe cumplir los requisitos de la OIE para los patógenos del nivel de Contención del Grupo 4, que en general es equivalente al Nivel 3 de Bioseguridad Agricultura (BSL3-Ag) o al Nivel 3 de Bioseguridad Mejorado (BSL3-E) del Departamento de Agricultura de EE.UU. En algunos países puede ser necesaria una supervisión reguladora adicional.

A. INTRODUCCIÓN

La enfermedad de Newcastle (EN) está causada por cepas virulentas del paramixovirus aviar tipo 1 (PMVA-1), que es un serotipo del género *Avulavirus* perteneciente a la subfamilia *Paramyxovirinae*, familia *Paramyxoviridae*. Los paramixovirus aislados procedentes de especies aviares se han clasificado mediante pruebas serológicas y análisis filogenéticos en diez subtipos, denominados PMVA-1 a PMVA-10 (Miller *et al.*, 2010a); el virus de la EN (VEN) se ha denominado PMVA-1 (Alexander & Senne, 2008b).

Desde su reconocimiento en 1926, la EN se considera endémica en muchos países. La vacunación profiláctica se practica en casi todos los países productores de aves de corral a escala comercial.

Una de las propiedades más características de las distintas cepas del VEN es su enorme variación respecto a la patogenicidad en los pollos. Las cepas del VEN se agrupan en cinco patotipos en base a los signos clínicos observados en los pollos infectados (Alexander & Senne, 2008b). Estos son:

1. Velogénico viscerotrópico: es una forma muy patógena en la que se observan frecuentemente lesiones intestinales hemorrágicas;
2. Velogénico neurotrópico: se presenta con mortalidad elevada, habitualmente después de signos respiratorios y nerviosos;
3. Mesogénico: se presenta con signos respiratorios y signos nerviosos ocasionales pero baja mortalidad;
4. Lentogénico o respiratorio: se presenta con una infección respiratoria leve o subclínica;
5. Entérico asintomático: normalmente consiste en una infección entérica subclínica.

Las agrupaciones en patotipos casi nunca están claramente definidas (Alexander & Allan, 1974), e incluso en infecciones de aves libres de patógenos específicos (SPF) se puede apreciar un considerable solapamiento. Además, puede tener lugar una exacerbación de los signos clínicos inducida por las cepas más benignas si se superponen infecciones por otros microorganismos o en caso de condiciones medioambientales adversas. Como los signos de la enfermedad clínica en pollos varían ampliamente y el diagnóstico puede complicarse posteriormente por las respuestas diferentes a la infección en los distintos hospedadores, los signos clínicos por sí solos no son fiables para el diagnóstico de la EN. Sin embargo, los signos clínicos y las lesiones asociadas con los patotipos virulentos proporcionarán una fuerte sospecha de enfermedad.

El VEN es un agente patógeno de los humanos y el signo de infección más frecuente es la conjuntivitis, que aparece en un plazo de 24 horas tras la exposición al VEN por vía ocular (Swayne & King, 2003). Las infecciones registradas no suponen un riesgo para la vida y la debilidad que causan no dura más de dos o tres días (Chang, 1981). Los síntomas que con mayor frecuencia se han señalado en las infecciones humanas son la infección ocular, que normalmente consiste en enrojecimiento de uno o de los dos ojos, lagrimeo excesivo, edema palpebral, conjuntivitis, y hemorragia subconjuntival. Aunque el daño ocular puede ser bastante grave, las infecciones suelen ser pasajeras y la cornea no se ve afectada. No existe evidencia de contagio entre humanos. Se dispone de un informe del aislamiento de un PMVA-1 variante paloma procedente de tejido pulmonar, orina y heces de un paciente inmunocomprometido que murió de neumonía (Goebel *et al.*, 2007).

La EN, tal como se la define en el apartado B.1.6 de este capítulo, está sometida a control oficial en la mayoría de los países y existe un gran riesgo de propagación del virus desde el laboratorio; de ahí que se deba llevar a cabo una evaluación del riesgo para determinar el nivel de bioseguridad y seguridad humana necesario para llevar a cabo el diagnóstico y la caracterización del virus. La instalación debe cumplir los requisitos para el Grupo de contención adecuado, tal como determina la valoración de riesgos y como se esboza en el capítulo 1.1.4 *Bioseguridad y bioprotección: norma para la gestión del riesgo biológico en el laboratorio veterinario y en las*

instalaciones de los animales. Los países que no tienen acceso a laboratorios nacionales o regionales deben enviar muestras a un Laboratorio de Referencia de la OIE.

B. TÉCNICAS DE DIAGNÓSTICO

1. Identificación del agente

1.1. Muestras para el aislamiento vírico

Cuando se estudia la EN como consecuencia de la aparición de enfermedad severa y mortalidad elevada en grupos de aves de corral, es corriente intentar el aislamiento del virus a partir de aves muertas recientemente o aves moribundas que se sacrifican por métodos humanitarios. Las muestras procedentes de aves muertas deben consistir en hisopos oronasales, así como tejidos de pulmón, riñones, intestino (incluyendo contenido), amígdalas cecales, bazo, encéfalo, hígado y corazón. Pueden recogerse separadamente o combinadas, aunque, habitualmente, las muestras intestinales y las de encéfalo se procesan de forma separada de otras muestras.

Las muestras procedentes de aves vivas deben incluir tanto hisopos traqueales u orofaríngeos como cloacales, y estos últimos deben estar visiblemente cubiertos de material fecal. La aplicación del hisopo puede dañar a las aves pequeñas y delicadas, pero en estos casos puede optarse por la recogida de heces frescas, que constituye una buena alternativa.

En el caso de que haya pocas oportunidades de obtener muestras, es importante que se examinen los hisopos cloacales (o fecales) y los traqueales (u orofaríngeos) o el tejido traqueal, así como órganos o tejidos afectados macroscópicamente o asociados a la enfermedad clínica. Las muestras deben tomarse en las primeras fases de la enfermedad.

Las muestras deben ponerse en solución salina isotónica tamponada con fosfato (PBS), pH 7,0–7,4, que contenga antibióticos. También se han utilizado medios basados en proteína, como infusión de cerebro-corazón (BHI) o caldo de triptosa tamponado con Tris (TBTB), lo que puede incrementar la estabilidad del virus, sobre todo durante el transporte. Los antibióticos pueden variar de acuerdo a las condiciones locales, pero podría ser, por ejemplo, penicilina (2.000 unidades/ml); estreptomycin (2 mg/ml); gentamicina (50 µg/ml); y micostatina (1.000 unidades/ml) para hisopos traqueales y de tejidos, pero a concentraciones cinco veces superiores para hisopos cloacales y de heces. Es importante reajustar la solución reserva concentrada a pH 7,0–7,4 antes de añadirla a la muestra. Si se quiere controlar *Chlamydomphila*, se debe incluir 0,05-0,1 mg/ml de oxitetraciclina. Las heces y los tejidos troceados finamente deben prepararse como suspensiones al 10–20% (p/v) en la solución de antibiótico. Las suspensiones deben procesarse cuanto antes tras la incubación, durante 1–2 horas a temperatura ambiente. Cuando no puedan procesarse de inmediato, las muestras pueden conservarse a 4°C hasta 4 días.

1.2. Aislamiento del virus (prueba prescrita para el comercio internacional)

Los líquidos sobrenadantes de las heces o las suspensiones de tejidos e hisopos obtenidos mediante clarificación por centrifugación a 1.000 **g** durante aproximadamente 10 minutos a una temperatura que no exceda los 25°C se inoculan en volúmenes de 0,2 ml en la cavidad alantoidea de cada uno de al menos cinco huevos embrionarios de aves SPF de 9–11 días de incubación. Si no se dispone de huevos de aves SPF, serán necesarios huevos negativos al menos para anticuerpos contra el VEN. Después de la inoculación, se incuban a 35–37°C durante 4–7 días. Para acelerar el aislamiento final, se pueden llevar a cabo dos pases con una diferencia de 3 días, con lo que se obtendrán resultados comparables a dos pases con un intervalo de 4-7 días (Alexander & Senne, 2008a). Los huevos que contengan embriones muertos o moribundos al eclosionar, y todos los huevos que al final del periodo de incubación todavía no hayan eclosionado, deben enfriarse primero a 4°C durante 4 horas o durante toda la noche, y en los líquidos alantoideos debe comprobarse si hay actividad de hemoaglutinación (HA). Los líquidos que den una reacción negativa deben ser pasados al menos en un lote más de huevos. Deben realizarse pruebas sistemáticas de contaminación sembrando muestras en placas de agar Luria Broth y leyéndolas a las 24 y 48 horas de incubación a contraluz. Las muestras contaminadas se pueden tratar mediante incubación durante 2-4 horas con concentraciones de antibiótico aumentadas (soluciones de gentamicina, penicilina G, y anfotericina B a unas concentraciones finales de un máximo de 1 mg/ml, 10,000 U/ml, y 20 µg/ml, respectivamente). Las muestras muy contaminadas por bacterias que no puedan eliminarse por centrifugación ni controlarse mediante antibióticos pueden filtrarse por filtros estériles de 0,45 y 0,2 micras. La filtración debe emplearse solo cuando otros métodos fracasen, porque la agregación puede reducir de forma considerable el título vírico.

Para intentar el aislamiento en cultivos celulares también puede emplearse la suspensión de órganos, heces o hisopos homogenados preparados igual que para el aislamiento en huevos. Las cepas del PMVA-1 pueden replicarse en gran variedad de cultivos celulares de origen aviar y no aviar, entre los cuales los más utilizados son los siguientes: células de hígado de embrión de pollo (CEL), células de riñón de embrión de pollo (CEK), fibroblastos de embrión de pollo (CEF), células de riñón de mono verde africano (Vero), células miógenas aviares (QM5) y células relacionadas con el embrión de pollo (CER) (Terregino & Capua, 2009). Los cultivos celulares primarios de origen aviar son los más susceptibles. Para optimizar la probabilidad de recuperación de virus en el caso de cepas de baja virulencia, debe añadirse tripsina al medio de cultivo. La concentración de tripsina variará en función del tipo de tripsina y del tipo de células empleadas. Un ejemplo es añadir 0,5 µg/ml de tripsina porcina a células CEF. El cultivo vírico suele ir acompañado de efectos citopáticos, típicamente caracterizados por la perturbación de la monocapa y la formación de sincitios.

El sistema de cultivo óptimo para el virus depende hasta cierto punto de la cepa. Algunas cepas de PMVA-1 crecen mal en cultivo celular y se replican hasta títulos más altos en huevos embrionados, mientras que algunas cepas de PMV-1 variante paloma (PPMV-1) y de PMVA-1, como la cepa apatógena de Ulster, pueden aislarse en hígado de pollo o células renales de pollo pero no en huevos embrionados (Kouwenhoven, 1993). Siempre que sea posible, y principalmente cuando se trata con muestras sospechosas de estar infectadas por el PPMV-1, el aislamiento del virus debe intentarse empleando ambos sustratos (huevos embrionados y células primarias de embrión de pollo). Dado que el título vírico obtenido en cultivo celular suele ser muy bajo, deben realizarse otros pasos de replicación en huevos embrionados antes de caracterizar la cepa mediante HI u otros métodos fenotípicos.

1.3. Identificación del virus

La actividad HA detectada en líquidos bacteriológicamente estériles recogidos a partir de huevos inoculados puede deberse a la presencia de cualquiera de los diez subtipos de PMVA (incluido el VEN) o de los 16 subtipos de hemoaglutinina de los virus de la influenza A. El líquido no estéril podría contener actividad HA bacteriana. El VEN puede confirmarse empleando antisuero específico en una prueba de inhibición de la hemoaglutinación (HI). Habitualmente se utiliza el antisuero de pollo preparado contra una de las cepas del VEN.

En la prueba de la HI, puede observarse cierto nivel de reactividad cruzada entre los distintos serotipos de paramixovirus aviares. Puede observarse reactividad cruzada entre virus PMVA-1 y PMVA-3 (en concreto con la variante de las psitácidas PMVA-3, frecuentemente aislada de aves mascota o exóticas) o PMVA-7. El riesgo de tipificar erróneamente una cepa puede reducirse mucho empleando valores de sueros de referencia o anticuerpos monoclonales (MAbs) específicos de PMVA-1, PMVA-3 and PMVA-7.

Actualmente, las técnicas basadas en la RT-PCR para la detección y tipificación (patotipificación y genotipificación) del ARN del PMVA-1 en líquido alantoideo de huevos de aves de corral inoculados es cada vez más frecuente en los laboratorios de diagnóstico. No obstante, la variabilidad genética de las cepas de PMVA-1 debe tenerse muy en cuenta como posible causa de falsos negativos en las pruebas de laboratorio basadas en la genética. Véanse los apartados B.1.5, B.1.8 y B.1.9 de este capítulo.

1.4. Índice de patogenicidad

La variación extrema en la virulencia de las distintas cepas del VEN y el uso generalizado de vacunas vivas implica que la identificación de una cepa como PMVA-1 a partir de aves que presenten signos clínicos no confirma un diagnóstico de EN, por lo que también se requiere una valoración de la virulencia de la cepa (véase el apartado B.1.6 bajo el título "Definición de la enfermedad de Newcastle"). En el pasado, se han utilizado pruebas como el promedio de muerte en huevos, la prueba de la patogenicidad intravenosa, y variaciones de esas pruebas (Alexander & Senne, 2008b), pero por acuerdo internacional, se utiliza la prueba del índice de patogenicidad intracerebral (ICPI) para la valoración de la virulencia del virus. La definición actual de la Organización Mundial de Sanidad Animal (OIE) (apartado B.1.6 más adelante) también reconoce los avances en los conocimientos sobre las bases moleculares de la patogenicidad y permite una confirmación de la virulencia, aunque no de la ausencia de virulencia, mediante pruebas *in vitro* para determinar la secuencia de aminoácidos en el punto de escisión de la proteína F0. Dada la severidad del procedimiento, el ICPI solo debe emplearse cuando esté claramente justificado por las circunstancias epidemiológicas, por ejemplo, en la primera cepa aislada de un brote. No sería adecuado emplear el ICPI para cepas detectadas en la vigilancia rutinaria de aves sanas.

Las pruebas *in vivo* en cepas aisladas de especies distintas del pollo (como palomas) pueden causar ciertos problemas y pueden no producir lecturas exactas hasta que se pasan en pollos o huevos de pollo embrionados (Alexander & Parsons, 1986) Mediante la infección experimental de un número estadísticamente significativo (≥ 10) de aves jóvenes y adultas con una dosis estándar de virus (por ejemplo, de 10^5 DIH₅₀) administrada por vías naturales (como la oro-nasal) se podría obtener una información más exacta sobre la patogenicidad real de los virus de la EN en una especie susceptible.

1.4.1. Índice de patogenicidad intracerebral

- i) Se diluye líquido alantoideo infectivo y fresco con un título HA $>2^4$ ($>1/16$) a 1/10 en solución salina isotónica estéril sin aditivos, tales como antibióticos.
- ii) Se inyectan por vía intracerebral 0,05 ml del virus diluido en diez polluelos procedentes de huevos de un grupo de aves SPF. En el momento de la inoculación, estos polluelos deben tener más de 24 y menos de 40 horas de vida.
- iii) Las aves se examinan cada 24 horas durante 8 días.
- iv) En cada observación, las aves se puntúan: 0 si es normal, 1 si está enferma y 2 si está muerta. Las aves que están vivas pero son incapaces de comer o beber deben sacrificarse por métodos humanitarios y ser contabilizadas como muertas en la observación posterior. (Los individuos muertos deben puntuarse como 2 en cada una de las observaciones diarias siguientes a la muerte).
- v) El índice de patogenicidad intracerebral (ICPI) es la puntuación media por ave y por observación durante el periodo de 8 días.

Los virus más virulentos presentarán índices que se aproximan a la puntuación máxima de 2,0, mientras que las cepas entéricas lentogénicas y asintomáticas presentarán valores próximos a 0,0.

1.5. Base molecular de la patogenicidad

Durante la replicación, las partículas del PMVA-1 se producen con un precursor glucoproteico, F0, que tiene que escindirse en F1 y F2 para que las partículas víricas sean infectivas. Esta división post-traduccional está mediada por proteasas de la célula hospedadora. La tripsina es capaz de escindir F0 de todas las cepas del VEN.

Parece ser que las moléculas F0 de virus virulentos para los pollos pueden dividirse mediante una proteasa del hospedador o proteasas encontradas en un rango amplio de células y tejidos y, de este modo, diseminarse por todo el hospedador dañando órganos vitales, mientras que las moléculas F0 de los virus de baja virulencia solo se escinden mediante ciertas proteasas del hospedador, lo cual implica que estos virus solo se replican en ciertos tipos de células hospedadoras.

La mayoría de los virus PMVA-1 que son patógenos para los pollos tienen la secuencia ¹¹²R/K-R-Q-K/R-R¹¹⁶ (Choi *et al.*, 2010; Kim *et al.*, 2008a) en el extremo C-terminal de la proteína F2 y F (fenilalanina) en el residuo 117, el extremo N-terminal de la proteína F1, mientras que los virus de baja virulencia tienen secuencias en la misma región de ¹¹²G/E-K/R-Q-G/E-R¹¹⁶ y L (leucina) en el residuo 117. Algunos de los virus examinados de la variante de la paloma (PPMV-1) tienen la secuencia ¹¹²G-R-Q-K-R-F¹¹⁷, pero tienen valores de ICPI altos (Meulemans *et al.*, 2002). Así, para que el virus sea virulento en los pollos parece ser que existe el requisito de al menos un par de aminoácidos básicos en los residuos 116 y 115 más una fenilalanina en el residuo 117 y un aminoácido básico (R) en 113. Sin embargo, algunos PPMV-1 pueden tener puntos de escisión relacionados con la virulencia y valores de ICPI bajos (Collins *et al.*, 1994). Este fenómeno se ha asociado no a la proteína de fusión (Dortmans *et al.*, 2009), sino al complejo de replicación formado por la nucleoproteína, la fosfoproteína y la polimerasa (Dortmans *et al.*, 2010).

Se han realizado diversos estudios empleando técnicas moleculares para determinar la secuencia del punto de escisión de F0 mediante la reacción en cadena de la polimerasa con transcripción inversa (RT-PCR), bien en los virus aislados o bien en tejidos y heces procedentes de aves infectadas, realizándose a continuación el análisis del producto mediante el análisis con enzimas de restricción, la hibridación con sonda o la secuenciación de nucleótidos al objeto de establecer una prueba *in vitro* rutinaria para determinar la virulencia (Miller *et al.*, 2010b). La determinación de la secuencia del segmento de escisión de F0 puede proporcionar una indicación clara de la virulencia del virus y esto se ha incorporado a la definición de la EN (véase el apartado B.1.6).

En el diagnóstico de la EN es importante entender que la demostración de la presencia del virus con múltiples aminoácidos básicos en el punto de escisión de F0 confirma la presencia de virus virulentos o potencialmente virulentos, pero que la falta de detección de virus o la detección de VEN sin múltiples

aminoácidos básicos en el punto de escisión de F0 empleando técnicas moleculares no confirma la ausencia de virus virulentos. Una falta de coincidencia con el cebador, o la posibilidad de una población mixta de virus virulentos y avirulentos, implica que todavía será necesario el aislamiento del virus y una valoración *in vivo* de su virulencia, por ejemplo en función del ICPI.

Los análisis de virus aislados en Irlanda en 1990 y durante los brotes de EN de 1998–2000 en Australia han proporcionado una clara evidencia de que pueden surgir virus virulentos a partir de virus progenitores de baja virulencia (Alexander & Senne, 2008b). También se ha generado de manera experimental VEN virulento a partir de un virus de baja virulencia mediante pases en pollos (Shengqing *et al.*, 2002).

1.6. Definición de la enfermedad de Newcastle

La gran mayoría de especies aviares es susceptible a la infección por PMVA-1 tanto de virulencia alta como de virulencia baja para los pollos, aunque los signos clínicos observados en aves infectadas varían mucho y dependen de factores tales como: el virus, la especie hospedadora, la edad del hospedador, la infección por otros microorganismos, el estrés medioambiental y el estado inmunitario. En determinadas circunstancias, la infección por virus extremadamente virulentos puede provocar una mortalidad repentina alta con signos clínicos relativamente escasos. Así, los signos clínicos son variables y están influidos por otros factores, de modo que ninguno puede considerarse patognomónico.

Incluso en los hospedadores susceptibles, los VEN causan considerable variedad de signos clínicos. Generalmente, la variación consiste en agrupaciones alrededor de los dos extremos en la prueba del ICPI, pero, por diversas razones, algunos virus pueden mostrar virulencia intermedia. La variación enorme en la virulencia y en los signos clínicos implica la necesidad de definir cuidadosamente lo que constituye la EN a efectos de comercio, políticas y medidas de control. La definición de la EN actualmente en uso en todos los estados miembros de la Unión Europea es la que se contempla en la Directiva 92/66/EEC de la Comisión Europea.

La definición de la OIE para anunciar un foco de EN es la siguiente:

“La enfermedad de Newcastle se define como una infección de aves de corral causada por un virus del serotipo 1 del paramixovirus aviar (PMVA-1) que cumple uno de los criterios siguientes de virulencia:

a) *El virus tiene un índice de patogenicidad intracerebral (ICPI) en polluelos de un día (Gallus gallus) de 0,7 o superior.*

o

b) *Se han demostrado en el virus múltiples aminoácidos básicos (o directamente o por deducción) en el extremo C-terminal de la proteína F2 y fenilalanina en el residuo 117, la cual está en el extremo N-terminal de la proteína F1. El término “múltiples aminoácidos básicos” se refiere a que existen al menos tres residuos de arginina o lisina entre las posiciones 113 y 116. La imposibilidad de demostrar el modelo característico de residuos de aminoácidos como se ha descrito anteriormente requeriría la caracterización del virus aislado mediante una prueba de ICPI.*

En esta definición, los residuos de aminoácidos se numeran desde el extremo N-terminal de la secuencia de aminoácidos deducida a partir de la secuencia de nucleótidos del gen F0 donde las posiciones 113 a 116 corresponden a las posiciones –4 a –1 a partir del punto de escisión.”

1.7. Anticuerpos monoclonales

Se han utilizado anticuerpos monoclonales (MAb) de ratón dirigidos contra cepas del VEN en pruebas HI para conseguir una identificación rápida del VEN sin las posibles reacciones cruzadas con otros serotipos de PMVA que pueden tener lugar con sueros policlonales. Se han creado MAb que dan reacciones en pruebas HI y que son específicos de cepas aisladas del VEN, variantes o no (Alexander *et al.*, 1997).

Se han empleado tablas de MAb para establecer perfiles antigénicos de cepas del VEN en función de si reaccionan o no con los virus. Pueden emplearse patrones típicos de cepas PPMV-1 frente a los MAb para diferenciarlas de otros PMVA-1.

1.8. Estudios filogenéticos

En los últimos años el desarrollo de técnicas mejoradas para la secuenciación de nucleótidos, la disponibilidad de datos de la secuencia de más virus PMVA-1 en bases de datos informatizadas y la demostración de que incluso longitudes de secuencia relativamente cortas pueden dar resultados significativos en análisis filogenéticos, han conducido a un avance considerable en tales estudios. Se ha detectado una diversidad genética considerable, pero los virus que comparten parámetros temporales, geográficos, antigénicos o epidemiológicos tienden a encajar en linajes o clados específicos, y se ha comprobado que esto es importante para valorar tanto la epidemiología global como la propagación local de la EN (Aldous *et al.*, 2003; Cattoli *et al.*, 2010; Czegledi *et al.*, 2006; Kim *et al.*, 2007).

Aunque en el pasado los estudios filogenéticos han sido impracticables como herramienta rutinaria, en la actualidad la mayor disponibilidad y el incremento en la velocidad de obtención de resultados empleando kits comerciales sofisticados de RT-PCR y secuenciadores automáticos permite que tales estudios se encuentren dentro de los equipamientos de muchos más laboratorios de diagnóstico y que puedan proporcionar resultados significativos que sean contemporáneos en lugar de retrospectivos (Miller *et al.*, 2010b). Aldous *et al.* (2003) propusieron que la genotipificación de las cepas del VEN formara parte de la caracterización diagnóstica del virus en los Laboratorios de Referencia mediante la producción de la secuencia de 375 nucleótidos del gen F, que incluye el punto de escisión del F0, de forma rutinaria para todos los virus y la comparación de las secuencias obtenidas con otras cepas recientes y 18 virus representativos de los linajes y sublinajes reconocidos. Ese análisis permitiría una rápida evaluación epidemiológica de los orígenes y la propagación de los virus responsables de los brotes de EN.

1.9. Técnicas moleculares para el diagnóstico

Además del uso de la RT-PCR y de otras técnicas similares para la determinación de la virulencia de los VEN (véase el apartado B.1.5) o para estudios filogenéticos (véase el apartado B.1.8), cada vez se utilizan más tales técnicas moleculares para detectar el VEN en muestras clínicas, con la ventaja de la demostración extremadamente rápida de la presencia del virus. Se debe tener cuidado en la selección de muestras clínicas ya que algunos estudios han demostrado falta de sensibilidad en la detección de los virus en algunos órganos y especialmente en las heces (Creelan *et al.*, 2002; Nanthakumar *et al.*, 2000). Con frecuencia se utilizan frotis traqueales u orofaríngeos como muestras de elección porque son fáciles de procesar y por lo general, contienen poco material orgánico extraño que pueda interferir con la recuperación y amplificación del ARN mediante la PCR. No obstante, también se han utilizado con cierto éxito muestras de tejidos y de órganos e incluso las heces. El sistema utilizado para la extracción del ARN también influirá en la eficacia de la RT-PCR con muestras clínicas, e incluso en el caso de los kits comerciales se debe procurar escoger los más adecuados o validados para las muestras a examinar.

Normalmente se han utilizado sistemas de RT-PCR para amplificar una porción específica del genoma que tienen un valor añadido; por ejemplo, amplificando parte del gen F que contiene el punto de escisión F0 de manera que el producto pueda utilizarse para valorar la virulencia (Creelan *et al.*, 2002). El principal inconveniente de la utilización de la RT-PCR para el diagnóstico tal vez estriben en la necesidad del procesamiento que sigue a la amplificación debido a la alta probabilidad de contaminación del laboratorio y de contaminación cruzada de las muestras. Para impedirlo, deben aplicarse extremas precauciones y estrictas pautas de manipulación de las muestras (véase el Capítulo 1.1.6. *Principios y métodos de validación de las pruebas de diagnóstico de las enfermedades infecciosas*).

Una de las estrategias que se siguen para no tener que realizar el procesamiento post-amplificación consiste en la utilización de las técnicas de RT-PCR (rRT-PCR) en tiempo real. La ventaja de estas pruebas es que la rRT-PCR basada en el uso de sonda de hidrólisis fluorógena o de tinciones fluorescentes hace innecesaria la fase de procesamiento post-amplificación y se pueden obtener los resultados en menos de 3 horas. Actualmente, la aplicación más utilizada de una prueba de rRT-PCR para la detección de PMVA-1 es la que tuvo lugar en EE.UU. cuando se produjeron los brotes de EN en 2002–2003, momento en el que se aplicó la prueba descrita por Wise *et al.* (2004). Los cebadores y las sondas del mencionado informe fueron validados en cepas lentogénicas, mesogénicas y velogénicas que se encuentran habitualmente en EE.UU. En el momento álgido del brote, se analizaron entre 1.000 y 1.500 muestras cada día mediante rRT-PCR. Sin embargo, estos protocolos no detectan todas las cepas de VEN, de tal modo que debería accederse a una parte más conservada del genoma, o bien aplicar un enfoque analítico múltiple (es decir, al menos dos pruebas de laboratorio de detección del antígeno independientes y claramente diferenciadas) para detectar el paciente cero.

De hecho, un problema importante es que se ha demostrado la existencia de cepas de PMVA-1 genéticamente diferenciables. Así, por ejemplo, un grupo de virus asignado al genogrupo 6 por Aldous *et al.* (2003) y posteriormente a la Clase I por Czeglédi *et al.* (2006), es tan diferente de todas las demás cepas de PMVA-1, es decir, de los virus de la Clase II (Czeglédi *et al.*, 2006) que se necesitan diferentes cebadores para su detección mediante pruebas de RT-PCR. Además, recientemente se ha demostrado que también en virus PMVA-1 de la clase II el gen de la matriz no está totalmente conservado y que aparecen falsos negativos cuando se estudian brotes o en vigilancias rutinarias de aves de corral empleando la prueba de la RT-PCR en tiempo real dirigida a este gen validada por la USA (Cattoli *et al.*, 2009; 2010; Khan *et al.*, 2010). Por otra parte, la PCR en tiempo real realizada en el gen de la matriz que en general se utiliza para identificar PMVA-1 no discrimina entre cepas lentogénicas y mesogénicas/velogénicas, y por tanto debe emplearse como prueba de detección de presencia de ARN de PMVA-1 en las muestras, y no para la detección ni confirmación de brotes de EN. Esto es especialmente cierto en zonas o países en los que se emplean vacunas vivas en aves de corral de forma sistemática. Una rRT-PCR universal específica del gen de fusión destinada a detectar y a determinar la virulencia del patotipo sería útil, porque permitiría una rápida patotipificación; no obstante, dada la variabilidad de la región que codifica el punto de escisión, las pruebas de las que se dispone no son demasiado útiles y podrían no detectar ciertas variantes. Un enfoque prometedor que consiste en incluir virus de la clase I en una rRT-PCR fue el que llevaron a cabo Kim *et al.* (2008b), combinando cebadores de la clase I y de la clase II (Kim *et al.*, 2008b). Actualmente, es importante tener en cuenta que las pruebas de RT-PCR múltiples o rRT-PCR destinadas a ampliar la variedad de virus detectables a menudo dan lugar a una disminución de la sensibilidad de la prueba en comparación con las pruebas que tienen por objetivo a una sola secuencia (Fuller *et al.*, 2010; Liu *et al.*, 2010).

2. Pruebas serológicas

El VEN puede emplearse como un antígeno en gran variedad de pruebas serológicas, lo que permite que se utilicen las técnicas de neutralización o de enzimo-inmunoanálisis (ELISA) y HI para valorar el nivel de anticuerpos en las aves. En la actualidad, la prueba HI es la más ampliamente utilizada para la detección de anticuerpos contra el PMVA-1 en las aves, mientras que es frecuente el empleo de kits comerciales de ELISA para evaluar los niveles de anticuerpos post-vacunación. En general, los títulos obtenidos mediante neutralización vírica o HI y los derivados del ELISA se correlacionan a nivel de parvada más que a nivel de ave. También se emplean pruebas serológicas en la vigilancia y el diagnóstico de la EN, debido al uso casi universal de vacunas en aves de corral.

2.1. Pruebas de hemaglutinación y de inhibición de la hemaglutinación

Los sueros de pollo raramente dan reacciones positivas no específicas en la HI y no es necesario aplicar ningún pretratamiento a los sueros. Los sueros procedentes de especies distintas de los pollos a veces pueden causar aglutinación de los eritrocitos de pollo, así que esta propiedad debe determinarse primero, y posteriormente extraer mediante adsorción del suero con eritrocitos de pollo. Esto se realiza añadiendo 0,025 ml de eritrocitos de pollo concentrados a cada 0,5 ml de antisueros, agitando suavemente y dejándolos durante al menos 30 minutos; a continuación los eritrocitos se precipitan mediante centrifugación a 800 *g* durante 2–5 minutos y se decantan los sueros adsorbidos.

En diferentes laboratorios se practican variaciones de los procedimientos para las pruebas HA y HI. Los siguientes ejemplos recomendados emplean placas de microtitulación de plástico y fondo en V en las que el volumen final para ambos tipos de prueba es de 0,075 ml. Los reactivos necesarios para estas pruebas son PBS isotónico (0,1 M), pH 7,0–7,2, y eritrocitos procedentes de un mínimo de tres pollos SPF y agrupados en un volumen igual de solución de Alsever. (Si no se dispone de pollos SPF, se puede emplear sangre procedente de aves no vacunadas que se controlen regularmente y que se sepa que están libres de anticuerpos frente al VEN). Las células se deben lavar tres veces en PBS antes de usarlas como suspensión al 1% (células concentradas v/v). Debe incluirse en cada prueba, según corresponda, un control positivo y uno negativo de los antígenos y de los antisueros.

2.1.1. Pruebas de hemaglutinación

- i) Se distribuyen 0,025 ml de PBS en cada pocillo de una placa de microtitulación de plástico y fondo en V.
- ii) Al primer pocillo se añaden 0,025 ml de la suspensión vírica (es decir, líquido alantoideo infectivo o inactivado). Para que la determinación del contenido de HA sea precisa, se debe llevar a cabo a partir de una serie de diluciones muy cercanas a una inicial, es decir, 1/3, 1/5, 1/7, etc.
- iii) A lo largo de toda la placa se practican diluciones a la mitad de la suspensión vírica en volúmenes de 0,025 ml.

- iv) Se añaden a cada pocillo 0,025 ml más de PBS.
- v) En cada pocillo se dispensan 0,025 ml de eritrocitos de pollo al 1% (v/v).
- vi) La solución se mezcla golpeando suavemente la placa. Se dejan reposar los eritrocitos durante unos 40 minutos a temperatura ambiente, es decir, aproximadamente a 20°C, o durante 60 minutos a 4°C si la temperatura ambiente es alta, momento en el que los eritrocitos control deben dejarse reposar hasta que formen un botón claramente diferenciado.
- vii) La HA se determina inclinando la placa y observando la presencia o ausencia de una corriente en forma de lágrima de los eritrocitos. Debe leerse la titulación a la dilución más alta a la que se dé una HA completa (sin corriente); esto representa 1 unidad HA (HAU) y puede calcularse de forma precisa a partir del rango inicial de diluciones.

2.1.2. Prueba de inhibición de la hemaglutinación

- i) Se dispensan 0,025 ml de PBS en cada pocillo de una placa de microtitulación de plástico y fondo en V.
- ii) Se adicionan 0,025 ml de suero en el primer pocillo de la placa.
- iii) A lo largo de la placa se realizan diluciones del suero a la mitad en volúmenes de 0,025 ml.
- iv) A cada pocillo se añaden 4 HAU de virus/antígeno en 0,025 ml y la placa se deja durante un mínimo de 30 minutos a temperatura ambiente, es decir, en torno a 20°C, o 60 minutos a 4°C.
- v) A cada pocillo se añaden 0,025 ml de eritrocitos de pollo al 1% (v/v) y, después de mezclar suavemente, los eritrocitos se dejan reposar unos 40 minutos a temperatura ambiente, es decir, en torno a 20°C, o durante unos 60 minutos a 4°C si la temperatura ambiente es alta, momento en el que los eritrocitos control deben dejarse reposar hasta que formen un botón claramente diferenciado.
- vi) El título de HI es la dilución mayor de suero que causa la inhibición completa de 4 HAU de antígeno. La aglutinación se valora inclinando las placas. Debe considerarse que muestran inhibición solo aquellos pocillos en los que la corriente de eritrocitos se produce a la misma velocidad que los pocillos control (controles de suero positivo, virus/antígeno y PBS).
- vii) La validez de los resultados debe evaluarse frente a un suero control negativo, que no debe presentar un título $>1/4$ ($>2^2$ o $>\log_2 2$ cuando se expresa como el recíproco), y un suero control positivo cuyo título debe encontrarse como máximo a una dilución del título conocido.

El valor de la serología en el diagnóstico está relacionado claramente con el estado inmunitario esperado de las aves afectadas. Los títulos de HI pueden considerarse positivos si hay inhibición a una dilución del suero de 1/16 (2^4 o $\log_2 4$ cuando se expresa como el recíproco) o superior contra 4 HAU de antígeno. Algunos laboratorios prefieren usar 8 HAU en las pruebas de HI, lo cual, aunque se permite, afecta a la interpretación de los resultados, de modo que un título positivo será 1/8 (2^3 o $\log_2 3$) o superior. Se debe incluir una titulación del antígeno por retroceso en todas las pruebas para verificar el número de HAU utilizadas.

En parvadas vacunadas que estén siendo controladas serológicamente, es posible identificar respuestas anamnésicas como resultado de una infección de desafío con el virus natural (Alexander & Allan, 1974), pero se debe proceder con gran cautela porque se pueden producir variaciones por otras causas. Por ejemplo, se ha demostrado que las infecciones por el virus PMVA-3 de pavos vacunados contra el VEN darán por resultado títulos sustancialmente elevados frente al VEN (Alexander *et al.*, 1983).

2.2. Enzimoimmunoanálisis

Se dispone de gran variedad de kits comerciales de ELISA que se basan en diversas estrategias para la detección de anticuerpos contra el VEN, incluyendo ELISA indirecto, tipo sándwich y de bloqueo o de competición, que emplean MAb. Al menos uno de los kits utiliza una subunidad antigénica. Habitualmente estas pruebas están validadas y evaluadas por el fabricante y, por tanto, es importante que para su uso, se sigan cuidadosamente las instrucciones especificadas. Las pruebas HI y ELISA pueden medir los anticuerpos contra diferentes antígenos; dependiendo del sistema utilizado, la prueba ELISA puede detectar anticuerpos contra más de un antígeno, mientras que el uso de la

prueba HI probablemente se limita a los anticuerpos contra la proteína de la HN. No obstante, algunos estudios de tipo comparativo han demostrado que los ELISA son reproducibles y tienen sensibilidad y especificidad altas; se ha observado que se correlacionan bien con la prueba HI (Brown *et al.*, 1990). Los ELISA convencionales tienen la desventaja de que es preciso validar la prueba para cada especie de ave con la que se emplean. En los ELISA de competición normalmente se utilizan MAb que, debido a su especificidad por epítomos individuales, puede ser que no reconozcan todas las cepas del PMVA-1.

C. REQUISITOS PARA LAS VACUNAS

1. Antecedentes

1.1. Fundamentos y uso previsto del producto

Se ha publicado una descripción detallada de todos los aspectos de las vacunas del VEN, incluyendo su producción y usos (Allan *et al.*, 1978) y debe consultarse para conocer los detalles de los procedimientos que aquí se recogen. En el capítulo 1.1.8. *Principios de producción de vacunas veterinarias*, se indican las directrices para la producción de vacunas veterinarias. Las directrices dadas aquí y en el capítulo 1.1.8 pretenden ser de carácter general y pueden complementarse en el caso de que existan requisitos regionales y nacionales. Si se utilizan formas virulentas del VEN en la producción de vacunas o en estudios de desafío, la instalación debe cumplir los requisitos de la OIE para los agentes patógenos del Grupo 4 de Contención, como se indica en el Capítulo 1.1.4.

En este apartado se tratarán las vacunas convencionales vivas e inactivadas, porque todavía se emplean universalmente. Sin embargo, hay que recordar que existen muchos trabajos recientes sobre la aplicación de técnicas de biología molecular a la producción de nuevas vacunas y hay constancia del éxito en la obtención de inmunidad protectora con virus recombinantes de la viruela aviar, el virus vaccinia, el virus de la viruela de la paloma, el herpesvirus del pavo y las células aviares en las que se expresan los genes del VEN HN, F, o ambos. En algunos países se ha autorizado el uso de varios de estos virus recombinantes.

Las cepas del VEN empleadas en las vacunas comerciales de virus vivos se encuadran en dos grupos: vacunas lentogénicas, tales como Hitchner-B₁, LaSota, V4, NDW, I2 y F, y vacunas mesogénicas, tales como Roakin, Mukteswar y Komarov. Se han seleccionado y clonado cepas de ambos grupos para satisfacer los diferentes criterios en su producción y aplicación. Todos los virus de vacunas mesogénicas tienen dos pares de aminoácidos básicos en el punto de escisión F0 y valores de ICPI de aproximadamente 1,4. Esto significa que las infecciones de aves con estos virus entrarían dentro de la definición propuesta para la EN (apartado B.1.6) pero como estas vacunas se emplean principalmente en países donde la EN es endémica, este hecho puede que no excluya necesariamente su uso. En EE.UU., el 9CFR 121.3b.818 establece que las cepas de VEN con valores de ICPI iguales o superiores a 0,7 son virulentas y de declaración obligatoria, y que se dejan las cepas de VEN de baja virulencia para ser empleadas como vacunas. La Unión Europea estableció en su Decisión de la Comisión 93/152/EEC (Comisión Europea, 1993) que para los programas rutinarios de vacunación contra la EN los virus empleados como vacunas vivas contra el VEN tienen que analizarse en condiciones específicas y tener un ICPI de menos de 0,4 o 0,5, en función de la dosis de vacuna administrada. La Comisión de Normas sobre Productos Biológicos de la OIE recomendó de forma similar en el año 2000 que en principio las vacunas debían tener un ICPI <0.7. Sin embargo, para justificar la variabilidad entre pruebas y laboratorios, debía permitirse un margen de seguridad, de tal modo que las cepas víricas del inóculo original de la vacuna no tuvieran un ICPI superior a 0,4.

Las vacunas con virus vivos pueden administrarse a las aves incorporándolas en el agua de bebida, administrándose como un spray (aerosol) grueso o mediante instilación conjuntival o intranasal. En EE.UU. se ha autorizado una vacuna viva para uso *in ovo* formulada a partir de un VEN de baja virulencia. Algunas cepas mesogénicas se administran por inoculación intradérmica en la membrana del ala. Se han preparado vacunas que dan resultados óptimos mediante la aplicación por vías específicas.

Las vacunas inactivadas son considerablemente más caras que las vacunas vivas y su empleo entraña la manipulación e inyección de aves individuales. Se preparan a partir de líquido alantoideo al que se inactiva su infectividad mediante la adición de formaldehído o beta-propiolactona. Se incorpora en una emulsión con aceite mineral o vegetal, y se administra por vía intramuscular o subcutánea. Así, cada ave recibe una dosis estándar. No se produce la propagación subsiguiente del virus ni reacciones respiratorias adversas. Se utilizan tanto cepas virulentas como avirulentas como inóculo vírico aunque, desde el punto de vista del control de la inocuidad, el uso de estas últimas parece menos adecuado. Como después de la administración no se produce la multiplicación vírica, se

requiere una cantidad de antígeno para la inmunización mucho mayor que en el caso de la vacunación con virus vivos.

La duración de la inmunidad depende del programa de vacunación elegido. Una de las consideraciones más importantes que afectan a los programas de vacunación es el nivel de inmunidad materna de los pollos jóvenes, que puede variar considerablemente entre explotaciones, lotes y animales. Por esta razón, se dispone de varias estrategias. O bien las aves no se vacunan hasta las 2–4 semanas de vida, momento en el que la mayoría de ellas será susceptible, o bien se vacunan con 1 solo día de vida por instilación conjuntival o mediante la aplicación de un spray de gota gruesa. Esto comportará una infección activa en algunas aves que persistirá hasta que la inmunidad materna mengüe. Entonces, se llevará a cabo una revacunación 2–4 semanas más tarde. La vacunación de aves de 1 día totalmente susceptibles, incluso con las vacunas vivas de la menor virulencia, puede provocar enfermedad respiratoria, especialmente en presencia de cantidades importantes de bacterias patógenas comunes.

Debe llevarse a cabo una revacunación de las ponedoras con la suficiente frecuencia como para mantener una inmunidad adecuada. Los programas de vacunación emplean a menudo vacunas con virus vivos un poco más patógenos para reforzar la inmunidad que en las usadas inicialmente. También pueden usarse estas vacunas vivas más patógenas después de una vacunación inicial con vacunas inactivadas en emulsión de aceite. Las ponedoras que tienen títulos serológicos de VEN altos están protegidas contra la caída de la puesta y la mala calidad de los huevos (sin cáscara, huevos de cáscara blanda, huevos descoloridos) (Allan *et al.*, 1978; Stone *et al.*, 1975). El nivel de homología entre la cepa vacunal y el virus natural puede influir en el grado de protección contra la reducción de la puesta (Cho *et al.*, 2008).

Cuando se diseña un programa de vacunación, debe tenerse en cuenta el tipo de vacuna utilizada, el estado inmunitario y respecto a la enfermedad en las aves a vacunar, y como el nivel de protección requerido en relación a cualquier posibilidad de infección con el virus natural en las condiciones locales (Allan *et al.*, 1978). Aquí se indican dos ejemplos de programas de vacunación que pueden utilizarse en diferentes circunstancias de enfermedad. Para el primer ejemplo, cuando la enfermedad es leve y esporádica se sugiere que se adopte el siguiente orden de vacunación: vacuna viva Hitchner-B₁ mediante administración conjuntival o de *spray* a 1 día de edad; vacuna viva Hitchner-B₁ o La Sota a los 18–21 días de vida en el agua de bebida; vacuna viva La Sota en el agua de bebida a las 10 semanas de vida y una vacuna inactivada en emulsión de aceite en el pico de puesta. Para el segundo ejemplo, cuando la enfermedad es grave y está más extendida, se adopta el mismo protocolo ya indicado hasta los 21 días de vida, seguido de la revacunación a los 35–42 días de vida con la vacuna viva La Sota en el agua de bebida o como aerosol; esta revacunación se repite a las 10 semanas de vida con una vacuna inactivada (o una vacuna viva mesogénica) y de nuevo se repite en el pico de puesta (Allan *et al.*, 1978). El primer protocolo en general es aplicable a países en los que el VEN virulento no es endémico y tiene por objetivo minimizar las pérdidas de producción empleando una vacuna más suave en la vacunación inicial. En cuanto a las posibles limitaciones de la vacunación contra la EN, sobre todo aplicables a las vacunas vivas, debe validarse la inmunización mediante pruebas serológicas en las parvadas vacunadas. Sea cual sea el sistema analítico empleado, como el ELISA o la HI, debe demostrarse una respuesta inmunitaria humoral a nivel de la parvada.

Cuando se emplea HI para evaluar la respuesta inmunitaria tras la vacunación, debe tenerse en cuenta que los títulos obtenidos mediante HI están muy influidos por la calidad de la vacuna, la vía y método de administración y factores ambientales e individuales, pero también por la especie (así, en general, la respuesta a la HI en algunas especies, como los pavos o las palomas, es menor que la de los pollos). También se recomienda inactivar agentes hemaglutinantes inespecíficos que a menudo se encuentran en el suero de ciertas especies, como las aves de caza (faisanes, perdices, etc.), codornices, avestruces y gallinas de Guinea, mediante el tratamiento térmico en baño de agua a 56°C durante 30 minutos.

Las vacunas simples con virus lentogénicos vivos pueden producir una respuesta en aves susceptibles con títulos de HI de alrededor de 4–6 log₂, pero tras un programa de vacunación con vacunas en emulsión oleosa pueden obtenerse títulos de HI de incluso 11 log₂ o más. Los títulos actuales y su relación con el tipo de protección y duración de la inmunidad para una parvada y programa dados son difíciles de predecir. Puede producirse variación en los títulos de HI por factores inespecíficos; así, por ejemplo, debido a las correlaciones antigénicas, infecciones por otros AMPV (como el PMVA-3) pueden dar lugar a importantes aumentos de títulos contra el VEN. El título de HI también está influido por las características del antígeno empleado. Por ejemplo, el uso del antígeno homólogo de La Sota en la prueba de la HI tras la vacunación con este virus dio lugar a títulos considerablemente más altos que cuando se empleó virus Ulster heterólogo (Maas *et al.*, 1998). Además, antígenos de referencia producidos con cepas históricas pueden reducir la sensibilidad de la prueba de la HI cuando se emplean para la detección de anticuerpos contra virus de la EN

actualmente circulantes. Por ello, es importante investigar las relaciones antigénicas entre el antígeno utilizado en el laboratorio y los virus actualmente circulantes, y entre cepas vacunales y antígenos de HA de referencia, par evitar interpretaciones incorrectas en la estimación de los títulos séricos de anticuerpos.

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

2.1. Características del inóculo

2.1.1. Características biológicas

El primer principio a considerar cuando se selecciona una cepa para una vacuna viva contra el VEN es si se va a usar como vacuna primaria o secundaria, siendo su patogenicidad la principal consideración. Los métodos de aplicación y frecuencia de uso son consideraciones válidas. En general, las vacunas vivas más inmunógenas son más virulentas, y por tanto es más probable que causen efectos adversos. Por ejemplo, la vacunación con la cepa LaSota causará problemas considerablemente más importantes en aves jóvenes susceptibles que la cepa Hitchner-B₁, las vacunas basadas en la cepa Ulster o los clones de LaSota, aunque en general la vacunación periódica con LaSota induce una respuesta inmunitaria más fuerte. Existe una variación detectable en la antigenicidad de las distintas cepas circulantes, lo cual puede indicar la necesidad de adaptar las vacunas más cuidadosamente para acercarlas antigénicamente a cualquier virus natural prevalente (Miller *et al.*, 2007).

Se han empleado con éxito variable vacunas vivas administradas con el alimento en las que se han incluido cualquiera de las dos cepas australianas avirulentas de VEN escogidas por su termoestabilidad, la V4 o la I-2, que actúan como portadoras para combatir los problemas específicos relacionados con la cría de pollos en aldeas en países en vías de desarrollo. La intención es que esta vacuna se presentara recubriendo el alimento, y por tanto que fuera fácilmente ingerida pollos vagabundos; al mismo tiempo, sería ligeramente más resistente a la inactivación por altas temperaturas ambientales. Recientemente, se han formulado vacunas con ambas cepas víricas que producen títulos de anticuerpos suficientes según la HI (Olabode *et al.*, 2010), y en algunos casos previenen la mortalidad tras desafíos con cepas virulentas (Wambura, 2010).

La consideración más importante en la selección de un inóculo para preparar una vacuna inactivada es la cantidad de antígeno producida cuando crece en huevos embrionarios; raramente es rentable concentrar el virus. Se han usado tanto cepas virulentas como lentogénicas para preparar vacunas inactivadas, pero las primeras implican un riesgo innecesario porque suponen la manipulación de grandes cantidades de virus virulentos así como el peligro de una inactivación insuficiente y la posible contaminación consiguiente.

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

Tras preparar el inóculo original, debe comprobarse su esterilidad, inocuidad, potencia y posible presencia de agentes extraños. El inóculo original debe estar libre de contaminación bacteriana (incluida *Salmonella*), fúngica y micoplásmica, y debe estar libre de virus extraños. Además de las pruebas de laboratorio para la detección de leucosis linfóide aviar, agentes citopáticos y hemadsorbentes, virus de la anemia del pollo y virus de la reticuloendoteliosis, también debe evaluarse si el inóculo original utilizado en vacunas vivas contiene agentes patógenos, mediante inoculación en huevos de gallina embrionados, así como en pollos sanos que no hayan sido vacunados contra la EN.

2.2. Método de fabricación

2.2.1. Procedimiento

Las instalaciones donde se produzca la vacuna deben funcionar con procedimientos y prácticas adecuados de bioseguridad. Si se emplea el VEN, como se define en el apartado B.1.6 de este capítulo, para la producción de vacuna o para estudios de vacuna-desafío, la parte de la instalación donde se lleve a cabo este trabajo debe cumplir los requisitos para los agentes patógenos del Grupo 4 de Contención, como se explica en el capítulo 1.1.4 de este *Manual Terrestre*.

Se establece un inóculo original y a partir del mismo un inóculo de trabajo. Si la cepa se ha clonado mediante dilución limitante o selección en placa, el establecimiento de un cultivo original tal vez solo consista en producir un gran volumen de líquido alantoideo infectivo (como

mínimo 100 ml), que puede conservarse en forma de alícuotas liofilizadas (0,5 ml). Deben pasarse virus inóculo de pedigrí desconocido por huevos de aves SPF y clonarse antes de producir el inóculo original. También es deseable algún pase por pollos SPF (Allan *et al.*, 1978).

Para la producción de la vacuna, primero se establece un inóculo de trabajo, a partir del cual se producen los lotes de vacuna, mediante la expansión de una alícuota del inóculo original hasta un volumen suficiente que permita la producción de la vacuna para 12–18 meses. Es mejor conservar el inóculo de trabajo de forma líquida a una temperatura de –60°C o inferior porque el virus liofilizado no siempre se multiplica hasta un título alto en el primer pase siguiente (Allan *et al.*, 1978).

La mayoría de las vacunas contra la EN se producen en huevos embrionarios de aves de corral y las vacunas de virus vivos deberían producirse en huevos SPF. El método de producción es la propagación del virus aséptica y a gran escala, con todos los procedimientos realizados en condiciones de esterilidad. Es habitual diluir el inóculo de trabajo en PBS estéril, pH 7,2, de modo que aproximadamente se inoculan 10^3 – 10^6 DIH₅₀/0,1–0,2 ml en la cavidad alantoidea de huevos de 9 o 10 días en embrionaje puestos por aves SPF. A continuación, se incuban a 37°C. Se deben desechar los huevos que contengan embriones que hayan muerto en las primeras 24 horas. El tiempo de incubación dependerá de la cepa vírica utilizada y se predeterminará para asegurar una producción máxima con el número mínimo de muerte de embriones.

Los huevos infectados deben refrigerarse a 4° C antes de recolectarse. Se quitan las partes superiores de los huevos y se aspiran los líquidos alantoideos después de apartar el embrión hacia abajo. Debe evitarse la inclusión de resto alguno de yema o albúmina. Se deben conservar todos los líquidos inmediatamente a 4° C y comprobar si presentan contaminación bacteriana antes de preparar grandes cantidades para la liofilización o inactivación. Normalmente, las vacunas vivas se liofilizan. La metodología depende de los aparatos utilizados y de la pericia de los fabricantes, pero esta es una etapa muy importante ya que una liofilización inadecuada da lugar tanto a pérdidas de título como a un periodo de validez reducido.

En la producción de vacunas inactivadas, se trata el líquido alantoideo recolectado con formaldehído (una concentración final normal es 1/1000) o bien beta-propiolactona (una concentración final normal es 1/2.000–1/4.000). El tiempo requerido debe ser suficiente para asegurar que esté libre de virus vivos. La mayoría de vacunas inactivadas no se concentran; el líquido alantoideo inactivado normalmente se emulsiona con aceite mineral o vegetal. Generalmente, las fórmulas exactas son secretos comerciales.

Generalmente, las vacunas inactivadas basadas en aceite se preparan como emulsiones primarias de agua en aceite. Habitualmente, la fase oleosa consiste en nueve volúmenes de aceite mineral altamente refinado, tal como Marcol 52, Drakeol 6VR o BayolF, más un volumen de agente emulsionante, tal como Arlacel A, Montanide 80 y Montanide 888. La fase acuosa es el virus inactivado al que se le añade un emulsionante no iónico como Tween 80. Normalmente la proporción entre fase oleosa y la fase acuosa es de 1:1 hasta 1:4. Los fabricantes se esfuerzan por conseguir un equilibrio entre el efecto adyuvante, la viscosidad y la estabilidad. Si la viscosidad es demasiado alta, la vacuna es difícil de inyectar, y si es demasiado baja, la vacuna es inestable.

2.2.2. Requisitos para los sustratos y los medios

La mayoría de cepas víricas para vacuna se cultivan en la cavidad alantoidea de huevos embrionados de aves de corral pero algunas, sobre todo ciertas cepas mesogénicas, se han adaptado a gran variedad de sistemas de cultivo de tejidos. En EE.UU., se preparan vacunas contra la EN tanto vivas como muertas en huevos de aves SPF.

2.2.3. Controles durante el proceso

En el caso de las producidas en huevos, el control más importante durante el proceso consiste en comprobar si hay contaminación bacteriana o fúngica. Es necesario por la aparición ocasional de huevos en putrefacción, que pueden pasar desapercibidos en el momento de la recolección. En EE.UU., no se exige el pase a no ser que los resultados sean inconcluyentes.

2.2.4. Prueba en lotes de producto final

i) Esterilidad/pureza

En el capítulo 1.1.9 se describen las pruebas de esterilidad y ausencia de contaminación en los productos biológicos de uso veterinario. En EE.UU., se han llevado a cabo varias pruebas de pureza en cada serie de vacunas vivas. La mayoría de estas podría omitirse en el caso de las vacunas muertas si el agente inactivante hace que los resultados no tengan sentido.

ii) Inocuidad

Algunos países también requieren estudios con paso inverso para las vacunas vivas contra el VEN, con el fin de garantizar que la patogenicidad no aumente al circular por las aves (CFR, 2009).

iii) Potencia del lote

Debe comprobarse la viabilidad y la potencia de cada lote de virus para vacuna viva. En el caso de las vacunas inactivadas, la eficacia del proceso de inactivación debe comprobarse en huevos embrionados, tomando 25 alícuotas (0,2 ml) de cada lote y pasándolas tres veces por embriones SPF (Allan *et al.*, 1978).

La mayoría de países han publicado especificaciones para el control de producción y análisis de las vacunas contra el VEN, lo cual incluye la definición de pruebas obligatorias en las vacunas durante y después de la fabricación. En Europa, la Farmacopea Europea establece que no es necesario repetir la prueba de potencia en cada lote si se ha demostrado que un lote representativo del producto final generado a partir del inóculo original ha superado la prueba de potencia.

En EE.UU, se comprueba la potencia en cada lote seriado de vacuna inactivada contra la EN mediante vacunación-desafío (CFR, 2009), como se describe en el apartado C.4.c anterior. Deben emplearse al menos diez aves vacunadas y diez aves control de 2–6 semanas de edad, y al menos el 90% de las aves control debe presentar signos típicos de enfermedad de Newcastle o morir, y al menos el 90% de las aves vacunadas debe permanecer normal durante el periodo de observación de 14 días post-desafío. En EE.UU., cada lote seriado y cada subserie de vacuna viva contra la EN debe tener un título vírico de como mínimo $10^{0.7}$ DIH₅₀ más que el título de virus empleado en el estudio de inmunogenicidad descrito anteriormente (CFR, 2009). El título mínimo no debe ser inferior a las $10^{5.5}$ DIH₅₀.

La infectividad de las vacunas víricas vivas se analiza titulando el virus en huevos embrionados de aves de corral para calcular la DIH₅₀. Esto implica hacer diluciones decimales del virus; 0,1 ml de cada dilución se inoculan en cinco a 9 huevos embrionados de 10 días de vida de aves de corral. Tras 5 a 7 días de incubación a 37°C, los huevos se refrigeran y se comprueba si presentan actividad hemaglutinante, lo cual es indicativo de la presencia de virus vivo. La DIH₅₀ a punto final se calcula empleando una fórmula estándar como la de Spearman–Kärber o la de Reed Muench (Thayer & Beard, 2008).

2.3. Requisitos para la autorización

2.3.1. Requisitos de inocuidad

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

Las vacunas vivas contra el VEN pueden suponer un riesgo para el ser humano. Existen casos de virus de la EN, tanto virulentos como de baja virulencia para los pollos, que han infectado a seres humanos, normalmente causando conjuntivitis tras una introducción directa en el ojo. Son infecciones por lo general pasajeras y la córnea no resulta afectada.

Las vacunas con emulsión de aceite mineral suponen un importante peligro para la persona que las administra. La inyección accidental en el ser humano debe tratarse de inmediato lavando la zona para eliminar la sustancia, eliminando tejido si es necesario, igual que si se tratara de una herida por pistola engrasadora.

ii) Reversión a la virulencia en vacunas atenuadas/vivas

El 9CFR 113.329.768 establece que en EE.UU. el uso de pollos para el análisis de vacunas contra el VEN implica la inoculación de 25 aves SPF de cinco días o menos de vida. Se administran por vía supraconjuntival diez dosis de vacuna viva a cada ave, y a continuación se observan durante 21 días. Ninguna de ellas debe presentar signos clínicos graves ni debe morir por causas atribuibles a la vacuna. Una alternativa es emplear la parte pre-desafío de la prueba de potencia, descrita a continuación, como prueba de inocuidad, y si aparecen reacciones adversas atribuibles al producto, la prueba se declara inconcluyente y se repite la prueba de inocuidad. Si al repetirla no se obtienen resultados satisfactorios, el lote se rechaza (CFR, 2009). En EE.UU., la prueba de inocuidad se lleva a cabo con una sola dosis, administrada a pollos de 2-6 semanas de vida (CFR, 2009); la parte pre-desafío de la prueba de potencia puede servir como prueba de inocuidad.

Teniendo en cuenta el hallazgo de que puede emerger VEN virulento por mutación de virus de baja virulencia (Gould *et al.*, 2001), debe plantearse seriamente la introducción de cepas totalmente nuevas de EN en las vacunas vivas, y someter las vacunas a evaluación antes de ser utilizadas. Las cepas recombinantes que se emplean en las vacunas vivas en EE.UU se someten a requisitos adicionales de inocuidad. Para poder ser utilizadas en producción, debe demostrarse la estabilidad genética del virus al nivel de pase más alto. El efecto fenotípico de cualquier modificación genética debe evaluarse a fondo para garantizar que las modificaciones genéticas no hayan dado lugar a algún efecto inesperado *in vivo*. Deben llevarse a cabo estudios en pollos para evaluar posibles alteraciones en el tropismo tisular, así como para evaluar si el virus vacunal se excreta. Debe comprobarse la inocuidad de las cepas recombinantes que se excretan al ambiente en especies aviares no de destino, así como en especies de mamíferos, y debe tratarse la capacidad de persistir en el ambiente en condiciones naturales.

iii) Consideraciones ambientales

Ninguna.

2.3.2. Requisitos de eficacia

i) Para la producción animal

Se han propuesto distintos métodos para el análisis de la potencia de las vacunas contra el VEN. Se ha destacado la importancia de emplear una cepa de desafío adecuada para evaluarlas (Allan *et al.*, 1978). Las cepas de desafío empleadas en Europa y en EE.UU son la Herts 33 y la GB Texas, respectivamente. En el caso de las vacunas vivas, el método recomendado implica la vacunación de 10 o más aves SPF u otras plenamente susceptibles, aunque algunos países especifican 20 aves, a la edad mínima recomendada y por la vía sugerida empleando la dosis mínima recomendada. Pasados 14 a 28 días, cada ave vacunada y diez aves control se exponen por vía intramuscular a un mínimo de 10^4 DIH₅₀ (dosis que resulta infectiva en el 50% de los huevos expuestos) o 10^5 DL₅₀ (dosis que resulta letal en el 50% de los huevos expuestos) de virus de la EN de desafío. Las aves expuestas se observan durante 14 días; al menos el 90% de las aves control debe presentar signos clínicos y morir en un plazo de 6 días por enfermedad de Newcastle. Si al menos el 90-95% de las aves vacunadas no queda libre de signos clínicos, el inóculo original se considerará insatisfactorio.

En el caso de las vacunas inactivadas, en Europa se emplean pollos de 21–28 días de vida SPF o susceptibles. Se inyecta por vía intramuscular tres grupos de 20 aves con volúmenes de vacuna equivalentes a 1/25, 1/50 y 1/100 de una dosis. Un grupo de diez pollos se deja como control. Pasados 17–21 días, todas las aves se exponen por inyección intramuscular a 10^6 LD₅₀ de virus de la EN de desafío. Los pollos se observan durante 21 días. La DP₅₀ (dosis que protectora en un 50% de las aves expuestas) se calcula mediante métodos estadísticos estándar. Esta prueba solo es válida si todas las aves control expuestas mueren en un plazo de 6 días. La vacuna supera la prueba si la DP₅₀ no es inferior a 50 por dosis y si el límite inferior de confianza no es menor de 35 DP₅₀ por dosis. Algunas autoridades aceptan una prueba a 1/50, por motivos de bienestar animal. No es necesario repetir la prueba de potencia en cada lote si se ha demostrado que un lote representativo del producto final generado a partir del inóculo original ha superado la prueba.

En EE.UU, la prueba de eficacia recomendada para las vacunas inactivadas es un estudio de vacunación-desafío (CFR, 2009). Al menos diez pollos SPF, de 2–6 semanas de edad,

se vacunan con la dosis mínima recomendada. El 9CFR 113.205.727 establece que a los 14 días post-vacunación, las aves vacunadas y al menos diez controles no vacunados se expongan a la cepa GB Texas del virus de la enfermedad de Newcastle y que las aves vacunadas se observen durante 14 días. Al menos el 90% de las aves control debe desarrollar signos clínicos de enfermedad de Newcastle durante el periodo de observación. Si al menos el 90% de las aves vacunadas no permanece libre de signos clínicos, el inóculo original se considerará insatisfactorio.

ii) Para el control y la erradicación

El nivel de inmunidad alcanzado con una sola dosis o pauta de vacunación contra la EN variará mucho en función de la vacuna y de la especie hospedadora. Es muy complejo y difícil evaluar cuál es el nivel de inmunidad requerido en un hospedador dado (es decir, el necesario para proteger contra la muerte, la enfermedad o pérdidas de producción de carne o huevos). En general, debe hacerse alguna evaluación de la longevidad de los anticuerpos séricos y adoptarse pautas vacunales para mantenerlos por encima de un nivel aceptable (Allan *et al.*, 1978). La mayoría de vacunas comerciales están diseñadas para controlar los signos clínicos, pero no previenen la replicación vírica ni son adecuadas para erradicar la enfermedad.

La transmisión del virus de la EN en una zona podría interrumpirse solo si se inmuniza de forma suficiente un porcentaje muy alto de la población susceptible residente (>85%), de tal forma que presente un título de anticuerpos $\geq 1:8$ (van Boven *et al.*, 2008).

2.3.3. Estabilidad

Cuando se almacena en las condiciones recomendadas, el producto vacunal final debe mantener la potencia durante al menos el periodo de validez indicado. Pueden emplearse pruebas de estabilidad acelerada como la reducción de la infectividad tras una incubación a 37°C durante 7 días (Lensing, 1974) como orientación de la capacidad de resistencia en almacenamiento de un lote dado de vacuna viva. Las vacunas con emulsión oleosa también deben someterse a pruebas de envejecimiento acelerado almacenándolas a 37°C, durante un mínimo de 1 mes, y no pueden presentar separación de las fases acuosa y oleosa. En EE.UU. se exige demostrar estabilidad en tiempo real en al menos tres series secuenciales de vacuna contra el VEN (CFR, 2009). Cada serie debe evaluarse a intervalos múltiples hasta llegar a la fecha de caducidad, con el fin de obtener un perfil de degradación del producto.

Las vacunas con virus vivo deben utilizarse inmediatamente después de reconstituirse. Las vacunas inactivadas no deben congelarse. En la mayoría de países no pueden incluirse conservantes en el producto vivo liofilizado, pero sí conservantes antimicrobianos en el diluyente empleado para reconstituir la vacuna. Una alternativa empleada en EE.UU. es permitir el uso de ciertos conservantes, pero deben aparecer indicados en la etiqueta.

3. Vacunas basadas en la ingeniería genética

3.1. Vacunas existentes y sus ventajas

La llegada de la tecnología del ADN recombinante ha dado lugar al desarrollo de nuevas vacunas contra el VEN. Una de las clases consiste en vacunas vectorizadas, que están formadas por un virus portador adecuado que expresa una o más proteínas inmunógenas del VEN (normalmente F y/o HN), induciendo así una respuesta inmunitaria contra el VEN y el virus vector en sí. Ejemplos de estas vacunas vectorizadas son vacunas recombinantes basadas en virus vaccinia (Meulemans, 1988), virus de la viruela aviar (Bourne *et al.*, 1990; Karaca *et al.*, 1998; Olabode *et al.*, 2010), virus de la viruela de las palomas (Letellier *et al.*, 1991), herpesvirus del pavo (Heckert *et al.*, 1996; Morgan *et al.*, 1992; Reddy *et al.*, 1996), Marek's virus de la enfermedad de Marek (Sakaguchi *et al.*, 1998) y virus aviar asociado a adenovirus (Perozo *et al.*, 2008).

Otros enfoques consisten en el desarrollo de vacunas de subunidades basadas en la expresión a gran escala de proteínas del VEN (normalmente F y/o HN) empleando vectores baculovirus (Fukanoki *et al.*, 2001; Lee *et al.*, 2008; Mori *et al.*, 1994; Nagy *et al.*, 1991) o plantas (Berinstein *et al.*, 2005; Yang *et al.*, 2007) y el uso de vacunas de ADN, es decir, ADN de plásmido que codifique proteínas del VEN inmunógenas relevantes (Loke *et al.*, 2005; Rajawat *et al.*, 2008). El establecimiento de un sistema de genética inversa para el VEN (Peeters *et al.*, 1999; Romer-Oberdorfer *et al.*, 1999) ha hecho posible modificar genéticamente el genoma del VEN y desarrollar cepas de VEN con nuevas propiedades. Estas incluyen la implementación de diferenciación serológica (vacunas DIVA) (Mebatsion *et al.*, 2002; Peeters *et al.*, 2001) y la incorporación y expresión de genes extraños, consiguiendo así que el propio

VEN sea un vector vacunal para la aplicación a aves de corral (Nakaya *et al.*, 2001; Schroer *et al.*, 2009; Steel *et al.*, 2008) y otras especies, incluidos primates (Dinapoli *et al.*, 2007).

El perfil deseable de las vacunas contra el VEN incluye: 1) prevención de la transmisión; 2) diferenciación entre animales infectados y vacunados (DIVA); 3) inducción de protección con una sola dosis; 4) ausencia de interferencia por parte de los anticuerpos maternos; 5) vacunación masiva; 6) protección cruzada contra cepas variantes; 7) alta inocuidad y mínimos efectos secundarios. Algunas de las vacunas mencionadas en este capítulo cumplen o superan la eficiencia de las vacunas convencionales en cuanto a inducción de anticuerpos o protección contra cepas virulentas de desafío, y por tanto constituyen grandes esperanzas para su futuro uso. Además, ofrecen muchas ventajas en comparación con las vacunas vivas convencionales contra el VEN, como i) mejora de la inocuidad en aves vacunadas debido a la ausencia de virulencia residual, ii) implementación del principio DIVA, y iii) mayor coincidencia inmunógena con las cepas causantes de los brotes.

Solo algunas de las vacunas desarrolladas mediante ingeniería genética mencionadas anteriormente están autorizadas en algunos países para ser utilizadas en avicultura (VectorVax FP-N, Trovac-NDV, Innovax-ND). Un problema de algunas de las vacunas mencionadas aquí podría ser que la inmunidad existente contra el vector podría interferir con la aplicación genérica de estas vacunas en el campo. Dado que la mayoría de vacunas vectorizadas se basa en virus que por sí mismos pueden ser patógenos en las aves, es difícil garantizar una completa inocuidad en condiciones de campo. Además, el hecho de que la mayoría de estas vacunas sean organismos genéticamente modificados (OGM) significa que tienen que pasar por rigurosas y lentas pruebas y procesos de registro. Además, la producción de vacunas mediante ingeniería genética probablemente es más cara que la de las vacunas clásicas contra el VEN. Dado que las vacunas clásicas empleadas actualmente son baratas y adecuadas, al menos para la protección de las aves contra los signos clínicos y la muerte, no existe un verdadero incentivo para que la industria farmacéutica veterinaria desarrolle nuevas vacunas. Y es probable que los avicultores solo estén dispuestos a pagar más por una vacuna si ofrece importantes ventajas respecto a las convencionales. Es improbable que esta situación cambie a corto plazo a no ser que las autoridades nacionales o internacionales modifiquen las exigencias en materia de vacunación contra la EN, como por ejemplo un requisito mínimo para la reducción de la excreción de virus de desafío o la implementación del principio DIVA.

Los brotes recurrentes de EN en aves vacunadas han suscitado dudas acerca de si las vacunas actualmente utilizadas contra la EN siguen siendo suficientes, no solo para proteger a las aves contra la enfermedad clínica, sino también para inhibir la transmisión del virus (Kapczynski & King, 2005). De hecho, se ha observado que el grado de homología entre cepas vacunales y de desafío es importante para reducir la excreción de virus virulento (Hu *et al.*, 2009; Miller *et al.*, 2007). El intercambio de los genes F y HN de una cepa vacunal con los correspondientes genes de la cepa de un brote dio lugar a una vacuna que era mucho más capaz de reducir la excreción de la cepa vírica del brote que la vacuna no modificada. Estos resultados constituyen un argumento para una adaptación de las cepas vacunales clásicas con el fin de mejorar la coincidencia antigénica entre las cepas de VEN vacunales y las virulentas actualmente en circulación.

3.2. Requisitos especiales para las vacunas desarrolladas mediante ingeniería genética

Una vez registradas y autorizadas, las vacunas desarrolladas mediante ingeniería genética deben cumplir los mismos requisitos o similares que las vacunas clásicas, como se ha detallado anteriormente (apartado C; requisitos para las vacunas).

BIBLIOGRAFÍA

ALDOUS E.W., MYNN J.K., BANKS J. & ALEXANDER D.J. (2003). A molecular epidemiological study of avian paramyxovirus type 1 (Newcastle disease virus) isolates by phylogenetic analysis of a partial nucleotide sequence of the fusion protein gene. *Avian Pathol.*, **32**, 239–256.

ALEXANDER D.J. & ALLAN W.H. (1974). Newcastle disease virus pathotypes. *Avian Pathol.*, **3**, 269–278.

ALEXANDER D.J., MANVELL R.J., LOWINGS J.P., FROST K. M., COLLINS M.S., RUSSELL P.H. & SMITH J.E. (1997). Antigenic diversity and similarities detected in avian paramyxovirus type 1 (Newcastle disease virus) isolates using monoclonal antibodies. *Avian Pathol.*, **26**, 399–418.

ALEXANDER D.J. & PARSONS G. (1986). Pathogenicity for chickens of avian paramyxovirus type 1 isolates obtained from pigeons in Great Britain during 1983-1985. *Avian Pathol.*, **15**, 487-493.

- ALEXANDER D.J., PATTISON M. & MACPHERSON I. (1983). Avian Paramyxovirus of PMV-3 serotype in British turkeys. *Avian Pathol.*, **12**, 469–482.
- ALEXANDER D.J. & SENNE D.A. (2008a). Newcastle Disease, Other Avian Paramyxoviruses, and Pneumovirus Infections. *In: Diseases of Poultry, Twelfth Edition*, Saif Y.M., Fadly A.M., Glisson J.R., McDougald L.R., Nolan L.K. & Swayne D.E., eds. Iowa State University Press, Ames, Iowa, USA, 75–116.
- ALEXANDER D.J. & SENNE D.A. (2008b). Newcastle Disease and Other Avian Paramyxoviruses. *In: A Laboratory Manual for the Isolation, Identification and Characterization of Avian Pathogens*, Dufour-Zavala L. (Editor in Chief) Swayne D.E., Glisson J.R., Jackwood M.W., Pearson J.E., Reed W.M., Woolcock P.R., 4th ed., American Association of Avian Pathologists, Athens, GA, 135–141.
- ALLAN W.H., LANCASTER J.E. & TOTH B. (1978). Newcastle Disease Vaccines. FAO, Rome, Italy.
- BERINSTEIN A., VAZQUEZ-ROVERE C., ASURMENDI S., GOMEZ E., ZANETTI F., ZABAL O., TOZZINI A., CONTE GRAND D., TABOGA O., CALAMANTE G., BARRIOS H., HOPP E & CARRILLO E. (2005). Mucosal and systemic immunization elicited by Newcastle disease virus (NDV) transgenic plants as antigens. *Vaccine*, **23**, 5583–5589.
- VAN BOVEN M., BOUMA A., FABRI T.H., KATSMAN E., HARTOG L. & KOCH G. (2008). Herd immunity to Newcastle disease virus in poultry by vaccination. *Avian Pathol.*, **37**, 1–5.
- BOURSNELL M.E., GREEN P.F., SAMSON A.C., CAMPBELL J.I., DEUTER A., PETERS R.W., MILLAR N.S., EMMERSON P.T. & BINNS M.M. (1990). A recombinant fowlpox virus expressing the hemagglutinin-neuraminidase gene of Newcastle disease virus (NDV) protects chickens against challenge by NDV. *Virology*, **178**, 297–300.
- BROWN J., RESURRECCION R.S. & DICKSON T.G. (1990). The relationship between the hemagglutination-inhibition test and the enzyme-linked immunosorbent assay for the detection of antibody to Newcastle disease. *Avian Dis.*, **34** (3), 585–587.
- CATTOLI G., DE BATTISTI C., MARCIANO S., ORMELLI S., MONNE I., TERREGINO C. & CAPUA I. (2009). False-negative results of a validated real-time PCR protocol for diagnosis of Newcastle disease due to genetic variability of the matrix gene. *J. Clin. Microbiol.*, **47**, 3791–3792.
- CATTOLI G., FUSARO A., MONNE I., MOLIA S., LE MENACH A., MAREGEYA B., NCHARE A., BANGANA I., MAINA A.G., KOFFI J.N., THIAM H., BEZEID O.E., SALVIATO A., NISI R., TERREGINO C. & CAPUA I. (2010). Emergence of a new genetic lineage of Newcastle disease virus in West and Central Africa – implications for diagnosis and control. *Vet. Microbiol.*, **142**, 168–176.
- CHANG P.W. (1981). Newcastle disease. *In: CRC Handbook Series in Zoonoses. Section B: Viral Zoonoses Volume II*, Beran G.W., ed. CRC Press. Boca Raton, Florida, USA, 261–274.
- CHO S.H., KWON H.J., KIM T.E., KIM J.H., YOO H.S., PARK M.H., PARK Y.H. & KIM S.J. (2008). Characterization of a recombinant Newcastle disease virus vaccine strain. *Clin. Vaccine Immunol.*, **15**, 1572–1579.
- CHOI K.S., LEE E.K., JEON W.J. & KWON J.H. (2010). Antigenic and immunogenic investigation of the virulence motif of the Newcastle disease virus fusion protein. *J. Vet. Sci.*, **11**, 205–211.
- CODE OF FEDERAL REGULATIONS (OF THE UNITED STATES OF AMERICA) (CFR) (2009). Title 9, Parts 1–199. US Government Printing Office, Washington DC, USA.
- COLLINS M.S., STRONG I. & ALEXANDER D.J. (1994). Evaluation of the molecular basis of pathogenicity of the variant Newcastle disease viruses termed “pigeon PMV-1 viruses”. *Arch. Virol.*, **134**, 403–411.
- CREELAN J.L., GRAHAM D.A. & MCCULLOUGH S.J. (2002). Detection and differentiation of pathogenicity of avian paramyxovirus serotype 1 from field cases using one-step reverse transcriptase-polymerase chain reaction. *Avian Pathol.*, **31**, 493–499.
- CZEGLEDI A., UJVARI D., SOMOGYI E., WEHMANN E., WERNER O. & LOMNICZI B. (2006). Third genome size category of avian paramyxovirus serotype 1 (Newcastle disease virus) and evolutionary implications. *Virus Res.*, **120**, 36–48.

- DINAPOLI J.M., YANG L., SUGUITAN A., ELANKUMARAN S., DORWARD D.W., MURPHY B.R., SAMAL S.K., COLLINS P.L. & BUKREYEV A. (2007). Immunization of primates with a Newcastle disease virus-vectored vaccine via the respiratory tract induces a high titer of serum neutralizing antibodies against highly pathogenic avian influenza virus. *J. Virol.*, **81**, 11560–11568.
- DORTMANS J.C., KOCH G., ROTTIER P.J. & PEETERS B.P. (2009). Virulence of pigeon paramyxovirus type 1 does not always correlate with the cleavability of its fusion protein. *J. Gen. Virol.*, **90** (Pt 11), 2746–2750.
- DORTMANS J.C., ROTTIER P.J., KOCH G. & PEETERS B.P. (2010). The viral replication complex is associated with virulence of Newcastle disease virus (NDV). *J. Virol.*, **84**, 10113–10120.
- EUROPEAN COMMISSION (1993). Commission Decision of 8 February 1993 laying down the criteria for vaccines to be used against Newcastle disease in the context of routine vaccination programmes (93/152/EEC): *Official Journal of the European Communities* L 59, 35 (Decision as amended by Decision 2010/633/EC: *Official Journal of the European Union*, L 279, 33).
- FUKANOKI S., IWAKURA T., IWAKI, S., MATSUMOTO K., TAKEDA R., IKEDA K., SHI Z. & MORI H. (2001). Safety and efficacy of water-in-oil-in-water emulsion vaccines containing Newcastle disease virus haemagglutinin-neuraminidase glycoprotein. *Avian Pathol.*, **30**, 509–516.
- FULLER C.M., BRODD L., IRVINE R.M., ALEXANDER D.J. & ALDOUS E.W. (2010). Development of an L gene real-time reverse-transcription PCR assay for the detection of avian paramyxovirus type 1 RNA in clinical samples. *Arch. Virol.*, **155**, 817–823.
- GOEBEL S.J., TAYLOR J., BARR B.C., KIEHN T.E., CASTRO-MALASPINA H.R., HEDVAT C.V., RUSH-WILSON K.A., KELLY C.D., DAVIS S.W., SAMSONOFF W.A., HURST K.R., BEHR M.J. & MASTERS P.S. (2007). Isolation of avian paramyxovirus 1 from a patient with a lethal case of pneumonia. *J. Virol.*, **81**, 12709–12714.
- GOULD A.R., KATTENBELT J.A., SELLECK P., HANSSON E., LA-PORTA A. & WESTBURY H.A. (2001). Virulent Newcastle disease in Australia: molecular epidemiological analysis of viruses isolated prior to and during the outbreaks of 1998-2000. *Virus Res.*, **77**, 51–60.
- HECKERT R.A., RIVA J., COOK S., McMILLEN J. & SCHWARTZ R.D. (1996). Onset of protective immunity in chicks after vaccination with a recombinant herpesvirus of turkeys vaccine expressing Newcastle disease virus fusion and hemagglutinin-neuraminidase antigens. *Avian Dis.*, **40**, 770–777.
- HU S., MA H., WU Y., LIU W., WANG X., LIU Y. & LIU X. (2009). A vaccine candidate of attenuated genotype VII Newcastle disease virus generated by reverse genetics. *Vaccine*, **27**, 904–910.
- KAPCZYNSKI D.R. & KING D.J. (2005). Protection of chickens against overt clinical disease and determination of viral shedding following vaccination with commercially available Newcastle disease virus vaccines upon challenge with highly virulent virus from the California 2002 exotic Newcastle disease outbreak. *Vaccine*, **23**, 3424–3433.
- KARACA K., SHARMA J.M., WINSLOW B.J., JUNKER D.E., REDDY S., COCHRAN M. & McMILLEN J. (1998). Recombinant fowlpox viruses coexpressing chicken type I IFN and Newcastle disease virus HN and F genes: influence of IFN on protective efficacy and humoral responses of chickens following *in ovo* or post-hatch administration of recombinant viruses. *Vaccine*, **16**, 1496–1503.
- KHAN T.A., RUE C.A., REHMANI S.F., AHMED A., WASILENKO J.L., MILLER P.J. & AFONSO C.L. (2010). Phylogenetic and biological characterization of Newcastle disease virus isolates from Pakistan. *J. Clin. Microbiol.*, **48**, 1892–1894.
- KIM L.M., KING D.J., CURRY P.E., SUAREZ D.L., SWAYNE D.E., STALLKNECHT D.E., SLEMONS R.D., PEDERSEN J.C., SENNE D.A., WINKER K. & AFONSO C.L. (2007). Phylogenetic diversity among low virulence Newcastle disease viruses from waterfowl and shorebirds and comparison of genotype distributions to poultry-origin isolates. *J. Virol.*, **81**, 12641–12653.
- KIM L.M., KING D.J., GUZMAN H., TESH R.B., TRAVASSOS DA ROSSA A.P.A., BUENO R., DENNET J.A. & AFONSO C.L. (2008a). Biological and phylogenetic characterization of pigeon paramyxovirus serotype 1 circulating in wild North American pigeons and doves. *J. Clin. Microbiol.*, **46**, 3303–3310.

- KIM L.M., SUAREZ D.L. & AFONSO C.L. (2008b). Detection of a broad range of class I and II Newcastle disease viruses using multiplex real-time reverse transcription polymerase chain reaction assay. *J. Vet. Diagn. Invest.*, **20**, 414–425.
- KOUWENHOVEN B. (1993). Newcastle Disease *In: Virus Infection of Birds*, McFerran J.B. & McNulty M.S., eds. Elsevier Science Publishers B.V., Amsterdam, Netherlands, 341–4361.
- LEE Y.J., SUNG H.W., CHOI J.G., LEE E.K., YOON H., KIM J.H. & SONG C.S. (2008). Protection of chickens from Newcastle disease with a recombinant baculovirus subunit vaccine expressing the fusion and hemagglutininneuraminidase proteins. *J. Vet. Sci.*, **9**, 301–308.
- LENSING H.H. (1974). Newcastle disease – live vaccine testing. *Dev. Biol. Stand.*, **25**, 189–194.
- LETELLIER C., BURNY A. & MEULEMANS G. (1991). Construction of a pigeonpox virus recombinant: expression of the Newcastle disease virus (NDV) fusion glycoprotein and protection of chickens against NDV challenge. *Arch. Virol.*, **118**, 43–56.
- LIU H., ZHAO Y., ZHENG D., LV Y., ZHANG W., XU T., LI J. & WANG Z. (2011). Multiplex RT-PCR for rapid detection and differentiation of class I and class II Newcastle disease viruses. *J. Virol. Methods*, **171**, 149–155. Epub 27 Oct. 2010.
- LOKE C.F., OMAR A.R., RAHA A.R., & YUSOFF K. (2005). Improved protection from velogenic Newcastle disease virus challenge following multiple immunizations with plasmid DNA encoding for F and HN genes. *Vet. Immunol. Immunopathol.*, **106**, 259–267.
- MAAS R.A., OEI H.L., KEMPER S., KOCH G. & VISSER L. (1998). The use of homologous virus in the haemagglutination-inhibition assay after vaccination with Newcastle disease virus strain La Sota or Clone30 leads to an over estimation of protective serum antibody titres. *Avian Pathol.*, **27**, 625–631.
- MEBATSION T., KOOLEN M. J., DE VAAN L. T., DE HAAS N., BRABER M., ROMER-OBERDORFER A., VAN DEN ELZEN, P. & VAN DER MARCEL P. (2002). Newcastle disease virus (NDV) marker vaccine: an immunodominant epitope on the nucleoprotein gene of NDV can be deleted or replaced by a foreign epitope. *J. Virol.*, **76**, 10138–10146.
- MEULEMANS G. (1988). Newcastle disease virus F glycoprotein expressed from a recombinant vaccinia virus vector protects chickens against live-virus challenge. *Avian Pathol.*, **17**, 821–827.
- MEULEMANS G., VAN DEN BERG T.P., DECAESSTECKER M. & BOSCHMANS M. (2002). Evolution of pigeon Newcastle disease virus strains. *Avian Pathol.*, **31**, 515–519.
- MILLER P.J., AFONSO C.L., SPACKMAN E., SCOTT M.A., PEDERSEN J.C., SENNE D.A., BROWN J.D., FULLER C.M., UHART M.M., KARESH W.B., BROWN I.H., ALEXANDER D.J. & SWAYNE D.E. (2010a). Evidence for a New Avian Paramyxovirus Serotype-10 Detected in Rockhopper Penguins from the Falkland Islands. *J. Virol.*, **84**, 11496–11504.
- MILLER P.J., DECANINI E.L. & AFONSO C.L. (2010b). Newcastle disease: Evolution of genotypes and the related diagnostic challenges. *Infect. Genet. Evol.*, **10**, 26–35.
- MILLER P.J., KING D.J., AFONSO C.L. & SUAREZ D.L. (2007). Antigenic differences among Newcastle disease virus strains of different genotypes used in vaccine formulation affect viral shedding after a virulent challenge. *Vaccine*, **25**, 7238–7246.
- MORGAN R.W., GELB J., SCHREURS C.S., LUTTICKEN D., ROSENBERGER J.K. & SONDERMEIJER P.J. (1992). Protection of chickens from Newcastle and Marek's diseases with a recombinant herpesvirus of turkeys vaccine expressing the Newcastle disease virus fusion protein. *Avian Dis.*, **36**, 858–870.
- MORI H., TAWARA H., NAKAZAWA H., SUMIDA M., MATSUBARA F., AOYAMA S., IRANTI Y., HAYASHI Y. & KAMOGAWA K. (1994). Expression of the Newcastle disease virus (NDV) fusion glycoprotein and vaccination against NDV challenge with a recombinant baculovirus. *Avian Dis.*, **38**, 772–777.
- NAGY E., HUBER P., KRELL P.J. & DERBYSHIRE J.B. (1991). Synthesis of Newcastle disease virus (NDV)-like envelopes in insect cells infected with a recombinant baculovirus expressing the haemagglutinin-neuraminidase of NDV. *J. Gen. Virol.*, **72** (Pt 3), 753–756.

- NAKAYA T., CROS J., PARK M.S., NAKAYA Y., ZHENG H., SAGRERA A., VILLAR E., GARCIA-SASTRE A. & PALESE P. (2001). Recombinant Newcastle disease virus as a vaccine vector. *J. Virol.*, **75**, 11868–11873.
- NAYAK B., KUMAR S., DINAPOLI J.M., PALDURAI A., PEREZ D.R., COLLINS P.L. & SAMAL S.K. (2010). Contributions of the avian influenza virus HA, NA, and M2 surface proteins to the induction of neutralizing antibodies and protective immunity. *J. Virol.*, **84**, 2408–2420.
- NANTHAKUMAR T., KATARIA R.S., TIWARI A.K., BUTCHIAH G. & KATARIA J.M. (2000). Pathotyping of Newcastle disease viruses by RT-PCR and restriction enzyme analysis. *Vet. Res. Commun.*, **24**, 275–286.
- OLABODE A.O., NDAKO J.A., ECHEONWU G.O., NWANKITI O.O. & CHUKWUEDO A.A. (2010). Use of cracked maize as a carrier for NDV4 vaccine in experimental vaccination of chickens. *Virology*, **7**, 67.
- PEETERS B.P., DE LEEUW O.S., KOCH G. & GIELKENS A.L. (1999). Rescue of Newcastle disease virus from cloned cDNA: evidence that cleavability of the fusion protein is a major determinant for virulence. *J. Virol.*, **73**, 5001–5009.
- PEETERS B.P., DE LEEUW O.S., VERSTEGEN I., KOCH G. & GIELKENS A.L. (2001). Generation of a recombinant chimeric Newcastle disease virus vaccine that allows serological differentiation between vaccinated and infected animals. *Vaccine*, **19**, 1616–1627.
- PEROZO F., VILLEGAS P., ESTEVEZ C., ALVARADO I.R., PURVIS L.B. & SAUME E. (2008). Avian adeno-associated virus-based expression of Newcastle disease virus hemagglutinin-neuraminidase protein for poultry vaccination. *Avian Dis.*, **52**, 253–259.
- RAJAWAT Y.S., SUNDARESAN N.R., RAVINDRA P.V., KANTARAJA C., RATTA B., SUDHAGAR M., RAI A., SAXENA V.K., PALIA S.K. & TIWARI A.K. (2008). Immune responses induced by DNA vaccines encoding Newcastle virus haemagglutinin and/or fusion proteins in maternal antibody-positive commercial broiler chicken. *Br. Poult. Sci.*, **49**, 111–117.
- REDDY S. K., SHARMA J. M., AHMAD J., REDDY D.N., McMILLEN J.K., COOK S.M., WILD M.A & SCHWARTZ R.D. (1996). Protective efficacy of a recombinant herpesvirus of turkeys as an in ovo vaccine against Newcastle and Marek's diseases in specific-pathogen-free chickens. *Vaccine*, **14**, 469–477.
- ROMER-OBERDORFER A., MUNDT E., MEBATSION T., BUCHHOLZ U.J. & METTENLEITER T.C. (1999). Generation of recombinant lentogenic Newcastle disease virus from cDNA. *J. Gen. Virol.*, **80** (Pt 11), 2987–2995.
- SAKAGUCHI M., NAKAMURA H., SONODA K., OKAMURA H., YOKOGAWA K., MATSUI K. & HIRA K. (1998). Protection of chickens with or without maternal antibodies against both Marek's and Newcastle diseases by one-time vaccination with recombinant vaccine of Marek's disease virus type 1. *Vaccine*, **16** (5), 472-479.
- SCHROER D., VEITS J., GRUND C., DAUBER M., KEIL G., GRANZOW H., METTENLEITER T.C. & ROMER-OBERDORFER A. (2009). Vaccination with Newcastle disease virus vectored vaccine protects chickens against highly pathogenic H7 avian influenza virus. *Avian Dis.*, **53**, 190–197.
- SHENGQING Y., KISHIDA N., ITO H., KIDA H., OTSUKI K., KAWAOKA Y. & ITO T. (2002). Generation of Velogenic Newcastle Disease Viruses from a Nonpathogenic Waterfowl Isolate by Passaging in Chickens. *Virology*, **301**, 206–211.
- STEEL J., BURMAKINA S.V., THOMAS C., SPACKMAN E., GARCIA-SASTRE A., SWAYNE D.E. & PALESE P. (2008). A combination *in-ovo* vaccine for avian influenza virus and Newcastle disease virus. *Vaccine*, **26**, 522–531.
- STONE H.D., BONEY W.A. JR, CORIA M.F. & GILLETTE K.G. (1975). Viscerotropic velogenic Newcastle disease in turkeys: vaccination against loss of egg production. *Avian Dis.*, **19**, 47–51
- SWAYNE D.E. & KING D.J. (2003). Avian influenza and Newcastle disease. *J. Am. Vet. Med. Assoc.*, **222**, 1534–1540.
- TERREGINO C. & CAPUA I. (2009). Clinical traits and pathology of Newcastle disease infection and guidelines for farm visit and differential diagnosis. *In: Avian Influenza and Newcastle Disease*, Capua I., ed. AD Springer Milan, Milan, Italy.

THAYER S.G. & BEARD C.W. (2008). Serologic Procedures. *In: A Laboratory Manual for the Identification and Characterization of Avian Pathogens*, Fifth Edition, Dufour-Zavala L., ed. American Association of Avian Pathologists, USA, pp. 222–229.

WAMBURA P.N. (2011). Formulation of novel nano-encapsulated Newcastle disease vaccine tablets for vaccination of village chickens. *Trop. Anim Health Prod.*, 43, 165–169.

WISE M.G., SUAREZ D.L., SEAL B.S., PEDERSEN J.C., SENNE D.A., KING D.J., KAPCZYNSKI D. & SPACKMAN E. (2004). Development of a real-time reverse-transcription PCR for detection of Newcastle disease virus RNA in clinical samples. *J. Clin. Microbiol.*, 42, 329–338.

YANG Z.Q., LIU Q.Q., PAN Z.M., YU H.X. & JIAO X.A. (2007). Expression of the fusion glycoprotein of Newcastle disease virus in transgenic rice and its immunogenicity in mice. *Vaccine*, 25, 591–598.

*
* *

NB: Existen Laboratorios de Referencia de la OIE para la Enfermedad de Newcastle (véase la Tabla de la Parte 4 de este *Manual Terrestre* consúltese la lista más actualizada en la página web de la OIE: <http://www.oie.int/es/nuestra-experiencia-cientifica/laboratorios-de-referencia/lista-des-laboratorios/>). Por favor, contacte con los Laboratorios de Referencia de la OIE para información adicional sobre las pruebas de diagnóstico, los reactivos y las vacunas para la Enfermedad de Newcastle.

NB: ADOPTADO POR PRIMERA VEZ EN 1989; ÚLTIMAS ACTUALIZACIONES ADOPTADAS EN 2012.