

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

RESUMEN

Descripción de la enfermedad: La enfermedad de Newcastle (EN) está causada por cepas virulentas de paramixovirus tipo 1 (APMV-1), también denominado virus de la enfermedad de Newcastle (VEN), del género Orthoavulavirus, perteneciente a la familia Paramyxoviridae. En la actualidad, hay 21 serotipos de paramixovirus aviar, designados como APMV-1 a APMV-21. Cada virus pertenece a una especie vírica y están distribuidos entre tres géneros, denominados: metaavulavirus aviares, orthoavulavirus aviares y paraavulavirus aviares.

Se ha comprobado que APMV-1 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 APMV-1 de baja virulencia pueden inducir una enfermedad respiratoria y entérica grave si se exacerban por la presencia de otros microorganismos o por condiciones ambientales adversas. El método preferido de diagnóstico es la reacción en cadena de la polimerasa con transcripción inversa (RT-PCR) validada y la secuenciación, pero el aislamiento sigue siendo una importante herramienta de laboratorio.

Detección 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 embrionados de gallina con 9-11 días de embrionaje. Los huevos se incuban a 37°C durante 2-7 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 para detectar el genoma vírico.

En cualquiera de los agentes hemoaglutinantes debe comprobarse si presenta inhibición específica con un antisuero monoespecífico frente al APMV-1. El APMV-1 puede mostrar cierta relación antigénica cruzada con algunos de los demás serotipos del paramixovirus aviar, en concreto el APMV-3, el APMV-7 y el APMV-12. Como método alternativo para la identificación inicial de APMV-1 también se podría utilizar RT-PCR en tiempo real en los líquidos alantoideos positivos.

La virulencia de los APMV-1 recientemente aislados se puede evaluar empleando técnicas moleculares, es decir, reacción en cadena de la polimerasa con transcripción inversa y secuenciación. Como alternativa, también se puede emplear el índice de patogenicidad intracerebral (ICPI). 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. Todo APMV-1 con un ICPI ≥ 0.7 , o con múltiples aminoácidos básicos en el extremo C de la proteína F2 y fenilalanina en el residuo 117 de su proteína F se considera virulento.

Las pruebas basadas en la genética son las más aplicadas al diagnóstico de rutina y ofrecen alternativas rápidas, sensibles y rentables a los métodos convencionales. La RT-PCR en tiempo real dirigida a un gen muy conservado supera la amplia heterogeneidad en los genes de fusión (F) o de hemaglutinina-neuraminidasa (HN). Se pueden aplicar directamente a las muestras clínicas una vez tratadas para extraer el ARN vírico y se pueden utilizar para analizar grandes cantidades de muestras. La confirmación de la detección mediante RT-PCR en tiempo real de cribado

altamente sensible e incluso debe ir seguida de la secuenciación del gen F para determinar la virulencia del virus (el sitio de escisión proteolítica del gen F) y el genotipo del virus. Es importante que las pruebas seleccionadas hayan demostrado ser capaces de detectar con sensibilidad virus que se sabe que circulan o amenazas emergentes en la región en la que se aplican.

Se recomienda una prueba de detección mediante RT-PCR en tiempo real para identificar APMV-1 virulento y avirulento. Cuando una prueba es positiva, se pueden usar otras pruebas dirigidas al sitio de escisión de los genes de fusión para identificar virus con un sitio de escisión compatible con VEN. Debido a la variabilidad del sitio de escisión en los genes de fusión, si se usa RT-PCR en tiempo real, puede requerir más de una prueba identificar todos los genotipos virulentos que circulan en un país o región, por lo que la secuenciación de genes es el método preferido. En el caso de los brotes que tienen aves con signos compatibles con el virus de la enfermedad de Newcastle, que son positivos en la prueba de detección de RT-PCR en tiempo real, y que son negativos en las RT-PCR en tiempo real de detección de genes de fusión de virus virulentos, pueden ser necesarias la secuenciación directa del punto de escisión de los genes de fusión o el aislamiento vírico y el análisis clásico.

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. También se utilizan enzimoanálisis, y existen varios kits comerciales.

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 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 APMV-1 para la producción de vacunas o en estudios de desafío, la instalación debe cumplir los requisitos para lograr un nivel adecuado de bioseguridad y bioprotección, que vendrá determinado por un análisis del riesgo biológico.

A. INTRODUCCIÓN

La enfermedad de Newcastle (EN) está causada por cepas virulentas del paramixovirus aviar tipo 1 (APMV-1), del género *Orthoavulavirus*, perteneciente a la subfamilia *Avulavirinae*, familia *Paramyxoviridae*. Los paramixovirus aislados procedentes de especies aviares se han clasificado mediante pruebas serológicas y análisis filogenéticos en 21 serotipos de paramixovirus aviares, que se designan como APMV-1 a APMV-21. Cada virus pertenece a una especie vírica y están distribuidos en tres géneros: metaavulavirus, orthoavulavirus y paraavulavirus (Amarasinghe *et al.*, 2019; ICTV 2019).

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 APMV-1 es su enorme variación respecto a la patogenicidad en los pollos. Las cepas del APMV-1 se agrupan en cinco patotipos en base a los signos clínicos observados en los pollos infectados (Alexander y 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 subclínico: normalmente consiste en una infección entérica subclínica.

Las agrupaciones en patotipos casi nunca están claramente definidas, 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 APMV-1 puede infectar a los humanos, cuyo signo de infección más frecuente es la conjuntivitis, que aparece en un plazo de 24 horas tras la exposición al APMV-1 virulento 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. 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 la variante APMV-1 de la paloma (PPMV-1) procedente de tejido de pacientes inmunocomprometidos que han muerto de neumonía.

La EN, tal como se la describe 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. Todas las manipulaciones de laboratorio con el virus vivo o material que pueda estar infectado/contaminado por el mismo deben llevarse a cabo a un nivel de bioseguridad y bioprotección adecuado, que vendrá determinado por un análisis del riesgo biológico según se indica 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 instalaciones de laboratorio adecuadas deben enviar las muestras a un Laboratorio de Referencia de la OIE para esta enfermedad.

B. TÉCNICAS DE DIAGNÓSTICO

Tabla 1. Métodos analíticos disponibles y su propósito

Método	Propósito					
	Demostrar ausencia de infección en la población	Demostrar ausencia de infección en animales individuales antes de los desplazamientos	Contribuir a las políticas de erradicación	Confirmar casos clínicos	Determinar la prevalencia de la infección – vigilancia	Determinar el estado inmunitario en animales o poblaciones tras la vacunación
Detección del agente						
Aislamiento del virus	–	+++	+	+++	+ –	–
PCR convencional y secuenciación	+	++	+	+++	+	–
RT-PCR en tiempo real	++	+++ ¹	++	+++ ¹	+	–

Método	Propósito					
	Demostrar ausencia de infección en la población	Demostrar ausencia de infección en animales individuales antes de los desplazamientos	Contribuir a las políticas de erradicación	Confirmar casos clínicos	Determinar la prevalencia de la infección – vigilancia	Determinar el estado inmunitario en animales o poblaciones tras la vacunación
Detección de respuesta inmunitaria						
ELISA	+	+	++	–	++	++
HI	–	–	+	–	++	+++

Clave: +++ = recomendado para este propósito; ++ = recomendado pero tiene limitaciones; + = adecuado en muy pocas situaciones; – = no adecuado para este propósito.
 RT-PCR = reacción en cadena de la polimerasa con transcripción inversa;
 ELISA = enzimoimmunoanálisis; HI = prueba de inhibición de la hemaglutinación.
¹Se utilizan métodos que resultan acordes a lo exigido, son específicos y son inclusivos.

1. Detección del agente

La identificación de los virus APMV-1 como causa de infecciones y enfermedades en aves de corral y otras aves requiere una investigación diagnóstica exhaustiva para diferenciarlos de enfermedades similares causadas por otros agentes víricos, especialmente los virus de la influenza A. Cada cepa aislada de virus APMV-1 e influenza A varía mucho en cuanto a la virulencia, causando varios síndromes evidentes como infecciones subclínicas, disminución en la producción de huevos, enfermedad respiratoria y enfermedad grave y de alta mortalidad. Este último síndrome clínico puede estar causado por virus APMV de la enfermedad de Newcastle (APMV-1 virulento) o de la influenza aviar de alta patogenicidad (IAAP). Es prudente aplicar un solo procedimiento de muestreo y ejecutar simultáneamente pruebas de diagnóstico diferenciadoras específicas para ambas categorías de agentes en muestras de campo, con el fin de obtener un diagnóstico etiológico preciso de un solo agente o, en ocasiones, la confirmación de la infección dual por APMV-1 y virus de la influenza A.

1.1. Muestras para el aislamiento vírico

El aislamiento del virus es el método de referencia, pero es laborioso y lento, y se utiliza sobre todo para el diagnóstico de un primer caso clínico de un brote y para obtener cepas víricas para posteriores análisis de laboratorio.

Cuando se estudian casos de la enfermedad graves y con alta mortalidad 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 incluir contenido intestinal (heces) o hisopos cloacales e hisopos orofaríngeos o traqueales, y también deben obtenerse y procesarse por separado o en conjunto muestras de pulmones, sacos aéreos, intestino, bazo, riñones, amígdalas cecales, encéfalo, hígado y corazón. Al combinar las muestras, el encéfalo debe obtenerse y procesarse primero (para evitar la contaminación cruzada por otros tipos de tejidos) y mantenerse separado, ya que la presencia de virus en el encéfalo puede ser un indicador de VEN o IAAP. Los otros grupos de muestras deben formarse en función de los tropismos víricos que se conocen para los virus APMV-1 (ya sean VEN o no), es decir, deben agruparse según ubicación respiratoria, sistémica o gastrointestinal.

Las muestras de aves vivas deben incluir hisopos traqueales u orofaríngeos y cloacales, y estas últimas deben estar cubiertas visiblemente de material fecal. Para evitar dañarlos, los hisopos de las aves pequeñas y delicadas debe ser especialmente pequeños, los cuales suelen estar a la venta y se destinan a pediatría humana; la obtención de heces frescas puede constituir una alternativa adecuada (debe tenerse en cuenta que algunos casos de virus de influenza A y avulavirus tipo 1 aviares pueden tener un fuerte tropismo respiratorio). Se pueden combinar muestras de hisopos similares del mismo sitio anatómico (es decir, hisopos cloacales con hisopos cloacales, hisopos orofaríngeos con hisopos orofaríngeos) y lo más habitual es combinar cinco u ocasionalmente más, siempre que esta práctica esté válida adecuadamente para no reducir la sensibilidad de detección, aunque deberán utilizarse tipos específicos de hisopos (Spackman *et al.*, 2013). Además, el tipo de hisopos utilizados puede afectar a la sensibilidad o la validez de la prueba, prefiriéndose hisopos de alambre delgado o con varilla de plástico.

Las muestras deben ponerse en solución salina tamponada con fosfato isotónico (PBS), pH 7,0–7,4 con antibióticos o una solución que contenga proteínas y antibióticos. Los antibióticos pueden variar según las condiciones locales, pero podrían ser, por ejemplo, penicilina (2000 unidades/ml); estreptomycin (2 mg/ml); gentamicina (50 µg/ml); y micostatina (1000 unidades/ml) para tejidos e hisopos orofaríngeos o traqueales, pero a concentraciones cinco veces más altas para heces e hisopos cloacales. Es importante reajustar la solución primaria concentrada a un pH de 7,0 a 7,4 tras la adición de los antibióticos. Se recomienda que la solución para el transporte de los hisopos contenga proteínas para estabilizar el virus (p. ej., medios comerciales para el transporte de muestras de tipo infusión cerebro-corazón o similares, con un máximo de un 5% [v/v] de suero bovino y un 0,5% [p/v] de albúmina bovina).

Si se quiere controlar *Chlamydomphila*, se debe incluir 0,05-0,1 mg/ml de oxitetraciclina. Las heces y los tejidos homogeneizados 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. Para una conservación prolongada, las muestras para el diagnóstico y los aislamientos deben conservarse a -80 °C, aunque para el transporte sobre hielo seco ($\leq -50^{\circ}\text{C}$) se utiliza mucho. Deben evitarse ciclos repetidos de congelación y descongelación.

1.2. Aislamiento del virus

El método preferido de cultivo de virus APMV-1 es la inoculación en huevos embrionados de gallina que estén libres de patógenos específicos (SPF), o bien en huevos negativos respecto a anticuerpos específicos (SAN). Los líquidos sobrenadantes de las heces, los hisopos o las suspensiones de tejidos 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 tres a cinco huevos embrionarios de gallina SPF o SAN de 9–11 días de incubación. Después de la inoculación, se incuban a 35–37°C durante 2–7 días. Para acelerar el aislamiento final, se pueden llevar a cabo hasta dos pases a intervalos de 1 a 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 un mínimo de 2 horas o durante toda la noche (y se comprobará si hay muerte embrionaria antes de proceder), 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. También se pueden utilizar placas de agar BHI o agar sangre. En el caso de cantidades mayores de muestra, se puede realizar un cultivo inicial en caldo de fosfato triptosa. 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 APMV-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 APMV-1 crecen mal en cultivo celular y se replican hasta títulos más altos en huevos embrionados, mientras que algunas cepas de APMV-1 variante paloma (PPMV-1) y de APMV-1, como la cepa avirulenta de Ulster, pueden aislarse en hígado de pollo o células renales de pollo pero no en huevos embrionados. 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. Al comparar las tasas de aislamiento vírico de APMV-1 *in ovo* con los resultados de la reacción en cadena de la polimerasa con transcripción inversa (RT-PCR) en tiempo real en muestras positivas obtenidas de programas de vigilancia de aves silvestres, se demostró que no había diferencias significativas en la frecuencia de aislamiento al utilizar huevos de gallina embrionados, huevos de pato embrionados o huevos de pavo embrionados. Por el contrario, se notificaron tasas muy significativas de aislamiento del virus con huevos de ave embrionados en comparación con los cultivos en células Vero o de riñón canino Madin-Darby de muestras positivas respecto a APMV-1 en la RT-PCR en tiempo real (Moresco *et al.*, 2012). Por razones de bienestar animal, el número de huevos embrionados debe mantenerse al mínimo, aplicando los principios de las 3R.

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 cualquier subtipo de APMV (incluido APMV-1), de 16 subtipos de hemaglutinina de los virus de la influenza A aviar, de adenovirus hemaglutinantes o de APMV-1 HA bacteriano. El APMV-1 se puede confirmar mediante un antisuero específico en una prueba de inhibición de la hemaglutinación (HI). Habitualmente, se utiliza el antisuero de pollo preparado contra una de las cepas del APMV-1.

El APMV-1 aislado de algunas especies de aves silvestres, como p. ej., cormoranes, no siempre muestra capacidad de hemaglutinar glóbulos rojos. El reemplazo de glóbulos rojos de pollo por glóbulos rojos de pavo puede ser beneficioso cuando se analiza líquido alantoideo/amniótico infectado por el virus aislado de dichas especies. Incluso cuando se utilizan glóbulos rojos de pavo, la actividad HA del virus permanece baja, lo que hace que la prueba HA no sea fiable para evaluar estas cepas de APMV-1 aisladas de algunas especies de aves silvestres (Hines y Miller, 2012).

En la prueba de la HI, puede observarse cierto nivel de reactividad cruzada entre los distintos serotipos de paramixovirus aviarios. Puede observarse reactividad cruzada entre virus APMV-1 y APMV-3 (en concreto con la variante de las psitácidas APMV-3, frecuentemente aislada de aves mascota o exóticas) o APMV-7 o APMV-12. El riesgo de tipificar erróneamente una cepa puede reducirse mucho empleando valores de sueros de referencia o anticuerpos monoclonales (MAbs) específicos de APMV-1, APMV-3, APMV-7 y APMV-12. Véase también el apartado B.1.7.

Actualmente, las técnicas basadas en la RT-PCR para la detección y tipificación (patotipificación y genotipificación) del ARN del APMV-1 en líquido alantoideo de huevos de aves de corral inoculados es el método estándar en los laboratorios de diagnóstico. No obstante, la variabilidad genética de las cepas de APMV-1 debe tenerse muy en cuenta como posible causa de falsos negativos cuando se utilizan pruebas de laboratorio basadas en la genética si no se ha comprobado que tengan inclusividad. 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 APMV-1 y el uso generalizado de vacunas vivas implica que la identificación de una cepa como APMV-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 y 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 OIE (*Código Sanitario para los Animales Terrestres*, Capítulo 10.9, *Infección por el virus de la enfermedad de Newcastle*) 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 (caso inicial). No sería adecuado emplear el ICPI para cepas detectadas en la vigilancia rutinaria de aves sanas no vacunadas. Se recomienda utilizarlo solo cuando otros métodos, como la secuenciación génica y los datos clínicos, aportan resultados anómalos.

Las pruebas *in vivo* de patogenicidad 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 como se ha descrito con frecuencia en el caso de PPMV-1. 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, libre de virus influenza A y de cualquier otro agente extraño, 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. Toda puntuación $\geq 0,7$ se considera virulenta.

1.5. Base molecular de la patogenicidad

Durante la replicación, las partículas del APMV-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-traducciona 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, como células epiteliales de los tractos respiratorio y gastrointestinal.

La mayoría de los virus APMV-1 que son patógenos para los pollos tienen la secuencia ¹¹²R/K-R-Q-K/R-R¹¹⁶ (Choi *et al.*, 2010) 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 variables (Heiden *et al.*, 2014). Este fenómeno se ha asociado no solo a la proteína de fusión, sino también al complejo de replicación formado por la nucleoproteína, la fosfoproteína y la polimerasa (Dortmans *et al.*, 2011; Heiden *et al.*, 2014).

Se han llevado a cabo 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 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 APMV-1 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. La determinación del sitio de escisión mediante secuenciación u otros métodos se ha convertido en el método de elección para la evaluación inicial de la patogenicidad de estos virus y se ha incorporado a definiciones acordadas. Esto ha reducido el número de pruebas *in vivo*, aunque el resultado de la secuenciación inicial de Sanger de un sitio de escisión F0 del APMV-1 debe confirmarse mediante la inoculación de aves o una secuenciación exhaustiva utilizando secuenciación de alto rendimiento con un mínimo de 1000 lecturas para confirmar que no hay subpoblaciones víricas de los virus virulentos.

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. También se ha generado de manera experimental virus virulento a partir de un virus de baja virulencia mediante pases en pollos (Dortmans *et al.*, 2011).

1.6. Descripción de la enfermedad de Newcastle

La gran mayoría de especies aviares es susceptible a la infección por APMV-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. Los signos menos agudos son abatimiento, diarrea, edema de la cabeza y signos neurológicos, como tortícolis, pero con niveles de mortalidad muy altos. Las cáscaras de los huevos pueden ser blandas o las aves pueden dejar de poner por completo. Las cepas moderadamente virulentas (mesogénicas) suelen producir signos respiratorios con secuelas neurológicas y niveles de mortalidad <50%. Algunas cepas, como las de las palomas, pueden inducir diarrea con signos neurológicos en las aves de corral junto con una producción de huevos muy reducida. Las cepas de baja virulencia producen una enfermedad respiratoria leve o no producen enfermedad en absoluto. Circunstancias exacerbantes, incluida la coinfección por otros agentes patógenos y un mal manejo, pueden provocar un aparente aumento de la virulencia. Así, los signos clínicos son variables y están influidos por otros factores, de modo que ninguno puede considerarse patognomónico. Además, la gama de signos clínicos no se puede distinguir fácilmente de los de la influenza aviar de alta patogenicidad.

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 enfermedad de Newcastle a los efectos de declaración de la enfermedad y de las medidas de control de la misma se puede consultar en el *Código Sanitario para los Animales Terrestres*.

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 APMV 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 MABs para diferenciarlas de forma rápida y barata de otros APMV-1.

1.8. Estudios filogenéticos

El desarrollo de técnicas mejoradas para la secuenciación de nucleótidos, la disponibilidad de datos de secuencia para un número cada vez mayor de virus APMV-1 en bases de datos en línea y la demostración de que incluso longitudes de secuencia relativamente cortas podrían dar resultados significativos en análisis filogenéticos, han llevado a que estos métodos se utilicen mucho. Se ha detectado una diversidad genética considerable, pero los virus que comparten parámetros temporales,

geográficos, antigénicos o epidemiológicos tienden a pertenecer a linajes o genotipos genéticos específicos, lo cual se ha comprobado que es valioso para evaluar tanto la epidemiología global como la propagación local de la enfermedad de Newcastle (Diel *et al.*, 2012 ; Dimitrov *et al.*, 2019).

La mayor disponibilidad y velocidad de producción de datos de secuencia utilizando los sofisticados kits que se venden para los hardware de RT-PCR y de secuenciación automática permite que los estudios filogenéticos estén al alcance de un número cada vez mayor de laboratorios de diagnóstico y que puedan dar resultados significativos, que son más contemporáneos que retrospectivos (Miller *et al.*, 2010). Para clasificar los nuevos virus APMV-1, Diel *et al.* (2012) diseñaron una nomenclatura y un sistema de clasificación unificados basados en los análisis filogenéticos de secuencias completas del gen F y en criterios objetivos para clasificar APMV-1 en genotipos y subgenotipos. Este trabajo confirmó la existencia de dos flogrupos principales distintos denominados clase I y II (Miller *et al.*, 2010). La clase I incluye en gran medida cepas de baja virulencia recuperadas de mercados de aves vivas y aves acuáticas silvestres de todo el mundo, mientras que la clase II comprende la gran mayoría de virus de alta y baja virulencia aislados de aves de corral y aves silvestres. Por clases, se observó un solo genotipo para los virus de clase I, mientras que los aislados de VEN de la clase II se han dividido en 18 genotipos. Se han adoptado nuevas revisiones del sistema de Diel *et al.* a partir de determinaciones claramente definidas para asignar virus a genotipos y subgenotipos. Este sistema analizó virus de 1956 y estableció que la clase II tiene 22 genotipos y la clase I dos genotipos (Dimitrov *et al.*, 2019). Mediante el uso de los conjuntos de datos de secuencias de referencia proporcionados, estas nomenclaturas se pueden aplicar a las investigaciones filogenéticas, asignando cualquier virus nuevo a una clase específica (Clase I o II) y a un genotipo establecido o nuevo. Sin embargo, todo sistema de clasificación de virus en uso debe revisarse periódicamente para garantizar que se pueda incorporar cualquier virus nuevo o emergente que quede fuera del sistema de clasificación actual. En general, este análisis permite una evaluación epidemiológica rápida de los orígenes y la propagación de los virus responsables de los brotes. Además, permite una separación clara entre APMV-1 y los virus vacunales que pueden detectarse como parte de la vigilancia de rutina en las aves de corral, y facilita el mapeo preciso de dichos virus, incluida posiblemente la vacuna en el caso de este último.

1.9. Técnicas moleculares para el diagnóstico

Para detectar el APMV-1 en muestras clínicas, las técnicas moleculares se han convertido en los métodos de elección en muchos laboratorios de diagnóstico. Además, la RT-PCR y la secuenciación se utilizan mucho para la determinación de la virulencia de APMV-1 (véase el apartado B.1.5) y para estudios filogenéticos. Se debe escoger la muestra clínica con cuidado, puesto que algunos estudios han puesto de manifiesto la falta de sensibilidad para detectar estos virus en algunos órganos y, sobre todo, en las heces (Creelan *et al.*, 2002). 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 éxito muestras de tejidos y de órganos e incluso las heces, puesto que estas pueden contener cargas víricas superiores de APMV-1. Es posible que cada cepa de APMV-1 tenga un tropismo distinto, de tal forma que se recomienda obtener y analizar hisopos tanto orofaríngeos como cloacales al emplear este tipo de muestra.

El sistema de extracción de ARN también afectará al éxito de la RT-PCR en muestras clínicas, de tal forma que incluso al utilizar kits comerciales debe procederse con cuidado para escoger un sistema adecuado y validado de procesamiento de las muestras que se van a analizar. Dadas las dificultades en el envío de materiales biológicos que contengan sustancias infecciosas, cada vez se utilizan más tarjetas tratadas químicamente comerciales diseñadas para el envío de muestras destinadas al análisis del ADN y el ARN (Perozo *et al.*, 2006), sobre todo en situaciones en las que ya se sabe que el virus es endémico en un país.

Debido a la gran diversidad genética entre los virus APMV-1 (Diel *et al.*, 2012; Dimitrov *et al.*, 2019), lo ideal sería desarrollar un algoritmo de pruebas de laboratorio teniendo en cuenta el propósito para el que se aplica cada prueba. Además, debería tenerse en cuenta la relevancia de las pruebas para la detección, en particular, de cepas locales que circulen contemporáneamente (pero considerando también el riesgo de introducción de nuevos virus) y deberían validarse adecuadamente para el propósito para el que se utilizan. Esto podría incluir la evaluación a través de ensayos en anillo entre laboratorios. Lo ideal sería que un algoritmo de pruebas moleculares para la detección de VEN comprendiera un ensayo de cribado de alta sensibilidad e inclusividad dirigido a un gen conservado (es decir, genes de matriz, proteína L o polimerasa), seguido de un ensayo de patotipificación. El más aplicado a muestras positivas en ensayos de cribado es un examen adicional en el que se emplea metodología dirigida a la determinación de la secuencia del gen F, el cual permite la clasificación del virus de la EN como APMV virulento o avirulento.

El principal desafío con el uso de la RT-PCR convencional es la necesidad del procesamiento posterior a la amplificación debido al alto potencial de contaminación procedente del laboratorio y de contaminación cruzada entre las muestras. Por lo tanto, es necesario extremar las precauciones y aplicar estrictas rutinas de manipulación de las muestras para evitarlas (véase el Capítulo 2.1.2 *Bioteχνología en el diagnóstico de enfermedades infecciosas*). Sin embargo, una de las estrategias utilizadas para esquivar este problema es aplicar técnicas de RT-PCR en tiempo real. Las ventajas son que los ensayos de RT-PCR en tiempo real se basan en sondas de hidrólisis fluorogénica o tinciones fluorescentes que eliminan el paso de procesamiento posterior a la amplificación y pueden proporcionar resultados en unas pocas horas. Estos tipos de análisis se han utilizado con éxito durante los brotes de enfermedad de Newcastle, cuando es posible que se requiera que el laboratorio analice un gran número de muestras. Es posible que durante un brote se aplique un ensayo a medida con una coincidencia perfecta y una alta sensibilidad respecto a la cepa circulante. En principio, al confirmar un nuevo episodio de la enfermedad, es apropiado utilizar una combinación de pruebas (es decir, al menos dos pruebas de laboratorio independientes distintas para la detección de antígenos o ácidos nucleicos) y ciertamente se recomienda para detectar la confirmación de un caso índice.

Este podría ser un ensayo de cribado de RT-PCR en tiempo real sensible que utiliza un gen altamente conservado seguido de la secuenciación de los genes para determinar la virulencia.

Es posible que los ensayos a medida que amplifican una porción específica del genoma puedan proporcionar un valor añadido, como por ejemplo, amplificando parte del gen F que contiene el sitio de escisión F0 para que el producto pueda usarse posteriormente para el patotipado (Fuller *et al.*, 2009; Steyer *et al.*, 2010) o el análisis de la secuencia simultáneos. Sin embargo, debido a la diversidad genética descrita en la Sección B.1.8 *Estudios filogenéticos*, las pruebas universales de RT-PCR específicas del gen F para detectar y patotipos de virulencia siguen siendo un desafío. Además, debido a la variabilidad en la región F0 que codifica el sitio de escisión, las pruebas actualmente existentes son de uso limitado y pueden fallar en la detección de variantes.

La mayoría de los virus que afectan a las aves de corral son de la clase II de APMV-1, pero dentro de esta clase existe una amplia diversidad genética, e incluso genes altamente conservados, como los de la matriz o la proteína L, contienen cierta heterogeneidad que podría dar lugar a falsos negativos en las pruebas. Además, dado el uso extensivo de cepas vacunales vivas, tales ensayos no discriminarán de manera fiable entre virus lentogénicos, mesogénicos y velogénicos. Se ha validado ampliamente un sistema de detección basado en el gen L para una amplia gama de genotipos (Sutton *et al.*, 2019) y proporciona sensibilidad y fiabilidad en la detección de cepas de clase I y de clase II. Además, se ha demostrado que tiene una gran utilidad durante los ensayos comparados entre laboratorios, puesto que produce resultados fiables y reproducibles. Asimismo, se han desarrollado otros ensayos para incluir virus de clase I y de clase II (Kim *et al.*, 2008). Existe una amplia gama de otros ensayos que están descritos y se utilizan, pero generalmente carecen de coherencia en un amplio espectro de análisis, también respecto a la sensibilidad, por lo que deben seleccionarse cuidadosamente de acuerdo con el entorno local y las cepas que circulan.

Algunos ensayos utilizan más de un gen para la detección y el patotipado de APMV-1, como por ejemplo, tanto el gen F como el gen M en una reacción de un solo tubo. Además, se han desarrollado ensayos dúplex en tiempo real que pueden detectar y diferenciar simultáneamente entre VEN y el virus de la influenza aviar (VIA) (Nguyen *et al.*, 2013). Sin embargo, los avances más recientes incluyen la aplicación de tecnologías de PCR múltiple basadas en analizadores para la detección y diferenciación simultáneas de una gama aún más amplia de agentes patógenos aviares (Xie *et al.*, 2014). También se han desarrollado métodos rápidos de alto rendimiento que combinan RT-PCR múltiple de un solo tubo con tecnología de hibridación y detección basada en perlas, útiles para identificar simultáneamente varios virus respiratorios aviares presentes en una infección única o mixta (Laamiri *et al.*, 2016). En la actualidad, debe tenerse en cuenta que la multiplexación de RT-PCR o ensayos de RT-PCR en tiempo real con el objetivo de ampliar la gama de virus detectados con frecuencia da como resultado una reducción de la sensibilidad de la prueba en comparación con los ensayos cuyo objetivo es solo uno (Fuller *et al.*, 2010).

1.10. Secuenciación génica

Actualmente, la RT-PCR en tiempo real es el método preferido de vigilancia de virus porque proporciona diagnósticos rápidos y sensibles para VEN y está disponible con altos rendimientos. Sin embargo, un mayor uso de las tecnologías de secuenciación, particularmente a medida que los costes unitarios se reducen con la mejora de la tecnología, ofrece poderosas oportunidades de detectar y secuenciar simultáneamente muestras clínicas en un laboratorio o entorno de campo, por ejemplo, aplicando tecnología de nanoporos (Butt *et al.*, 2018).

La metodología de secuenciación de Sanger se ha utilizado mucho durante décadas, permite la determinación rápida de un gen diana (F), habitualmente en 24 a 36 horas, para definir la virulencia del virus, y todavía tiene una utilidad generalizada. Sin embargo, como los datos genómicos se pueden determinar rápidamente utilizando tecnología de secuenciación de alto rendimiento, esta permite un análisis más amplio utilizando varias herramientas bioinformáticas. Por ejemplo, al iniciarse el acceso a la metodología de secuenciación, ya sea a través de laboratorios especializados o proveedores comerciales, ahora es posible determinar las secuencias genómicas de VEN aviar para proporcionar un nivel de caracterización importante en la identificación rápida de agentes patógenos y para determinar la intervención en los brotes. Convencionalmente, las secuencias de nucleótidos se han utilizado en la epidemiología de los brotes para inferir el origen del virus y las relaciones precisas entre los diferentes virus asociados dentro del mismo evento (por filogenia), con el fin de respaldar la gestión de los brotes. Las secuencias de genes víricos de la neuraminidasa F o HN pueden compararse rápidamente con secuencias conocidas registradas en bases de datos de genes y usarse para revelar las coincidencias más cercanas, identificando así los virus. Esto a menudo evita la necesidad de cultivar el virus para una identificación rápida, aunque la fiabilidad y la calidad de los datos se reducen al aumentar los valores del ciclo umbral de las muestras que se utilizan en las pruebas de RT-PCR en tiempo real. En ocasiones, estos análisis se han aplicado a nivel de genoma completo y pueden ofrecer una mayor especificidad analítica a los análisis cuando se trata de grupos de virus de la enfermedad de Newcastle muy estrechamente relacionados entre sí.

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 enzimoimmunoanálisis (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 APMV-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. Además, los antígenos de referencia producidos con cepas históricas pueden reducir la sensibilidad de las pruebas de HI cuando se utilizan para la detección de anticuerpos contra virus de la EN actualmente en circulación. Por este motivo, es importante investigar las relaciones antigénicas existentes entre el antígeno utilizado en el laboratorio y los virus circulantes en la actualidad.

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 (se puede utilizar fondo en U pero debe tenerse cuidado al realizar la lectura porque se observará menos definición) 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. Prueba 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, 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 APMV-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, incluidos los que están registrados formalmente por la OIE¹ 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 MABs.

¹ <https://www.oie.int/en/scientific-expertise/registration-of-diagnostic-kits/background-information/>

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 y se verifique su rendimiento en el laboratorio. 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 APMV-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 (Brown *et al.*, 2019) 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 APMV-1 (VEN) en la producción de vacunas o en estudios de desafío, la instalación debe cumplir los requisitos para lograr un nivel de bioseguridad y biocontención adecuados, que vendrá determinado por un análisis del riesgo biológico, según 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 aprobado 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 APMV-1 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 aprobado una vacuna viva para uso *in ovo* formulada a partir de un APMV-1 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 (BPL). 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) (Brown *et al.*, 2019). 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 (Brown *et al.*, 2019). 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 (Brown *et al.*, 2019). 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 APMV-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, para 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 por pollos vagabundos; al mismo tiempo, sería ligeramente más resistente a la inactivación por altas temperaturas ambientales. 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 linfocitaria 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 de bioseguridad y bioprotección, 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 gallina 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 gallinas 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 gallina 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, 2019).

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, 2019), 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, 2019). 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 gallina 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 gallina de 10 días de vida. 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 aprobación del registro

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, 2019). 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, 2019); 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, 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 excreten 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 inyectan 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 (>80%), de tal forma que presente un título de anticuerpos $\geq 1:8$ (Brown *et al.*, 2019).

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 almacenaje 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, 2019). 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 (Bournsnel *et al.*, 1990; Olabode *et al.*, 2010), virus de la viruela de las palomas (Letellier *et al.*, 1991), herpesvirus del pavo (Heckert *et al.*, 1996), virus de la enfermedad de Marek (Sakaguchi *et al.*, 1998) y virus aviar asociado a adenovirus (Perozo *et al.*, 2008).

Otros métodos 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 (Lee *et al.*, 2008) o plantas (Berinstein *et al.*, 2005) y el uso de vacunas de ADN, es decir, ADN de plásmido que codifique proteínas del VEN inmunógenas relevantes (Loke *et al.*, 2005). El establecimiento de un sistema de genética inversa para el VEN (Peeters *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) 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, iii) mayor coincidencia inmunógena con las cepas causantes de los brotes, iv) posibilidad de una vacunación masiva *in ovo* controlada de forma óptima, y v) inmunidad de larga duración proporcionada por una sola dosis de vacuna (Palya *et al.*, 2014).

Solo algunas de las vacunas desarrolladas mediante ingeniería genética mencionadas anteriormente están aprobadas en algunos países para ser utilizadas en avicultura. 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. Estos problemas se pueden resolver con la vacuna recombinante apatógena que contiene el herpesvirus del pavo (Palya *et al.*, 2012). 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, poner un requisito mínimo para la reducción de la excreción de virus de desafío, la interrupción de la transmisión del virus o la implementación del principio DIVA. También debe tenerse en cuenta que la aplicación de vacunas vectorizadas *in ovo* o al día de edad nuevas, inocuas y eficaces, cuando se utilicen solas en países con alto riesgo de enfermedad de Newcastle, no brindará la protección necesaria. En estos escenarios epidemiológicos, la protección temprana debe reforzarse mediante la administración en el criadero de una vacuna viva atenuada seguida de una vacuna de refuerzo aproximadamente a las 2 semanas de edad, ya que la inmunidad protectora inducida por las vacunas basadas en vectores solo se logra unas semanas después de la administración.

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 (Mayers *et al.*, 2017). Algunos estudios han indicado 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), pero ello puede no estar necesariamente correlacionado con la enfermedad o la transmisión. Se ha comprobado que 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. No obstante, un fallo en la vacuna puede ser atribuible a muchos factores, como las malas prácticas de vacunación. Dortmans *et al.* (2014) pusieron de manifiesto que la susceptibilidad de aves de corral vacunadas a la infección por VEN cuando exponían pollos vacunados a VEN contemporáneos de distintos genotipos no era resultado de utilizar una vacuna no adecuada. Se precisan más estudios para definir y conocer a fondo los factores que conducen a una reducción de la eficacia vacunal en condiciones de campo.

3.2. Requisitos especiales para las vacunas desarrolladas mediante ingeniería genética

Una vez obtenida la aprobación del registro, 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

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., 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.
- AMARASINGHE G.K., AYLLÓN M.A., BÀO Y., BASLER C.F., BAVARI S., BLASDELL K.R., BRIESE T., BROWN P.A., BUKREYEV A., BALKEMA-BUSCHMANN A., BUCHHOLZ U.J., CHABI-JESUS C., CHANDRAN K., CHIAPPONI C., CROZIER I., DE SWART R.L., DIETZGEN R.G., DOLNIK O., DREXLER J.F., DÜRRWALD R., DUNDON W.G., DUPREX W.P., DYE J.M., EASTON A.J., FOOKS A.R., FORMENTY P.B.H., FOUCHIER R.A.M., FREITAS-ASTÚA J., GRIFFITHS A., HEWSON R., HORIE M., HYNDMAN T.H., JIANG D., KITAJIMA E.W., KOBINGER G.P., KONDŌ H., KURATH G., KUZMIN I.V., LAMB R.A., LAVAZZA A., LEE B., LELLI D., LEROY E.M., LÍ J., MAES P., MARZANO S.L., MORENO A., MÜHLBERGER E., NETESOV S.V., NOWOTNY N., NYLUND A., ØKLAND A.L., PALACIOS G., PÁLYI B., PAWEŚKA J.T., PAYNE S.L., PROSPERI A., RAMOS-GONZÁLEZ P.L., RIMA B.K., ROTA P., RUBBENSTROTH D., SHÍ M., SIMMONDS P., SMITHER S.J., SOZZI E., SPANN K., STENGLEIN M.D., STONE D.M., TAKADA A., TESH R.B., TOMONAGA K., TORDO N., TOWNER J.S., VAN DEN HOOGEN B., VASILAKIS N., WAHL V., WALKER P.J., WANG L.F., WHITFIELD A.E., WILLIAMS J.V., ZERBINI F.M., ZHANG T., ZHANG Y.Z. & KUHN J.H. (2019). Taxonomy of the order Mononegavirales: update 2019. *Arch. Virol.*, **164**, 1967–1980. doi: 10.1007/s00705-019-04247-4.
- 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.
- 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 I.H., CARGILL P., WOODLAND R. & VAN DEN BERG T. (2020) Newcastle disease virus. *In: Veterinary Vaccines for Livestock*, 1st Edition, Metwally S., ElIdrissi & Viljoen G., eds. FAO publishing.
- 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**, 585–587.
- BUTT S.L., TAYLOR T.L., VOLKENING J.D., DIMITROV K.M., WILLIAMS-COPLIN D., LAHMERS K.K., MILLER P.J., RANA A.M., SUAREZ D.L., AFONSO C.L. & STANTON J.B. (2018). Rapid virulence prediction and identification of Newcastle disease virus genotypes using third-generation sequencing. *Virol. J.*, **15**, 179, <https://doi.org/10.1186/s12985-018-1077-5>
- 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) (2009–2019). Title 9, Parts 1–199. US Government Printing Office, Washington DC, USA.
- 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.
- DIEL D.G., DA SILVA L.H., LIU H., WANG Z., MILLER P.J. & AFONSO C.L. (2012). Genetic diversity of avian paramyxovirus type 1: proposal for unified nomenclature and classification system of Newcastle disease virus genotypes. *Infect. Genet. Evol.*, **12**, 1770–1779. doi: 10.1016/j.meegid.2012.07.012.

- DIMITROV K.M., ABOLNIK C., AFONSO C.L., ALBINA E., BAHL J., BERG M., BRIAND F.X., BROWN I.H., CHOI K.S., CHVALA I., DURR P.A., FERREIRA H.L., FUSARO A., GIL P., GOUGOULOVA G.V., GRUND C., HICKS J.T., JOANNIS T.M., TORCHETTI M.K., KOLOSOV S., LAMBRECHT B., LEWIS N., LIU HA., HUALEI LIU HU., MCCULLOUGH S., MILLER P.J., MONNE I., MULLER C.P., MUNIR M., PCHELKINA I., REISCHAK D., SABRA M., SAMAL S., SERVAN DE ALMEIDA R., SHITTU I., SNOECK C.J., SUAREZ D.L., VAN BORM S., WANG Z. & WONG F. (2019). Updated unified phylogenetic classification system and revised nomenclature for Newcastle disease virus. *Infect. Genet. Evol.*, **74**, 103917. doi: 10.1016/j.meegid.2019.103917. [Epub ahead of print]
- 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., ROTTIER P.J., KOCH G. & PEETERS B.P. (2011). Passaging of a Newcastle disease virus pigeon variant in chickens results in selection of viruses with mutations in the polymerase complex enhancing virus replication and virulence. *J Gen Virol.*, **92**, 336–345. doi: 10.1099/vir.0.026344-0.
- DORTMANS J.C., VENEMA-KEMPER S, PEETERS B.P. & KOCH G. (2014). Field vaccinated chickens with low antibody titres show equally insufficient protection against matching and non-matching genotypes of virulent Newcastle disease virus. *Vet Microbiol.*, **172**, 100–107. doi: 10.1016/j.vetmic.2014.05.004.
- 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).
- 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.
- FULLER C.M., COLLINS M.S. & ALEXANDER D.J. (2009) Development of a real-time reverse-transcription PCR for the detection and simultaneous pathotyping of Newcastle disease virus isolates using a novel probe. *Arch. Virol.*, **154**, 929–937.
- 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 turkey vaccine expressing Newcastle disease virus fusion and hemagglutinin-neuraminidase antigens. *Avian Dis.*, **40**, 770–777.
- HEIDEN S., GRUND C., HÖPER D., METTENLEITER T.C. & RÖMER-OBERDÖRFER A. (2014). Pigeon paramyxovirus type 1 variants with polybasic F protein cleavage site but strikingly different pathogenicity. *Virus Genes.*; **49**, 502–506. doi: 10.1007/s11262-014-1111-7. Epub 2014 Sep 17.
- HINES N.L. & MILLER C.L. (2012). Avian paramyxovirus serotype-1: a review of disease distribution, clinical symptoms and laboratory diagnostics. *Vet. Med. Int.*, **2012**, 708216. doi: 10.1155/2012/708216.
- 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.
- INTERNATIONAL COMMITTEE ON TAXONOMY OF VIRUSES (ICTV) (2019). Orthomyxoviridae. Virus Taxonomy: 2019 Release. https://talk.ictvonline.org/ictv-reports/ictv_9th_report/negative-sense-rna-viruses-2011/w/negrna_viruses/209/orthomyxoviridae. Accessed 9 June 2020.
- 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.
- LAAMIRI N., FÄLLGREN P., ZOHARI S., BEN ALI J., GHAM A., LEIJON M. & HMILA I. (2016). Accurate Detection of Avian Respiratory Viruses by Use of Multiplex PCR-Based Luminex Suspension Microarray Assay. *J. Clin. Microbiol.*, **54**, 2716–2725.
- 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 hemagglutinin-neuraminidase 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.
- 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.
- MAYERS J., MANSFIELD K.L. & BROWN I.H. (2017). The role of vaccination in risk mitigation and control of Newcastle disease in poultry. *Vaccine*, **35**, 5974–5980. doi.org/10.1016/j.vaccine.2017.09.008
- 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., 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.
- MORESCO K.A., STALLKNECHT D.E. & SWAYNE D.E. (2012). Evaluation of different embryonating bird eggs and cell cultures for isolation efficiency of avian influenza A virus and avian paramyxovirus serotype 1 from real-time reverse transcription polymerase chain reaction-positive wild bird surveillance samples. *J. Vet. Diagn. Invest.*, **24**, 563–567. doi: 10.1177/1040638712440991.
- 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.
- NGUYEN T.T., KWON H.J., KIM I.H., HONG S.M., SEONG W.J., JANG J.W. & KIM J.H. (2013). Multiplex nested RT-PCR for detecting avian influenza virus, infectious bronchitis virus and Newcastle disease virus. *J. Virol. Methods*, **188**, 41–46.
- 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. *Viol. J.*, **7**, 67.
- PALYA V., KISS I., TATÁR-KIS, T., MATÓ, T., FELFÖLDI B. & GARDIN, Y. (2012). Advancement in vaccination against Newcastle disease: recombinant HVTNDV provides high clinical protection and reduce virus shedding with the absences of vaccine reactions. *Avian Dis.*, **56**, 282–287.
- PALYA V., KISS I., TATÁR-KIS, T., MATÓ, T., FELFÖLDI B, KOVÁCS E. & GARDIN Y. (2014). Onset and long-term duration of immunity provided by a single vaccination with a turkey herpesvirus vector vaccine in commercial layers. *Vet. Immunol. Immunopathol.*, **158**, 105–115.
- 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. & Purvis L.B. (2006). USE OF FTA® FILTER PAPER FOR THE MOLECULAR DETECTION OF NEWCASTLE DISEASE VIRUS. *Avian Pathol.*, **35**, 93–98. 10.1080/03079450600597410

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.

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**, 472–479.

SPACKMAN E., PEDERSEN J.C., MCKINLEY E.T. & GELB J. (2013). Optimal specimen collection and transport methods for the detection of avian influenza virus and Newcastle disease virus. *BMC Vet. Res.*, **9**, 35.

STEYER F.A., ROJS O.Z., KRAPEŽ U., SLAVEC B. & BARLIČ-MAGANJA D. (2010). A diagnostic method based on MGB probes for rapid detection and simultaneous differentiation between virulent and vaccine strains of avian paramyxovirus type 1. *J. Virol. Methods*, **166**, 28–36.

SUTTON D., ALLEN D., FULLER C., MAYERS J., MOLLETT B., LONDT B., REID S., MANSFIELD K. & BROWN I. (2019). Development of an avian avulavirus type 1 (APMVV-1) L-gene real-time RT-PCR assay using minor groove binding probes for application as a routine diagnostic tool. *J. Virol. Methods*, **265**, 9–14.

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.

XIE Z., LUO S., XIE L., LIU J., PANG Y., DENG X., XIE Z., FAN Q. & KHAN M.I. (2014). Simultaneous typing of nine avian respiratory pathogens using a novel GeXP analyzer-based multiplex PCR assay. *J. Virol. Methods*, **207**, 188–195.*

* *

NB: Existen Laboratorios de Referencia de la OIE para la enfermedad de Newcastle (puede consultarse la página web de la OIE: <https://www.oie.int/es/que-ofrecemos/red-de-expertos/laboratorios-de-referencia/#ui-id-3>) 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 2021.