

INFLUENZA AVIAR (INCLUIDA LA INFECCIÓN POR LOS VIRUS DE LA INFLUENZA AVIAR ALTAMENTE PATÓGENOS)

RESUMEN

La influenza A está causada por virus específicos que son miembros de la familia Orthomyxoviridae y que pertenecen al género Alphainfluenzavirus (Influenzavirus A o virus de la influenza A). Hay siete géneros de influenza, pero por lo que se sabe, solo los virus de la influenza A infectan a las aves. El diagnóstico se realiza mediante el aislamiento del virus o mediante la detección y caracterización de fragmentos de su genoma. Esto se debe a que las infecciones aviarias pueden dar lugar a una amplia variedad de signos clínicos que pueden variar según el hospedador, la cepa vírica, el estado inmunitario del hospedador, la presencia de posibles microorganismos secundarios agravantes y las condiciones ambientales.

Detección del agente: Las suspensiones en solución antibiótica de hisopos (o heces) orofaríngeas y cloacales extraídas de aves vivas, o de heces y muestras combinadas de órganos de aves muertas, se inoculan en la cavidad alantoidea de huevos de gallina embrionados de 9 a 11 días de edad. Los huevos se incuban a 37 °C (rango de 35 a 39°C) durante 2 a 7 días. El líquido alantoideo de cualquier huevo que contenga embriones muertos o moribundos durante la incubación y todos los huevos del final del período de incubación se analizan para detectar la posible presencia de actividad hemaglutinante. La presencia del virus de la influenza A se puede confirmar mediante una prueba de inmunodifusión entre el virus concentrado y un antisuero contra la nucleoproteína y/o antígenos de la matriz, los cuales son comunes a todos los virus de la influenza A, o mediante la reacción en cadena de la polimerasa con transcripción inversa en tiempo real (RT-PCR en tiempo real) en los fluidos alantoideos. El aislamiento en embriones se ha reemplazado en gran medida por el diagnóstico inicial por detección directa en muestras de uno o más segmentos del genoma de la influenza A utilizando RT-PCR en tiempo real u otras técnicas moleculares validadas.

Para la subtipificación serológica del virus, un laboratorio de referencia debe realizar pruebas de inhibición de la hemaglutinación o la neuraminidasa frente a una batería de antisueros policlonales o monoespecíficos contra cada uno de los 16 subtipos de hemaglutinina (H1-16) y los 9 de subtipos de neuraminidasa (N1-9) del virus de la influenza A. Como alternativa, se identifica el genoma de los subtipos H y N específicos utilizando tecnologías de detección del ARN con cebadores y sondas específicos de subtipo (por ejemplo, RT-PCR en tiempo real) o secuenciación y análisis filogenético.

Dado que el término general "influenza aviar altamente patógena" y el término histórico "plaga aviar" se refieren a la infección por cepas de alta patogenicidad del virus de la influenza A, es necesario evaluar la patogenicidad de las cepas del virus de la influenza A en las aves de corral domésticas. Todas las cepas de virus de la influenza aviar de alta patogenicidad (IAAP) de origen natural aisladas hasta la fecha han sido del subtipo H5 o H7, y un subconjunto de estas cepas ha sido H5 o H7 de baja patogenicidad. Los métodos utilizados para la determinación de la virulencia de las cepas en las aves han evolucionado en los últimos años, debido a un mayor conocimiento de las bases moleculares de la patogenicidad. Independientemente de su patogenicidad en los pollos, los virus H5 o H7 que tienen una secuencia de aminoácidos del sitio de escisión HA0 similar a cualquiera de las que se han observado en los virus de alta patogenicidad se consideran virus de la influenza A de alta patogenicidad. Se considera que las cepas H5 y H7 que no son altamente patógenas en los pollos y que no tienen una secuencia de aminoácidos en el sitio de escisión HA0

similar a cualquiera de las que se han observado en virus altamente patógenos tienen baja patogenicidad. Sin embargo, en algunas circunstancias es necesario verificar el grado de patogenicidad (alta o baja) de los virus aislados mediante la inoculación intravenosa de un mínimo de ocho pollos susceptibles de 4 a 8 semanas de edad con virus infeccioso; así, se considera que las cepas son de alta patogenicidad si causan más del 75% de mortalidad en 10 días, o si la inoculación de 10 pollos susceptibles de 4 a 8 semanas de edad da lugar a un índice de patogenicidad intravenosa (IVPI) superior a 1,2. La caracterización de las cepas víricas sospechosas de ser altamente patógenas debe realizarse en un laboratorio de biocontención protegido contra virus. En las aves de corral, la presencia de virus de la influenza aviar de baja patogenicidad (IABP) puede ir acompañada de un aumento repentino e inesperado de la virulencia (enfermedad emergente) o tener una transmisión natural comprobada a los humanos asociada a consecuencias graves. En estos escenarios de enfermedad, las autoridades nacionales deben realizar un seguimiento formal de las poblaciones de aves de corral pertinentes. Se debe monitorizar la presencia de virus de la influenza aviar de baja patogenicidad H5 y H7, ya que algunos tienen el potencial de mutar a virus de la influenza aviar de alta patogenicidad.

Pruebas serológicas: como todos los virus de la influenza A tienen antígenos nucleoproteínicos y matriciales antigénicamente similares, estas son las dianas preferidas de los métodos serológicos destinados a detectar virus del grupo de la influenza A. Los enzoinmunoanálisis (ELISA) se utilizan mucho para detectar anticuerpos contra estos antígenos en formatos analíticos específicos de la especie del hospedador (indirectos) o independientes de la misma (de competición). Las pruebas de inhibición de la hemaglutinación también se han empleado en la serología de diagnóstico de rutina, pero es posible que esta técnica pueda pasar por alto algunas infecciones particulares porque la hemaglutinina es específica del subtipo.

Requisitos para las vacunas: El primer uso de la vacuna en un programa de erradicación de la influenza aviar fue contra la IABP. Los programas utilizaban vacunas en emulsión oleosa inactivadas con los mismos subtipos de hemaglutinina y neuraminidasa que el virus natural circulante, y las bandadas infectadas se identificaban mediante la detección de virus o de anticuerpos contra el virus en aves centinela no vacunadas. En México y Pakistán, durante la década de 1990, se empleó el uso profiláctico de vacunas en emulsión oleosa inactivadas para controlar los brotes generalizados de IAAP y IABP H5/H7. Durante el brote de IABP H7 de 1999-2001 de Italia, se utilizó una vacuna inactivada con el mismo subtipo de hemaglutinina que la del virus natural (es decir, homóloga respecto al mismo), pero con una neuraminidasa diferente (es decir, heteróloga respecto al mismo). Esto permitió la diferenciación serológica de aves vacunadas no infectadas de aves vacunadas infectadas por el virus natural y finalmente dio lugar a la erradicación del virus natural. El uso profiláctico de las vacunas H5 y H7 se ha practicado en ciertas partes de Italia con el objetivo de prevenir las infecciones por IABP H5/H7, y en varios países de Asia, África y Oriente Medio como ayuda para controlar virus de la IAAP, en China (Rep. Pop. de) para el H7N9, y en México para el IAAP H7N3. Los virus de la influenza aviar de alta patogenicidad no deben utilizarse como virus inóculo para la producción de vacuna.

Cuando en estudios de desafío se utilizan virus IABP y IAAP, se debe utilizar un nivel de contención adecuado según lo determine la evaluación de riesgos.

A. INTRODUCCIÓN

La influenza aviar está causada por la infección por un virus de la familia Orthomyxoviridae, incluido en el género Alphainfluenzavirus (influenzavirus A o influenza A virus) (*International Committee on Taxonomy of Viruses* (ICTV), 2019). Los virus de la influenza A son los únicos ortomixovirus que se sabe que afectan de forma natural a las aves (Swayne y Sims, 2020). Se ha demostrado que muchas especies aviares son susceptibles a la infección por virus de la influenza A; las aves acuáticas forman un reservorio importante de estos virus, y la inmensa mayoría de las cepas aisladas han sido de baja patogenicidad (baja virulencia) en pollos y pavos. Los virus de la influenza A tienen nucleoproteínas y proteínas de matriz relacionadas antigénicamente, pero se clasifican en subtipos en función de sus antígenos de hemaglutinina (H) y neuraminidasa (N) (Comité de Expertos de la Organización Mundial de la Salud, 1980). En la actualidad, los subtipos 16H (H1-H16) y los subtipos 9N (N1-N9) se reconocen con nuevos subtipos propuestos (H17, H18) para los virus de influenza A recuperados de murciélagos de Guatemala (ICTV 2019; Swayne *et al.*, 2020; Tong *et al.*, 2013). Hasta la fecha, los virus de influenza A de alta patogenicidad de origen natural que producen una enfermedad clínica aguda en pollos, pavos y otras aves de importancia económica se han asociado solo a los subtipos H5 y H7. Los subtipos

H5 y H7 de baja patogenicidad se presentan mucho en aves de corral y aves silvestres acuáticas, aunque la propagación intercontinental de la influenza aviar altamente patógena ha recibido mayor atención en los últimos años. Existe el riesgo de que un virus H5 o H7 de baja patogenicidad (influenza aviar de baja patogenicidad H5/H7 [IABP]) se vuelva altamente patógeno por mutación. Algunas cepas del virus de la influenza aviar han causado infecciones zoonóticas esporádicas principalmente de los subtipos H5, H7 y H9 y estos tres subtipos se han destacado como posibles riesgos pandémicos en caso de que se produzcan mutaciones adicionales que favorezcan la transmisión sostenida de persona a persona (Cox *et al.*, 2017).

A lo largo de este capítulo del *Manual Terrestre*, se utilizarán los siguientes términos: 1) IAAP, para indicar una infección por un virus de la influenza aviar que cumple con la definición de alta patogenicidad, 2) IABP, para indicar una infección por cualquier virus de la influenza aviar H1-H16 que sea no de alta patogenicidad, y 3) influenza A, para indicar una infección por cualquier virus IAAP o IABP.

Dependiendo de la especie, la edad y el tipo de ave, las características específicas de la cepa vírica involucrada y los factores ambientales, la enfermedad altamente patógena, en aves totalmente susceptibles, puede variar desde una muerte súbita sin signos clínicos evidentes, hasta una enfermedad más patógena con presentaciones clínicas variables que incluyen signos respiratorios, tales como secreciones oculares y nasales, tos, bufidos y disnea, hinchazón de los senos nasales y/o de la cabeza, apatía, reducción de la vocalización, reducción marcada de la ingesta de alimento y agua, cianosis de la piel desprovista de plumas y de las barbas y la cresta, falta de coordinación y signos nerviosos, y diarrea (Swayne *et al.*, 2020). En las aves ponedoras, otras características clínicas incluyen una marcada caída de la puesta de huevos, generalmente acompañada de un aumento en el número de huevos de mala calidad. Por lo general, la alta morbilidad va acompañada de una mortalidad inexplicablemente alta y en rápido aumento. Sin embargo, ninguno de estos signos puede considerarse patognomónico. En determinadas especies hospedadoras, como los patos Pekin (*Anas platyrhynchos domesticus*), algunos virus de la influenza aviar altamente patógena no necesariamente producen una enfermedad clínica significativa. Además, los virus IABP que normalmente causan solo una enfermedad clínica leve o nula, pueden, en ciertas circunstancias, producir un espectro de signos clínicos, cuya severidad puede acercarse a la de la IAAP, particularmente si de forma concomitante el animal sufre infecciones y/o existen condiciones ambientales adversas que las exacerban. El diagnóstico confirmatorio de la enfermedad, por lo tanto, se basa en el aislamiento o detección del virus causal y en la demostración de que cumple uno de los criterios descritos en el apartado B.1.1.1. El análisis de sueros de aves sospechosas utilizando métodos de detección de anticuerpos puede complementar el diagnóstico, pero estos métodos no son adecuados para una identificación definitiva. El diagnóstico con fines de control oficial se establece se basa en criterios de patogenicidad oficiales acordados de acuerdo con pruebas *in vivo* o determinantes moleculares (es decir, la presencia de un sitio de escisión de la proteína precursora de la hemaglutinina HA0 compatible con virus de la influenza aviar altamente patógena) y el subtipo de hemaglutinina. Estas definiciones evolucionan a medida que aumenta el conocimiento científico de la enfermedad.

La IAAP debe estar sujeta a control oficial por parte de las autoridades nacionales. Por su parte, la IABP, en particular los subtipos H5 y H7, puede estar sujeta a control nacional o regional/provincial. Los virus que causan la influenza A tienen el potencial de propagarse desde el laboratorio si no existen niveles suficientes de bioseguridad y bioprotección. Los virus de la influenza aviar deben manipularse aplicando las medidas apropiadas, como se describe en el Capítulo 1.1.4 *Bioseguridad y bioprotección: Norma para la gestión del riesgo biológico en el laboratorio veterinario y en las instalaciones para animales*. Las medidas de biocontención deben determinarse mediante un análisis del riesgo, como se describe en el Capítulo 1.1.4. Las medidas requeridas pueden variar según los subtipos y patotipos de los virus de la influenza A, de tal forma que se indica un nivel de contención más alto para algunos virus IABP y IAAP, que pueden requerir mejoras adicionales en los procedimientos, el equipo y las instalaciones en ciertas circunstancias, como altas concentraciones del virus, alojamiento de animales infectados o la ejecución de procedimientos con actividades que generen aerosoles. Los países que no tengan acceso a un laboratorio nacional o regional especializado de este tipo deben enviar las muestras a un Laboratorio de Referencia de la OMSA.

B. TÉCNICAS DE DIAGNÓSTICO

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

Método	Propósito					
	Demostrar ausencia de infección en la población	Demostrar ausencia de infección en animales individuales antes de los desplazamientos	Contribuir a las políticas de erradicación	Confirmar casos clínicos	Determinar la prevalencia de la infección – vigilancia	Determinar el estado inmunitario en animales o poblaciones tras la vacunación
Detección del agente^(a)						
Aislamiento del virus	+	+++	+	+++	+	–
Detección de antígeno	+	+	+	+	+	–
RT-PCR en tiempo real	++	+++	++	+++	++	–
Detección de respuesta inmunitaria						
AGID	+ (Influenza A)	+ (Influenza A)	++ (Influenza A)	+ (convaleciente)	++ (Influenza A)	++ (Influenza A)
HI	+++ (H5 o H7)	++ (H5 o H7)	+++ (H5 o H7)	++ (convaleciente) e	+++ (H5 o H7)	+++ (H5 o H7)
ELISA	+	+	++	+ (convaleciente)	++	++

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; AGID = inmunodifusión en gel de agar;

HI = prueba de inhibición de la hemaglutinina; ELISA = enzimoimmunoanálisis.

^(a)Se recomienda aplicar una combinación de métodos de identificación a una misma muestra clínica.

1. Detección del agente

La identificación de los virus de la influenza A como causa de infecciones y enfermedades en las aves de corral y otras aves requiere un proceso de diagnóstico exhaustivo para diferenciarlos de enfermedades similares causadas por otros agentes víricos, especialmente el paramixovirus aviar tipo 1 (APMV-1). Cada cepa de virus de la influenza A y del APMV-1 varía mucho en 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 de la influenza aviar altamente patógena o por virus de la enfermedad de Newcastle. Por lo tanto, es prudente aplicar un solo procedimiento de muestreo y realizar simultáneamente pruebas de diagnóstico de diferenciación específicas para los virus de la influenza A y del APMV-1 en muestras de campo con el fin de obtener un diagnóstico etiológico preciso de un solo agente o, en ocasiones, la confirmación de una infección dual.

1.1. Muestras para el aislamiento del virus

El aislamiento del virus es el método de referencia, pero es laborioso y requiere mucho tiempo, y se utiliza principalmente para el diagnóstico de un primer caso clínico en un brote y para obtener cepas del virus para analizarlas con mayor detalle en el laboratorio.

En las investigaciones de enfermedades graves y de alta mortalidad en bandadas de aves de corral, es habitual intentar aislar el virus de aves recientemente muertas o de aves moribundas que hayan sido sacrificadas de forma humanitaria. Las muestras tomadas de aves muertas deben incluir

contenido intestinal (heces) o hisopos cloacales e hisopos orofaríngeos o traqueales. También deben obtenerse muestras de tráquea, pulmones, sacos aéreos, intestino, bazo, amígdalas cecales, riñón, encéfalo, hígado y corazón, y procesarse por separado o combinadas. Al combinar 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 IAAP o de virus de la enfermedad de Newcastle (NDV). Deberán realizarse otras combinaciones de muestras en función de los tropismos que se sabe que tienen los virus de la IAAP y la IABP, es decir, agrupaciones de muestras según la procedencia sea respiratoria, sistémica o gastrointestinal.

Las muestras de aves vivas deben incluir hisopos orofaríngeos o traqueales y cloacales, y estos últimos deben estar cubiertos visiblemente con materia fecal. Para evitar dañar a las aves pequeñas y delicadas, en estos casos los hisopos deben ser especialmente pequeños; así, por ejemplo, los destinados a pediatría humana pueden servir como una alternativa adecuada para la obtención de heces frescas (debe tenerse en cuenta que algunos casos de enfermedad aviar por virus de influenza A y paramixovirus aviares tipo 1 pueden tener un fuerte tropismo respiratorio). Se pueden juntar muestras de hisopos similares del mismo sitio anatómico (es decir, hisopos cloacales con hisopos cloacales, hisopos orofaríngeos con hisopos orofaríngeos), aunque lo más habitual es combinar 5 u, ocasionalmente, más si están adecuadamente validados para no reducir la sensibilidad de la detección, aunque deberán utilizarse hisopos específicos (Spackman *et al.*, 2013). Además, el tipo de hisopos utilizados puede afectar la sensibilidad o la validez de la prueba, prefiriéndose hisopos con mango de alambre delgado o de plástico.

Las muestras deben ponerse en solución salina tamponada con fosfato (PBS) isotónica, a 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), estreptomina (2 unidades/ml), gentamicina (50 µg/ml) y micostatina (1000 unidades/ml) en el caso de hisopos de tejidos y orofaríngeos o traqueales, pero a concentraciones cinco veces más altas en el caso de hisopos de heces y cloacales. Es importante reajustar el pH de la solución a un pH de 7,0–7,4 tras la adición de los antibióticos. Se recomienda que la solución para el transporte de los hisopos contenga proteínas para estabilizar el virus (por ejemplo, infusión cerebro-corazón, hasta un 5% [v/v] de suero bovino, un 0,5% [p/v] de albúmina bovina o medios comerciales similares para el transporte). Si se desea el control de *Chlamydophila*, se deben incluir 0,05–0,1 mg/ml de oxitetraciclina. Las heces y los tejidos finamente picados deben prepararse como suspensiones al 10–20% (p/v) en la solución antibiótica. Las suspensiones deben procesarse lo antes posible después de la incubación durante 1 a 2 horas a temperatura ambiente. Cuando el procesamiento inmediato no sea viable, las muestras se pueden conservar a 4°C hasta un máximo de 4 días. Para una conservación prolongada, las muestras de diagnóstico y las cepas deben mantenerse a –80°C, pero para el transporte en hielo seco ($\leq -50^{\circ}\text{C}$) se utiliza mucho. Debe evitarse la congelación y descongelación repetidas.

1.2. Aislamiento del virus

El método preferido de cultivo de virus de la influenza A es la inoculación de huevos de gallina embrionados libres de patógenos específicos (SPF) o huevos negativos respecto a anticuerpos específicos (SAN). Los líquidos sobrenadantes se obtienen a partir de suspensiones de heces, hisopos o tejidos obtenidos mediante clarificación por centrifugación a 1000 **g** durante unos 10 minutos a una temperatura no superior a 25°C. Las preparaciones clarificadas se pueden inocular utilizando varias vías, incluido el saco amniótico o el saco o la membrana corioalantoideas (uno de los cuales se recomienda para el aislamiento primario) y, en todos los casos, los sacos alantoideos de tres a cinco huevos de gallina embrionados SPF o SAN que lleven 9 a 11 días de incubación. Los huevos se incuban a 37°C (rango de 35 a 39°C) durante 2 a 7 días. Los huevos que contienen embriones muertos o moribundos a medida que surgen, y todos los huevos que quedan al final del período de incubación, deben enfriarse primero hasta 4°C a lo largo de 4 horas o durante la noche. Después de comprobar que los embriones han muerto, los líquidos amnioalantoideos deben recuperarse y analizarse con una prueba de cribado (como la prueba de hemaglutinación [HA]), una prueba específica del tipo de influenza A (como la prueba de inmunodifusión en gel de agar [AGID] o un ensayo inmunoanálisis [ELISA] de captura de antígeno de fase sólida), pruebas específicas del subtipo de influenza A (como pruebas de inhibición de la hemaglutinación [HI] o de inhibición de la neuraminidasa [N] [NI]) o una prueba molecular para detectar ácido nucleico específico del virus de la influenza A nucleico (como la reacción en cadena de la polimerasa con transcripción inversa [RT-PCR] en tiempo real) como se describe más adelante (véase el apartado B.1.2.2). La detección de actividad HA (hemaglutinante) en líquidos amnioalantoideos libres de bacterias verificada por ensayo microbiológico indica una alta probabilidad de presencia de un virus de la influenza A o de un ortoavulavirus aviar (anteriormente denominado paramixovirus aviar). Los líquidos que dan una reacción negativa deben pasarse por al menos un lote más de huevos y someterse hasta a tres pases.

Se deben realizar controles de rutina para detectar contaminación bacteriana sembrando las muestras en placas de agar con Caldo Luria y leyéndolas a las 24 y 48 horas de incubación contra una fuente de luz. También se pueden usar placas de agar BHI y agar sangre. En los casos en los que se dispone de un mayor número de muestras, el cultivo inicial podría realizarse en caldo de fosfato de triptosa. Las muestras contaminadas pueden tratarse mediante incubación con concentraciones altas de antibiótico durante 2 a 4 horas (soluciones de gentamicina, penicilina G y anfotericina B en concentraciones finales de hasta un máximo de 1 mg/ml, 10.000 U/ml y 20 µg/ml, respectivamente). Las muestras muy contaminadas por bacterias que no pueden eliminarse mediante centrifugación o controlarse con antibióticos se pueden filtrar a través de filtros estériles de 0,45 y 0,2 micras. La filtración debe usarse solo cuando otros métodos fallan porque la agregación puede reducir significativamente el título vírico.

1.3. Identificación del virus

Puede confirmarse la presencia del virus de la influenza tipo A mediante pruebas de AGID, comprobando la presencia de los antígenos de la nucleocápsida o la matriz, ambos comunes a todos los virus de la influenza tipo A (véase el apartado B.3.1). Los antígenos pueden prepararse concentrando el virus a partir del líquido alantoideo infectivo o extrayendo las membranas corioalantoideas infectadas; los antígenos se comprueban frente a antisueros que se sabe que son positivos. Los virus pueden concentrarse a partir del líquido alantoideo infectivo mediante ultracentrifugación, o mediante precipitación en ambiente ácido. Este último método consiste en la adición de HCl 1,0 M al líquido alantoideo infectivo hasta que alcance aproximadamente un pH de 4,0. La mezcla se coloca en un baño con hielo durante 1 hora y a continuación se clarifica mediante centrifugación a 1.000 **g** a 4°C. Se desecha el líquido sobrenadante. Los concentrados víricos se resuspenden en tampón glicina/sarcosil: este consiste en un 1% (p/v) de lauril sarcosinato sódico tamponado hasta pH 9,0 con glicina 0,5 M. Estos concentrados contienen polipéptidos de la nucleocápsida y de la matriz.

También pueden obtenerse preparaciones del antígeno enriquecidas en nucleocápsida a partir de las membranas corioalantoideas para su uso en la prueba de la AGID (Beard, 1970). Este método implica retirar las membranas corioalantoideas de los huevos infectados que presentan líquidos alantoideos con actividad de HA. A continuación, se homogeneizan las membranas o se trituran hasta obtener una pasta. Esta se somete a tres ciclos de congelación–descongelación, seguidos de una centrifugación a 1.000 **g** durante 10 minutos. Se desecha el precipitado y se emplea el sobrenadante como antígeno después de un tratamiento con formalina al 0,1% o betapropiolactona al 1%.

La utilización de la prueba de la AGID para poner de manifiesto antígenos de nucleocápsida o matriz es una forma satisfactoria de indicar la presencia de virus de la influenza A en líquido amnioalantoideo, pero carece de la sensibilidad de otros métodos, incluidos algunos moleculares (véase el apartado 1.2.2); sin embargo, existen distintos ELISA de captura de antígeno en fase sólida (AC-ELISA) rápidos, tanto experimentales como comerciales, que constituyen una eficaz alternativa (Swayne *et al.*, 2013). La mayoría de AC-ELISA se han aprobado y comercializado para detectar el virus de la influenza tipo A humano en muestras clínicas. Algunos han demostrado eficacia en la detección de influenza A, pero muchas de estas pruebas comerciales son poco sensibles (Slomka *et al.*, 2012). Los preferidos son los que están validados para uso veterinario.

Cuando se observa actividad HA en líquidos estériles tomados de huevos inoculados, lo más probable es que esté causada por un virus de la influenza tipo A o un paramixovirus aviar, pero algunas cepas de reovirus aviar, así como el líquido no estéril que contiene HA de origen bacteriano pueden causar la aglutinación de eritrocitos. Actualmente existen 21 serotipos reconocidos de paramixovirus aviáres (ICTV, 2019). La mayoría de los laboratorios dispondrán de antisuero específico contra el virus de la enfermedad de Newcastle (paramixovirus aviar tipo 1, APMV1), y en vista de la generalizada aparición de casos y de un uso casi universal como vacuna viva en las aves de corral, es mejor determinar su presencia mediante pruebas de inhibición de la hemaglutinación (HI) (véase el capítulo 3.3.14. *Enfermedad de Newcastle*).

Como alternativa, la presencia del virus de la influenza puede confirmarse mediante el empleo de RT-PCR o RT-PCR en tiempo real empleando cebadores conservados específicos de la nucleoproteína o específicos de la matriz (Nagy *et al.*, 2020; Spackman *et al.*, 2002). La presencia de los subtipos H5 o H7 del virus de la influenza también puede confirmarse utilizando cebadores específicos de los subtipos H5 o H7 (Slomka *et al.*, 2007; Spackman *et al.*, 2002).

La subtipificación antigénica se puede llevar a cabo mediante antisueros monoespecíficos preparados contra proteínas específicas del subtipo H y N purificadas o recombinantes, que pueden utilizarse en pruebas de HI y de NI, o bien antisueros policlonales generados contra una batería de virus influenza intactos y utilizados en pruebas de HI y de NI.

A los laboratorios que realizan la prueba HI para el subtipo H, se les recomienda encarecidamente que utilicen dos sueros para cada subtipo H pero con un N heterólogo, y lo ideal es que utilicen antisueros para virus contemporáneos relevantes para la región en la que se detecta el virus. La subtipificación también se puede lograr utilizando cebadores específicos de subtipo H y N en la RT-PCR y en la RT-PCR en tiempo real; o usando análisis de la secuencia de los genes H y N. La identificación de subtipos mediante estas técnicas es cada vez más común, pero queda fuera del alcance de muchos laboratorios de diagnóstico que no se especializan en los virus de la influenza. Ofrecen ayuda los Laboratorios de Referencia y Centros Colaboradores de la OMSA (consulte el sitio web de la OMSA para obtener una lista actualizada de los mismos).

1.4. Evaluación de la patogenicidad

La expresión IAAP guarda relación con la evaluación de la patogenicidad en los pollos e implica la intervención de cepas del virus altamente patógenas. Se utiliza para describir una enfermedad de las aves plenamente susceptibles con signos clínicos que pueden consistir en uno o más de los siguientes: secreciones oculares y nasales, tos, sonidos respiratorios y disnea, hinchazón de los senos y/o de la cabeza, languidez, disminución de la vocalización, una disminución considerable de la ingesta de alimento y agua, cianosis de la piel desprovista de plumas, de las barbas y de la cresta, falta de coordinación de movimientos, signos nerviosos y diarrea. En las aves ponedoras, otros signos clínicos son un acusado descenso de la producción de huevos que suele cursar con un aumento de los de mala calidad. Lo normal es que la alta morbilidad curse con una alta mortalidad inexplicable y que se intensifica rápidamente. Sin embargo, ninguno de estos signos puede considerarse patognomónico y puede producirse una alta mortalidad sin que dichos signos estén presentes. Además, los virus de la influenza A levemente patógenos, que normalmente no causan enfermedad o causan una enfermedad leve, pueden causar una enfermedad mucho más grave si se hallan presentes infecciones exacerbantes o factores ambientales adversos y, en algunas circunstancias, la gama de signos clínicos puede ser idéntica a la de la IAAP.

La expresión utilizada clásicamente “peste aviar” se ha abandonado para dar paso a la expresión más exacta de IAAP. Dado que todos los virus naturales de la IAAP conocidos hasta hoy han sido de los subtipos H5 y H7, y que estudios genómicos han determinado que los virus de la IAAP derivan de una mutación de los virus de la IABP H5/H7, todos los virus de la IABP H5/H7 se han reconocido como potencialmente patógenos, aunque predecir qué cepas de IABP mutarán a IAAP no es posible. Los cambios de patogenicidad se han asociado a cambios en el punto de corte proteolítico de la hemaglutinina, como los siguientes: 1) sustituciones de aminoácidos no básicos por aminoácidos básicos (arginina o lisina); 2) inserciones de múltiples aminoácidos básicos de codones duplicados del punto de escisión de la hemaglutinina; 3) insertos cortos de aminoácidos básicos y no básicos de origen desconocido; 4) recombinación con insertos de otros segmentos génicos de virus de la influenza A o genoma de células del hospedador aviar (por ejemplo, ARNr de la subunidad 28S) que alarguen el punto de escisión proteolítica; y 5) pérdida del punto de glucosilación protectora en el residuo 13 en combinación con múltiples aminoácidos básicos en el punto de escisión¹. La secuenciación de aminoácidos de los puntos de escisión de las cepas de influenza subtipos H5 y H7 levemente patógenas en las aves permitiría identificar los virus que tienen la capacidad de convertirse en muy patógenos para las aves de corral después de sufrir una mutación puntual.

La OMSA ha adoptado los siguientes criterios para determinar la patogenicidad de virus de la influenza tipo A:

- a) Se utiliza uno de los dos métodos siguientes para determinar la patogenicidad en los pollos. Un virus influenza tipo A de alta patogenicidad es:
 - i) Cualquier virus influenza tipo A que sea letal² para seis, siete u ocho pollos susceptibles de 4–8 semanas de edad dentro de los 10 días posteriores a la inoculación intravenosa de 0,2 ml de una dilución a 1/10 de líquido alantoideo infectivo libre de bacterias
 - o
 - ii) Cualquier virus que tenga un índice de patogenicidad intravenosa (IVPI) superior a 1,2. El procedimiento de cálculo del IVPI es el siguiente:
 - Se diluye a 1/10 en solución salina estéril isotónica el líquido alantoideo infectivo fresco, que se haya confirmado que está libre de APMV-1 u otros agentes extraños, con un título de HA >1/16 (>2⁴ o > log₂ 4 expresado como el inverso).

1 http://www.offlu.net/fileadmin/home/en/resource-centre/pdf/Influenza_A_Cleavage_Sites.pdf

2 Cuando las aves están demasiado enfermas para comer o beber, deben sacrificarse de forma humanitaria.

- Se inyectan por vía intravenosa 0,1 ml del virus diluido a diez pollos susceptibles SAN de 6 semanas de edad; siempre que sea posible deben utilizarse pollos SPF.
 - Las aves se examinan en intervalos de 24 horas durante 10 días. Durante cada observación, cada ave se puntúa como 0 si se encuentra normal, 1 si está enferma, 2 si está muy enferma, y 3 si se ha muerto. (El juicio sobre las aves enfermas o muy enfermas es una valoración clínica subjetiva. Normalmente, las aves “enfermas” deberían manifestar uno de los siguientes signos, y las “muy enfermas” más de uno: afectación respiratoria, depresión, diarrea, cianosis en la piel expuesta o en las barbas, edema en la cara y/o en la cabeza, signos nerviosos. Las aves muertas deben puntuarse como 3 en cada uno de los días siguientes de observación después de la muerte³.)
 - El IVPI es la puntuación media por ave por observación calculada según las puntuaciones anotadas a lo largo de un periodo de 10 días. Un índice de 3,00 significa que todas las aves murieron en 24 horas, y un índice de 0,00 significa que ningún ave mostró signo clínico alguno durante los 10 días del periodo de observación.
- b) En todos los virus H5 y H7 de baja patogenicidad en pollos, debe determinarse la secuencia de aminoácidos del péptido de conexión de la molécula de hemaglutinina (HA0) (es decir, el sitio de escisión). La presencia de varios aminoácidos básicos, insertos de ácidos nucleicos celulares o víricos o la pérdida de sitios de glicosilación específicos en el sitio de escisión de la HA0 es el estándar genotípico para las cepas de IAAP; por lo tanto, si la cepa aislada que se está analizando tiene un motivo de sitio de escisión de HA0 idéntico al de virus de IAAP previos, debe designarse como IAAP independientemente de que tenga una patogenicidad baja o alta determinada por patotipificación en pollos (véase la tabla que enumera todos los sitios de escisión proteolítica de la hemaglutinina notificados para la proteína HA0 en los virus IABP y IAAP H5 y H7 en base a la secuencia de aminoácidos deducida, que se puede encontrar en el sitio web de la OFFLU [ver nota a pie de página 2]). Es más, toda cepa con un motivo nuevo debe analizarse *in vivo* mediante IVPI. En caso de dificultades en la interpretación del motivo del sitio de escisión, se debe consultar a los Laboratorios de Referencia de la OMSA y/o la FAO.

El sistema de clasificación de la OMSA para identificar los virus de la influenza A para los que se deben tomar medidas de control y de declaración de enfermedades está definido en el *Código Terrestre*.

Se han empleado con éxito varias técnicas y estrategias para secuenciar los nucleótidos de la región del gen HA que codifica la región del punto de escisión de la hemaglutinina de los subtipos H5 y H7 del virus de la influenza aviar, lo que permite deducir los aminoácidos presentes. Esto se puede llevar a cabo mediante la extracción de la muestra y la secuenciación directa del punto de escisión proteolítica de la hemaglutinina, o clonando primero la hemaglutinina y secuenciando después el ADNc. Pueden facilitarse varias fases del protocolo empleando sistemas comerciales y secuenciadores automáticos.

La determinación del punto 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 las definiciones acordadas. Ello ha reducido el número de pruebas *in vivo*, aunque el resultado inicial de la secuenciación de Sanger del sitio de escisión de HA para los virus IABP H5 o H7 debe confirmarse mediante inoculación de aves o secuenciación exhaustiva empleando secuenciación de alto rendimiento con un mínimo de 1000 lecturas, para excluir la presencia de todo posible virus IAAP.

Aunque todos los verdaderos virus de la IAAP aislados hasta la fecha han pertenecido a los subtipos H5 o H7, se ha descrito que al menos tres cepas, ambas del subtipo H10 (H10N1, H10N4 y H10N5), habrían cumplido las definiciones *in vivo* de la OMSA y la UE para los virus de la IAAP (Bonfante *et al.*, 2014; Wood *et al.*, 1996) ya que mataron 6/10, 7/10 y 8/10 pollos con valores del IVPI > 1,2 cuando las aves se inocularon por vía intravenosa. Sin embargo, estos virus no produjeron muertes ni signos de la enfermedad cuando se inocularon por vía intranasal, y no presentaron una secuencia del sitio de escisión de la hemaglutinina compatible con virus de IAAP. De forma similar, otros virus de la influenza A inoculados por vía intravenosa son nefrotropicos y las aves que mueren tienen títulos altos de virus en los riñones, lo cual indica una patogenia renal (Slemons y Swayne, 1990), pero esta biopatología inducida en el laboratorio no iguala a la infección multiorgánica ni a la enfermedad sistémica causadas por los

3 Cuando las aves están demasiado enfermas para comer o beber, deben sacrificarse de forma humanitaria y computarse como muertas en la siguiente observación.

virus IAAP. Un virus H4N2 aislado de codorniz tenía una secuencia de sitio de escisión multibásico (PEKRRTR/GLF) pero con un valor de IVPI de 0.0 (Wong *et al.*, 2014), lo que sugiere que el sitio de escisión multibásico en virus distintos de H5 y H7 por sí solo puede no ser suficiente para declarar la presencia de un virus IAAP, sino que deberá realizarse una prueba *in-vivo*. Por el contrario, se han descrito cuatro virus (A/chicken/Pennsylvania/1/83 [H5N2] y A/goose/Guangdong/2/96 [H5N1], A/turkey/England/87-92BFC/91 [H5N1] o A/chicken/Texas/298313/04 [H5N2]) que tienen sitios de escisión de HA0 que contienen múltiples aminoácidos básicos, pero que muestran baja patogenicidad (IVPI <1.2) cuando se inoculan por vía intravenosa en pollos de 6 semanas de edad (Londt *et al.*, 2007). Se ha dado más de una explicación, incluida la presencia de un sitio de glicosilación que enmascara el sitio de escisión de HA0, lo cual destaca tanto las influencias intrahemaglutininas como las multigénicas, en casos muy infrecuentes, en la expresión fenotípica de la alta patogenicidad. La presencia de un sitio de escisión de hemaglutinina de alta patogenicidad en los virus de la influenza A H5 y H7 requiere una declaración de la presencia de estos virus de alta patogenicidad para facilitar el control inmediato de la enfermedad; de lo contrario, una demora para completar las pruebas *in vivo* puede dar lugar a una transmisión y diseminación continuas entre instalaciones con consecuencias graves para su futura erradicación una vez el virus ha sido confirmado como virus de la influenza aviar altamente patógeno.

En la página web de la OFFLU se puede consultar una tabla con la lista de todos los puntos de escisión proteolítica de la proteína HA0 precursora de la hemaglutinina para virus IABP e IAAP H5 y H7 en base a una secuencia de aminoácidos deducida. Esta tabla se actualizará a medida que se caractericen nuevos virus; se puede consultar en la página web de la OFFLU (véase la nota 2 a pie de página).

1.5. Técnicas de captura de antígeno y moleculares

En la actualidad, las técnicas convencionales de aislamiento y caracterización para el diagnóstico de la influenza A continúan siendo métodos fundamentales, al menos para el diagnóstico inicial de las infecciones por influenza A y para proporcionar virus para análisis más detallados, como las pruebas *in vivo* y la secuenciación génica. A partir de aquí, pueden no resultar útiles para confirmar o descartar la presencia de virus infeccioso cuando los resultados de otras pruebas, como la RT-PCR convencional o en tiempo real, son todas débilmente positivas. Sin embargo, los métodos convencionales tienden a ser costosos, emplean numerosa mano de obra y son lentos. Ha tenido lugar una gran evolución y mejora de las técnicas moleculares y de otras técnicas diagnósticas, muchas de las cuales se aplican actualmente de forma habitual al diagnóstico de las infecciones por influenza A como primera opción.

1.5.1. Detección del antígeno

Existen varios kits comerciales de AC-ELISA para la detección de los virus de la influenza A en las aves de corral (Swayne *et al.*, 2020). La mayoría de estos kits son enzimo-inmunoanálisis o se basan en la inmunocromatografía (dispositivos de flujo lateral) y utilizan un anticuerpo monoclonal frente a la nucleoproteína; deben ser capaces de detectar cualquier virus de la influenza tipo A. La principal ventaja de estas pruebas consiste en que pueden poner de manifiesto la presencia de influenza A en 15 minutos. Las desventajas son que pueden carecer de sensibilidad, que pueden no haber sido validadas para diferentes especies de aves, que no se consigue la identificación del subtipo vírico H o N y que son caros. Las pruebas deben interpretarse solo en la parvada como un colectivo y no como prueba individual. Las muestras orofaríngeas o traqueales de aves clínicamente infectadas o muertas proporcionan la mejor sensibilidad. Sin embargo, la falta de sensibilidad constituye una importante desventaja para la utilización de las pruebas de detección de antígeno disponibles. Las sensibilidades de estas pruebas pueden variar entre los hisopos cloacales y traqueales, mientras que pueden funcionar peor con muestras de aves acuáticas o aves silvestres que con pollos. Se ha descrito una sensibilidad mejorada pero moderada en los llamados dispositivos de flujo lateral cuando se usan muestras de folículos de plumas de aves infectadas por IAAP (Slomka *et al.*, 2012). Debido a la baja sensibilidad, la detección de antígenos se utiliza principalmente para la detección, en condiciones de campo, de casos clínicos de alta mortalidad por presuntas infecciones por el virus de la influenza A, seguida de la confirmación de los resultados mediante una prueba de laboratorio más sensible.

1.5.2. Detección directa del ARN

Como se ha indicado en las definiciones actuales de la IAAP, se han utilizado técnicas moleculares en el diagnóstico de la IA durante cierto tiempo. Además, recientemente ha habido desarrollos para su aplicación a la detección y caracterización del virus de la influenza A directamente a partir de muestras clínicas de aves infectadas. Es obligatorio el uso de

protocolos estrictos para evitar el riesgo de contaminación cruzada entre las muestras clínicas cuando se utilicen métodos de detección molecular muy sensibles que permiten una rápida detección del ARN vírico para el diagnóstico de laboratorio confirmativo de las infecciones por influenza aviar. Además, los métodos analíticos de detección de ARN deben validarse con respecto al estándar de la OMSA (véase el capítulo 1.1.6 *Principios y métodos de validación de las pruebas de diagnóstico de las enfermedades infecciosas*) utilizando materiales clínicos para demostrar que las pruebas son “adecuadas para el fin” y pueden aplicarse en el diagnóstico de campo, el cual puede incluir el uso de estándares internos para la prueba. Las reacciones control propician una mayor confianza en la integridad de las reacciones moleculares, en las muestras clínicas y en los resultados.

Además, estas evaluaciones permiten establecer de forma adecuada los umbrales para la interpretación de los resultados (valores que determinan si el resultado es positivo o negativo). La mayor sensibilidad de la RT-PCR en tiempo real conduce a la detección de ARN vírico en muestras en ausencia de virus infecciosos y se debe tener cuidado al interpretar resultados con límites de detección pequeños que pueden no ser indicativos de una infección activa. Este problema puede superarse mediante el análisis de varias muestras de la misma parvada de aves infectadas, lo que es especialmente relevante cuando se analizan muestras de aves de corral domésticas para la investigación de enfermedades.

En entornos con instalaciones más limitadas, las técnicas de RT-PCR en muestras clínicas pueden, con los cebadores correctamente definidos, dar como resultado una rápida detección e identificación de subtipos (al menos de los subtipos H5, H7 y H9, y también existen ensayos desarrollados más recientemente para otros subtipos), incluido un producto de ADNc que se puede utilizar para la secuenciación de nucleótidos. Sin embargo, estos métodos ahora han sido reemplazados en gran medida por las pruebas de detección molecular preferidas para el virus de la influenza A mediante RT-PCR en tiempo real, una modificación de la RT-PCR que reduce el tiempo tanto para la identificación del subtipo de virus como para la secuenciación. Por ejemplo, Spackman *et al.* (2002) utilizaron un sistema de cebador de RT-PCR en tiempo real de un solo paso/ sonda de hidrólisis fluorogénica para la detección de los virus de la influenza A y la determinación del subtipo H5 o H7. La prueba funcionó bien en relación con el aislamiento del virus y ofreció una alternativa mucho más barata y rápida, con diagnóstico en muestras clínicas en menos de 3 horas. En estudios posteriores, se demostró que la RT-PCR en tiempo real tiene una sensibilidad y una especificidad equivalentes al aislamiento del virus en numerosos entornos, pero las actualizaciones del diseño de cebadores/sondas pueden ser beneficiosas con el tiempo para adaptarse a la evolución genética en las regiones de genes a las que se dirigen los ensayos (Laconi *et al.*, 2020). Estas pruebas proporcionan una alta sensibilidad y especificidad, similares a las del aislamiento de virus cuando se utilizan en frotis traqueales y orofaríngeos de pollos y pavos, pero pueden carecer de sensibilidad para la detección del virus de la influenza A en frotis fecales, heces y tejidos de algunas especies de aves, debido a la presencia de inhibidores de la PCR que dan lugar a falsos negativos (Das *et al.*, 2006). La incorporación de un control interno positivo en la prueba verificará una ejecución adecuada de la misma. Además, se han desarrollado mejoras en los métodos de extracción de ARN para eliminar la mayoría de los inhibidores de la PCR de las muestras.

La RT-PCR en tiempo real, normalmente basada en la sonda de hidrólisis para la generación de la señal de fluorescencia específica de la diana, se ha convertido en el método de referencia de muchos laboratorios para el diagnóstico, al menos parcial, directamente a partir de muestras clínicas. Este método ofrece resultados rápidos, con sensibilidad y especificidad comparables a las del aislamiento del virus. Estas cualidades son ideales para la gestión de un brote de la influenza A, en que el periodo de tiempo durante el cual puede obtenerse un diagnóstico fiable es crucial para la toma de decisiones por parte de las autoridades veterinarias correspondientes. Además, se pueden diseñar sistemas de RT-PCR en tiempo real para trabajar con un formato de 96 pocillos en combinación con la extracción robotizada del ARN de alto rendimiento a partir de las muestras (Agüero *et al.*, 2007).

El método de diagnóstico mediante RT-PCR en tiempo real adoptado en la mayoría de los laboratorios se ha basado en la detección genérica inicial del virus de la influenza A en muestras clínicas, principalmente dirigiéndose inicialmente al gen de la matriz (M), que está altamente conservado en todos los virus de la influenza A, seguido de pruebas específicas de RT-PCR en tiempo real para los subtipos víricos H5 y H7. Se han descrito numerosos ensayos para la detección altamente sensible del gen M (o NP) que cumplen los criterios de una prueba de detección adecuada. Para la identificación de subtipos, los cebadores utilizados en la RT-PCR en tiempo real se dirigen a la región HA2, ya que está relativamente bien conservada dentro de los genes de la hemaglutinina de los subtipos H5 y H7 (Spackman *et al.*, 2008; Spackman y Suarez, 2008). Por lo tanto, ha servido como región diana para estos subtipos. Spackman *et al.* (2002) demostraron la detección específica de estos subtipos, pero advirtieron

que sus secuencias de cebador/sonda para H5 y H7 habían sido diseñadas para la detección de cepas H5 y H7 de Norteamérica y podrían no ser adecuadas para todas las cepas H5 y H7. Y así sucedió. Slomka *et al.* (2007) describieron la modificación de las secuencias de oligonucleótidos de H5 utilizadas por Spackman *et al.* (2002) para permitir la detección del subtipo H5N1 (linaje eurasiático ["Goose/Guangdong" [Gs/GD]]) y otros subtipos H5 eurasiáticos que se han aislado en los últimos 15 años tanto en aves de corral como en aves silvestres. A medida que el grupo de virus 'Gs/GD' se diversificó y se extendió por varios continentes, se volvió importante que los diagnósticos en todos los entornos demostraran ser adecuados para la detección de este linaje de virus H5 dividido en múltiples clados (Organización Mundial de la Salud, Organización Mundial de Sanidad Animal, Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura, y Grupo de Trabajo sobre Evolución del H5N1, 2014). Se han desarrollado métodos rápidos más nuevos que permiten la detección y la subtipificación simultáneas, acelerando el tiempo para lograr una identificación rápida de un virus de la influenza A utilizando tecnologías de matrices (Hoffmann *et al.*, 2016) o microchip (Kwon *et al.*, 2019). La RT-PCR en tiempo real de Eurasia validada ha demostrado ser valiosa en la investigación de muchas muestras clínicas de influenza aviar altamente patógena H5Nx y otros subtipos enviados a Laboratorios de Referencia Internacionales de Europa, África, Asia y Norteamérica desde 2005 (Liu *et al.*, 2018; Slomka *et al.*, 2007). Cada conjunto de cebadores y sondas debe validarse frente a un conjunto diverso de virus para que la prueba sea aplicable a una amplia gama de especies de aves y en virus de amplias áreas geográficas y períodos de tiempo. Además, los métodos de RT-PCR en tiempo real ahora se utilizan ampliamente para la determinación rápida y precisa del subtipo de neuraminidasa (James *et al.*, 2018)

Uno de los problemas de las pruebas nuevas que surgen rápidamente es que los métodos y protocolos pueden desarrollarse y comunicarse sin que la prueba esté debidamente validada. Esto se ha abordado para algunos de los protocolos de RT-PCR en tiempo real. En la Unión Europea, los Laboratorios Nacionales de Referencia han colaborado para definir y validar protocolos que pueden recomendarse para su uso en Europa (Hoffmann *et al.*, 2016; Nagy *et al.*, 2020; Slomka *et al.* 2007). Es importante que esto incluya análisis de rutina de los virus detectados (coordinados a través de los Laboratorios de Referencia de la OMSA) en ensayos estándar para asegurar una detección específica fiable de virus contemporáneos que afectan a las aves de corral y otras poblaciones. Además, dada la alta variabilidad en el genoma de la influenza A, es imperativo que los ensayos utilizados en el diagnóstico y la vigilancia de rutina tengan sean sometidos a una demostración continua de su aptitud para la detección de virus contemporáneos validada para su uso en la región donde se aplican. Debe haber una correspondencia adecuada con las cepas locales, teniendo en cuenta que existe una variabilidad regional e intercontinental significativa entre virus endémicos particulares. Laconi *et al.* (2020), al revisar cinco métodos de RT-PCR en tiempo real validados y bien utilizados, concluyeron que el monitoreo continuo del rendimiento del ensayo utilizando metodología tanto *in silico* como *in vitro* era importante, ya que la aparición de nuevas cepas que contienen mutaciones dentro de las áreas de unión de cebadores y sondas podría afectar significativamente el resultado de una prueba. De forma creciente, con las mejoras en el diseño de ensayos y el uso de métodos bioquímicos novedosos, se desarrollan ensayos de detección relevantes para todos los virus de la influenza A de todos los hospedadores (animales y humanos) (Nagy *et al.*, 2020) con gran relevancia para una interfaz entre las aves y 'otros' hospedadores.

Se han descrito protocolos de la RT-PCR en tiempo real que amplifican regiones de la totalidad del punto de escisión del gen de la HA0. Esto puede proporcionar pruebas que sean útiles para virus específicos. Por ejemplo, Hoffman *et al.* (2007) han descrito una prueba RT-PCR en tiempo real específica para los virus euroasiáticos de IAAP H5N1 tipo Quinghai del clado 2.2 que constituye un medio rápido para determinar el patotipo en este subgrupo de virus H5N1 de la IAAP sin secuenciación. Para situaciones en las que se detectan grandes cantidades de muestras/casos positivos durante episodios de la enfermedad, se han creado RT-PCR en tiempo real dirigidas de forma específica para la detección y patotipificación sensible y simultánea de los virus, lo cual puede resultar muy útil, sobre todo cuando se aplica a sistemas de alerta temprana, como la vigilancia de poblaciones de aves silvestres destinada a determinar la posible presencia local de IAAP (Graaf *et al.*, 2017; Naguib *et al.*, 2017).

Se han diseñado modificaciones del método sencillo de detección de ARN vírico por RT-PCR para reducir el efecto de las sustancias inhibitoras en la muestra tomada, la posibilidad de contaminar los ácidos nucleicos y el tiempo necesario para producir un resultado. El sistema de amplificación isotérmica mediada por bucle (LAMP) para la detección de H5 y H7 parece mostrar una alta sensibilidad y una especificidad fiable (Ahn *et al.*, 2019; Bao *et al.*, 2014), pero puede tener una aplicación limitada debido a la susceptibilidad a mutaciones víricas que afecten a las regiones diana, lo cual reduce la detección de virus (Postel *et al.*, 2010).

El aumento de la innovación y las mejoras tecnológicas han hecho posible que las tecnologías de detección de antígenos mejoradas y de base molecular se hayan desarrollado lo suficiente como para disponer de pruebas rápidas para la detección en la parvada de la presencia de subtipos específicos del virus de la influenza A y marcadores de patogenicidad (Inui *et al.*, 2019). Además, las innovaciones en el diseño de pruebas han permitido, por ejemplo, el desarrollo de PCR ultrarrápidas basadas en chips aplicables en condiciones de campo (Kwon *et al.*, 2018) con una aplicación cada vez mayor prevista en el futuro.

1.5.3. Secuenciación génica

Actualmente, la RT-PCR en tiempo real es el método preferido de vigilancia de virus porque la prueba proporciona diagnósticos rápidos y sensibles para la influenza H5, H7 y H9 y está disponible en altas producciones. Sin embargo, un mayor uso de las tecnologías de secuenciación, particularmente a medida que los costos unitarios se reducen con la mejora de la tecnología, ofrece poderosas oportunidades para detectar y secuenciar simultáneamente muestras clínicas en un laboratorio o en condiciones de campo, por ejemplo, aplicando tecnología de nanoporos (King *et al.*, 2020).

La secuenciación de genes se está aplicando cada vez más no solo a la caracterización detallada de virus para su uso en epidemiología molecular, sino también a la subtipificación de virus y definición de marcadores para todos los hospedadores, incluido el riesgo zoonótico. La metodología de secuenciación de Sanger se ha utilizado mucho durante décadas y permite la determinación rápida clásicamente de un gen diana (H) en 24-36 horas para definir la patogenicidad del virus (véase el apartado B.1.1.1) y todavía tiene una utilidad generalizada. Sin embargo, dado que los datos genómicos se pueden determinar rápidamente utilizando tecnología de secuenciación de próxima generación, permite un análisis más amplio con diversas herramientas bioinformáticas (Zhang *et al.*, 2017). Por ejemplo, con la ampliación del acceso a la metodología de secuenciación, ya sea a través de laboratorios especializados o proveedores comerciales, ahora es posible determinar las secuencias genómicas de los virus de la influenza A de las aves para proporcionar un nivel de caracterización importante en la identificación rápida de agentes patógenos y la intervención en los brotes. Convencionalmente, las secuencias de nucleótidos se han utilizado en la epidemiología de los brotes para inferir el origen de los virus y las relaciones precisas entre los diferentes virus asociados dentro del mismo evento (por filogenia), con el fin de apoyar la gestión de los brotes. Las secuencias de genes de la hemaglutinina y la neuraminidasa víricas pueden compararse rápidamente con secuencias conocidas de todos los subtipos en bases de datos de genes y usarse para comprobar coincidencias, identificando así el subtipo vírico y sus relaciones filogenéticas. 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 en las muestras que se utilizan en la RT-PCR en tiempo real.

Cada vez más, estos análisis se están aplicando ahora a nivel del genoma completo para revelar los genotipos del virus y proporcionar una mayor especificidad analítica a los análisis. Dichos métodos son especialmente valiosos para rastrear desde la evolución del virus, que puede mapearse con mayor precisión, incluido el cambio debido al reordenamiento genético, un mecanismo clave asociado a la diversidad del virus y la aptitud para infectar a las aves. Este sistema es especialmente valioso para incursiones tempranas o iniciales en un episodio nuevo, ya que permite una mayor precisión en la determinación del origen del virus y los mecanismos que conducen a la aparición del virus. Esto se ha vuelto cada vez más importante para caracterizar la rápida evolución y la amplia diversidad de virus del linaje Gs/GD asociados a la propagación transcontinental. La traducción de las secuencias de nucleótidos de todos los segmentos genómicos en secuencias de aminoácidos permite la extracción de datos para deducir otras características o rasgos del virus, como el tropismo, los marcadores de rango de hospedadores, incluida la susceptibilidad zoonótica y antiviral predicha, que tienen un gran valor como datos a tener en cuenta en la gestión de los brotes.

2. Pruebas serológicas

2.1. Enzimoanálisis (ELISA)

Existen kits comerciales de ELISA que permiten detectar anticuerpos frente a la proteína de la nucleocápsida. Se han desarrollado y validado kits con un formato de ELISA indirecto y de competición/bloqueo, que ahora se están utilizando para detectar anticuerpos específicos contra virus de la influenza A. se han desarrollado y validado varios ELISA de competición (AIV C-ELISA IA) o de bloqueo (AIV B-ELISA) para influenza aviar como alternativa más sensible que la AGID para la detección de anticuerpos reactivos del grupo de la influenza A en sueros de pollos y de otras especies

aviares (SCAHLS, 2009). Esta plataforma ELISA AIV, tanto en formato “de competición” como “de bloqueo”, detecta anticuerpos contra virus de la influenza A al permitir que estos anticuerpos compitan por los puntos de unión al antígeno con un anticuerpo monoclonal contra un epítipo situado en la superficie de la nucleoproteína que está conservado en todos los virus de influenza A.

Estos kits deben validarse para la especie concreta de interés y para el objetivo/s concreto/s de uso. Se utilizan varias pruebas y métodos distintos de preparación del antígeno. Normalmente, tales pruebas han sido evaluadas y validadas por el fabricante, y es por tanto importante que se sigan cuidadosamente las instrucciones específicas para su empleo. Por favor, consulte el Registro de la OMSA de kits certificados por la Organización⁴. Los kits de ELISA tienen un coste moderado y están preparados para llevar a cabo un cribado de alto rendimiento en la detección de infecciones por virus de la influenza A, y tienen una gran utilidad para ser aplicados a programas de serovigilancia a gran escala; además, son comparativamente mejores que la HI (Arnold *et al.*, 2018). Pero todos los resultados positivos deben ir seguidos de una prueba HI de subtipificación que determine si el virus es H5 o H7. Existen algunos kits ELISA, por ejemplo, para determinar anticuerpos contra H5, H7, H9 y ciertos subtipos N, es decir, N1, pero en general tienen menor sensibilidad que el ELISA para el virus de la influenza A.

2.2. Inmunodifusión en gel de agar

Todos los virus influenza tipo A poseen antígenos de la nucleocápsida antigénicamente similares y antígenos de la matriz antigénicamente similares. Debido a ello, las pruebas de AGID permiten detectar la presencia o ausencia de anticuerpos contra cualquier virus influenza tipo A. Las preparaciones concentradas de virus, como se ha descrito anteriormente, contienen antígenos tanto de la matriz como de la nucleocápsida; el antígeno de la matriz difunde más rápidamente que el antígeno de la nucleocápsida. Se han empleado pruebas de AGID extensa y sistemáticamente para detectar anticuerpos específicos en parvadas de pollos o pavos como un indicador de la existencia de la infección, pero las pruebas de AGID son menos fiables para detectar anticuerpos tras la infección por virus de la influenza tipo A en otras especies aviares. Generalmente, en estas pruebas se han utilizado preparaciones enriquecidas en nucleocápsida obtenidas a partir de las membranas corioalantoideas de huevos de gallina embrionados (Beard, 1970) que han sido infectados a los 10 días de edad, se han homogeneizado, congelado y descongelado tres veces, y centrifugado a 1.000 **g**. Los líquidos sobrenadantes se inactivan añadiendo formalina al 0,1% o beta-propiolactona al 1%, se vuelven a centrifugar y se utilizan como antígeno. Es posible que no todas las especies de aves produzcan anticuerpos precipitantes después de la infección por el virus de la influenza, por ejemplo los patos. La AGID es una prueba de cribado serológico de bajo coste útil para detectar infecciones genéricas por virus de influenza A, pero debe ir seguida de una HI para subtipificar los resultados positivos a influenza A y determinar si son H5 o H7.

Normalmente, las pruebas se realizan empleando geles de agarosa al 1% (p/v) o agar de tipo II purificado con un 8% (p/v) de NaCl en tampón fosfato 0,1 M, pH 7,2, que se vierten en placas de Petri o en portaobjetos hasta obtener un grosor de 2–3 mm y se incuban en una cámara humidificada. Mediante un molde y un cúter, se excavan pocillos de unos 5 mm de diámetro en el agar separados entre ellos unos 3 mm. Usando un patrón para los pocillos, debe colocarse cada suero sospechoso al lado de un suero que se sepa que es positivo y un antígeno. A cada pocillo debe añadirse reactivo suficiente como para llenarlo, de tal modo que la parte superior del menisco corresponda con la parte superior del gel, pero sin pasarse de ese punto. En cada pocillo se precisan alrededor de 25-30 µl de reactivo, aunque la cantidad dependerá del espesor del gel, ya que en el caso de los más espesos se requiere más volumen.

Debe comprobarse en cada pocillo si aparecen líneas de precipitina a las 24 horas, y las muestras positivas débiles o aquellas en las que no se hayan formado líneas específicas deberán volver a incubarse y examinarse de nuevo pasadas 48 horas. El tiempo necesario para la formación de líneas visibles de precipitina depende de las concentraciones del anticuerpo y del antígeno. Las líneas de precipitina se observan mejor sobre un fondo oscuro iluminando por detrás. Se considera que se ha obtenido un resultado específico positivo cuando la línea de precipitina situada entre los pocillos del control positivo es continua con la línea situada entre el antígeno y el pocillo problema. Las líneas cruzadas se interpretan como causadas por un suero problema que carece de identidad con los anticuerpos del pocillo del control positivo.

Si bien la prueba AGID es relativamente económica y adecuada para entornos con recursos limitados, está siendo reemplazada cada vez más por otras plataformas como ELISA para investigaciones serológicas a nivel de parvada, incluido el cribado de aves antes de la exportación/importación para comprobar si tienen antecedentes de exposición a la influenza A.

4 <https://www.woah.org/en/what-we-offer/veterinary-products/#ui-id-5>

2.3. Pruebas de hemaglutinación y de inhibición de la hemaglutinación

En diferentes laboratorios se realizan distintas variantes de los protocolos de las pruebas de HA y de HI. Los siguientes ejemplos recomendados se basan en el uso de placas de micropocillos de plástico con el fondo en V, y en las que el volumen final para ambas pruebas es de 0,075 ml. Se pueden utilizar placas con pocillos de fondo en U pero es necesario tener cuidado durante la lectura porque ofrecen menos definición. Los reactivos necesarios para realizar estas pruebas son PBS isotónico 0,01 M, pH 7,4, y eritrocitos obtenidos a partir de un mínimo de tres pollos SPF o SAN y combinados en un volumen igual de solución de Alsever. Las células deben lavarse tres veces en PBS antes de emplearse como una suspensión al 1% (concentrado de células v/v). Deben utilizarse en cada prueba antígenos y antiseros control positivos y negativos, según corresponda.

2.3.1. Prueba de la hemaglutinación

- i) Se depositan 0,025 ml de PBS en cada pocillo de una placa de microtitulación de plástico con fondo en V.
- ii) Se depositan 0,025 ml de la suspensión vírica (es decir, líquido alantoideo infectivo) en el primer pocillo. Para una determinación precisa del contenido de HA, esta prueba debe realizarse a partir de un intervalo estrecho de una serie inicial de diluciones, es decir, 1/3, 1/4, 1/5, 1/6, etc.
- iii) Se preparan y depositan en toda la placa diluciones a la mitad de volúmenes de 0,025 ml de la suspensión vírica.
- iv) Se depositan 0,025 ml más de PBS en cada pocillo.
- v) Se depositan 0,025 ml de eritrocitos de pollo al 1% (v/v) en cada pocillo.
- vi) Se mezcla cuidadosamente sellando la placa con cinta y se dejan sedimentar los eritrocitos durante 40 minutos a temperatura ambiente, es decir, a unos 20°C, o durante 60 minutos a 4°C si la temperatura ambiente es elevada; en este tiempo los eritrocitos control deben haber formado un botón nítido.
- vii) La HA se determina inclinando la placa y observando la presencia o ausencia de arrastre de los eritrocitos con forma de gota. La titulación debe leerse a la dilución más alta que da lugar a una HA completa (ausencia de arrastre); esto representa 1 unidad HA (UHA) y puede calcularse de manera precisa a partir del intervalo inicial de diluciones.

2.3.2. Prueba de inhibición de la hemaglutinación

- i) Se depositan 0,025 ml de PBS en cada pocillo de una placa de microtitulación de plástico con fondo en V.
- ii) Se depositan 0,025 ml de suero en el primer pocillo de la placa.
- iii) Se preparan diluciones a la mitad de volúmenes de 0,025 ml del suero en toda la placa.
- iv) Se añaden 4 UHA de virus/antígeno en volúmenes de 0,025 ml a cada pocillo y se dejan durante un mínimo de 30 minutos a temperatura ambiente (es decir, a unos 20°C) o 60 minutos a 4°C.
- v) Se añaden 0,025 ml de eritrocitos de pollo al 1% (v/v) en cada pocillo y se mezcla cuidadosamente, se dejan sedimentar los eritrocitos durante unos 40 minutos a temperatura ambiente, es decir, a unos 20°C, o durante 60 minutos a 4°C si la temperatura ambiente es elevada; en este tiempo los eritrocitos control deben haber formado un botón nítido.
- vi) El título de HI es la dilución más alta de suero que ocasiona la inhibición completa de 4 UHA de antígeno. La aglutinación se valora inclinando las placas. Solamente debe considerarse que presentan inhibición aquellos pocillos en los que los eritrocitos se arrastran en la misma proporción que los pocillos control (que contienen solo 0,025 ml de eritrocitos y 0,05 ml de PBS).
- vii) La validez de los resultados debe evaluarse frente a un suero control negativo, el cual no debe producir un título $>1/4$ ($>2^2$ o $>\log_2 2$ expresado como el inverso), y un suero control positivo en el que el título debe encontrarse dentro de una dilución del título conocido.

La prueba de la HI se utiliza principalmente para determinar si los anticuerpos que indican infecciones por virus de influenza A son de subtipo H5 o H7. Los títulos determinados por HI pueden considerarse positivos si existe inhibición a una dilución del suero de 1/16 (2^4 o $\log_2 4$ expresado como el inverso) o más alta frente a 4UHA de antígeno. Algunos laboratorios prefieren emplear 8 UHA en las pruebas HI.

Aunque está permitido, afecta a la interpretación de los resultados, de forma que un título positivo es $1/8$ (2^3 o $\log_2 3$) o más alto. El significado de un título positivo muy bajo no debe ser malinterpretado; no implica, por ejemplo, que las aves inmunizadas con ese título estarán protegidas contra el desafío ni que las aves con títulos inferiores serán susceptibles a la exposición. En cada lote de pruebas de HI debe incluirse un control del virus y del antígeno, suero control positivo y eritrocitos control.

En esta prueba, los sueros de pollos casi nunca dan lugar a reacciones de aglutinación positivas inespecíficas, y por lo tanto no es necesario pre-tratarlos. Los sueros de especies distintas del pollo a veces pueden causar aglutinación de eritrocitos de pollo, dando así lugar a una aglutinación inespecífica. Por tanto, inicialmente debe comprobarse si el suero presenta esta idiosincrasia y, si lo hace, debe inhibirse mediante adsorción con eritrocitos de pollo. Se realiza añadiendo 0,025 ml de eritrocitos concentrados de pollo a cada 0,5 ml de antisuero, agitando cuidadosamente y dejando reposar 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. Como alternativa, pueden usarse los eritrocitos de las especies aviares estudiadas. Puede producirse inhibición inespecífica de la aglutinación derivada de una inhibición estérica cuando el suero analizado contiene anticuerpos contra el mismo subtipo B que el antígeno H utilizado en la prueba HI. La reacción de inhibición estérica puede dar lugar a la formación de un botón de eritrocitos en el fondo de la placa o una corriente con la misma velocidad que el control. La reacción de inhibición estérica puede provocar que los glóbulos rojos se abotonen en el fondo de la placa o fluyan a la misma velocidad que el control. Si se usa antígeno de virus completo en la prueba de HI para subtipificación, es importante asegurarse de que se usen dos antígenos para cada subtipo de hemaglutinina con neuraminidasa heteróloga, es decir, H5N1 y H5N6, con el fin de eliminar la posibilidad de interferencia en el ensayo con anticuerpos anti N, que podrían dar lugar a falsos resultados de tipificación. Como alternativa, el antígeno H usado puede ser proteína H recombinante o purificada que carezca de proteína N. La prueba HI se basa en la unión antigénica entre el antígeno H y el antisuero y, por lo tanto, otros factores pueden causar una unión inespecífica del antígeno H y el suero, dando lugar a una reacción de inhibición inespecífica. En este momento no hay reacciones cruzadas documentadas o reacciones de inhibición inespecíficas entre los diferentes subtipos de hemaglutinina de los virus de la influenza A.

2.4. Prueba de inhibición de la neuraminidasa

La prueba de inhibición de la neuraminidasa se ha utilizado para identificar el tipo de neuraminidasa de las cepas aisladas de virus de la influenza A, así como para caracterizar el anticuerpo en aves infectadas. El procedimiento requiere pericia y reactivos especializados; en consecuencia, esta prueba se suele realizar en un Laboratorio de Referencia de la OMSA. La estrategia DIVA (diferenciar animales infectados de vacunados) utilizada anteriormente en Italia también se basa en una prueba serológica para detectar anticuerpos específicos anti-N; se ha descrito el procedimiento analítico (Capua *et al.*, 2003).

C. REQUISITOS PARA LAS VACUNAS

1. Antecedentes

La vacunación por sí sola no es la solución para el control de la influenza aviar altamente patógena si la erradicación es el resultado deseado. Sin la aplicación de sistemas de seguimiento, bioseguridad estricta y despoblación frente a la infección, la IAAP se volverá endémica en las poblaciones de aves de corral vacunadas. La circulación del virus a largo plazo en una población vacunada puede provocar cambios tanto antigénicos como genéticos, como ha ocurrido con los virus de la influenza A H5Nx (linaje Gs/GD), H7N3, H7N9 y H9N2 en México y en varios países de Oriente Medio y Asia (Swayne y Sims, 2020). Se han revisado las vacunas actualmente utilizadas y el uso de la vacunación (FAO, 2016; Swayne y Sims, 2020). La hemaglutinina es la principal proteína vírica de la influenza A que provoca una respuesta inmunitaria protectora utilizada en las vacunas avícolas aprobadas oficialmente y dicha inmunidad es específica del subtipo de hemaglutinina.

Hasta la fecha, la mayoría de las vacunas contra la influenza A utilizadas en aves de corral han sido vacunas de virus completo inactivado preparadas a partir de líquido alantoideo infeccioso de huevos de gallina embrionados, inactivados con beta-propiolactona o formalina y emulsionados con adyuvantes de aceite mineral. Debido a la posibilidad de que la recombinación conduzca a un aumento de la virulencia, no se recomiendan las vacunas de influenza convencionales vivas contra ningún subtipo. Sin embargo, la biotecnología tiene un gran potencial para generar vacunas con virus vivos de la influenza aviar con segmentos de genes alterados que reducen el riesgo de recombinación, limitan la replicación y anulan los aspectos negativos de las vacunas con virus vivos de la influenza A (Song *et al.*, 2007). La existencia de un gran número de subtipos de hemaglutinina (es decir, H1-16), junto con la variedad conocida de diferentes cepas dentro de un subtipo, plantean serios problemas al seleccionar cepas para producir vacunas inactivadas contra la influenza A. Además, algunas cepas no alcanzan

un título suficientemente alto como para producir vacunas suficientemente potentes sin una preconcentración costosa. Si bien algunas estrategias de vacunación utilizan vacunas autógenas, es decir, vacunas preparadas a partir de cepas aisladas específicamente involucradas en una epizootia, otras se basan en vacunas preparadas a partir de virus de cepas de inóculos totalmente aprobados y caracterizados biológicamente que poseen el mismo subtipo de hemaglutinina que el virus natural y son capaces de producir altas concentraciones de antígeno. Históricamente, las vacunas inactivadas para el control de la IABP y de la IAAP han utilizado virus de IABP con un subtipo de hemaglutinina coincidente procedente de brotes a modo de cepas de inóculo, pero debido a la aparición de resistencia a nivel de campo asociada al uso prolongado de las vacunas, la mayoría de las cepas de inóculo vacunal inactivadas ahora son virus derivados de genética inversa con una hemaglutinina de alta coincidencia antigénica y, a veces, también la neuraminidasa, respecto a las de los virus naturales circulantes. Debido a preocupaciones relativas a la bioseguridad, se desaconseja claramente el uso de virus de la influenza aviar altamente patógena que sean cepas de inóculo vacunal inactivadas.

Desde la década de 1970, en los EE. UU., las vacunas inactivadas contra la influenza A se han utilizado principalmente en pavos contra los virus de la IABP en programas de vacunación de emergencia, pero desde la década de 2000, la mayoría de las vacunas han sido contra los virus de la influenza A porcina H1 y H3, utilizados en un programa de vacunación preventiva de rutina en pavos reproductores (Swayne *et al.*, 2020). Desde principios de la década de 1990, la vacunación contra el virus H9N2 de la IABP se ha utilizado ampliamente en Asia y Oriente Medio aplicando miles de millones de dosis de vacunas inactivadas (Swayne y Sims, 2020). La vacunación contra la influenza aviar altamente patógena se utilizó por primera vez en México durante los brotes de H5N2 de 1994-1995 (Villarreal, 2007), y en Pakistán (Naeem, 1998), durante los brotes de H7N3 de 1995. Desde los brotes de IAAP H5N1 (linaje ganso/Guangdong [Gs/GD]) que tuvieron lugar en Hong Kong en 2002 (Sims, 2003), se adoptó una política de vacunación utilizando cepas de inóculo de la vacuna H5N2 de la IABP y posteriormente se reemplazó con cepas de inóculo de la vacuna de genética inversa H5Nx, ya que el virus natural se propagó por todo China y también fuera del país entre 2002 y 2010, y se utilizaron 113 000 millones de dosis de vacuna para controlar la influenza aviar altamente patógena, un 95% de las cuales fueron inactivadas y un 5% recombinantes, y sigue aplicándose una tasa de uso similar (Swayne *et al.*, 2011; Swayne y Sims, 2020). A medida que la influenza aviar altamente patógena H5Nx Gs/GD se ha extendido por todo el mundo, otros países han implementado programas de vacunación preventiva o de emergencia para el control de la influenza aviar altamente patógena. De manera similar, en la década de 2000, se permitió la vacunación preventiva contra la influenza aviar altamente patógena H5N1 para aves de corral y aves de zoológico al aire libre en varios países de la Unión Europea.

Desde 1997, en algunos países se han aprobado y utilizado vacunas de virus vivos recombinantes vectorizados con insertos del gen de la hemaglutinina del virus de la influenza A H5, principalmente en pollos, e incluyen vacunas del virus de la viruela aviar recombinante (rFPV), del virus de la enfermedad de Newcastle recombinante (rNDV) y del herpesvirus recombinante del pavo (rHVT). Desde 2015, la partícula de ARN del gen de la H5 no replicante basada en hemaglutinina, el baculovirus expresado en H5 y las vacunas de ADN del gen de la H5 han sido aprobadas para aves de corral, pero han tenido un uso limitado (Swayne y Sims, 2020).

1.1. Fundamentos y uso previsto del producto

El trabajo experimental ha demostrado, respecto a la IAAP y la IABP, que las vacunas potentes y administradas correctamente aumentan la resistencia o previenen la infección, protegen contra los signos clínicos y la mortalidad, previenen las caídas en la producción de huevos, reducen la diseminación del virus desde los tractos respiratorio e intestinal, protegen frente a diversos virus naturales del mismo subtipo de hemaglutinina, protegen de la exposición de desafío baja y alta, y reducen la excreción, y así previenen la transmisión por contacto con el virus de desafío (Capua *et al.*, 2004; Swayne y Sims, 2020). Aunque en estudios experimentales de vacunación, un virus de desafío aún puede infectar y replicarse en aves SPF vacunadas clínicamente sanas cuando se exponen a dosis altas, las cantidades eliminadas pueden ser insuficientes para la transmisión del virus (Van der Goot *et al.*, 2005).). La mayor parte del trabajo de evaluación de vacunas se ha realizado en pollos y pavos y se debe tener cierto cuidado al extrapolar los resultados obtenidos a otras especies. La mayoría de las reglamentaciones nacionales de control de la IAAP y la IABP se reservan el derecho a utilizar vacunas en situaciones de emergencia.

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

La información que se ofrece a continuación se basa principalmente en las experiencias de EE.UU. y en las directrices y política de aprobación para el registro de vacunas contra la influenza A en ese país (Departamento de Agricultura de EE.UU., 1995 [actualizado en 2006]). Los principios básicos de producción de vacunas, en concreto vacunas inactivadas, son los mismos para varios virus, como el de la enfermedad de Newcastle (Capítulo 3.3.14).

Las directrices para la producción de vacunas veterinarias se indican en el Capítulo 1.1.8 *Principios de producción de vacunas veterinarias*. Las directrices aquí indicadas y en el Capítulo 1.1.8 son de carácter general y pueden completarse con requisitos nacionales o regionales.

Las instalaciones donde se produzcan vacunas deben funcionar mediante procedimientos y prácticas de bioseguridad adecuados. Si va a utilizarse virus de la IAAP en estudios de desafío, las instalaciones que se utilicen para estos estudios deben cumplir los requisitos establecidos por las autoridades veterinarias relativas al nivel de contención para el Grupo 3 de agentes patógenos, como se indica en el Capítulo 1.1.4.

2.1. Características del inóculo

2.1.1. Características biológicas

Sea cual sea el subtipo, para establecer un inóculo primario para vacunas inactivadas solo deben utilizarse virus de la influenza A bien caracterizados y de probada baja patogenicidad, preferiblemente obtenidos en una reserva internacional o nacional. No deben utilizarse virus de la IAAP como virus inóculo para la producción de vacunas. En cuanto a la IAAP, son preferibles las cepas de inóculo vacunal producidas mediante genética inversa, basadas en el gen de la hemaglutinina del virus de la IAAP, pero deben tener una secuencia del punto de escisión alterada respecto de la de un virus de IABP H5/H7.

Se establece un inóculo primario, a partir del cual se obtiene un inóculo de trabajo. El inóculo primario y el inóculo de trabajo se producen en huevos embrionados SPF o SAN. Es posible que el establecimiento de un cultivo primario solo requiera producir un gran volumen de líquido alantoideo infectivo (mínimo de 100 ml), que puede conservarse en forma de alícuotas liofilizadas (0,5 ml).

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

En el inóculo primario establecido debe realizarse un seguimiento o comprobarse respecto a la esterilidad, la inocuidad, la potencia y la ausencia de agentes extraños específicos.

2.2. Método de fabricación

2.2.1. Procedimiento

Para la producción de vacuna, en primer lugar se establece un inóculo de trabajo en huevos embrionados SPF o SAN mediante expansión de una alícuota de inóculo primario a un volumen suficiente como para poder producir vacuna durante 12-18 meses, a partir del cual se producirán los lotes de vacuna. Es mejor conservar el inóculo de trabajo en forma líquida a temperaturas inferiores a los -60°C, ya que el virus liofilizado no siempre se multiplica hasta un título alto en el siguiente primer paso.

El procedimiento sistemático es diluir el inóculo de trabajo en tampón isotónico estéril (por ejemplo, PBS, a pH 7,2), para poder inocular alrededor de 10^3 – 10^4 DIH₅₀ en 0,1 ml en cada cavidad alantoidea de huevos embrionados SPF o SAN de entre 9 y 11 días de edad. A continuación, estos huevos se incuban a 37°C. Los huevos con embriones que mueran en un plazo de 24 horas deben desecharse. El tiempo de incubación dependerá de la cepa vírica utilizada y se determinará para garantizar la máxima producción con el mínimo número de muertes embrionarias.

Los huevos infectados deben refrigerarse a 4°C antes de recogerlos. Las partes superiores de los huevos se eliminan y se extraen los líquidos alantoideos por succión. Debe evitarse por completo la succión de yema o albúmina. Todos los líquidos deben conservarse de inmediato a 4°C y analizarse para comprobar si presentan contaminación bacteriana.

En la fabricación de vacunas inactivadas, el líquido alantoideo obtenido se trata con formaldehído (una concentración final habitual es la de 1/1000, es decir, un 0,1% de formalina) o bien con beta-propiolactona (BPL) (una concentración final habitual es la de 1/1000–1/4000, es decir, un 0,1–0,025% de BPL de una pureza del 99%). El tiempo exigido debe ser suficiente para garantizar la ausencia de virus vivo. La mayoría de vacunas inactivadas se formulan con líquido alantoideo inactivado no concentrado (principio activo). No obstante, pueden concentrarse los principios activos para facilitar la conservación del antígeno. El principio activo se suele emulsionar con aceite mineral o vegetal. Las formulaciones exactas suelen ser secreto comercial.

2.2.2. Requisitos para los sustratos y los medios

Las vacunas inactivadas contra influenza A preparadas a partir de virus convencionales se producen en huevos embrionados de gallina SPF o SAN de entre 9 y 11 días de edad. El método de producción es básicamente el mismo que para la propagación de virus de forma aséptica; todos los procedimientos se llevan a cabo en condiciones de esterilidad.

2.2.3. Controles durante el proceso

En el caso de las vacunas inactivadas, en huevos embrionados debe comprobarse si el proceso de inactivación se ha completado, tomando al menos 10 alícuotas de 0,2 ml de cada lote y pasando cada alícuota al menos dos veces por embriones SPF o SAN. No debe quedar infectividad vírica.

2.2.4. Pruebas en lotes de producto final

La mayoría de países ha publicado especificaciones para el control de la producción y el análisis de vacunas, que incluyen la definición de las pruebas obligatorias en vacunas durante y después de la fabricación.

i) Esterilidad y pureza

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

ii) Inocuidad

En el caso de las vacunas inactivadas, se administra una dosis doble por la vía recomendada a diez aves de 3 semanas de edad, y durante 2 semanas se comprueba si estas presentan signos clínicos o lesiones locales propios de la enfermedad.

iii) Potencia del lote

La potencia de la vacuna contra la influenza A generalmente se evalúa comprobando la capacidad de la vacuna para inducir un título de anticuerpos (según la prueba HI) significativo en aves SPF o SAN. Las pruebas de potencia convencionales que implican el uso de tres dosis diluidas y la exposición al virus de la influenza aviar altamente patógena (p. ej., las indicadas en el capítulo 3.3.14) también se pueden utilizar para las vacunas destinadas a brindar protección contra los subtipos de influenza aviar altamente patógena. En el caso de las vacunas inactivadas contra virus de la IAAP o la IABP, las pruebas de potencia pueden basarse en la respuesta inmunitaria o en un desafío y posterior evaluación de la morbilidad, la mortalidad (solo IAAP) y el grado de reducción de la replicación del virus de desafío en las vías respiratoria (orofaríngea o traqueal) e intestinal (cloacal). La evaluación del contenido de antígeno de hemaglutinina podría resultar útil para la extrapolación *in vitro* a la potencia de lotes de vacunas posteriores.

iv) Conservantes

Puede utilizarse un conservante para los recipientes de vacuna multidosis.

2.3. Requisitos para la aprobación para el registro

2.3.1. Requisitos de inocuidad

i) Inocuidad en especies de destino y no de destino

La mayoría de vacunas inactivadas contra la influenza A están aprobadas para su uso en pollos y pavos. Deben llevarse a cabo ensayos de campo en las especies de destino para determinar la tolerancia y la inocuidad de la vacuna a dosis completas. Recientemente, el uso de vacunas inactivadas contra la influenza A se ha ampliado a los patos, las ocas y otras aves de corral y de zoológico. Toda utilización de las vacunas para fines distintos de los autorizados en la ficha técnica debe realizarse con mucha cautela y bajo la supervisión de un veterinario con experiencia en el control de enfermedades durante la vacunación de la especie en cuestión. Debe tenerse cuidado de evitar la auto-inyección con vacunas de emulsión oleosa.

ii) Reversión a la virulencia en vacunas atenuadas/vivas

Contra el virus de la influenza A solo se recomiendan las vacunas inactivadas. No se recomienda utilizar vacunas vivas contra la influenza A de cualquier subtipo por el riesgo de recombinación de segmentos génicos del virus de la vacuna con el virus natural, que podría crear virus naturales más patógenos.

iii) Consideraciones ambientales

Ninguna.

2.3.2. Requisitos de eficacia

i) Para la producción animal

A los efectos del registro, las vacunas contra la influenza A deben superar una prueba de eficacia en la que debe utilizarse un número estadísticamente significativo de pollos SPF o SAN por grupo. El desafío debe producirse un mínimo de tres semanas post-vacunación, utilizando una dosis de virus de la IAAP que cause un 90% o más de mortalidad en la población simulada. Lo más habitual es utilizar una dosis de desafío estandarizada de una media de 10^6 dosis infecciosas en embrión de pollo. La protección contra la mortalidad en el grupo vacunado debe ser de al menos un 80%. En el caso de la IABP H5/H7, no se da mortalidad en los modelos de desafío, y por lo tanto, debe observarse una reducción estadísticamente significativa en el título de excreción de virus y/o en el número de aves que excretan virus por la orofaringe o la cloaca entre la población simulada y la vacunada. También pueden utilizarse otros parámetros indicadores de la protección para determinar la eficacia, como la prevención de las caídas en la producción de huevos.

Al establecer los requisitos mínimos de antígeno, se han sugerido 50 PD₅₀ o 3 µg de hemaglutinina por dosis (Swayne y Sims, 2020). Los títulos serológicos mínimos obtenidos mediante HI en aves salvajes deben ser de 1:32 para proteger contra la mortalidad, o superiores a 1/128 para proporcionar una reducción de la replicación del virus de desafío y de la excreción de virus vacunales estrechamente emparentados y del virus de desafío.

ii) Para el control y la erradicación

La eficacia debe ser la misma que para la producción animal.

2.3.3. Estabilidad

Cuando se conserva en las condiciones recomendadas, la vacuna final debe mantener su potencia durante al menos 1 año. Las vacunas inactivadas no se pueden congelar.

3. Vacunas desarrolladas mediante ingeniería genética

3.1. Vacunas existentes y sus ventajas

Se han fabricado vacunas recombinantes contra virus de la influenza A mediante la inserción del gen codificador de la hemaglutinina del virus de la influenza A en un virus vivo no de influenza A que actúa como vector, y la utilización de ese virus recombinante para vacunar aves de corral contra la influenza A (Swayne y Sims, 2020). Las vacunas con virus vector vivo recombinante tienen varias ventajas: 1) se trata de vacunas vivas capaces de inducir inmunidad mucosa, humoral y celular; 2) se pueden administrar *in-ovo* o a aves de 1 día de edad en la incubadora, en condiciones de bioseguridad, e inducen una protección temprana; y 3) ayudan a distinguir fácilmente entre aves infectadas y aves no infectadas, ya que no inducen la producción de anticuerpos contra los antígenos de la nucleoproteína o de la matriz que son comunes a todos virus de la influenza A, es decir, ayudan a diferenciar entre animales infectados y vacunados (DIVA). Por lo tanto, solo las aves infectadas en condiciones de campo mostrarán anticuerpos en las pruebas AGID o ELISA dirigidas a la detección de anticuerpos del grupo de la influenza A (nucleoproteína y/o matriz). Sin embargo, las vacunas vivas recombinantes tienen limitaciones en el sentido de que pueden tener una replicación reducida y, por lo tanto, inducen una inmunidad protectora solo parcial o no la inducen en absoluto en aves que han estado expuestas a nivel de campo al virus vector o al inserto del gen H o bien que han desarrollado esta inmunidad inducida por la vacuna (Bertran *et al.*, 2018; Swayne y Sims, 2020). Si se usa en aves de un día o jóvenes, el efecto de los anticuerpos maternos contra el virus vector sobre la eficacia de la vacuna puede variar según el tipo de vector; es decir, el grado de inhibición, en orden decreciente, dependerá de si se trata del virus de la enfermedad de Newcastle, el virus de la viruela aviar y los vectores del

HVT (herpesvirus del pavo). Además, debido a que los vectores son virus vivos que pueden tener un rango de hospedadores restringido, el uso de tales vacunas debe restringirse a especies en las que se haya demostrado su eficacia.

A principios de la década de 1980, se creó una vacuna rFPV-H5, con inserto del gen H para A/turkey/Ireland/1378/1983 (H5N8), y se autorizó a partir de 1998 para su uso contra el virus IABP H5N2 de México (Swayne y Sims, 2020). Esta vacuna se ha utilizado principalmente en México, con ampliación a otros países de Centroamérica y Vietnam, y se entre 1998 y 2016 se utilizaron más de 9 mil millones de dosis. Esta vacuna rFPV-H5 contiene una actualización del inserto del gen H a A/chicken/Mexico/P-14/2016 (H5N2) (Bertran *et al.*, 2020). Asimismo, se ha desarrollado y aprobado una vacuna rFPV-H7 con inserto del gen de la hemaglutinina de A/chicken/Guanajuato/07437-15/2015 (H7N3) con aplicación en México en 2018 contra la influenza aviar altamente patógena H7N3, y una rFPV-H5 con insertos de los genes de la H y la N de A/goose/Guangdong/1996 (H5N1, clado 0) que se utilizó en China contra la IAAP H5N1 durante 2005 (Chen y Bu, 2009; Criado *et al.*, 2019; Swayne y Sims, 2020). La rFPV puede ser eficaz cuando se administra a pollitos de 1 día con diferentes niveles de inmunidad materna (Arriola *et al.*, 1999). Sin embargo, cuando se anticipan niveles muy altos de inmunidad inhibitoria debido a una infección o vacunación previa, la eficacia de la vacuna viva recombinante en los pollos de 1 día de edad debe confirmarse y puede requerir una aplicación de refuerzo inicial de la vacuna recombinante seguida, un mínimo de 10 días después, de un refuerzo de la vacuna inactivada contra la influenza A para brindar una inmunidad óptima (Richard-Mazet *et al.*, 2014; Swayne y Sims, 2020).

El virus de la enfermedad de Newcastle también se puede usar como vector para expresar genes de hemaglutinina de la influenza. Se demostró que un virus recombinante de la vacuna contra la enfermedad de Newcastle (rNDV) que expresa un gen H5 HA (rNDV-H5) protege a los pollos SPF contra el desafío tanto con el virus virulento de la enfermedad de Newcastle como con el virus IAAP H5N2 (Veits *et al.*, 2006). Por otra parte, en China (Rep. Pop. de) se produjo un virus recombinante similar que contiene la cepa La Sota de la vacuna del virus de la enfermedad de Newcastle y que expresa el gen H de A/goose/Guangdong/1996 (clado 0) (H5N1) (Ge *et al.*, 2007) y se describió que es eficaz en estudios de protección frente a cualquiera de los virus. Esta vacuna rNDV-H5 (clado 0) se ha utilizado ampliamente con la actualización posterior del inserto de HA dos veces, utilizando insertos de hemaglutinina del clado 2.3.4 y 2.3.2 (Swayne y Sims, 2020). Se ha desarrollado, aprobado y utilizado en México un rNDV-H5 con inserto del gen H de A/chicken/Mexico/435/2005 (H5N2) contra IABP H5N2 (Swayne y Sims, 2020). Una vacuna rNDV-H5 con inserto del gen H de A/chicken/Iowa/04-20/2015 (H5N2) (linaje Gs/GD, clado 2.3.4.4) fue eficaz para proteger a los pollos contra la exposición al virus IAAP H5N2 homólogo en pollos que carecían de inmunidad frente al virus vector o al inserto del gen H de la enfermedad de Newcastle, pero la vacuna rNDV-H5 fue ineficaz como vacuna primaria o de refuerzo en aves de corral con inmunidad materna o bien inmunizadas contra el virus de la enfermedad de Newcastle o la proteína de la hemaglutinina H5 de este virus (Bertran *et al.*, 2018). Las vacunas rNDV-H5 son eficaces como vacuna primaria si se utilizan en pollos con enfermedad de Newcastle o en pollos negativos respecto a anticuerpos contra H5, o como vacuna primaria seguida de una vacuna de refuerzo con una vacuna inactivada contra la influenza A en pollos con enfermedad de Newcastle o con anticuerpos contra H5. La principal ventaja de rNDV-H5 es la capacidad de aplicación masiva de bajo coste mediante aspersión en la planta de incubación o en el campo (Swayne y Sims, 2020).

Desde 2010, está aprobada una vacuna rHVT-H5 con inserto de hemaglutinina de A/swan/Hungary/4999/2006 (linaje Gs/GD, clado 2.2) y se utiliza en Egipto y Bangladesh contra la IAAP H5Nx (linaje Gs/GD) y en México contra el IABP H5N2 (Rauw *et al.*, 2011; Swayne y Sims, 2020). Esta vacuna rHVT-H5 ha producido una amplia protección contra diversos virus IAAP H5 (Rauw *et al.*, 2011). Además, los anticuerpos maternos contra el vector rHVT o la proteína de la hemaglutinina H5 han tenido muy poco impacto negativo en la efectividad de la vacuna en pollos de engorde después de una única vacunación a 1 día de edad (Bertran *et al.*, 2018). La vacuna rHVT-H5 se limita a la aplicación solo *in ovo* o a 1 día de edad a pollitos de incubadora, ya que la aplicación posterior en la explotación no es factible debido a la infección ubicua por el virus de la enfermedad de Marek o el uso de vacunas contra la enfermedad de Marek.

Debido a que inducen una inmunidad mucosa, humoral y celular más amplia, las vacunas recombinantes con vectores vivos se utilizaban más, antes de la aparición de virus de campo resistentes a las cepas de la vacuna, que las vacunas de virus completo inactivado, que producen principalmente una fuerte inmunidad humoral. Se ha desarrollado un recombinante del virus de la enteritis del pato en patos domésticos y se ha demostrado su eficacia, pero está pendiente de aprobación para el registro y de distribuirse en China (Rep. Pop. de) (Liu *et al.*, 2011).

En EE.UU., se han aprobado para uso avícola vacunas de partículas de ARN no replicantes y de ADN que contienen el gen H de hemaglutinina de A/Gyrfalcon/Washington/40188-6/2014 (H5N8) (linaje

Gs/GD, clado 2.3.4.4) (Swayne y Sims, 2020). La vacuna de partículas de ARN H5 es parte del banco de vacunas de emergencia de EE. UU., junto con las vacunas rHVT-H5 y vacunas inactivadas contra H5N2. Se ha demostrado que la vacuna de partículas de ARN de H5 es una vacuna de refuerzo eficaz para reemplazar la vacuna contra H5Nx inactivada generada mediante genética inversa (Bertran *et al.*, 2017). En Bangladesh, Egipto y México, se ha aprobado para uso avícola un baculovirus con inserto del gen H de A/duck/China/E319-2/2003 (linaje Gs/GD, clado 2.3.3) (Swayne y Sims, 2020). Dado que esta categoría de vacuna solo contiene la proteína específica de la hemaglutinina de influenza A, son fáciles de utilizar en pruebas serológicas DIVA con ensayos diseñados para identificar anticuerpos contra la nucleoproteína/proteína de la matriz. Sin embargo, los informes de campo de protección con vacunas de influenza A vectorizadas y convencionales sugieren que la protección con una sola dosis de las vacunas vectorizadas para aves de corral de vida larga no es factible, ya que la protección de campo a largo plazo requiere un refuerzo con vacuna contra el virus de la influenza A inactivada o bien una vacuna con gen de la hemaglutinina no replicante (Swayne y Sims, 2020).

Además de estas vacunas aprobadas, se han descrito varias vacunas experimentales contra la influenza A H5 y H7 basadas en hemaglutinina en las que se utilizan sistemas de expresión *in vivo* o *in vitro* que incluyen adenovirus recombinantes, salmonela, vaccinia, virus de la leucosis aviar, varios sistemas eucariotas (cultivos vegetales o celulares) y el virus de la laringotraqueítis infecciosa (Swayne y Sims, 2020).

3.2. Requisitos especiales para vacunas desarrolladas mediante ingeniería genética, si las hay

Las vacunas vivas recombinantes vectorizadas con insertos del gen de la hemaglutinina de la influenza A deben someterse a una evaluación completa del impacto ambiental para determinar el riesgo de que la vacuna sea virulenta en especies aviarias no de destino y de que aumente su virulencia en las especies aviarias de destino.

4. Métodos de vigilancia para detectar infección en parvadas y aves vacunadas

Se ha propuesto una estrategia para la “diferenciación entre animales infectados y animales vacunados” (DIVA) como posible solución para lograr la erradicación de la IAAP y la IABP H5/H7 sin necesidad de sacrificar aves de forma masiva y sin el consiguiente perjuicio económico que esto conllevaría, especialmente en países en vías de desarrollo (FAO, 2004). Esta estrategia proporciona las ventajas de la vacunación (menos virus en el medio ambiente), pero además la capacidad para identificar parvadas infectadas permitiría la puesta en práctica de otras medidas de control, como el sacrificio sanitario. En las estrategias DIVA, se utilizan uno de los dos siguientes mecanismos de detección en la población vacunada: 1) detección del virus de la influenza A (“DIVA respecto al virus”), o 2) detección de anticuerpos contra la infección por el virus natural de la influenza A (“DIVA serológica”). A nivel de parvada, un método sencillo consiste en el seguimiento periódico de aves centinela que se dejan sin vacunar dentro de cada parvada vacunada, pero este método conlleva algunos problemas de gestión, en concreto el relativo a la identificación de las aves centinela dentro de grandes parvadas. Como sistema alternativo o secundario, se pueden realizar pruebas de infección natural de aves vacunadas mediante la detección del virus natural o de anticuerpos contra el virus. Para detectar el virus natural, se pueden analizar hisopos orofaríngeos o cloacales de aves muertas el día de la toma de muestras o enfermas, de forma individual o combinada, mediante métodos moleculares, tales como la RT-PCR en tiempo real o mediante AC-ELISA en las poblaciones vacunadas (Swayne y Kapczynski, 2008).

Para el empleo de la DIVA serológica, deben utilizarse sistemas de vacunación que faciliten la detección de la exposición al virus natural en poblaciones vacunadas. Se han utilizado varios sistemas. En primer lugar, vacunas que contengan un virus con el mismo subtipo de hemaglutinina (H) pero diferente neuraminidasa (N) que el virus natural. Los anticuerpos frente a la N del virus natural actúan como marcadores naturales de la infección. Este sistema se ha utilizado en Italia tras el resurgimiento, en el año 2000, de un virus IABP H7N1, y utilizaron una vacuna H7N3 inactivada, de tal forma que la detección de anticuerpos contra N3 indicaba una parvada vacunada, los anticuerpos contra N1 indicaban infección, y la presencia de anticuerpos tanto contra N1 como contra N3 indicaba que se trataba de una parvada vacunada e infectada (Capua *et al.*, 2003). Surgirían problemas con este sistema si surge un virus natural que tiene un antígeno N diferente al del virus natural existente o si ya están circulando en el campo subtipos con diferentes antígenos N, como ocurre en muchos países de rentas bajas y medias con H5Nx (linaje Gs/GD), H9N2 y otros subtipos de NA en los mercados de aves de corral vivas (Swayne y Sims, 2020). Una segunda opción de DIVA serológica es el uso de vacunas que contengan solo HA, p. ej. vacunas recombinantes, ya sean replicantes o no, lo cual permite utilizar sistemas validados de AGID clásico validado y ELISA basados en nucleoproteínas (NP) o proteínas de la matriz para detectar anticuerpos indicativos de infección en aves vacunadas. Por último, en el caso de las vacunas inactivadas, se ha descrito una prueba que detecta anticuerpos contra las proteínas víricas no estructurales o M2e (Avellaneda *et al.*, 2010; Lambrecht *et al.*, 2007). Estos sistemas aún no se han validado en condiciones de campo.

5. Evaluación y actualización continuas de las cepas de los inóculos vacunales para proteger contra variantes emergentes de cepas víricas naturales

Históricamente, determinadas cepas de inóculo vacunal contra IABP H5 inactivadas y virus de la viruela aviar recombinantes con insertos del gen H5 han mostrado una amplia protección cruzada en pollos frente al desafío con diversos virus IAAP H5 de Eurasia y Norteamérica (Swayne y Kapczynski, 2008). En 1995, México implementó el uso de la vacuna contra la influenza A para las aves de corral como herramienta de la estrategia de control de la influenza aviar altamente patógena, y logró la erradicación de la cepa de la influenza aviar altamente patógena en junio de 1995, pero a medida que continuaron circulando virus IABP H5N2, se mantuvo la vacunación contra estos virus H5N2 (Villarreal, 2007). En unos pocos años, surgieron múltiples linajes de virus naturales de IABP H5N2 con variantes antigénicas que escaparon de la inmunidad inducida por la cepa del inóculo vacunal inactivado original de 1994 (Lee *et al.*, 2004). De manera similar, desde 2005, en China (Rep. Pop.), Indonesia, Egipto y varios otros países de Asia y Oriente Medio han surgido virus naturales del linaje Gs/GD de virus IAAP H5Nx emergentes que escaparon de la inmunidad inducida por las cepas de los inóculos vacunales clásicos IABP H5 inactivados, e incluso de la generada por cepas de inóculo vacunal H5 creadas por genética inversa y utilizadas en vacunas comerciales (Grund *et al.*, 2011; Liu *et al.*, 2020; Swayne y Sims, 2020). De manera similar, en varios países de Asia y Oriente Medio han surgido virus naturales IABP H9N2 resistentes a cepas del inóculo vacunal inactivadas después del uso prolongado de una única cepa de inóculo vacunal inactivada. No está claro si la aparición de estas variantes antigénicas está relacionada con el uso de las vacunas en sí o el uso inadecuado de las mismas, pero la aparición de resistencias requirió un cambio en las cepas de inóculo vacunal para igualarlo antigénicamente a las cepas naturales circulantes (Cattoli *et al.*, 2011; Lee *et al.*, 2016). China, como el mayor usuario de vacunas contra la influenza aviar, ha actualizado sus cepas de inóculo inactivadas H5Nx (linaje Gs/GD) y H7N9 ocho veces y una vez, respectivamente, y la vida útil de una cepa de inóculo le oscila entre los 3 y los 7 años (Liu *et al.*, 2020; Swayne y Sims, 2020). México ha actualizado sus cepas de inóculo inactivadas H5N2 dos veces y su rFPV-H5 una vez a lo largo de un período de 20 años de uso de la vacuna H5 (Swayne y Sims, 2020). Inicialmente, en Corea del Sur, el uso de la vacuna inactivada contra el virus H9N2 se asoció a una menor diversidad de virus natural, ya que la inmunidad vacunal inhibió por completo la replicación del virus natural estrechamente relacionado desde el punto de vista antigénico (Lee *et al.*, 2016). Sin embargo, la diversidad de virus natural aumenta a medida que surgen variantes antigénicas naturales y se expanden sus poblaciones. Las vacunas vivas recombinantes vectorizadas se han actualizado con menos frecuencia, lo cual sugiere una inmunidad más amplia y que requiere actualizaciones de insertos menos frecuentes que en las cepas de inóculo vacunal inactivadas.

Todos los programas de vacunación contra la influenza A deben incluir un programa de vigilancia epidemiológicamente relevante que tenga en cuenta todas las regiones geográficas y sectores de producción relevantes. Las cepas resultantes, junto con los virus obtenidos de los brotes, deben evaluarse para determinar la variación genética y antigénica como parte de un programa continuo de evaluación de la eficacia de la vacuna en condiciones de campo. Inicialmente, los virus deben secuenciarse y analizarse para detectar posibles cambios críticos de aminoácidos dentro de los cinco epítomos antigénicos principales del gen de la HA. Se debe analizar la reactividad cruzada de un subconjunto representativo de variantes antigénicas en una prueba de HI utilizando un panel de antisueros estándar producidos contra diversos virus de la influenza A del mismo subtipo de HA, y los datos deben ser analizados para detectar posibles cambios cuantitativos mediante cartografía antigénica (Fouchier y Smith, 2010). A partir de estos datos cartográficos, algunos de los virus de la influenza A predominantes en circulación y algunas de las variantes antigénicas seleccionadas deben usarse en estudios de eficacia con pruebas de desafío (Swayne *et al.*, 2015). Las vacunas que no son protectoras deben suspenderse y reemplazarse por vacunas que contengan cepas de inóculo vacunal inactivadas actualizadas o inserciones del gen de la HA dentro de otras plataformas vacunales. En China (Rep. Pop. de), según el cronograma para la aparición de variantes antigénicas de los virus H5N1, las vacunas deben evaluarse como mínimo cada 2 a 3 años para determinar su eficacia contra los virus naturales predominantes en circulación en el país o la región. Como alternativa, las cepas de inóculo vacunal deben actualizarse cuando un mutante que haya escapado de la vacuna represente más del 30% del subtipo de virus de la IA relevante (Liu *et al.*, 2020). Así, según esta información científica, la autoridad veterinaria competente del país debe establecer, tras consultar con los principales científicos y organizaciones internacionales relacionados con las vacunas veterinarias, las cepas de inóculo vacunal contra IABP generadas por genética inversa o aisladas de manera natural que formarán parte de las vacunas inactivadas convencionales, y los conjuntos de genes de hemaglutinina H5 y H7 que se insertarán en el caso de las vacunas recombinantes. En algunas situaciones, puede ser necesaria más de una variedad de inóculo para cubrir todos los sectores de producción de un país. Para el uso en programas de control, solo se deben aprobar vacunas potentes y de calidad. La administración adecuada de vacunas potentes de calidad es fundamental para inducir una inmunidad protectora en las poblaciones de aves de corral.

BIBLIOGRAFÍA

AGUERO M., SAN MIGUEL E., SÁNCHEZ A., GÓMEZ-TEJEDOR C. & JIMÉNEZ-CLAVERO M.A. (2007). A fully automated procedure for the high-throughput detection of avian influenza virus by real-time reverse transcription–polymerase chain reaction. *Avian Dis.*, **51**, 235–241. doi: 10.1637/7634-042806R1.1.

AHN S.J., BAEK Y.H., LLOREN K.K.S., CHOI W.S., JEONG J.H., ANTIGUA K.J.C., KWON H.I., PARK S.J., KIM E.H., KIM Y.I., SI Y.J., HONG S.B., SHIN K.S., CHUN S., CHOI Y.K. & SONG M.S. (2019). Rapid and simple colorimetric detection of multiple influenza viruses infecting humans using a reverse transcriptional loop-mediated isothermal amplification (RT-LAMP) diagnostic platform. *BMC Infect. Dis.*, **19**, 676. doi.org/10.1186/s12879-019-4277-8

ARNOLD M.E., SLOMKA M.J., BREED A.C., HJULSAGER C.K., PRITZ-VERSCHUREN S., VENEMA-KEMPER S., BOUWSTRA R.J., TREBBIEN R., ZOHARI S., CEERAZ V., LARSEN L.E. & BROWN I.H. (2018). Evaluation of ELISA and haemagglutination inhibition as screening tests in serosurveillance for H5/H7 avian influenza in commercial chicken flocks. *Epidemiol. Infect.*, 146,1–8. https://doi.org/10.1017/S0950268817002898

ARRIOLA J.M., FARR W., URIBE G. & ZURITA J. (1999). Experiencias de campo en el uso de vacunos contra influenza aviar. *In: Proceedings Curso de Enfermedades Respiratorias de las Aves, Asociacion Nacional de Especialistas en Cienvias Avicelase*, 3–13.

AVELLANEDA G., MUNDT E., LEE C.W., JADHAO S. & SUAREZ D.L. (2010). Differentiation of infected and Vaccinated animals (DIVA) using the NS1 protein of avian influenza virus. *Avian Dis.*, **54** (Suppl. 1), 278–286. doi: 10.1637/8644-020409-Reg.1.

BAO H., ZHAO Y., WANG Y., XU X., SHI J., ZENG X., WANG X. & CHEN H. (2014). Development of a reverse transcription loop-mediated isothermal amplification method for the rapid detection of subtype H7N9 avian influenza virus (2014) *BioMed Res. Int.*, Art. no. 525064. doi: 10.1155/2014/525064

BEARD C.W. (1970). Demonstration of type-specific influenza antibody in mammalian and avian sera by immunodiffusion. *Bull. WHO*, **42**, 779–785.

BERTRAN K., BALZLI C., LEE D.H., CRIADO M., KILLMASTER L., KAPCZYNSKI D.H. & SWAYNE D.E. (2018). Maternal antibody inhibition of recombinant Newcastle disease virus vectored vaccine in a primary or booster avian influenza vaccination program of broiler chickens. *Vaccine*, **36**, 6361–6372, 2018. doi: 10.1016/j.vaccine.2018.09.015.

BERTRAN K., BALZLI C., LEE D.H., SUAREZ D.L., KAPCZYNSKI D.R. & SWAYNE D.E. (2017). Protection of White Leghorn chickens by U.S. emergency H5 vaccines against clade 2.3.4.4 H5N2 high pathogenicity avian influenza virus. *Vaccine*, **35**, 6336–6344. doi: 10.1016/j.vaccine.2017.05.051.

BERTRAN K., CRIADO M.F., LEE D.H., KILLMASTER L., SÁ E SILVA M., WIDENER J., PRITCHARD N. & SWAYNE D.E. (2020). Protection of White Leghorn chickens by recombinant fowlpox vector vaccine with updated H5 insert against Mexican H5N2 high and low pathogenicity avian influenza viruses. *Vaccine*, **39**, 1526–1534. doi:10.1016/j.vaccine.2019.11.072

BONFANTE F., FUSARO A., ZANARDELLO C., PATRONO L.V., DE NARDI R., MANIERO S. & TERREGINO C. (2014). Lethal Nephrotropism of an H10N1 Avian Influenza Virus Stands Out as an Atypical Pathotype *Vet. Microbiol.*, **173**, 189–200.

CAPUA I., TERREGINO C., CATTOLI G., MUTINELLI F. & RODRIGUEZ J.F. (2003). Development of a DIVA (Differentiating Infected from Vaccinated Animals) strategy using a vaccine containing a heterologous neuraminidase for the control of avian influenza. *Avian Pathol.*, **32**, 47–55. doi:10.1080/0307945021000070714

CAPUA I., TERREGINO C., CATTOLI G. & TOFFAN A. (2004). Increased resistance of vaccinated turkeys to experimental infection with an H7N3 low-pathogenicity avian influenza virus. *Avian Pathol.*, **33**, 47–55. doi: 10.1080/03079450310001652077

CATTOLI G., FUSARO A., MONNE I., COVEN F., JOANNIS T., EL-HAMID H.S., HUSSEIN A.A., CORNELIUS C., AMARIN N.M., MANCIN M., HOLMES E.C. & CAPUA I. (2011). Evidence for differing evolutionary dynamics of A/H5N1 viruses among countries applying or not applying avian influenza vaccination in poultry. *Vaccine*, **29**, 9368–9375. doi: 10.1016/j.vaccine.2011.09.127

CHEN H. & BU Z. (2009). Development and application of avian influenza vaccines in China. *Curr. Top. Microbiol. Immunol.*, **333**, 153–162. doi: 10.1007/978-3-540-92165-3_7

COX N.J., TROCK S.C. & UYEKI T.M. (2017). Public health implications of animal influenza viruses. *In: Animal Influenza, Second Edition*, Swayne D.E., Ed. Wiley-Blackwell, Ames, Iowa, USA, pp 92–132.

CRIADO M., BERTRAN K., LEE D.H., KILLMASTER L., STEPHENS C.B., SPACKMAN E., ATKINS E., SA E SILVA M., MEBATSION T., SMITH R., HUGHES T., WIDENER J., PRITCHARD N. & SWAYNE D.E. (2019) Addition of N-glycosylation sites on the

globular head of the hemagglutinin induced escape of a 2015 Mexican H7N3 highly pathogenic avian influenza virus from vaccine-induced immunity. *Vaccine*, **37**, 2232–2243. doi: 10.1016/j.vaccine.2019.03.009

DAS A., SPACKMAN E., SENNE D., PEDERSEN J. & SUAREZ D.L. (2006). Development of an internal positive control for rapid diagnosis of avian influenza virus infections by real-time reverse transcription-PCR with lyophilized reagents. *J. Clin. Microbiol.*, **44**, 3065–3073.

FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION OF THE UNITED NATIONS (FAO) (2004). FAO, OIE & WHO Technical consultation on the Control of Avian Influenza. Animal health special report. FAO, Rome, Italy.

FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION OF THE UNITED NATIONS (2016). Rational use of vaccination for prevention and control of H5 highly pathogenic avian influenza. *Focus on*, **10**, 1–12. FAO, Rome, Italy.

FOUCHIER R.A.M. & SMITH D.J. (2010). Use of antigenic cartography in vaccine seed strain selection. *Avian Dis.*, **54**, 220–223.

GE J., DENG G., WEN Z., TIAN G., WANG Y., SHI J., WANG X., LI Y., HU S., JIANG Y., YANG C., YU K., BU Z. & CHEN H. (2007). Newcastle disease virus-based live attenuated vaccine completely protects chickens and mice from lethal challenge of homologous and heterologous H5N1 avian influenza viruses. *J. Virol.*, **81**, 150–158.

GRAAF A., BEER M. & HARDER T. (2017). Real-time reverse transcription PCR-based sequencing-independent pathotyping of Eurasian avian influenza A viruses of subtype H7. *Virol. J.*, **14**, 137. doi: 10.1186/s12985-017-0808-3

GRUND C., ABDELWHAB E.S., ARAFA A.S., ZILLER M., HASSAN M.K., ALY M.M., HAFEZ H.M., HARDER T.C. & BEER M. (2011). Highly pathogenic avian influenza virus H5N1 from Egypt escapes vaccine-induced immunity but confers clinical protection against a heterologous clade 2.2.1 Egyptian isolate. *Vaccine*, **29**, 5567–5573. doi: 10.1016/j.vaccine.2011.01.006.

HOFFMANN B., HOFFMANN D., HENRITZI D., BEER M. & HARDER T.C. (2016). Riems influenza a typing array (RITA): An RT-qPCR-based low density array for subtyping avian and mammalian influenza a viruses. *Sci. Rep.*, **6**, 27211.

INUI K., NGUYEN T., TSENG H.J., TSAI C.M., TSAI Y.L., CHUNG S., PADUNGTOD P., ZHU H., GUAN Y., KALPRAVIDH W. & CLAES F. (2019). A field-deployable insulated isothermal RT-PCR assay for identification of influenza A (H7N9) shows good performance in the laboratory. *Influenza Other Respir. Viruses*, **13**, 610–617.

INTERNATIONAL COMMITTEE ON TAXONOMY OF VIRUSES. (2019). Orthomyxoviridae. Virus Taxonomy: 2019 Release. https://talk.ictvonline.org/ictv-reports/ictv_9th_report/negative-sense-rna-viruses-2011/w/negna_viruses/209/orthomyxoviridae. Accessed 9 June 2020.

JAMES J., SLOMKA M., REID S., THOMAS S., MAHMOOD S., BYRNE A., COOPER J., RUSSELL C., MOLLETT B., AGYEMAN-DUA E., ESSEN S., BROWN I. & BROOKES S. (2018). Development and application of real-time PCR assays for specific detection of contemporary avian influenza virus subtypes N5, N6, N7, N8 and N9; *Avian Dis.*, **63**, 209–218. <https://doi.org/10.1637/11900-051518-Reg.1>

KING J., SCHULZE C., ENGELHARDT A., HLINAK A., LENNEMANN S.-L., RIGBERS K., SKUBALLA J., STAUBACH C., METTENLEITER T.C., HARDER T., BEER M. & POHLMANN A. (2020). Novel IAAPV H5N8 reassortant (Clade 2.3.4.4b) detected in Germany. *Viruses*, **12**, Art. no. 281, <https://www.scopus.com/inward/record.uri?eid=2-s2.0-85081231134&doi=10.3390%2fv12030281&partnerID=40&md5=4e8bd3edb9a711a33c6ec7abe68a5f49> doi: 10.3390/v12030281

KWON S.H., LEE S., JANG J., SEO Y. & LIM H.Y. (2018). A point-of-care diagnostic system to influenza viruses using chip-based ultra-fast PCR. *J. Med. Virol.*, **90**, 1019–1026.

KWON N., AHN J.J., KIM J.H., KIM S., LEE J.H., KWON J.H., SONG C.S. & HWANG S.Y. (2019). Rapid Subtyping and Pathotyping of Avian Influenza Virus using Chip-based RT-PCR. *Biochip J.*, **13**, 333–340.

LACONI A., FORTIN A., BEDENDO G., SHIBATA A., SAKODA Y., AWUNI J.A., GO-MARO E., ARAFA A., MAKEN ALI A.S., TERREGINO C. & MONNE I. (2020). Detection of avian influenza virus: a comparative study of the *in silico* and *in vitro* performances of current RT-qPCR assays. *Sci. Rep.*, **10**, Art. No. 8441. doi: 10.1038/s41598-020-64003-6.

LAMBRECHT B., STEENSELS M., VAN BORM S., MEULEMANS G. & VAN DEN BERG T. (2007). Development of an M2e-specific enzyme-linked immunosorbent assay for differentiating infected from vaccinated animals. *Avian Dis.*, **51** (Suppl. 1), 221–226. doi: 10.1637/7589-040206R.1.

- LEE C.W., SENNE D.A. & SUAREZ D.L. (2004). Effect of vaccine use in the evolution of Mexican lineage H5N2 avian influenza virus. *J. Virol.*, **78**, 8372–8381. doi: 10.1128/JVI.78.15.8372-8381.2004.
- LEE D.H., FUSARO A., SONG C.S., SUAREZ D.L. & SWAYNE D.E. (2016). Poultry vaccination directed evolution of H9N2 low pathogenicity avian influenza viruses in Korea. *Virology*, **488**, 225–231. DOI: 10.1016/j.virol.2015.11.023.
- LIU J., CHEN P., JIANG Y., WU L., ZENG X., TIAN G., GE J., KAWAOKA Y., BU Z. & CHEN H. (2011). A duck enteritis virus-vectored bivalent live vaccine provides fast and complete protection against H5N1 avian influenza virus infection in ducks. *J. Virol.*, **85**, 10989–10998. DOI: 10.1128/JVI.05420-11
- LIU J., YAO L., ZHAI F., CHEN Y., LEI J., BI Z., HU J., XIAO Q., SONG S., YAN L. & ZHOU J. (2018). Development and application of a triplex real-time PCR assay for the simultaneous detection of avian influenza virus subtype H5, H7 and H9. *J. Virol. Methods*, **252**, 49–56.
- LIU S., ZHUANG Q., WANG S., JIANG W., JIN J., PENG C., LOU G., LI J., YU J., YU X., LI H., SUN S., YUAN L. & CHEN J (2020). Control of avian influenza in China: Strategies and lessons. *Transbound. Emerg. Dis.*, **67**, 1–9. doi: 10.1111/tbed.13515
- LONDT B.Z., BANKS J. & ALEXANDER D.J. (2007). Highly pathogenic avian influenza viruses with low virulence for chickens in *in vivo* tests. *Avian Pathol.*, **36**, 347–350.
- NAEEM K. (1998). The avian influenza H7N3 outbreak in South Central Asia. Proceedings of the Fourth International Symposium on Avian Influenza, Athens, Georgia, USA. Swayne D.E. & Slemons R.D., eds. U.S. Animal Health Association, 31–35.
- NAGUIB M.M., GRAAF A., FORTIN A., LUTTERMANN C., WERNERY U., AMARIN N., HUSSEIN H.A., SULTAN H., AL ADHADH B., HASSAN M.K., BEER M., MONNE I. & HARDER T.C (2017). Novel real-time PCR-based patho- and phylotyping of potentially zoonotic avian influenza a subtype H5 viruses at risk of incursion into Europe in 2017. *Euro Surveill.*, **22**, 30435. doi: 10.2807/1560-7917.ES.2017.22.1.30435.
- NAGY A., ČERNÍKOVÁ L., KUNTEOVÁ K., DIRBÁKOVÁ Z., THOMAS S.S., SLOMKA M.J., DÁN Á., VARGA T., MÁTÉ M., JIŘINCOVÁ H. & BROWN I.H. (2020). A universal RT-qPCR assay for “One Health” detection of influenza A viruses. *bioRxiv* <https://doi.org/10.1101/2020.06.29.171306>.
- POSTEL A., LETZEL T., FRISCHMANN S., GRUND C., BEER M. & HARDER T (2010). Evaluation of two commercial loop-mediated isothermal amplification assays for detection of avian influenza H5 and H7 hemagglutinin genes. *J. Vet. Diagn. Invest.*, **22**, 61–66.
- RAUW F., PALYA V., VAN B.S., WELBY S., TATAR-KIS T., GARDIN Y., DORSEY K.M., ALY M.M., HASSAN M.K., SOLIMAN M.A., LAMBRECHT B. & VAN DEN BERG T. (2011). Further evidence of antigenic drift and protective efficacy afforded by a recombinant HVT-H5 vaccine against challenge with two antigenically divergent Egyptian clade 2.2.1 IAAP H5N1 strains. *Vaccine*, **29**, 2590–2600. doi: 10.1016/j.vaccine.2011.01.048
- RICHARD-MAZET A., GOUTEBROZE S., LE GROS F.X., SWAYNE D.E. & BUBLLOT M. (2014). Immunogenicity and efficacy of fowlpox-vectored and inactivated avian influenza vaccines alone or in a prime-boost schedule in chickens with maternal antibodies. *Vet. Res.*, **45**:e107. doi: 10.1186/s13567-014-0107-6.
- SCAHL (SUB-COMMITTEE ON ANIMAL HEALTH LABORATORY STANDARDS [AUSTRALIA/NEW ZEALAND]) (2009). SCAHLS Approved Tests. Avian Influenza b-ELISA. http://www.scahls.org.au/new_tests/scahls_approved_tests
- SIMS L.D. (2003). Avian influenza in Hong Kong 1997-2002. *Avian Dis.*, **47**, 832–838. doi: 10.1637/0005-2086-47.s3.832
- SLEMONS R.D. & D.E. SWAYNE (1990). Replication of a waterfowl-origin influenza virus in the kidney and intestine of chickens. *Avian Dis.*, **34**, 277–284.
- SLOMKA M.J., PAVLIDIS T., BANKS J., SHELL W., MCNALLY A., ESSEN S. & BROWN I.H. (2007). Validated H5 Eurasian real-time reverse transcriptase–polymerase chain reaction and its application in H5N1 outbreaks in 2005–2006. *Avian Dis.*, **51**, 373–377.
- SLOMKA M.J., TO T., TONG H., COWARD V., MAWHINNEY I., BANKS J. & BROWN I.H. (2012). Evaluation of lateral flow devices for identification of infected poultry by testing swab and feather specimens during H5N1 highly pathogenic avian influenza outbreaks in Vietnam. *Influenza Other Respir. Viruses*, **6**, 318–327.

- SONG H., NIETO G.R. & PEREZ D.R. (2007). A New Generation of Modified Live-Attenuated Avian Influenza Viruses Using a Two-Strategy Combination as Potential Vaccine Candidates. *J. Virol.*, **17**, 9238–9248. doi: 10.1128/JVI.00893-07.
- SPACKMAN E., IP HS, SUAREZ D.L., SLEMONS R.D. & STALLKNECHT D.E. (2008). Analytical validation of a real-time reverse transcription polymerase chain reaction test for Pan-American lineage H7 subtype Avian influenza viruses. *J. Vet. Diagn. Invest.*, **20**, 612–616.
- 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.
- SPACKMAN E., SENNE D.A., MYERS T.J., BULAGA L.L., GARBER L.P., PERDUE M.L., LOHMAN K., DAUM L.T. & SUAREZ D.L. (2002). Development of a real-time reverse transcriptase PCR assay for type A influenza virus and the avian H5 and H7 hemagglutinin subtypes. *J. Clin. Microbiol.*, **40**, 3256–3260.
- SPACKMAN E. & SUAREZ D.L. (2008). Detection and identification of the H5 hemagglutinin subtype by real-time RT-PCR. *Methods Mol. Biol.*, **436**, 27–33.
- SWAYNE D.E. & KAPCZYNSKI D. (2008). Vaccines, vaccination, and immunology for avian influenza viruses in poultry. In: Avian Influenza. Swayne D.E. ed., Wiley-Blackwell, Ames, Iowa, USA, 407–451.
- SWAYNE D.E., PAVADE G., HAMILTON K., VALLAT B. & MIYAGISHIMA K. (2011). Assessment of national strategies for control of high pathogenicity avian influenza and low pathogenicity notifiable avian influenza in poultry, with emphasis on vaccines and vaccination. *Rev. sci. tech. Off. Int. Epiz.*, **30**, 839–870. doi: 10.20506/rst.30.3.2081
- SWAYNE D.E. & SIMS L. (2020). Avian influenza. In: Veterinary Vaccines: Principles and Applications, Metwally S, El Idrissi M., Viljoen G., eds. Wiley, Chichester, United Kingdom, 229–251.
- SWAYNE D.E., SUAREZ D.L. & SIMS L.D. (2020). Influenza. In: Diseases of Poultry, Fourteenth Edition. Swayne D.E., Boulianne, M., Logue, C., McDougald L.R., Nair, V., & Suarez D.L., eds. Wiley Publishing, Ames, Iowa, USA, 210–256.
- SWAYNE D.E., SUAREZ D.L., SPACKMAN E., JADHAO S., DAUPHIN G., KIM M., MCGRANE J., WEAVER J, DANIELS P., WONG F., SELLECK P., WIYONO A., INDRIANI R., YUPIANA Y., SIREGAR E.S., PRAJITNO T., FOUCHIER R. & SMITH D. (2015). Antibody titer has positive predictive value for vaccine protection against challenge with natural antigenic drift variants of H5N1 high pathogenicity avian influenza viruses from Indonesia. *J. Virol.*, **89**, 3746–3762. doi: 10.1128/JVI.00025-15.
- TONG S., ZHU X., LI Y., SHI M., ZHANG J., BOURGEOIS M., YANG H., CHEN X., RECUENCO S., GOMEZ J., CHEN L.M., JOHNSON A., TAO Y., DREYFUS C., YU W., MCBRIDE R., CARNEY P.J., GILBERT A.T., CHANG J., GUO Z., DAVIS C.T., PAULSON J.C., STEVENS J., RUPPRECHT C.E., HOLMES E.C., WILSON I.A. & DONIS R.O. (2013). New world bats harbor diverse influenza A viruses. *PLoS Pathog.*, **9**, e1003657. doi: 10.1371/journal.ppat.1003657
- VAN DER GOOT J.A., KOCH G., DE JONG M.C. & VAN BOVEN M. (2005). Quantification of the effect of vaccination on transmission of avian influenza (H7N7) in chickens. *Proc. Natl Acad. Sci. USA*, **102**, 18141–18146. doi:10.1073/pnas.0505098102.
- VEITS J., WIESNER D., FUCHS W., HOFFMANN B., GRNZOW H., STARICK E., MUNDT E., SCHIRRMIEIER H., MEBATSION, T., METTENLEITER T.C. & ROMER-OBERDORFER A. (2006). Newcastle disease virus expressing H5 hemagglutinin gene protects chickens against Newcastle disease and avian influenza. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **103**, 8197–8202. DOI: 10.1016/j.vaccine.2007.09.048
- VILLARREAL C. (2007). Experiences in control of avian influenza in the Americas. *Dev. Biol.*, **130**, 53–60.
- WONG S.S., YOON S.W., ZANIN M., SONG M.S., OSHANSKY C., ZARAKET H., SONNBERG S., RUBRUM A., SEILER P., FERGUSON A., KRAUSS S., CARDONA C., WEBBY R.J. & CROSSLEY B. (2014). Characterization of an H4N2 influenza virus from quails with a multibasic motif in the hemagglutinin cleavage site. *Virology*, **468–470**, 72–80. doi: 10.1016/j.virol.2014.07.048
- WOOD G.W., BANKS J., STRONG I., PARSONS G. & ALEXANDER D.J. (1996). An avian influenza virus of H10 subtype that is highly pathogenic for chickens but lacks multiple basic amino acids at the haemagglutinin cleavage site. *Avian Pathol.*, **25**, 799–806.
- WORLD HEALTH ORGANIZATION/WORLD ORGANISATION FOR ANIMAL HEALTH/FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION (WHO/OIE/FAO) H5N1 EVOLUTION WORKING GROUP (2014) Revised and updated nomenclature for highly

pathogenic avian influenza A (H5N1) viruses. *Influenza Other Respir. Viruses*, **8**, 384–388. <https://doi.org/10.1111/irv.12230>

WORLD HEALTH ORGANIZATION EXPERT COMMITTEE (1980). A revision of the system of nomenclature for influenza viruses: a WHO Memorandum. *Bull. WHO*, **58**, 585–591.

ZHANG Y., AEVERMANN B.D., ANDERSON T.K., BURKE D.F., DAUPHIN G., GU Z., HE S., KUMAR S., LARSEN C.N., LEE A.J., LI X., MACKEN C., MAHAFFEY C., PICKETT B.E., REARDON B., SMITH T., STEWART L., SULOWAY C., SUN G., TONG L., VINCENT A.L., WALTERS B., ZAREMBA S., ZHAO H., ZHOU L., ZMASEK C., KLEM E.B. & SCHEUERMANN R.H. (2017). Influenza Research Database: An integrated bioinformatics resource for influenza virus research. *Nucleic Acids Res.*, **45** (D1), D466–D474.

*
* *

NB: Existen Laboratorios de Referencia de la OMSA para la influenza aviar
(puede consultarse la página web de la OMSA:

<https://www.woah.org/es/que-ofrecemos/red-de-expertos/laboratorios-de-referencia/#ui-id-3>)

Por favor, contacte con los Laboratorios de Referencia de la OMSA para información adicional sobre las pruebas de diagnóstico, los reactivos y las vacunas para la influenza aviar.

NB: ADOPTADO POR PRIMERA VEZ EN 1989 COMO INFLUENZA AVIAR (PLAGA DE AVES);
ÚLTIMAS ACTUALIZACIONES ADOPTADAS EN 2021.

DIRECTRICES RELATIVAS A LA BIOPROTECCIÓN DURANTE LA MANIPULACIÓN DE VIRUS DE LA INFLUENZA AVIAR ALTAMENTE PATÓGENA EN LABORATORIOS VETERINARIOS DE DIAGNÓSTICO

INTRODUCCIÓN

La diseminación de virus de la influenza aviar H5Nx de alta patogenicidad por toda Asia, África y Europa ha conllevado un aumento del número de laboratorios que realizan diagnósticos de este agente patógeno. Los virus de la influenza aviar de alta patogenicidad (IAAP), en general suponen una grave amenaza para las aves, y la mortalidad suele alcanzar el 100% en los pollos susceptibles. Además, estos agentes también pueden constituir una grave amenaza zoonótica, puesto que en humanos infectados por el virus de la IAAP H5N1 se han notificado mortalidades de alrededor del 60%. En reconocimiento de la necesidad de una norma relativa a cómo manipular de forma segura estos virus, la OMSA ha establecido las siguientes directrices de biocontención para la manipulación de muestras que puedan contener virus de la IAAP. Se basan 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*, en las recomendaciones de la Organización Mundial de la Salud⁵ y en los *Centers for Disease Control and Prevention*⁶.

NIVELES DE BIOCONTENCIÓN

Las muestras que vayan a someterse a pruebas de diagnóstico para detectar la influenza A de alta patogenicidad mediante las siguientes técnicas no requieren una biocontención de alto nivel pero deben llevarse a cabo a un nivel de bioseguridad y biocontención adecuado, que vendrá determinado por un análisis del riesgo (véase 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*):

- Reacción en cadena de la polimerasa con transcripción inversa (RT-PCR) y RT-PCR en tiempo real
- Pruebas de captura de antígeno
- Serología

Los procedimientos de aislamiento e identificación del virus en los que se manipulen muestras que pudieran contener altos títulos de virus de la IAAP deben, como mínimo, contar con lo siguiente:

- Se debe utilizar equipo de protección personal, que incluirá batas de laboratorio con la parte delantera de una sola pieza, guantes, gafas de seguridad y máscaras de oxígeno de una eficiencia del 95% o superior.
- Las muestras procedentes de aves o animales potencialmente infectados solo pueden procesarse en cabinas de seguridad biológica (CSB) de tipo II o III.
- Las necropsias de aves deben llevarse a cabo en una CSB de Tipo II utilizando protección respiratoria, como una máscara de oxígeno N95, o en una cabina de seguridad biológica Tipo III, u otro dispositivo de contención primaria con una filtración de aire de un 95% de eficiencia o superior.
- Debe llevarse a cabo una centrifugación en recipientes de centrifuga sellados.
- Los rotores de centrifugación deben abrirse y descargarse en una CSB.

⁵ OMS. Directrices sobre bioseguridad en el laboratorio al manipular muestras sospechosas de contener virus de la influenza A aviar, 12 de enero de 2005

⁶ Biosafety in Microbiological and Biomedical Laboratories, 5ª edición. HHS Publication No. (CDC) 21-1112. <https://www.cdc.gov/labs/pdf/CDC-BiosafetyMicrobiologicalBiomedicalLaboratories-2009-P.PDF> 1 de diciembre de 2009.

- Tras el procesado de las muestras deben descontaminarse superficies y equipos de trabajo.
- Todo material contaminado debe descontaminarse esterilizando por autoclave o desinfectando antes de desecharlo, o bien debe incinerarse.

Si se inoculan pollos u otras aves o mamíferos con virus de la IAAP, la inoculación debe llevarse a cabo a un nivel adecuado de biocontención, del siguiente modo:

- Los pollos inoculados deben mantenerse en jaulas de aislamiento u otros dispositivos de contención primaria, o bien en jaulas no de aislamiento/compartimientos en el suelo en salas de contención especialmente diseñadas.
- Las jaulas de aislamiento de los animales deben estar en una instalación independiente que vaya equipada para manipular al nivel adecuado de biocontención para la IAAP.
- En las salas debe haber presión negativa respecto al exterior, y las jaulas debe haber presión negativa respecto a la sala.
- Las jaulas deben disponer de filtro HEPA en las entradas y salidas de aire.
- En las instalaciones para los animales debe disponerse de una cabina de bioseguridad u otros dispositivos de contención primaria para llevar a cabo exámenes post-mortem y para obtener muestras.

*
* *