

LARINGOTRAQUEITIS INFECCIOSA AVIAR

RESUMEN

La laringotraqueitis infecciosa aviar (LTI) es una enfermedad respiratoria causada por el herpesvirus tipo 1 de las gallináceas, perteneciente a la familia Herpesviridae, tribu alfaherpesvirinae. Es, sobre todo, una enfermedad de los pollos, aunque también puede afectar a los faisanes, a las perdices y a los pavos. Los signos clínicos y las reacciones patológicas pueden variar desde una gravedad extrema, con muertes de aves por asfixia, hasta una muy leve, no diferenciable de otras enfermedades respiratorias leves de los pollos. La lesión más importante es la traqueitis.

El diagnóstico de laboratorio depende del aislamiento del virus, de la demostración de la presencia del virus o de antígenos víricos y de la detección de anticuerpos específicos en el suero. Puede ser valioso el examen histopatológico de la traquea para inclusiones intranucleares características.

Identificación del agente: *El aislamiento del virus puede hacerse por inoculación de material sospechoso en la membrana corioalantoidea desprendida de huevos embrionados o en cultivos de células embrionarias de aves. Estos métodos requieren mucho tiempo, pero son sensibles. Entre los métodos rápidos, están la microscopía electrónica directa de exudado traqueal, inmunofluorescencia de exudado traqueal o de secciones congeladas, inmunodifusión en gel de agar (IGDA) para detectar antígenos víricos en muestras traqueales o en material de huevos infectados y el enzoinmunoensayo (ELISA) para detectar antígeno vírico en los raspados de mucosa. Se ha dicho que las técnicas moleculares en las que se utiliza el procedimiento de la reacción en cadena de la polimerasa son más sensibles que el aislamiento del virus para el examen del material clínico y probablemente serán más utilizadas en el futuro. Puede ser necesario el aislamiento del virus si estas pruebas son negativas o no concluyentes.*

Pruebas serológicas: *Los anticuerpos contra el virus de la (LTI) pueden detectarse mediante pruebas de neutralización vírica realizadas en huevos o en cultivo celulares, por reacciones mediante la utilización del IGDA, por inmunofluorescencia indirecta o por ELISA.*

Requisitos para las vacunas y los materiales de diagnóstico: *Generalmente, las vacunas contra LTI se preparan a partir de virus vivos atenuados. Los virus de los que se dispone actualmente proporcionan cierto grado de protección pero no son completamente satisfactorios.*

A. INTRODUCCIÓN

La laringotraqueitis infecciosa aviar (LTI) es una enfermedad respiratoria de los pollos causada por un alphaherpesvirus. Tal enfermedad puede afectar también a los faisanes, las perdices y los pavos. Las principales características de la enfermedad en su forma virulenta son la historia, los signos clínicos y las lesiones traqueales severas, pero en la forma leve puede no distinguirse de otras enfermedades respiratorias leves. El diagnóstico del laboratorio depende de la detección de la presencia del virus, de antígenos víricos o de anticuerpos específicos en el suero (14).

Desde el punto de vista clínico, la enfermedad puede aparecer en tres formas: hiperaguda, subaguda y crónica o leve. En la forma hiperaguda, el comienzo de la enfermedad es repentino con una propagación rápida. La morbilidad es alta y la mortalidad puede exceder el 50%. Algunas aves pueden morir en buenas condiciones corporales antes de la aparición de signos que son característicos y que conllevan dificultad en la respiración, con extensión del cuello y jadeos en un intento por respirar. También se producen gorgoteos, crepitaciones y tos cuando las aves tratan de expulsar las obstrucciones de la tráquea. La tos puede producir expulsión de coágulos de sangre que pueden encontrarse en el suelo y en las paredes de la casa. Son también característicos los

cambios post-mortem, que están limitados al tracto respiratorio superior y consisten en traqueitis hemorrágica con coágulos de sangre, rinitis mucoide y mocos manchados de sangre a lo largo de la tráquea.

En la forma subaguda, el comienzo de la enfermedad es lento, y los signos respiratorios se pueden extender durante algunos días antes de que se produzcan las muertes. La morbilidad es alta pero la mortalidad es menor que la de la forma hiperaguda, entre un 10% y un 30%. Los hallazgos post-mortem son menos severos y consisten en exudado mucoide con o sin sangre en la tráquea. Se pueden encontrar membranas diftéricas caseosas amarillas adheridas a la laringe y a la mucosa traqueal superior.

Se puede observar la forma crónica o leve de la LTI entre los supervivientes de cualquiera de las formas de la enfermedad mencionadas anteriormente, aunque algunos de los focos pueden ser muy leves. La incidencia de la LTI crónica dentro de una bandada puede ser de sólo un 1–2%, y la mayoría de las aves afectadas mueren asfixiadas. Los signos son espasmos de tos y jadeos con descargas nasales y orales y disminución de la producción de huevos. En el examen post-mortem, se encuentran placas y tapones necróticos, caseosos y dipitéricos en la tráquea, laringe y boca. Los brotes de la forma leve de LTI pueden afectar a gran número de aves de forma simultánea, en cuyo caso la mayor parte de las lesiones pueden consistir tan sólo en conjuntivitis, sinusitis y traqueitis mucoide. Dado que la transmisión de LTI tiene lugar por contacto directo, la transmisión es más lenta en las baterías de cría que cuando las aves no están enjauladas, y la ruta de infección puede ser visible cuando se utilizan baterías de cría.

B. TÉCNICAS DE DIAGNÓSTICO

1. Identificación del agente

El virus puede aislarse en hígado de embrión de pollo (13) en riñón de embrión de pollo (6) o en cultivo de células renales de pollo (18). Se ha encontrado que la forma más sensible de aislamiento es la utilización de monocapas de las células del hígado de embrión de pollo. (8). El virus también puede crecer en la membrana corioalantoidea desprendida (CAM) de huevos de pollo embrionados que están libres de patógenos específicos, que tengan entre 10 y 12 días (9).

El herpesvirus causante se puede detectar en exudado traqueal mediante microscopía electrónica (18). Los antígenos víricos pueden detectarse mediante inmunofluorescencia (4, 19), inmunodifusión en gel de agar (IGDA) (10) o ensayo de inmunoadsorción enzimática (ELISA), utilizando raspados de la mucosa traqueal (21). También puede ser útil el examen histopatológico de la tráquea para detectar inclusiones intranucleares típicas del herpesvirus. (3, 15). Se han descrito métodos de detección del virus de la LTI en los que se utiliza la reacción en cadena de la polimerasa (PCR), y se ha dicho que la PCR es generalmente más sensible que el aislamiento del virus (2, 11, 12, 20).

a) Aislamiento del virus

Cuando se toman muestras de aves vivas para el aislamiento del virus, los frotis traqueales son mejores que los frotis orofaríngeos o conjuntivos. Estos se colocan en medio de transporte que contenga antibióticos. Cuando se selecciona material para el aislamiento del virus a partir de brotes crónicos, es más productivo sacrificar un ave en las primeras etapas de la infección que intentar aislar el virus de un ave que ha muerto por asfixia después de una enfermedad prolongada. La calidad de la muestra puede mejorarse aún más si se sacrifica el ave con barbitúricos u otra inyección en vez de por dislocación cervical. Se pueden presentar la cabeza y el cuello completos de las aves muertas, o sólo la tráquea y la laringe después de separar ambas con la menor contaminación posible. Las tráqueas deben transportarse en caldo de antibiótico para el aislamiento del virus, pero envueltas en papel de seda húmedo si se van a someter a microscopía electrónica. Cualquier almacenamiento prolongado de tejidos infectados debe hacerse a –70°C o menos para minimizar la pérdida del título del virus. Debe evitarse la repetición de congelaciones y descongelaciones pues disminuirían la infectividad del virus.

El exudado y las células epiteliales se raspan de la tráquea y se diluye aproximadamente 1/5 en caldo nutritivo que contenga penicilina y estreptomina, y se agita vigorosamente. La suspensión resultante se centrifuga a baja velocidad para remover los residuos y se inocula 0.1 ml del fluido sobrenadante en la CAM desprendida de al menos 3 de los huevos de pollo embrionados que tengan entre 10–12 días de incubación. Los huevos se sellan con cera de parafina y se incuban a 37°C durante un máximo de 7 días. Dichos huevos se miran al trasluz diariamente, y las CAMs de los embriones muertos o de aquellos que sobrevivan 7 días, se examinan para ver si hay postillas típicas. Alternativamente, se inoculan al menos dos hígados de embrión de pollo confluyente o monocapas de células renales de embrión de pollo, a los que se les ha retirado el medio, y se permite la absorción durante 1–2 horas. Los cultivos se cubren con medio fresco, se incuban durante 7 días y se examinan diariamente con el microscopio para buscar la evidencia del efecto citopático (ECP) de las células sincitiales características.

En cada caso pueden ser necesarios hasta tres pases de material antes de que un espécimen pueda considerarse negativo. El aislamiento del virus puede confirmarse como virus de la LTI mediante una prueba de neutralización en huevos o en cultivo celular utilizando antisuero hiperinmune al virus de la LTI. De forma alternativa, las partículas del virus se pueden identificar rápidamente en fluido de cultivo celular o en postillas sobre CAMs mediante microscopía electrónica, y los antígenos víricos pueden detectarse por inmunofluorescencia en cultivos de células infectadas por el virus de LTI, fijadas en acetona o en secciones congeladas de CAM.

b) Microscopía electrónica

Para detectar la presencia del virus mediante microscopía electrónica, el exudado traqueal o los raspados epiteliales de la tráquea se colocan en el porta y se mezclan con unas gotas de agua destilada. Se coloca una gota de suspensión en una rejilla cubierta de carbono y formvar y se deja durante 2 minutos, después de lo cual se remueve el exceso de humedad utilizando papel de filtro. Se añade una gota de ácido fosfotúngstico al 4%, pH 6.4, y el exceso se remueve después de otros 3 minutos. Se deja que la rejilla se seque completamente y se examina utilizando el microscopio electrónico a una magnificación de x 30–45,000 para detectar si hay partículas características de herpesvirus.

c) Inmunofluorescencia

En las pruebas de inmunofluorescencia para antígenos víricos, los raspados de las células epiteliales de la tráquea se colocan en un portaobjetos. Alternativamente, se pueden utilizar pequeñas secciones congeladas de tráquea de 5 µm de grosor. Las preparaciones se fijan en acetona a temperatura ambiente durante 10 minutos. Estas se pueden teñir directamente aplicando inmunoglobulina de virus anti LTI de pollo marcado con isocianato de fluoresceína (FITC) durante 1 hora, seguido de un aclarado en un baño de solución salina tamponada con fosfato (PBS), pH 7,2, durante 15 minutos y se agita con un agitador mecánico. Otra opción es utilizar tinción indirecta, aplicando una dilución apropiada de suero anti LTI de pollo durante 1 hora. El porta se enjuaga cuidadosamente con PBS durante 15 minutos como se indicó anteriormente y se aplica durante 30 minutos una inmunoglobulina antipollo marcada con FITC. Después de un aclarado final, se aplican los cubres sobre un líquido de montaje permanente. Se examinan los preparados para fluorescencia intranuclear específica en las células epiteliales utilizando un microscopio con iluminación ultravioleta epifluorescente. Entre los controles apropiados está la utilización de especímenes que se sepa que no están infectados y, para el método indirecto, la aplicación de un suero de pollo no inmune. Debe tenerse especial cuidado en la lectura de los preparados de inmunofluorescencia indirecta, ya que la existencia de IgG endógena de pollo puede causar en la tráquea un acoplamiento no deseado de IgG antipollo marcado con FITC.

d) Inmunodifusión en gel de agar

Los antígenos víricos de LTI se pueden detectar por medio de pruebas IGDA realizadas en exudado traqueal, CAMs infectadas y material de cultivo celular infectado, utilizando antisuero hiperinmune del virus LTI. El gel se elabora con agar Noble (1,5%) que contenga cloruro de sodio (8%) y azida de sodio (0,02%), como conservante, en agua destilada. Los ingredientes se esterilizan en el autoclave a una presión de 15 libras por pulgada cuadrada (2,4 bares), durante 15 minutos; se vierte 5 ml del agar líquido en una placa de Petri de 5 cm de diámetro. Cuando el agar se ha fijado, se excava en el agar un conjunto de pocillos compuesto de un pocillo central rodeado de otros seis. Normalmente los pocillos tienen 8 mm de diámetro, con una separación de 4 mm. entre pocillos. Se pipetea el suero hiperinmune dentro del pocillo central, mientras que los pocillos que lo rodean se llenan con muestras del virus sospecho que se va a probar, pero con al menos un pocillo que contenga el antígeno vírico positivo. Las cubetas se incuban en una atmósfera húmeda a temperatura ambiente o a 37°C y se examinan 24–48 horas más tarde mediante iluminación oblicua en busca de líneas de precipitación (identidad de reacciones). Las pruebas deberían incluir como controles, material no infectado como antígeno negativo y antisuero negativo conocido. Para economizar materiales, las pruebas pueden realizarse en una microescala – el agar se vierte sobre un porta en forma de capa fina y se excavan orificios de 4 mm. de diámetro, con una separación de 2 mm. entre pares de pocillos.

e) Enzimoimmunoensayo

Cuando se utiliza un ELISA de anticuerpo monoclonal (Mab) para detectar antígenos víricos (16), se mezcla exudado traqueal con un volumen igual de PBS que contenga 1% (v/v) de un detergente, como por ejemplo, Nonidet P40 (BDH Chemicals, Poole, Reino Unido); luego se pasa por el vortex durante 30 segundos y se centrifuga a 10 *g* durante un minuto. El fluido sobrenadante se vierte en pocillos de placas de microtitulación de 50 µl volúmenes, previamente recubiertas con IgG de conejo contra el virus de la LTI, diluido 1/200 en 0.05 M de carbonato/bicarbonato tamponado, pH 9.0, y se incuba durante una hora. Luego se añade a cada pocillo 0 µl de Mab contra las glucoproteínas principales del virus LTI, diluido a 1/50 en PBS, y a continuación se añade 50 µl de una dilución de 1/1.000 de conjugado de IgG de cabra antirratón a peroxidasa de rabano rusticano, y purificado por cromatografía de afinidad. El sustrato, es decir, el ácido aminosalicílico-5 (6.5 mM), se añade a los pocillos en volúmenes de 100 µl. Después de 30 minutos, las placas se leen en un espectrofotómetro a 450 nm y la lectura de absorbancia para cada uno de los pocillos se corrige restando la lectura obtenida para los pocillos que contengan tampón diluyente en lugar de

exudado traqueal. El punto de corte positivo o negativo se toma como el valor principal de absorbancia para varias muestras negativas (es decir, material traqueal sin virus de la LTI), más 3 desviaciones estándar.

f) Histopatología

Las traqueas a utilizar en el examen histopatológico deberían colocarse en formol salino y envolverse en cera de parafina inmediatamente después de ser extraídas de las aves. Las inclusiones intranucleares pueden verse en las células epiteliales de la tráquea en secciones longitudinales después de la tinción con hematoxilina y eosina. Se trata de las típicas inclusiones de herpesvirus denominadas tipo A Cowdry, pero pueden estar presentes durante sólo 3–5 días después de la infección. En los casos graves en que la mayoría de las células infectadas se han desprendido del revestimiento de la tráquea, las inclusiones se pueden ver en células sanas entre los restos celulares del lumen de la tráquea.

g) Métodos moleculares

Se ha informado de métodos moleculares para la identificación del ADN del virus de la LTI en muestras clínicas (11, 12, 20). Se ha demostrado que las pruebas de hibridación Dot-blot y los fragmentos de ADN vírico clonados son muy sensibles para la detección del virus cuando el aislamiento y el ELISA son negativos (11, 12).

Se ha demostrado que, tratándose de muestras clínicas, la PCR es más sensible que el aislamiento del virus, especialmente, cuando están presentes otros virus contaminantes tales como adenovirus (20). Alexander & Nagy (2) encontraron que, desde la fase media hasta la fase final de la infección, la PCR y el aislamiento del virus eran similares en sensibilidad, pero la PCR fue superior en la fase de recuperación.

Un problema con los métodos de detección del virus de LTI es que, hasta la fecha, no han sido capaces de diferenciar entre las cepas de campo y las cepas vacunales. Esto parece haber sido superado por Chang *et al.* (5), que utilizaron la PCR en conjunción con el análisis del polimorfismo de fragmentos de restricción (PCR-RFLP).

Esta aproximación también parecía ofrecer un mejor entendimiento de la epidemiología y evolución del virus de la LTI. En efecto, un análisis de las cepas coreanas del virus de la LTI por PCR-RFLP, que clasifica el virus de acuerdo a los genes de quinasa timidina y glucoproteína, dio como resultado que el método podría usarse para distinguir entre cepas de virulencia alta y cepas de virulencia baja.

2. Pruebas serológicas

Los anticuerpos contra el virus de la LTI en suero de pollo, pueden detectarse por neutralización del virus (NV), por IGDA, por pruebas de inmunofluorescencia indirecta y por ELISA (1).

a) Neutralización vírica

Las pruebas de neutralización vírica pueden realizarse con CAMs desprendidas de huevos de pollo embrionarios que hayan sido incubados durante 9–11 días, en las que el anticuerpo neutraliza específicamente la formación de pústula debido al virus de la LTI. Alternativamente, las pruebas pueden llevarse a cabo en cultivos celulares en los que el anticuerpo neutraliza específicamente al virus de la LTI y de este modo se previene el ECP. Se añaden diluciones dobles de suero a volúmenes iguales de una concentración constante de virus. Esta concentración puede ser o bien 100 veces las dosis (EID_{50}) infecciosas medias de huevo para inoculaciones de huevos, o 100 veces las dosis infecciosas medias de cultivo de tejido ($DICT_{50}$), para la inoculación de cultivos. Las mezclas se incuban a 37°C durante una hora para permitir cualquier neutralización.

Cuando se realiza la prueba en huevos, las mezclas de virus/suero se inoculan en las CAMs desprendidas, utilizando al menos 5 huevos por dilución. Los huevos se sellan e incuban a 37°C durante 6–7 días. El punto final se registra como la dilución más alta del suero en las que no aparecen pústulas en las CAMs. Cuando las pruebas se realizan en cultivos celulares, las diluciones de suero se preparan en placas de microtitulación de 96 pocillos y a continuación se añade el virus. Después del período de neutralización, se añade a cada pocillo, células de hígado o riñón de embrión de pollo recién preparadas. Las placas se incuban a 37°C en una atmósfera de CO_2 al 5% y se examinan diariamente para EPC; después de unos 4 días se lee el 50% de los puntos finales cuando el título control del virus indica que se han utilizado en la prueba 30–300 $DICT_{50}$ de virus. Para el método de prueba en cultivo celular, la neutralización vírica a 1/8 (de la dilución inicial) o mayor, se considera positiva.

b) Inmunodifusión en gel de agar

Para las pruebas IGDA, el antígeno se prepara a partir de CAMs infectadas por virus o cultivos celulares infectados. Para las primeras, se inocula al menos 10^4 $DICT_{50}$ del virus de la LTI en la cavidad alantoidea de un grupo de huevos de pollo libres de patógenos embrionarios específicos (SPF) de 10 días de edad.

Las CAMs se recogen después de 4 días de incubación y las que tengan pústulas grandes se homogenizan y se sonicán en una pequeña cantidad de PBS, pH 7.1. Alternativamente, las monocapas muy infectadas de hígado o de riñón de embrión de pollo o células de riñón de pollo se incuban a 37°C hasta que el ECP sea máximo. Las células adheridas restantes se raspan del recipiente de cultivo y se añaden al medio. El material total recogido del cultivo puede concentrarse hasta 100 veces mediante diálisis frente a polietilén glicol (PEG 20.000 o PEG 30.000) (5) Para la prueba, el agar se prepara como se describió anteriormente en relación con la detección del antígeno, pero, esta vez, la CAM o antígeno de cultivo celular se coloca en el pocillo central, y los sueros problema en los pocillos circundantes. Los antisueros positivos y negativos conocidos se incorporan a la prueba, la cual se lee después de una incubación de 24–48 horas de incubación a temperatura ambiente o a 37°C. Las pruebas IGDA son simples, económicas de realizar y útiles para la selección de la bandada, aunque son menos sensibles que otros métodos.

c) Prueba de inmunofluorescencia indirecta

Para pruebas de inmunofluorescencia indirectas, el antígeno consiste en monocapas de cultivo celular infectadas con el virus de la LTI cultivadas en portas de puntos múltiples recubiertos con teflón. Cuando el ECP está empezando a desarrollarse, los cultivos se fijan en acetona durante 10 minutos. Las diluciones de los sueros problema preparados en PBS se aplican a cada cultivo de puntos y los portas se incuban a 37°C durante una hora. Los portas se lavan en PBS como se describió anteriormente, se vacían y se tratan con una dilución apropiada de un IgG anti-pollo de conejo marcado con FITC y disponible comercialmente. Después de la incubación a 37°C durante una hora, los portas se lavan de nuevo y los cubres se aplican sobre líquido de montaje permanente. Dichos portas se examinan por epifluorescencia con iluminación ultravioleta y los títulos de punto final se leen como las diluciones de sueros más altas que producen tinción fluorescente específica. Esta prueba es más sensible que la IGDA, pero la interpretación de los resultados puede ser subjetiva.

d) Enzimoimmunoensayo

El antígeno para ELISA se obtiene por sonicación de cultivos celulares muy infectados en el momento del efecto citopático máximo, el cual es entonces absorbido dentro de los pocillos de las placas de microtitulación. Se obtiene un antígeno negativo mediante material de cultivo celular no infectado que se haya tratado de la misma forma. La prueba consiste fundamentalmente en la adición de 0,1 ml de diluciones al 1/10 de los sueros problema para duplicar los pocillos recubiertos con antígeno positivo o negativo. Después de la incubación a 37°C durante dos horas, las placas se lavan cuatro veces y se añade una dilución al 1/4000 de IgG antipollo de conejo conjugado con peroxidasa. Después de la incubación a 37°C durante una hora, las placas se lavan de nuevo 4 veces. Finalmente, se añade a cada pocillo un substrato consistente en ácido 5 aminosalicílico, y a continuación peróxido de hidrógeno a una concentración final de 0.0005% y la absorbancia del fluido en cada pocillo se lee en un espectrofotómetro a 450nm. El resultado de cada suero se expresa como la diferencia entre la absorbancia media producida con los antígenos positivo y negativo. El punto de corte positivo/negativo se toma como el valor de absorbancia media para numerosos sueros negativos más 3 desviaciones estándar. La prueba es muy sensible y posiblemente es la mejor de las disponibles a efectos de monitorización. También está disponible comercialmente un kit ELISA para anticuerpos de laringotraqueitis en aves de corral.

C. REQUISITOS PARA LAS VACUNAS Y LOS MATERIALES DE DIAGNÓSTICO

La LTI se controla generalmente con vacunas vivas, aunque las vacunas inactivadas también se han utilizado por razones de seguridad. El inóculo del virus vivo es una cepa convenientemente atenuada o naturalmente avirulenta del virus de la LTI. Las vacunas pueden administrarse en colirio, aerosol o agua potable. Si se administran por aerosol y se produce e inhala una pequeña gota, la enfermedad clínica puede precipitarse. Los pollos jóvenes pueden requerir vacunación en zonas endémicas, pero muestran reacciones más graves a la vacuna. Pueden requerirse dosis repetidas para conseguir una buena protección. El nivel de virulencia del virus de la vacuna es crítico. Las cepas de virulencia leve pueden no ser efectivas y las de virulencia más alta, pueden causar enfermedad grave. La vía de administración por aerosol requiere que se tenga cuidado con el tamaño de la gota y la uniformidad en la aplicación. Puede ser más efectiva con cepas de virulencia leve, pero puede ser más peligroso con cepas muy virulentas. En la actualidad, con las vacunas disponibles se trata de establecer un compromiso entre una falta de eficacia y una escasa seguridad. Debido a la persistencia del virus de la vacuna virulenta en una zona, puede ser difícil discontinuar la vacunación una vez se ha iniciado la misma. Infecciones subclínicas mixtas de vacuna y virus de campo en aves vacunadas, pueden causar enfermedad grave en contacto con aves cercanas no vacunadas.

En el Capítulo I.1.7. *Principios para la producción de vacunas veterinarias*, se dan directrices para la producción de dichas vacunas. Las directrices dadas en el presente capítulo y en el capítulo I.1.7, son de carácter general y se pueden complementar con requisitos a nivel nacional o regional (p. ej., Ref. 17)

1. Control del inóculo

a) Características del inóculo

Se selecciona el virus del inóculo primario (MSV) y se puede propagar en embriones de pollo SPF o en cultivos de tejido derivados de tales embriones. El MSV se prueba en embriones de pollo o en pollos con los siguientes fines: 1) pureza, 2) *Mycoplasma* spp., 3) *Salmonella* spp., 4) virus de la leukosis aviar, 5) virus de hemaglutinación, 6) identidad del virus y 7) patógenos extraños. Adicionalmente, las pruebas iniciales se realizan para demostrar la inocuidad y la eficacia del inóculo original seleccionado. La prueba de seguridad del MSV debería incluir pruebas muestren ausencia de retorno a la virulencia en pases seriados y también la seguridad en las aves. También se requiere evidencia de siembra y diseminación. El MSV se almacena en alícuotas a -70°C . El MSV no debería causar mortalidad o reacción respiratoria grave en los pollos después de la instilación ocular, aunque los faisanes son más susceptibles. Es conveniente la administración por aerosol, pero ésta puede causar enfermedad respiratoria bastante grave en algunas bandadas.

b) Método de cultivo

En la producción de vacunas a gran escala, el virus se propaga en embriones de pollo SPF o en cultivos de tejido derivados de tales embriones hasta el quinto pase del MSV. El nivel de pases aceptable se apoya experimentalmente en el nivel de pase utilizado para preparar el producto experimental utilizado en el análisis de la eficacia.

c) Validación como vacuna

Debe llevarse a cabo una prueba para establecer la eficacia de la vacuna en las aves más jóvenes a las cuales va destinado el producto y también para cada especie aviar. Esta prueba debe repetirse en lotes posteriores de pollos para cada ruta de administración recomendada y/o edad del ave. Tres semanas más tarde (o 10–14 días en EE.UU.), las aves, junto con 10 controles de la misma edad y fuente, se desafían intratraquealmente o en el seno orbital con una cepa del virus de la LTI que tenga una virulencia elevada conocida. Para que sea satisfactorio, sólo el 5% de las aves vacunadas deberían morir o mostrar signos graves de LTI. No más de 4 deberían mostrar signos leves de LTI. Al menos 8 de los controles deberían morir o mostrar signos graves de LTI.

2. Método de producción

La vacuna se fabrica por inoculación del virus del inóculo de producción en embriones de pollo que tengan entre 9 y 11 días o en cultivo de tejido preparado a partir de embriones de pollo derivados de bandadas SPF. Los huevos se inoculan en la CAM desprendida a través de un agujero en la cáscara. Estos se sellan y se incuban a 37°C durante 4–6 días. Todos los huevos deben mirarse al trasluz antes de la recolección y deben utilizarse sólo los que contengan embriones vivos. Para recolectar el virus, se enfrían los huevos, luego se limpian y se abren de forma aséptica. Las CAMs y los fluidos se mezclan en recipientes esterilizados y enfriados. Las CAMs deberían mostrar las placas grises y espesas típicas del crecimiento del virus de la LTI. El producto derivado del cultivo de tejido se prepararía a partir de los fluidos de cultivos celulares que contienen los virus, los cuales también se mezclarían y probarían a continuación.

3. Control del proceso

Los cultivos de tejido infectados o los homogenizados de cultivo de tejido se pueden probar para pureza, potencia y contenido vírico, mezclándolo con un estabilizador (generalmente con peptona y sacarosa, y luego se liofiliza y almacena a 4°C).

4. Control de lotes

a) Esterilidad

En el Capítulo I.1.5, se describen las pruebas de esterilidad y las pruebas para comprobar que los materiales biológicos están libres de contaminación.

b) Inocuidad

Utilizando la ruta de administración recomendada, cada lote de vacunas se prueba en 10 pollos SPF o en 10 aves de otras especies diana, utilizando 10 dosis por cada ave. Se observan las aves durante al menos 21 días para observar los efectos adversos atribuibles a la vacuna.

c) Potencia

Una vez se ha establecido la eficacia *in-vivo* de la vacuna, se puede determinar la potencia del lote, midiendo el contenido del virus. Se inoculan diluciones seriadas de la vacuna en la CAM desprendida de embriones de pollo SPF de 11 días de edad, utilizando al menos 7 huevos por dilución en un volumen de 100 µl. Los huevos se incuban durante 5 días y el título del virus se calcula mediante observación de las lesiones características en las CAMs. El contenido en virus debería ser igual o superior al nivel de virus en el producto comercializado y superior también al título vírico en el producto antes de su fecha de caducidad. Tanto el título de expedición como el de caducidad se basan en la dosis mínima de protección descrita anteriormente.

d) Duración de la inmunidad

Los resultados de la vacunación dependerán de varios factores que incluyen el momento de la dosis y la ruta de administración. Debería proveerse cierto grado de protección durante un período de varios meses.

e) Estabilidad

La estabilidad se prueba tomando muestras de vacunas correctamente almacenadas a intervalos y midiendo el contenido vírico. Las pruebas deberían realizarse sobre al menos 6 lotes de la vacuna o hasta que se haya evaluado un número de pases seriados estadísticamente válido, y se deberían seguir realizando durante 3 meses a partir de la fecha de caducidad aducida.

f) Conservantes

Los conservantes no son necesarios, pero pueden añadirse algunos antibióticos a la recogida de los tejidos o a un montaje en serie durante la producción. En los productos autorizados en los Estados Unidos, algunos antibióticos añadidos se hacen constar en la etiqueta.

g) Precauciones (riesgos)

Debería tenerse cuidado en la dilución y administración de la vacuna así como también en la utilización adecuada de nuevas vacunas.

5. Pruebas sobre el producto final

a) Inocuidad

En los Estados Unidos, se inyectaron intratraquealmente 25 pollos susceptibles y se observaron durante 14 días. Las muertes se cuentan como fallos. Se permiten cuatro fallos o menos para series satisfactorias. En la Unión Europea se realizan pruebas de contenido vírico. Normalmente, el título vírico no debe ser mayor de una décima parte de la dosis a la que se ha demostrado que la vacuna es inocua.

b) Potencia

La prueba del contenido vírico (véase anteriormente), puede utilizarse como medida de potencia. No debe ser inferior al título de expedición mínimo acordado. Cada serie o subserie debe tener un título vírico 10^7 superior a la dosis mínima de protección, pero no inferior a la dosis 10^{25} EID₅₀ (o DICC/T₅₀ para el producto preparado en cultivo de tejido).

c) Prueba del producto final

La ausencia de patógenos en los pollos debería confirmarse en embriones o en pollos. También debería confirmarse mediante pruebas para *Mycoplasma* spp., *Salmonella* spp., virus de la leukosis aviar y virus en hemaglutinación.

REFERENCIAS

1. ADAIR B.M., TODD D., MCKILLOP E.R. & BURNS K. (1985). Comparison of serological tests for the detection of antibodies to infectious laryngotracheitis virus. *Avian Pathol.*, **14**, 461–469.
2. ALEXANDER H.S. & NAGY E. (1997). Polymerase chain reaction to detect infectious laryngotracheitis virus in conjunctival swabs from experimentally infected chickens. *Avian Dis.*, **41**, 646–653.
3. ARMSTRONG W.H. (1959). A slide smear technique for the diagnosis of laryngotracheitis. *Avian Dis.*, **3**, 80–84.

4. BRAUNE M.O. & GENTRY R.F. (1985). Standardization of the fluorescent antibody technique for the detection of avian respiratory viruses. *Avian Dis.*, **9**, 535–545.
5. CHANG P.C., LEE Y.L., SHIEN J.H. & SHIEH H. K. (1997). Rapid differentiation of vaccine strains and field isolates of infectious laryngotracheitis virus by restriction fragment length polymorphism of PCR products. *J. Virol. Methods*, **66**, 179–186.
6. CHANG P.W., YATES V.J., DARDIRI A.H. & FRY D.E. (1960). Some observations of the propagation of infectious laryngotracheitis virus in tissue culture. *Avian Dis.*, **4**, 484–490.
7. HAN M.G. & SIM S.J. (2001). Analysis of Korean strains of infectious laryngotracheitis virus by nucleotide sequences and restriction fragment length polymorphism. *Vet. Microbiol.*, **83**, 321–331.
8. HUGHES C.S. & JONES R.C. (1988). Comparison of methods of isolation of infectious laryngotracheitis from field material. *Avian Pathol.*, **17**, 295–303.
9. JORDAN F.T.W. (1964). Diagnosis of infectious laryngotracheitis by chick embryo inoculation. *J. Comp. Pathol.*, **74**, 119–128.
10. JORDAN F.T.W. & CHUBB R.C. (1962). The agar gel diffusion technique in the diagnosis of infectious laryngotracheitis (ILT) and its differentiation from fowl pox. *Res. Vet. Sci.*, **3**, 245–255.
11. KEAM L., YORK J.J., SHEPPARD M. & FAHEY K.J. (1991). Detection of infectious laryngotracheitis virus in chickens using a non-radioactive DNA probe. *Avian Dis.*, **35**, 257–262.
12. KEY D.W., GOUGH B.C., DERBYSHIRE J.B. & NAGY E. (1994). Development and evaluation of a non-isotypically labeled DNA probe for the diagnosis of infectious laryngotracheitis. *Avian Dis.*, **38**, 467–474.
13. McNULTY M.S., ALLAN G.M. & McCracken R.M. (1985). Infectious laryngotracheitis in Ireland. *Irish Vet. J.*, **39**, 124–125.
14. MEULEMANS G. & HALEN P. (1978). A comparison of three methods of diagnosis of infectious laryngotracheitis. *Avian Pathol.*, **7**, 433–436.
15. PIROZOK R.P., HELMBOLDT C.F. & JUNGHERR E.L. (1957). A rapid histological technique for the diagnosis of avian infectious laryngotracheitis. *J. Am. Vet. Med. Assoc.*, **130**, 406–407.
16. SCHOLZ E., PORTER R.E. & GUO P.X. (1994). Differential diagnosis of infectious laryngotracheitis from other avian respiratory diseases by a simplified PCR procedure. *J. Virol. Methods*, **50**, 313–321.
17. UNITED STATES DEPARTMENT OF AGRICULTURE (2000). Code of Federal Regulations, Part 9, Section 113.328, Fowl Laryngotracheitis Vaccine. US Government Printing Office. Washington DC, USA.
18. VAN KAMMEN A. & SPADBROW P.B. (1976). Rapid diagnosis of some avian virus diseases. *Avian Dis.*, **20**, 748–751.
19. WILKS C.R. & KOGAN V.G. (1979). An immunofluorescence diagnostic test for avian infectious laryngotracheitis. *Aust. Vet. J.*, **55**, 385–388.
20. WILLIAMS R.A., SAVAGE C.E. & JONES R.C. (1994). A comparison of direct electron microscopy, virus isolation and a DNA amplification method for the detection of avian infectious laryngotracheitis virus in field material. *Avian Pathol.*, **23**, 709–720.
21. YORK J.J. & FAHEY K.J. (1988). Diagnosis of infectious laryngotracheitis using a monoclonal antibody ELISA. *Avian Pathol.*, **17**, 173–182.

*
* *