

FIEBRE AFTOSA

RESUMEN

La fiebre aftosa (FA) o glosopeda es la enfermedad más contagiosa de los mamíferos y posee un gran potencial para causar graves pérdidas económicas en animales ungulados de pezuña hendida. Existen siete serotipos del virus de la FA, que son O, A, C, SAT1, SAT2, SAT3 y Asia1. La infección con un serotipo no confiere protección frente a otro. Clínicamente, la FA no se puede diferenciar de otras enfermedades vesiculares, como la enfermedad vesicular porcina, estomatitis vesicular y el exantema vesicular. El diagnóstico de laboratorio en los casos de sospecha de FA es por tanto un asunto de urgencia.

*Los casos típicos de FA se caracterizan por la aparición de vesículas en las patas, la mucosa bucal y, en el caso de las hembras, en las mamas. Los síntomas clínicos varían desde ligeros a graves y pueden ocasionar muerte, en especial en animales jóvenes. En algunas especies, la infección puede ser subclínica, como en el búfalo africano (*Syncerus caffer*). El mejor tejido para el diagnóstico es el epitelio de vesículas intactas o recién rotas o del líquido vesicular. Cuando no es posible tomar esta muestra, una fuente alternativa de virus son las muestras de sangre y/o de líquido faringoesofágico tomadas con sonda en los ruminantes o por frotis de garganta en el caso de los cerdos. En casos de muerte se puede enviar tejido del miocardio o sangre pero, si están presentes las vesículas, éstas son preferibles.*

Es importante que el transporte de muestras de casos sospechosos sea seguro y adaptado a normas internacionales. Sólo deben enviarse a laboratorios autorizados.

El diagnóstico de la FA requiere el aislamiento del virus o la demostración del antígeno vírico de la FA o el ácido nucleico en las muestras de tejidos o fluidos. También puede utilizarse para diagnóstico la detección de anticuerpos específicos contra el virus y pueden utilizarse anticuerpos contra proteínas no estructurales (PNP) como indicadores de la infección, independientemente del estado de vacunación.

Identificación del agente: *Para un diagnóstico positivo, es suficiente con la demostración del antígeno vírico de la FA o el ácido nucleico. Debido a la naturaleza tan contagiosa y a la importancia económica de la FA, el diagnóstico de laboratorio y la identificación del serotipo del virus deben realizarse en un laboratorio que cumpla con los requisitos de la OIE para los patógenos del Grupo 4 de contención.*

El uso de la fijación del complemento (FC) se ha reemplazado en casi todos los laboratorios por el ensayo de inmunoenzimático (ELISA), ya que este último es más específico y sensible y no se ve afectado por factores pro- y anti-complementarios. Si la muestra es inadecuada o el resultado de la prueba es incierto, será necesario inocular los materiales de prueba en cultivos celulares susceptibles o en ratones lactantes de 2-7 días a fin de amplificar cualquier virus vivo que esté presente. Con preferencia, los cultivos deberían de ser cultivos primarios de tiroides bovino (ternera), aunque se pueden utilizar células de riñón de cerdo, cordero o ternero, o líneas celulares de sensibilidad comparable. Cuando en los cultivos se haya completado un efecto citopático (ECP), se pueden utilizar los sobrenadantes en pruebas FC o ELISA o mediante por reacción en cadena de la polimerasa de transcripción inversa (RT-PCR). Se pueden realizar pruebas similares con suspensiones homogenizadas de tejido derivado de músculo esquelético diseccionado de cualquier ratón que muera.

Las pruebas de reconocimiento de ácidos nucleicos, como la reacción en cadena de la polimerasa de transcripción inversa, se están utilizando mucho como métodos de diagnóstico rápidos y

sensibles. A veces se utiliza el examen por microscopía electrónica para diferenciar la FA de las enfermedades causadas por otros virus.

Pruebas serológicas: Para un diagnóstico positivo, es suficiente la demostración de anticuerpos específicos contra proteínas estructurales en animales no vacunados que presenten una manifestación vesicular. Esto resulta particularmente útil en casos benignos o cuando no se puede tomar tejido epitelial. Las pruebas para anticuerpos contra algunas NSP del virus de la FA proporcionan evidencia de infecciones previas o actuales del hospedador, independientemente del estado de vacunación. A diferencia de las proteínas estructurales, las NSP se conservan muy bien y, por tanto, no son específicas de serotipo y, en consecuencia, la detección de estos anticuerpos no está restringida a un serotipo particular.

Las pruebas de neutralización del virus (NV) y los ELISA para anticuerpos contra proteínas estructurales se emplean como pruebas serológicas específicas de serotipo. Las pruebas NV dependen de los cultivos de tejidos y por tanto son más propensas a variabilidad de resultados que las pruebas ELISA; son también más lentas y más fáciles de contaminar. Las técnicas ELISA para anticuerpos, presentan la ventaja de la rapidez y de no ser dependientes de los cultivos celulares. La prueba ELISA se puede llevar a cabo con antígenos inactivados, lo que requiere, por tanto, menos servicios restrictivos de biocontención.

Requisitos para las vacunas y los materiales de diagnóstico: Existen varios tipos de vacunas disponibles comercialmente con virus inactivados de composición variada. Por lo general, se infecta con el virus una suspensión o una monocapa de cultivo celular y la preparación que resulta se clarifica, se inactiva con etilenimina y se prepara con adyuvante. Muchas vacunas contra la FA son polivalentes con el fin de proporcionar protección contra los diferentes serotipos que es probable encontrar en determinadas condiciones de campo.

La vacuna terminada debe carecer de virus vivos residuales. La forma más efectiva de comprobar esto es la utilización de pruebas *in vitro* sobre las preparaciones concentradas de virus inactivados antes de la formulación de la vacuna, y después se confirma la ausencia de virus vivos durante las pruebas *in vivo* y/o *in vitro* sobre la vacuna final. También se realizan pruebas de desafío en el ganado vacunado para establecer la PD_{50} (dosis protectora del 50%), aunque una prueba serológica se considera satisfactoria cuando se establece una correlación válida entre la cantidad del antígeno presente en la vacuna, la protección observada y la respuesta del anticuerpo específico.

Los servicios de producción de la vacuna contra la FA deben cumplir también los requisitos de la OIE para patógenos del Grupo 4 de Contención.

Los reactivos para diagnóstico y de referencia se pueden obtener de los Laboratorios de Referencia de la OIE para la FA, y del Laboratorio de Referencia Mundial para la FA de la FAO (Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura)¹. El laboratorio de Pirbright del Instituto de Sanidad Animal posee doble condición, como Laboratorio de Referencia Mundial y como Laboratorio de Referencia de la OIE para la FA.

1 Laboratorio de Referencia mundial de la FAO para la fiebre aftosa, Ash Road, Pirbright, Woking, Surrey GU24 0NF, United Kingdom.

A. INTRODUCCIÓN

La fiebre aftosa o glosopeda (FA) está causada por un virus del género *Aftovirus*, de la familia *Picornaviridae*. Existen siete serotipos de virus FA, que son el O, A, C, SAT1, SAT2, SAT3 y Asia1, que infectan animales de pezuña hendida. La infección con un serotipo determinado no confiere inmunidad contra otro. Dentro de los serotipos, se pueden identificar muchos subtipos mediante pruebas bioquímicas e inmunológicas.

Los virus de la FA se mantienen en África en el ganado vacuno y en el búfalo africano (*Syncerus caffer*), que, por lo general, son los hospedadores más comunes. La información disponible indica que aunque se pueden infectar otras especies domésticas y salvajes, éstas son incapaces de mantener la infección más allá de unos cuantos meses en ausencia de ganado vacuno o del búfalo africano. En otras partes del mundo, el ganado vacuno es el principal reservorio, aunque, a veces, los virus implicados parecen haberse adaptado específicamente a cerdos domésticos, ovejas y cabras. Es probable que estos virus adaptados sean capaces de modificar su adaptación e infectar otras especies bajo condiciones adecuadas. Sin embargo, la cepa Cathay del virus de la FA adaptada a los cerdos no parece infectar a los grandes rumiantes, bien natural o experimentalmente y requiere células de origen porcino para el aislamiento primario. Hasta ahora, fuera de África, la fauna salvaje no parece ser capaz de mantener el virus de la FA. La evidencia indica que la infección de ciervos en el pasado derivó de contactos, directos o indirectos, con animales domésticos infectados.

De las especies domésticas, el ganado vacuno, porcino, ovino, caprino y los búfalos resultan susceptibles a la FA (30). Además, pueden infectarse muchas especies salvajes de pezuña hendida, como los ciervos, antílopes y cerdos salvajes aunque, con la excepción del búfalo africano, no se ha demostrado que desempeñen un papel importante en la epidemiología de la FA en las especies domésticas. Se han aislado de cerdos salvajes y de ciervos cepas de virus de la FA que infectan al ganado bovino. Para el diagnóstico de la FA en especies salvajes se pueden aplicar procedimientos similares a los descritos para los animales de granja.

La infección de animales susceptibles con el virus de la FA conduce a la aparición de vesículas en las patas, dentro y alrededor de la cavidad oral, y en las glándulas mamarias de las hembras. Las lesiones de las bandas coronarias pueden provocar bandas de interrupción del crecimiento cuya extensión a lo largo del lateral de la pezuña puede servir como indicador del tiempo transcurrido desde el comienzo de la infección. En infecciones graves de las patas pueden desprenderse las pezuñas. La mastitis es una secuela común de la FA en las vacas. También se pueden presentar vesículas en otros lugares, como en el interior de los ollares nasales y en los puntos de presión de los miembros -especialmente en cerdos. La gravedad de los síntomas clínicos varía con la cepa de virus, la dosis de exposición, la edad y raza del animal, la especie hospedadora y su grado de inmunidad (44). Los síntomas pueden variar desde una infección benigna y desapercibida hasta una grave. En algunos casos puede originar la muerte. La mortalidad por miocarditis multifocal es más común en animales jóvenes: también puede presentarse miositis en otros lugares.

Cuando se presenta una historia de muertes repentinas en ganado joven de pezuña hendida, un examen de los animales adultos revela a menudo la presencia de lesiones vesiculares, en caso de que se trate de FA. La presencia de vesículas en los casos graves es variable.

En animales con enfermedad vesicular, es suficiente para establecer un diagnóstico la detección del virus de la FA en muestras de líquido vesicular, tejido epitelial, muestra faringoesofágica, leche o sangre. También se puede establecer el diagnóstico por aislamiento del virus de la sangre, el corazón u otros órganos en casos fatales. En una alta proporción de estos casos, se puede observar macroscópicamente la presencia de miocarditis (el denominado "corazón atigrado").

El virus de la FA se puede multiplicar y excretar del tracto respiratorio de los animales. La excreción aérea del virus tiene lugar durante la fase aguda de la infección. Los virus pueden presentarse en todas las secreciones y excreciones de los animales con infección aguda, incluyendo el aire expirado. Generalmente, la transmisión tiene lugar por contacto directo entre animales infectados y susceptibles o, más raramente, por exposición de animales susceptibles a las secreciones y excreciones de animales con infección aguda. Después de la recuperación del estado agudo de la infección, los virus infecciosos desaparecen de todas las secreciones y excreciones con excepción de los líquidos faringoesofágicos de algunos rumiantes en los que se puede continuar recuperando los virus. Los animales en los que el virus persiste en los líquidos faringoesofágicos durante más de 28 días después de la infección se denominan portadores. Los cerdos no son portadores. Alguna evidencia circunstancial indica que, en raras ocasiones, especialmente cuando se trata del búfalo africano, los portadores son capaces de transmitir la infección a animales susceptibles con los que están en contacto estrecho: el mecanismo implicado resulta desconocido. Normalmente el estado de portador en el ganado bovino no persiste más allá de 6 meses, aunque en una pequeña proporción puede durar hasta 3 años. En búfalos africanos, a título individual, se ha visto que el virus persiste durante al menos 5 años, pero probablemente no es un fenómeno que dure toda la vida. Dentro de una manada de búfalos, el virus se puede mantener durante 24 años o más. No existe información sobre la duración del estado de portador en otro búfalo doméstico, el búfalo de los pantanos del este de Asia. Por lo general, el búfalo doméstico, las ovejas y las cabras no portan el virus de la FA durante más de unos pocos meses.

Debido a la naturaleza contagiosa y a la importancia económica de la FA, el diagnóstico de laboratorio y la identificación del serotipo del virus deben realizarse en una instalación que cumpla los requisitos del Grupo 4 de Contención de patógenos indicado en Capítulo I.1.6. de este *Manual*. Los países sin acceso a tal laboratorio especializado nacional o regional de estas características deben enviar las muestras a un Laboratorio de Referencia de la OIE para FA. Las instalaciones de producción de vacunas también deben cumplir los requisitos para el Grupo 4 de Contención de patógenos.

Los reactivos estándar y para el diagnóstico se pueden obtener como preparados comerciales o como artículos individuales proporcionados por los Laboratorios de Referencia de la OIE para la FA. El uso de antígenos inactivados en el ensayo de inmunoenzimático (ELISA), como controles en las pruebas de detección de antígeno o para reaccionar con sueros de ensayo en las pruebas ELISA bloqueantes en fase líquida o competitivas en fase sólida, reduce el riesgo de enfermedad existente en comparación con el uso de virus vivos. Los reactivos se suministran liofilizados o en glicerol o sin glicerol pero congelados, y pueden permanecer estables a temperaturas entre +1°C y +8°C, -30°C y -5°C, y -90°C y -50°C, respectivamente, durante muchos años. La Agencia Internacional de la Energía Atómica² ha editado un manual que incluye una prueba recomendada y protocolos para el control de calidad.

B. TÉCNICAS DE DIAGNÓSTICO

Para el diagnóstico, las muestras mejores son el tejido epitelial o el líquido vesicular. Idealmente, se debe recoger por lo menos 1 g de tejido epitelial de vesículas sin romper o recién rotas, normalmente de la lengua, de la mucosa bucal o de las patas. Para evitar daños al personal que recoge las muestras, así como por el cuidado a los animales, se recomienda sedar a los animales antes de obtener las muestras.

Las muestras de epitelio se deben colocar en un medio para transporte compuesto de cantidades iguales de glicerol y tampón fosfato 0,04 M, pH 7.2-7.6, preferiblemente con antibióticos (penicilina [1.000 Unidades Internacionales (UI)], sulfato de neomicina [100 UI], sulfato de polimixina B [50 UI], micostatin [100 UI]). Si no se dispone de tampón fosfato 0,04 M, se puede utilizar medio de cultivo de tejidos o solución salina tamponada (PBS), pero es importante que el pH final de la mezcla glicerol/tampón esté en el intervalo de pH 7.2-7.6. El virus de la fiebre aftosa es extremadamente lábil en pH bajo y el tamponamiento del medio de transporte es esencial para una toma de muestras satisfactoria. Las muestras deben mantenerse refrigeradas o en hielo hasta su llegada al laboratorio.

Cuando no se puede disponer de tejido epitelial de rumiantes, por ejemplo, en casos avanzados o de convalecencia, o cuando se sospecha la infección en ausencia de síntomas clínicos, se pueden tomar muestras de líquido faringoesofágico por medio de una sonda (esputos) (o en cerdos, por frotis de garganta) para su envío a un laboratorio para el aislamiento de virus o para PCR de transcripción inversa. También se puede detectar la viremia mediante el examen de muestras de suero por medio de PCR de transcripción inversa o por aislamiento de virus. Para la toma de frotis de garganta de cerdo, los animales deberán colocarse modo adecuado, preferiblemente en posición decúbito supino en una caja de madera y con el cuello extendido. Manteniendo una torunda de algodón con un instrumento apropiado, por ejemplo con unas pinzas hemostáticas, se empuja la torunda hacia la parte posterior de la boca dentro de la faringe.

Antes de recoger las muestras faringoesofágicas del ganado o de grandes rumiantes (como búfalos), se deben añadir, a un recipiente de unos 5 ml de capacidad y con capacidad de resistir la congelación por dióxido de carbono (nieve carbónica) o por nitrógeno líquido, 2 ml de líquido de transporte (formado por tampón fosfato 0,08 M que contenga 0,01% de seroalbúmina bovina, 0,002% de rojo fenol, antibióticos [1.000 unidades/ml de penicilina, 100 unidades/ml de micostatin, 100 unidades/ml de neomicina y 50 unidades/ml de polimixina], ajustado a pH 7,2) (39).

La muestra faringoesofágica se toma insertando una sonda por encima de la lengua en la zona orofaríngea y luego frotarla con energía hacia atrás y hacia adelante 5–10 veces entre la primera porción del esófago y la parte posterior de la faringe. El objetivo es tomar líquido orofaríngeo y, especialmente células epiteliales superficiales de esas zonas, incluida la parte anterior del esófago, las paredes de la faringe, las grutas de las amígdalas y la superficie del velo del paladar. Si la muestra no contiene restos celulares adecuados, se pueden repetir las acciones indicadas.

Después de recoger el líquido faringoesofágico mediante sonda, el contenido se vierte en una botella transparente de boca ancha de unos 20 ml de capacidad. Se examina el líquido, que debería contener algún material celular visible. Se toman 2 ml y se añaden a 2 ml del líquido de transporte, asegurándose que se transfiere material celular; la mezcla se agita suavemente y debe tener un pH final próximo a pH 7,6. Las muestras contaminadas con material del rumen pueden ser inadecuadas para cultivo y las que contienen sangre

2 Agencia Internacional de la Energía Atómica, Wagramerstrasse 5, P.O. Box 100, A-1400 Viena, Austria.

tampoco son por completo satisfactorias. Se puede repetir el muestreo después de lavar la boca y la garganta del animal con agua o PBS. Cuando hay que tomar muestras de varios animales, debe lavarse y desinfectarse la sonda para cada animal. Eso se lleva a cabo lavándola con agua corriente, sumergiéndola a continuación en un desinfectante adecuado (e.j. 0,5% [p/v] de ácido cítrico en agua corriente) y después aclarándola con agua corriente antes de utilizarla con el siguiente animal.

Las muestras faringoesofágicas de pequeños rumiantes se recogen poniendo 2 ml del líquido de transporte en una botella de boca ancha de unos 20 ml de capacidad y lavando, después de la toma, la sonda y la copa de recogida con este líquido de transporte para descargar la muestra faringoesofágica. Esto se transfiere luego a un recipiente de cerca de 5 ml de capacidad para el transporte. El pequeño recipiente debe tener la capacidad de resistir la congelación por dióxido de carbono (nieve carbónica) o por nitrógeno líquido (39).

Las muestras de líquido faringoesofágico se deben refrigerar o congelar inmediatamente después de tomadas. Si el transporte no dura más que unas pocas horas, se deben congelar preferentemente con nieve carbónica o con nitrógeno líquido. Antes de congelar, los recipientes se deben cerrar cuidadosamente con tapones herméticos o con silicona. Esto es particularmente importante cuando se utiliza nieve carbónica, pues la introducción de CO₂ en la muestra faringoesofágica hace que descienda el pH, inactivando cualquier virus de la FA que pudiera estar presente en la muestra. No deberían utilizarse recipientes de cristal por existir el riesgo de que exploten al descongelarse si penetra nitrógeno líquido. Las muestras deben llegar al laboratorio preferentemente en estado congelado, o, si eso no es posible, refrigeradas.

Se deben tomar precauciones especiales cuando se envíe material percedero sospechoso de FA tanto dentro de un país como entre diversos países. Las Regulaciones sobre Materiales Peligrosos (DGR) de la Asociación Internacional del Transporte Aéreo (IATA) especifican los requisitos de embalaje y envío de muestras diagnósticas por todos los medios comerciales de transporte. Éstos se resumen en el Capítulo I. 1. 1. *Métodos de muestreo*.

1. Identificación del agente

Se puede examinar una variedad de muestras que incluye el epitelio, muestras faringoesofágicas y suero mediante aislamiento del virus y RT-PCR. Por contra, el ELISA es adecuado para el examen de las suspensiones de epitelio, líquidos vesiculares o sobrenadantes de cultivos celulares, pero no es lo bastante sensible para el análisis directo de muestras orofaríngeas o suero.

a) Aislamiento del virus

La muestra de epitelio se extrae de la mezcla PBS/glicerol, se transfiere sobre papel absorbente para reducir el contenido en glicerol, que es tóxico para los cultivos celulares, y se pesa. Se debe preparar una suspensión homogenizando la muestra en arena estéril y un mortero con mano estéril con un pequeño volumen de medio de cultivo de tejidos y antibióticos. Se añade luego más medio hasta un volumen final 9 veces superior al de la muestra epitelial añadida, obteniéndose una suspensión al 10%. Ésta se clarifica en una centrifuga de sobremesa a 2.000 x *g* durante 10 minutos. Una vez clarificadas, las suspensiones de las muestras sospechosas de contener virus de la FA se inoculan en cultivos celulares o en ratones lactantes. Los sistemas de cultivos celulares sensibles incluyen células primarias de tiroides bovino (de ternera), y células primarias de riñón de cerdo, ternero o cordero. También se pueden utilizar líneas celulares establecidas, como la BHK-21 (de riñón de hámster lactante) o la IB-RS-2, pero, por lo general, son menos sensibles que las células primarias para detectar niveles bajos de infectividad (19). Se debería ensayar la sensibilidad de cualesquiera células utilizadas mediante preparaciones estandarizadas de virus de la FA. La utilización de células IB-RS-2 sirve de ayuda para distinguir entre la enfermedad vesicular porcina (EVP) y la fiebre aftosa (FA) (puesto que el virus de la EVP solamente crece en ese cultivo celular) y es a menudo esencial para el aislamiento de las cepas aisladas en ganado porcino, como O Cathay. Los cultivos celulares deben examinarse para efecto citopático (ECP) durante 48 horas. Si no se detecta ECP las células se deben congelar y descongelar, y utilizar para inocular cultivos frescos, que se examinan para ECP durante otras 48 horas. La alternativa a los cultivos celulares son los ratones lactantes, que deben tener 2-7 días de edad y proceder de cepas de razas seleccionadas. Algunos virus de campo necesitan varios pases antes de adaptarse a ratones (58). En el caso de los líquidos faringoesofágicos, el tratamiento preliminar con un volumen igual de clorofluorocarbones puede mejorar la velocidad de detección del virus liberando virus de instalaciones inmunes.

b) Métodos inmunológicos

- **Enzimoimmunoensayo**

El mejor procedimiento para la detección del antígeno vírico de la FA y para la identificación de los serotipos víricos es el ELISA (18, 53). Se trata de una prueba indirecta de tipo "sandwich" en la que las diferentes filas de las placas multipocillo están recubiertas con antisuero de conejo a cada uno de los siete serotipos del virus de la FA. Estos son los sueros de "captura". A cada una de las filas se añaden suspensiones de

las muestras de ensayo, incluyendo los controles apropiados. Después se añade antisuero de cobaya a cada uno de los serotipos del virus de la FA, y a continuación suero anti-cobaya de conejo conjugado con un enzima. Entre cada paso se lava cuidadosamente para eliminar los reactivos no fijados. Una reacción coloreada después de la adición del sustrato del enzima y el cromógeno indica una reacción positiva; también se puede identificar el serotipo del virus de la FA. Los valores próximos a 0,1 deben confirmarse por repetición o por amplificación del antígeno por pases en cultivo celular y prueba del sobrenadante después de que se haya desarrollado ECP. Más adelante se presenta un protocolo adecuado. Están disponibles otros protocolos con formatos y criterios de interpretación ligeramente distintos (3, 6).

Dependiendo de la especie y del origen geográfico de la muestra puede ser apropiado probar simultáneamente para el virus de la enfermedad vesicular porcina (EVP) y el virus de la estomatitis vesicular (EV). En teoría, en todas las condiciones de manifestaciones vesiculares se debería hacer un diagnóstico diferencial completo.

Como anticuerpo de captura, se utiliza antisuero de conejo contra el antígeno 146S de cada uno de los siete serotipos del virus de la FA (más el virus de la EVP o el virus de la EV, si fuera necesario), a una concentración óptima predeterminada y en tampón carbonato/bicarbonato, pH 9,6.

Los antígenos control se preparan de cepas seleccionadas de cada uno de los siete serotipos del virus de la FA (más el virus de la EVP si fuera necesario), que se cultivan en monocapas de células BHK-21 (células IB-RS-2 para el virus de la EVP). Se utilizan los sobrenadantes sin purificar y se pretitulan en placas ELISA. La dilución final que se escoge es la que corresponde a una absorbancia en la parte superior de la región lineal de la curva de titulación (densidad óptica aproximada 0,2), de modo que las diluciones a 1/5 de los antígenos control que se utilizan en la prueba den dos lecturas adicionales de densidad óptica más baja de las que se pueda tener referencia en la curva de titulación. Como diluyente se usa PBS con 0,05% de Tween 20 y rojo fenol como indicador (PBST).

Como anticuerpo de detección se utilizan antisueros de cobaya preparados por inoculación de cobayas con antígeno 146S de uno de los siete serotipos del virus de la FA (más el virus de la EVP si fuera necesario) y prebloqueados con suero bovino normal (NBS). Se preparan concentraciones óptimas predeterminadas en PBS con 0,05% de Tween 20 y 5% de leche en polvo desnatada (PBSTM).

Se utiliza inmunoglobulina de conejo (o de oveja) anti-cobaya conjugada con peroxidasa de rábano y prebloqueada con NBS, a una concentración óptima predeterminada en PBSTM. Como alternativa a los antisueros de cobaya o conejo, se pueden utilizar anticuerpos monoclonales (MAbs) adecuados unidos a las placas ELISA como anticuerpos de captura o conjugados con peroxidasa como anticuerpos de detección.

• **Procedimiento de la prueba**

- i) Las placas ELISA se recubren con sueros antivíricos de conejo (50 µl/pocillo) en tampón carbonato/bicarbonato, pH 9,6. Las filas A hasta H reciben, respectivamente, antisueros contra los serotipos O, A, C, SAT1, SAT2, SAT3, Asia1 y virus de la EVP o virus de la EV (opcional).
- ii) Se dejan toda la noche a 4°C en posición estática o en un agitador a 100-120 revoluciones por minuto en un incubador a 37°C durante 1 hora.
- iii) Preparar la suspensión de la muestra de ensayo (con la suspensión de la muestra original al 10% o con los sobrenadantes clarificados y sin diluir de los cultivos celulares).
- iv) Lavar cinco veces las placas ELISA con PBS.
- v) En cada placa, cargar los pocillos de las columnas 4, 8 y 12 con 50 µl de PBS. Además, añadir 50 µl de PBST a los pocillos 1, 2 y 3 de las filas A hasta H de la placa 1. Al pocillo 1 de la fila A de la placa 1 se añaden 12,5 µl de antígeno control de tipo O, y al pocillo 1 de la fila B se añaden 12,5 µl de antígeno control de tipo A. Se continúa de la misma forma para los antígenos control de tipo C, SAT 1, SAT 2, SAT 3, Asia 1 y SVDV o VS (si es necesario) al pocillo 1, desde la fila C hasta la H. Se mezcla el diluyente en el pocillo 1 de las filas A a la H y se transfieren 12,5 µl del pocillo 1 al pocillo 2 (de las filas A a la H). Se mezclan y transfieren 12,5 µl del pocillo 2 al 3, se mezclan y eliminan 12,5µl del pocillo 3 de las filas A hasta H (esto da diluciones seriadas de 1/5 de cada antígeno control). Sólo se requiere cambiar las puntas de las micropipetas entre antígenos. El resto de la placa se puede rellenar con muestra(s) de ensayo. Añadir 50 µl de la muestra uno a los pocillos 5, 6 y 7 de las filas A hasta H. La segunda muestra se coloca de modo similar en las columnas 9, 10 y 11 de las filas A hasta H.

Si se ensayan más de dos muestras al mismo tiempo, las otras placas ELISA se deben de utilizar como sigue:

Depositar 50 µl de PBST en los pocillos (en las filas A hasta H) de las columnas 4, 8 y 12 (columnas de control de tampón). Adviértase que en estas placas no se necesitan los antígenos control. Las

muestras de ensayo se pueden añadir en volúmenes de 50 µl en las columnas A hasta H a las columnas 1, 2, 3; 5, 6, 7; 9, 10, 11, respectivamente.

- vi) Cubrir con las tapas y colocar en un agitador orbital a 37°C durante 1 hora.
- vii) Lavar las placas por inundación con PBS -lavar tres veces como antes y vaciar el líquido residual. Secar las placas con papel secante.
- viii) Pasar 50 µl de cada dilución de suero de cobaya a cada pocillo de la placa en el orden apropiado, es decir, las filas A hasta H, reciben respectivamente antisueros contra los serotipos O, A, C, SAT1, SAT2, SAT3, Asia1 y contra el virus de EVP o virus de la EV (opcional).
- ix) Cubrir con las tapas y colocar en un agitador orbital a 37°C durante 1 hora.
- x) Lavar de nuevo las placas tres veces y añadir a cada pocillo 50 µl de inmunoglobulina de conejo anti-cobaya conjugada con peroxidasa de rábano. Las placas se incuban a 37°C durante 1 hora en un agitador orbital.
- xi) Lavar de nuevo las placas tres veces y añadir a cada pocillo 50 µl de solución de substrato con 0,05% de H₂O₂ más ortofenilén diamina o un cromógeno alternativo adecuado.
- xii) La reacción se detiene a los 15 minutos añadiendo 50 µl de ácido sulfúrico 1,25 M. Las placas se leen a 492 nm en un espectrofotómetro acoplado a un ordenador.

- **Prueba de fijación de complemento**

Por lo general, la técnica ELISA es preferible a la prueba de fijación de complemento (FC) porque es más sensible y no se ve afectada por factores pro- y anti-complementarios. No obstante, si se carece de los reactivos para ELISA, se puede utilizar la prueba FC del siguiente modo:

Se diluyen en tampón veronal (VBD) los antisueros contra cada uno de los siete tipos de virus de FA, en diluciones de 1.5 veces, desde una dilución inicial 1/16 para dejar 25 µl de las diluciones sucesivas de antisuero en pocillos con fondo redondeado de una placa de microtitulación. Se añade a éstos 50 µl de 3 unidades de complemento y a continuación 25 µl de suspensión de la(s) muestra(s) de ensayo. El sistema se incuba a 37°C durante 1 hora antes de añadir 25 µl de eritrocitos de oveja (SRBC) estandarizados al 1.4% en VBD y sensibilizados con 5 unidades de anti-SRBC de conejo. Los reactivos se incuban a 37°C durante otros 30 minutos y después se centrifugan las placas y se leen. Se incluyen controles adecuados para las suspensiones de ensayo, antisueros, células y complemento. Los títulos de FC se expresan como el inverso de la dilución del suero que produce un 50% de hemólisis. Un título FC ≥ 36 se considera una reacción positiva. Valores de 24 en el título deben confirmarse volviendo a probar el antígeno amplificado por pases en cultivo de tejidos.

c) **Métodos de reconocimiento del ácido nucleico**

Se puede utilizar la reacción en cadena de la polimerasa de transcripción inversa (RT-PCR) para amplificar los fragmentos del genoma del virus de la FA en materiales para diagnóstico, incluyendo epitelio, leche, suero y muestras faringoesofágicas (7, 13). La transcripción inversa combinada con la PCR de tiempo real tiene una sensibilidad comparable a la del aislamiento de virus (2, 51), y los procedimientos automatizados mejoran el rendimiento de la muestra (52). Se han diseñado cebadores específicos para distinguir cada uno de los siete serotipos. Para investigar la presencia del ARN del virus de la FA en muestras de tejidos se han desarrollado técnicas de hibridación *in situ* (63). Estas técnicas solo se utilizan en laboratorios especializados, aunque se están elaborando sistemas simplificados procedimientos para uso potencial en trabajo de campo (18).

- **Prueba RT-PCR basada en gel de agarosa**

Se describe el procedimiento utilizado en el Laboratorio de Referencia de la OIE de Pirbright (50). La prueba RT-PCR consta de los tres procedimientos sucesivos de (i) extracción de ARN molde de la muestra de prueba o control seguida de (ii) transcripción inversa (RT) del ARN extraído, (iii) Amplificación mediante PCR del producto de la RT y (iv) detección de los productos de la PCR por electroforesis en gel de agarosa.

- **Procedimiento de la prueba**

- i) Se añaden 200 µl de la muestra de prueba a 1 ml de TRIzol[®] Reagent en un tubo esterilizado. SE guarda a -70°C hasta que se requiera para la extracción de ARN.
- ii) Se transfiere 1 ml de la solución anterior) a un nuevo tubo esterilizado que contenga 200 µl de cloroformo. Se agita la mezcla con un vórtex durante unos 10–15 segundos y se deja a temperatura ambiente durante 3 minutos.
- iii) Se centrifuga durante 15 minutos a 20.000 g.

- iv) Se transfieren 500 µl de la fase acuosa a un nuevo tubo esterilizado que contenga 1 µl de glucógeno (20 mg/ml) y se añaden 500 µl de alcohol isopropílico (propan-2-ol). Se agita con vórtex durante unos segundos.
- v) SE deja a temperatura ambiente durante 10 minutos, luego se centrifuga durante 10 minutos a 20.000 **g**.
- vi) Se elimina el líquido sobrenadante de cada tubo y se añade 1 ml de etanol al 70%. Se agita con vórtex durante unos segundos.
- vii) Se centrifuga 10 minutos a 20.000 **g**.
- viii) Se elimina con cuidado el líquido sobrenadante de cada tubo procurando no desalojar o perder el precipitado del fondo del tubo.
- ix) Se seca al aire cada tubo a temperatura ambiente durante 2–3 minutos.
- x) Se resuspende cada precipitado añadiendo al tubo 20 µl de agua exenta de nucleasa.
- xi) Se guardan con hielo las muestras de ARN si se va a realizar pronto la fase de la transcripción inversa (RT). Si no es así, se guardan a –70°C.
- xii) Para cada muestra a ensayar, se añaden 2 µl de hexámeros tomados al azar (20 µg/ml) y 5 µl de agua exenta de nucleasa a un tubo estéril de microcentrifuga de 0,5 ml. Se recomienda preparar la dilución completa para el total de las muestras a de ensayo, pero preparando una muestra extra.
- xiii) Se añaden 5 µl de ARN del procedimiento de extracción descrito anteriormente hasta obtener un volumen de 12 µl en cada tubo. Se mezcla pipeteando hacia arriba y hacia abajo.
- xiv) Se incuba a 70°C durante 5 minutos.
- xv) Se enfría a temperatura ambiente durante 10 minutos.
- xvi) Durante los 10 minutos de incubación, se prepara la mezcla de reacción para la RT descrita más adelante para cada muestra. Se prepara la muestra de reacción completa en un tubo de microcentrifuga estéril de 1,5 ml para el número de muestras que se han de ensayar mas una muestra extra.

Tampón para la primera hebra, 5x conc. (4 µl); seroalbúmina bovina (acetilada), 1 mg/ml (2 µl); dNTPs, 10 mM de mezcla cada uno de los siguientes: dATP, dCTP, dGTP, dTTP (1 µl); DTT, 1 M (0,2 µl); Transcriptasa inversa de Moloney Murine, 200 U/ µl (1 µl).
- xvii) Se añaden 8 µl de la mezcla de reacción a 12 µl de cebador aleatorio /mezcla de ARN. Se mezcla todo pipeteando.
- xviii) Se incuba a 37°C durante 45 minutos.

Se mantienen en hielo los productos RT si se va a realizar pronto la fase de la transcripción inversa (RT). Si no es así, se guardan a –20°C.
- xx) Se prepara la mezcla para la PCR descrita más adelante para cada muestra. Se recomienda preparar una muestra completa de la que se obtendrá el número de muestras de prueba más una muestra extra.

Agua exenta de nucleasa (35 µl); tampón para la reacción por PCR, 10x conc (5 µl); MgCl₂, 50 mM (1,5 µl); dNTPs, 10 mM de mezcla de dATP, dCTP, dGTP, dTTP (1 µl); cebador 1, 10 pmoles/µl (1 µl); cebador 2, 10 pmoles/µl (1 µl); Taq polimerasa, 5 unidades/µl (0,5 µl).
- xxi) Se añaden 45 µl de mezcla para PCR a un pocillo de una placa para PCR o a un tubo de microcentrifuga para cada muestra de ensayo y a continuación 5 µl de producto RT hasta alcanzar un volumen de reacción de 50 µl.
- xxii) Se centrifuga la placa o los tubos durante un minuto en una centrífuga adecuada para mezclar el contenido de cada pocillo.
- xxiii) SE coloca la placa en un termociclador para la amplificación por PCR y se ejecuta el siguiente programa:

94°C durante 5 minutos: 1 ciclo;
94°C durante 1 minuto, 55°C durante 1 minuto, 72°C durante 2 minutos: 30 ciclos;
72°C durante 7 minutos: 1 ciclo.
- xxiv) SE mezcla una alícuota de 20 µl de cada producto de reacción por PCR con 4 µl de solución de tinción y se monta sobre gel de agarosa al 1,5%. Después de la electroforesis, un resultado positivo aparece

indicado por la presencia de una banda de 328 pb correspondientes a la secuencia del FMDV de la región 5' no traducida del genoma.

- **Soluciones base**

- Se encuentran disponibles en el mercado el agua exenta de nucleasa, TRIzol® Reagent, cloroformo, glucógeno, alcohol isopropílico (propan-2-ol), etanol, cebadores de hexanucleóticos aleatorios, tampón para la primera hebra, BSA (acetilado), dNTPs, DTT, Transcriptasa inversa Moloney Murine, tampón (10x) para reacción por PCR, MgCl₂ y Taq Polimerasa.
- Cebadores a una concentración de 10 pmoles/μl: secuencia del cebador 1 5'-GCCTG-GTCTT-TCCAG-GTCT-3' (cadena positiva); Secuencia del cebador 2 5'-CCAGT-CCCCT-TCTCA-GATC-3' (cadena negativa).

- **Ensayo de la RT-PCR en tiempo real**

Se describe el procedimiento utilizado en el Laboratorio de Referencia de la OIE de Pirbright. En la prueba RT-PCR se utiliza el mismo procedimiento de extracción de ARN total de las muestras de prueba o de control seguida de de la transcripción inversa de ARN extraído que el utilizado en el procedimiento convencional basado en gel de agarosa. Como alternativa a los procedimientos manuales descritos anteriormente, puede utilizarse la extracción automática de ácido nucleico total de las muestras seguido de programas de pipeteo automático para los pasos de la PCR y la RT (52). La amplificación del producto de RT mediante PCR se lleva a cabo mediante un procedimiento diferente. No es necesaria la detección de los productos de la PCR en geles de agarosa tras la amplificación en tiempo real.

- Se toman los productos de RT del paso (xix) (véase más arriba).
- Se prepara la mezcla para PCR descrita más adelante para cada muestra. Una vez más, se recomienda preparar la mezcla entera que se ha de utilizar para las muestras de prueba más una muestra extra: agua exenta de nucleasa (6 μl); mezcla base de reacción para PCR, 2x conc. (12,5 μl); cebador directo para PCR en tiempo real, 10 pmoles/μl (2,25 μl); cebador inverso para PCR en tiempo real, 10 pmoles/μl (2,25 μl); sonda TaqMan®, 5 pmoles/μl (1 μl).
- Se añaden 24 μl de mezcla de reacción PCR a un pocillo de una placa para PCR en tiempo real para cada muestra de prueba y, a continuación, 1 μl del producto de RT hasta alcanzar un volumen final de reacción de 25 μl.
- Se centrifuga la placa durante un minuto en una centrifuga adecuada para mezclar los contenidos de cada pocillo.
- Se coloca la placa en una máquina de PCR en tiempo real para amplificar y se ejecuta el siguiente programa:
50°C durante 2 minutos: 1 ciclo;
95°C durante 10 minutos: 1 ciclo;
95°C durante 15 segundos, 60°C durante 1 minuto: 50 ciclos.
- Lectura de los resultados:* se asigna un valor de ciclo umbral (CT) a cada reacción de PCR en un análisis de todas las representaciones gráficas de amplificación (una gráfica de la señal de fluorescencia frente al número de ciclos; puede ser adecuado utilizar diferentes valores de corte con diferentes tipos de muestra; 51). Los valores de corte utilizados para clasificar muestras como positivas o negativas al FMDV deben ser establecidos por cada laboratorio utilizando material de referencia adecuado. Por ejemplo, en el Laboratorio de Referencia de la OIE en Pirbright, las muestras de prueba negativas y los controles negativos deben tener un valor de corte de >50,0. Las muestras de prueba positivas y las muestras control positivas deben tener un valor de corte de <40. Las muestras con valores de corte situadas en el intervalo 40–50 se denominan “dudosas” y pueden volver a ensayarse. Las muestras fuertemente positivas de FA tienen un valor de corte inferior a 20,0 (51).

- **Solución de base para la prueba PCR en tiempo real**

- Están disponibles en el mercado el agua exenta de nucleasa y las mezclas base de reacción para PCR en tiempo real.
- Para la PCR en tiempo real del FMDV se puede utilizar uno de los dos siguientes juegos de cebadores y sondas:
5'UTR (51) cebador directo: CACYT YAAGR TGACA YTGRT ACTGG TAC; cebador inverso: CAGAT YCCRA GTGWC ICITG TTA y la sonda TaqMan®: CCTCG GGGTA CCTGA AGGGC ATCC.
3D (18) cebador directo: ACTGG GTTTT ACAA CCTGT GA; cebador inverso: GCGAG TCCTG CCACG GA y sonda TaqMan®: TCCTT TGAC GCCGT GGGAC.

- **Epidemiología molecular**

La epidemiología molecular de la FA se basa en la comparación de las diferencias genéticas entre virus. Se han publicado dendrogramas en los que se muestran las relaciones genómicas existentes entre las cepas vacunales y las cepas naturales para los siete serotipos basadas en secuencias derivadas del gen 1D (que codifica la proteína vírica VP1). La amplificación por PCR de transcripción inversa (RT-PCR) del ARN del virus de la FA, seguida de la secuenciación de nucleótidos, es el procedimiento preferido en la actualidad para generar los datos de las secuencias con los que realizar esas comparaciones. Muchos laboratorios han elaborado técnicas para la realización de esos estudios, y los laboratorios de referencia poseen bases de datos con más de 3000 secuencias parciales.

El método recomendado es el siguiente:

- i) Extraer el ARN del virus directamente de suspensiones epiteliales, o de pases bajos en cultivo celular.
- ii) Realizar una RT-PCR del gen 1D completo (o, si sólo una parte del gen 1D, el extremo 3´del gen es más útil)
- iii) Determinar la secuencia nucleotídica del producto de la PCR (o, por lo menos, 170 nucleótidos [preferiblemente 420 para los tipos SAT] en el extremo 3´del gen).

Se puede disponer de un protocolo completo con secuencias cebadoras en los laboratorios de referencia de la OIE, previa solicitud del WRL, o se puede bajar de la siguiente dirección en la World Wide Web:

<http://www.iah.bbsrc.ac.uk/virus/picornaviridae/aphthovirus/fmd.htm>

<http://bvs.panaftosa.org.br/textoc/SerManDid17.pdf>

2. Pruebas serológicas

Las pruebas serológicas para la FA tienen cuatro objetivos principales: 1) certificación individualizada de los animales antes de su importación o exportación (i.e. con fines comerciales); 2) confirmar casos sospechosos de FA; 3) comprobar la ausencia de infección; 4) demostrar la eficacia de la vacunación. Para concretar la ausencia de infección, se requieren diferentes enfoques dependiendo de si la población esté o no esté vacunada, y, en caso de haberse aplicado la vacunación, si su aplicación ha sido de emergencia o como parte de un programa de vacunación existente. La adecuación de las diferentes pruebas e interpretaciones de los resultados de las pruebas dependerá de los objetivos antes mencionados y en la validación del procedimiento escogido debe tenerse en cuenta el objetivo. Por ejemplo, los valores de corte deben tener distintos umbrales según se trate de serovigilancia basada en los rebaños o de certificar la ausencia de infección para cada uno de los animales con el objetivo de destinarlos al comercio internacional.

Las pruebas serológicas para la FA son de dos tipos; las que sirven para detectar anticuerpos contra las proteínas víricas estructurales (SP) y las que sirven para detectar anticuerpos contra las proteínas víricas no estructurales (NSP).

Las pruebas SP son específicas de serotipo y detectan anticuerpos producidos por vacunación e infección; por ejemplo, la prueba de neutralización vírica (NV) (32), el ELISA competitivo en fase sólida (SPCE; 41, 48) y el ELISA de bloqueo en fase líquida (LPBE; 35, 36). Estas pruebas son específicas de serotipo y son muy sensibles proporcionando que el virus o antígeno usado en la prueba sea casi igual que la cepa natural. Son las pruebas prescritas para el comercio y son adecuadas para confirmar una infección anterior o actual en animales no vacunados así como para observar la inmunidad proporcionada por la vacunación en el campo. La prueba de neutralización vírica precisa de instalaciones para cultivo celular, la utilización de virus vivos y entre 2 y 3 días para obtener resultados. Las pruebas ELISA son ensayos de bloqueantes o competitivos en los que se utilizan anticuerpos policlonales o monoclonales específicos de serotipo, es más rápida de realizar y no depende del uso de sistemas de cultivos celulares ni la utilización de virus vivos. Por cualquiera de las dos pruebas ELISA se puede esperar una proporción baja de sueros de título bajo con reacciones positivas falsas. Una combinación de análisis por ELISA y la confirmación de los positivos por la prueba de NV reduce los resultados falsos positivos. Los sueros de referencia para estandarizar las pruebas serológicas de SP par la FA están disponibles en el Laboratorio de referencia de Pirbright.

La detección de anticuerpos contra las proteínas no estructurales (NSP) del virus de la FA se puede utilizar para identificar infecciones pasadas o actuales con algunos de los siete serotipos del virus, independientemente de que el animal haya sido también vacunado. Por tanto, las pruebas pueden utilizarse para confirmar casos sospechosos de FA y para detectar actividad vírica o para comprobar la ausencia de infección utilizando la población. En relación con la certificación para el comercio, las pruebas tienen la ventaja sobre los métodos con SP de que no tiene que conocerse el serotipo del virus. Sin embargo, hay evidencia experimental de que unos pocos animales, vacunados y después probados en desafío con virus vivos y con infección persistente, pueden

pasar sin ser detectados en algunas pruebas anti-NSP, originando resultados negativos falsos (17). Estos ensayos miden los anticuerpos contra las NSP utilizando antígenos producidos mediante técnicas recombinantes en una variedad de sistemas de expresión *in-vitro*. Por lo general, a los anticuerpos contra las poliproteínas 3AB o 3ABC se les considera como los indicadores más fiables de la existencia de infección (42). En animales seropositivos para anticuerpos contra 3AB o 3ABC, los anticuerpos contra una o más de las otras NSP, pueden ayudar en la interpretación final de la prueba (14, 42). Sin embargo, la pureza de la vacuna es una consideración importante ya que la presencia de de NSP en algunas preparaciones de vacunas puede originar una clasificación errónea en animales que han sido vacunados repetidamente. En la sección D de este capítulo se explican los procedimientos para evaluar la pureza de la vacuna.

Se han elaborado sueros internacionales estándar para pruebas con NSP en ganado y están disponibles en el Laboratorio de Referencia de la OIE Panaftosa, PAHO/WHO. En el futuro también se podrá disponer de sueros estándar para ovejas y cerdos. Se han establecido paneles de sueros bovinos para comparar la sensibilidad de las pruebas con NSP en laboratorios de referencia de la OIE.

a) Prueba de neutralización de virus (una prueba prescrita para el comercio internacional)

La microprueba cuantitativa NV para anticuerpo contra la FA se realiza con células IB-RS-2, BHK-21 o con células de riñón de cordero o cerdo, en placas de microtitulación para cultivo de tejidos con pocillos de fondo plano.

Los virus se cultivan en monocapas celulares y se guardan a -20°C después de añadir glicerol al 50%. (El virus es estable en estas condiciones por lo menos durante 1 año). Antes de la prueba, los sueros de ensayo se inactivan a 56°C durante 30 minutos. El suero control estándar es suero de convaleciente o post-vacunado de 21 días. Un medio adecuado es el medio completo de Earle/LYH (solución salina equilibrada de Hank con hidrolizado de levadura y lactoalbúmina) más tampón Hepes y antibióticos.

La prueba utiliza volúmenes idénticos de 50 µl.

• **Procedimiento de la prueba:**

- i) Comenzando con la dilución 1/4, se diluyen los sueros en soluciones dobles seriadas por la placa, utilizando al menos dos filas de pocillos por suero, preferiblemente cuatro filas, y un volumen de 50 µl.
- ii) Se añade virus previamente titulado; cada 50 µl de suspensión vírica debe contener aproximadamente 100 DICT₅₀ (dosis infectiva 50% cultivo de tejidos) dentro de un margen aceptable (por ejemplo, 32-320 DICT₅₀).
- iii) Los controles incluyen un antisuero estándar de título conocido, un suero negativo, un control de células, un control de medio y una titulación vírica empleada para calcular el título real del virus utilizado en la prueba.
- iv) Incubar a 37°C durante 1 hora con las placas cubiertas.
- v) Se prepara una suspensión celular de 10⁶ células/ml en medio que contenga 10% de suero bovino (negativo para el anticuerpo específico) para el crecimiento celular. A cada pocillo se añaden 50 µl de la suspensión celular.
- vi) Las placas se cierran a presión con las tapas y se incuban a 37°C durante 2-3 días. Alternativamente, se cubren con las tapas flojas y se incuban a 37°C durante 2-3 días en una atmósfera de 3-5% de dióxido de carbono.
- vii) Después de 48 horas se pueden realizar lecturas microscópicas. Finalmente las placas se fijan y se tiñen, por lo general, al tercer día. La fijación se hace con 10% formol en solución salina durante 30 minutos. Para la tinción las placas se sumergen en 0,05% de azul de metileno con 10% de formalina durante 30 minutos. Una alternativa de fijación y tinción consiste en utilizar una solución de azul negro de naftaleno (0,4% [p/v] de azul negro de naftaleno, 8% [p/v] de ácido cítrico en solución salina). Las placas se lavan con agua del grifo.
- viii) Los pocillos positivos (allí donde el virus se ha neutralizado y las células permanecen intactas) contienen capas celulares teñidas de azul; los pocillos negativos (donde el virus no ha sido neutralizado) están vacías. Los títulos se expresan como la dilución final del suero presente en la mezcla suero/virus donde el 50% de los pocillos está protegido. La prueba se considera válida cuando la cantidad de virus utilizada por pocillo está comprendida en el intervalo log₁₀ 1.5-2.5 DICT₅₀, y el suero positivo estándar está dentro de un margen equivalente a dos veces su título esperado.
- ix) La interpretación de las pruebas puede variar entre laboratorios respecto al umbral de corte positivo/negativo. Los laboratorios deben establecer sus propios criterios con referencia a reactivos estándar que pueden obtenerse del laboratorio de Referencia de Pirbright. En general, un título de 1/45 o más de la dilución final del suero en la mezcla suero/virus se considera positivo. Para la

certificación de animales individuales para el comercio internacional, los títulos de 1/16 a 1/32 se consideran dudosos, y se necesitan más muestras de suero para prueba. Los resultados se consideran positivos, si la segunda muestra presenta un título de 1/16 o superior. Cuando el objetivo es la sero-vigilancia como parte de un estudio serológico estadísticamente válido, puede resultar adecuado un corte de 1/45. [Los títulos de corte para evaluar la protección inmunológica proporcionada por la vacunación deben establecerse a partir de la obtención de resultados de prueba de potencia con la vacuna y especie diana pertinentes.](#)

b) Enzimoimmunoensayo competitivo en fase sólida (prueba prescrita para el comercio internacional)

Como anticuerpo de captación, se utiliza antisuero de conejo contra el antígeno 146S de uno de los siete tipos de virus de la FA a una concentración óptima predeterminada³ en tampón carbonato/bicarbonato, pH 9.6.

Los antígenos se preparan inactivando virus procedentes de cultivos celulares con etilnimina, utilizando los procedimientos descritos para la producción de vacunas. La dilución final escogida es la que, después de añadir un volumen idéntico de diluyente, proporciona una absorbancia en la parte superior de la región lineal de la curva de titulación (densidad óptica aproximada de 1,5). Como diluyente se utiliza PBS que contiene 0,05% de Tween 20, [10% de suero bovino normal, 5% de suero normal de conejo e indicador de fenol rojo \(tampón de bloqueo\).](#)

Como anticuerpos de detección, se utilizan antisueros de cobaya, preparados mediante inoculación de cobayas con el antígeno 146S de uno de los siete serotipos y prebloqueado con suero normal de bovino. Las concentraciones óptimas predeterminadas se preparan en tampón de bloqueo PBS que contiene 0,05% de Tween 20 y 5% de leche desnatada en polvo (PBSTM).

La inmunoglobulina anti-cobaya de conejo (o de oveja) se emplea como conjugado a una concentración óptima predeterminada en tampón de bloqueo PBSTM conjugada con peroxidasa de rábano y prebloqueada con NBS.

Los sueros de ensayo se diluyen en tampón de bloqueo PBST.

El ELISA competitivo en fase sólida es más específico que el ELISA de bloqueo en fase líquida, pero de sensibilidad similar (41, 48). Se han descrito métodos para la elaboración de sueros estándar secundarios y activos (33) y para diagramar la realización del ensayo (34).

• **Procedimiento de la prueba**

- i) Las placas ELISA se recubren con 50 µl/pocillo de anticuerpo de conejo contra el antígeno vírico de la FA diluido en tampón carbonato/bicarbonato, pH 9.6, y se deja toda la noche a 4°C en una cámara húmeda.
- ii) Las placas ELISA se lavan tres veces con PBS.
- iii) A continuación se añaden, a cada pocillo de la placa de ELISA, 50 µl del antígeno del virus de la FA diluido en tampón de bloqueo. (Tampón de bloqueo: 0,05% [p/v] de Tween 20, 10% [v/v] de suero bovino normal, 5% [v/v] de suero de conejo normal). Las placas se tapan y se colocan en un agitador orbital a 37°C durante 1 hora, con agitación continua.
- iv) Después de lavar tres veces con PBS, se añaden a cada pocillo 40 µl de tampón de bloqueo y 10 µl de suero de ensayo (o de suero control), lo que proporciona una dilución inicial de suero de 1/5.
- v) Inmediatamente se añaden 50 µl de antisuero de cobaya contra el virus de la FA diluido en tampón de bloqueo, obteniendo una dilución final del suero de 1/10.
- vi) Las placas se tapan y se colocan en un agitador orbital a 37°C durante 1 hora.
- vii) Después de lavar tres veces con PBS, se añaden 50 µl de Ig anti-cobaya conjugada (pre-bloqueada por incubación durante un 1 hora con un volumen igual de NBS), diluida en tampón de bloqueo. Las placas se tapan y se colocan en un agitador orbital a 37°C durante 1 hora.
- viii) Después de lavar tres veces con PBS, se añaden a cada pocillo 50 µl de solución de sustrato que contiene 0,05% de H₂O₂ más ortofenilén diamina o un cromógeno alternativo adecuado.

3 Se realiza una titulación del tipo en tablero de ajedrez del antisuero captador de conejo, del antisuero de cobaya y del antisuero anti-cobaya. Antes de utilizar el ELISA de captación de antígeno o el ELISA de bloqueo en fase líquida, se titula cada uno de estos reactivos, uno frente al otro, manteniendo el tercero a una concentración constante. De este modo, se pueden determinar las diluciones óptimas (para color positivo y para bajo color de fondo). Estas diluciones "predeterminadas" se pueden utilizar después para todas las pruebas que en el futuro utilicen estos lotes particulares de reactivos.

- ix) La reacción se para a los 10 minutos añadiendo 50 µl de ácido sulfúrico 1 M. Las placas se leen en un espectrofotómetro acoplado a un ordenador.
- x) *Controles:* Se utilizan dos pocillos por cada placa para los controles de conjugado (sin suero de cobaya), cuatro pocillos para sueros positivos fuertes y débiles, dos pocillos para sueros negativos y cuatro pocillos para competición nula (sin suero de ensayo).
- xi) *Interpretación de los resultados:* Para cada pocillo se calcula un porcentaje de inhibición, visualmente o mediante un programa adecuado de ordenador ($100 - [\text{densidad óptica de cada valor de ensayo o control} / \text{densidad óptica media del resultado de competición nula}] \times 100$) que represente la competición entre el suero de ensayo y el antisuero de cobaya contra el virus de la FA en la placa de ELISA. Los laboratorios deben validar el ensayo en términos de valores de corte por encima de los cuales los sueros deban considerarse positivos en relación a (i) los serotipos particulares y cepas del virus investigados, (ii) el objetivo de la prueba y (iii) la población ensayada, utilizando los métodos descritos en el capítulo 1.1.3. [En el Laboratorio de Referencia de la OIE en Pirbright, para el serotipo O, para todas las especies, y a efectos de la demostración de la ausencia de infección, se considera positiva una inhibición superior al 60% \(48\). Para la sensibilidad máxima, por ejemplo cuando se certifican animales individuales para el comercio internacional, puede establecerse un rango indefinido de entre el 40 y el 60%.](#)

c) Enzoinmunoensayo de bloqueo en fase líquida (prueba prescrita para el comercio internacional)

Los antígenos se preparan a partir de cepas seleccionadas de virus de la FA cultivados en monocapas de células BHK-21. Se utilizan los sobrenadantes sin purificar y se pretitulan con diluciones seriadas dobles, pero sin suero. La dilución final elegida es la que, después de añadir el mismo volumen de diluyente (ver a continuación), proporciona una absorbancia en la parte superior de la región lineal de la curva de titulación (Densidad óptica aproximada de 1,5). Como diluyente se emplea PBS con 0,05% de Tween 20 y rojo de fenol como indicador (PBST). Los otros reactivos utilizados en la prueba son los mismos que para ELISA de bloqueo en fase sólida. A continuación se describe un ejemplo del procedimiento de la prueba. La temperatura y el tiempo de incubación pueden variar dependiendo del protocolo.

• **Procedimiento de la prueba**

- i) Las placas ELISA se recubren con 50 µl/pocillo de antisuero de conejo contra el antígeno 146S que se va a ensayar y se dejan toda la noche en una cámara húmeda a temperatura ambiente.
- ii) Las placas ELISA se lavan tres veces con PBS.
- iii) En placas multipocillo con fondo en U (placas portadoras) se preparan por duplicado 50 µl de diluciones seriadas dobles de cada suero de ensayo, comenzando con 1/8. A cada pocillo, se añaden 50 µl de una dosis constante de antígeno vírico homólogo al antisuero de conejo utilizado para recubrir las placas, y las mezclas se dejan toda la noche a 4°C, o se incuban a 37°C durante 1 hora. La adición del antígeno aumenta la dilución final del suero a 1/16.
- iv) A continuación se transfieren 50 µl de las mezclas suero/antígeno de las placas portadoras a las placas ELISA recubiertas con suero de conejo y se incuban las placas a 37°C durante 1 hora en un agitador orbital.
- v) Después de lavar, se añaden a cada pocillo 50 µl de antisuero de cobaya homólogo al antígeno utilizado en el paso previo (iv) (pre-bloqueado con suero bovino normal y diluido que contenga [5% de polvo de leche desnatada](#)). A continuación, las placas se incuban a 37°C durante 1 hora en un agitador orbital.
- vi) Se lavan las placas y se añaden a cada pocillo 50 µl de inmunoglobulina de conejo anti-cobaya, conjugada con peroxidasa de rábano. Se incuban las placas a 37°C durante 1 hora en un agitador orbital.
- vii) Las placas se lavan de nuevo tres veces y se añaden a cada pocillo 50 µl de la solución de sustrato que contiene 0,5% de H₂O₂ más ortofenilén diamina o un cromógeno alternativo adecuado.
- viii) La reacción se para a los 15 minutos mediante la adición de 50 µl de ácido sulfúrico 1 M. Las placas se leen en un espectrofotómetro acoplado a un ordenador.
- ix) *Controles:* En cada placa se incluye un mínimo de cuatro pocillos para cada uno de los sueros bovinos de referencia (muy positivo, débilmente positivo y negativo) a una dilución final de 1/32 junto con un número equivalente de pocillos para control de antígeno, que contengan sólo antígeno en diluyente sin suero. Para pruebas de titulación a punto final, en cada prueba se debe incluir por duplicado, por lo menos en una placa, una serie de diluciones dobles de sueros bovinos de referencia positivos y negativos.
- x) *Interpretación de los resultados:* Los títulos de anticuerpo se expresan como el 50% del título a punto final, es decir, la dilución a la que la reacción de los sueros ensayados origina una densidad óptica

igual al 50% de inhibición de la densidad óptica media de la reacción en los pocillos control (antígeno) (Kärber) (38). La mediana se calcula como la media de dos valores medios de la reacción en los pocillos control, eliminando del cálculo los valores más altos y los más bajos (alternativamente, se puede utilizar el valor medio después de ajustar unos límites adecuados de tolerancia al control para variaciones entre los pocillos). En general los sueros con títulos superiores a 1/40 se consideran positivos. Los títulos inferiores a 1/40 se consideran negativos. [Para la certificación de animales individuales a efectos del comercio internacional, los títulos superiores a 1/40, pero inferiores a 1/90 se consideran dudosos, y pueden requerirse muestras adicionales para el ensayo; Los resultados se consideran positivos si la segunda muestra tiene un título de 1/40 o superior. A los efectos de serovigilancia del rebaño como parte de un estudio serológico con validez estadística, puede ser adecuado un corte de 1/90. Los títulos de corte para la evaluación de la protección inmunológica proporcionada por la vacunación han de establecerse a partir de los resultados que se obtengan en las pruebas de potencia con la vacuna y la especie diana pertinentes.](#)

d) Pruebas de anticuerpo contra proteínas no estructurales

Los anticuerpos contra las NSP expresadas en virus recombinantes de la FA (ej. 3A, 3B, 2B, 2C, 3ABC) se pueden medir por diferentes formatos de ELISA o por inmunotransferencia. Estos enzimoimmunoensayos utilizan antígenos purificados que se adsorben directamente en microplacas o emplean anticuerpos policlonales o monoclonales para capturar antígenos específicos de preparaciones semi-purificadas (14, 20, 42, 59). Más adelante se describe detalladamente el método de análisis de índices utilizado en Panaftosa. Se ha observado que otros anticuerpos bovinos contra 3ABC utilizados en pruebas de ELISA indirectos y competitivos tienen rasgos de realización del diagnóstico equivalentes (17). Estos mismos estudios corroboran los datos preliminares de Panaftosa en virtud de los cuales se sugiere que las características de realización diagnóstica de estas pruebas son similares en el ganado vacuno, el ovino y los cerdos.

- **Enzimoimmunoensayo indirecto**
- **Preparación de antígenos recombinantes (véase más adelante la sección B.2.d. Prueba de enzimoimmunotransferencia)**
- **Procedimiento de la prueba**
 - i) Las microplacas se recubren durante toda la noche a 4°C con 1 µg/ml del antígeno de fusión 3ABC en tampón carbonato/bicarbonato, pH 9,6 (100 µl por pocillo). El antígeno 3ABC se expresa y purifica como se indica para las pruebas EITB (prueba de enzimoimmunotransferencia (EITB) (45).
 - ii) Se lavan las placas seis veces con PBS, pH 7,2, que contiene 0,05% de Tween 20 (PBST).
 - iii) Se añaden los sueros de ensayo (100 µl por pocillo) a una dilución 1/20 en tampón de bloqueo que consiste en PBS, 0,05% de Tween 20, 5% de leche en polvo desnatada, 10% de suero de caballo y 0,1% de lisado de *Escherichia coli*. Cada placa incluye un juego de controles positivos y negativos, fuertes y débiles, calibrados frente a los Sueros Internacionales Estándar descritos más abajo.
 - iv) Se incuban las placas durante 30 minutos a 37°C y se lavan seis veces con PBST.
 - v) Se añaden 100 µl por pocillo de IgG de conejo contra la especie, conjugada con peroxidasa de rábano y diluida de modo óptimo en tampón de bloqueo. Se incuban las placas durante 30 minutos a 37°C.
 - vi) Después de seis lavados, cada pocillo recibe 100 µl de 3´3´, 5´5´-tetrametilbenzidina más 0,004% (p/v) de H₂O₂ en tampón fosfato/citrato, pH 5.5.
 - vii) La reacción se para a los 15 minutos de incubación a temperatura ambiente añadiendo 100 µl de ácido sulfúrico 0,5 M H₂SO₄. La absorbancia se lee a 450 nm y a 620 nm para corrección de fondo.
 - ix) *Interpretación de los resultados:* Los resultados se expresan como porcentaje relativo de positividad respecto al control positivo fuerte [(densidad óptica del pocillo de ensayo o control/densidad óptica del control positivo fuerte) x 100], o alternativamente, como prueba para controlar el índice (T/C) relativo al control del corte (i.e. umbral positivo). El perfilamiento de los niveles de reactividad de los anticuerpos para NSP en rebaños, junto con la estratificación de edad/vacunación ayuda a interpretar el estado infeccioso del rebaño en poblaciones vacunadas (15). Los valores de corte, con y sin zonas de sospecha, se determinan por los laboratorios individuales en función de la finalidad de la prueba y de la población objeto del análisis. Cuando los resultados no son concluyentes pueden utilizarse pruebas confirmatorias. En caso de animales repetidamente vacunados, se recomienda el EITB, mientras que, en animales que sólo han recibido una o dos vacunaciones, se resuelven los resultados no concluyentes y se confirman los resultados positivos repitiendo la prueba con otro ELISA para NSP (teniendo presente la dependencia condicional de las dos pruebas). Para ello debe tenerse en cuenta la sensibilidad y especificidad del sistema completo de pruebas cuando se diseñen programas de serovigilancia. A pesar de no ser un test prescrito para comercio, los ELISA NSP pueden ser un complemento valioso en circunstancias en donde el serotipo o subtipo viral en el país de origen es desconocido.

- **Prueba de enzimoimmunotransferencia (EITB)**

La prueba EITB se ha empleado mucho en Sudamérica como prueba confirmatoria para el método de análisis de índices. Se dispone de más información en el Laboratorio de Referencia de la OIE de Panaftosa, PAHO/WHO

- **Preparación de las tiras de ensayo con los antígenos recombinantes**

- i) Las cinco NSP del virus de la FA sometidas a ingeniería genética, 3A, 3B, 2C, 3D, y 3ABC, se expresan en *E. coli* C600 por termo-inducción. El polipéptido 3D se expresa en su forma completa (45), mientras que el resto de las proteínas se obtiene como productos de fusión con la porción N-terminal del gen de la polimerasa del MS-2 (40).
- ii) La polimerasa expresada se purifica en fosfocelulosa, y después por columnas de Sefarosa poli-U. Las proteínas de fusión 3A, 3B, 2C y 3ABC se purifican por extracción secuencial de los extractos bacterianos con concentraciones crecientes de urea. La fracción 7M, que contiene las proteínas de fusión, se purifica por una SDS-PAGE preparativa al 10% (dodecil sulfato sódico-electroforesis en gel de poliacrilamida). La banda de proteínas de fusión se separa del gel y se electroeluye (45).
- iii) Mediante SDS-PAGE al 12.5%, se separa una mezcla que contenga 20 ng/ml de cada uno de los polipéptidos recombinantes purificados y se transfieren electroforéticamente a nitrocelulosa (45).

- **Procedimiento de la prueba**

- i) Debe determinarse la cantidad necesaria de tiras de muestra considerando que, por cada lámina de nitrocelulosa que define un gel de transferencia, se debe probar un suero positivo, otro positivo débil, otro de corte, y un control de suero negativo. En general, de un gel deben derivar 24 tiras de nitrocelulosa, cada una de 3 mm de ancho.
- ii) A cada pocillo se añaden 0,8 ml de tampón de saturación (50 mM de Tris-HCl, pH 7,5; 150 mM NaCl; 0,2% Tween 20; 5% de leche desnatada en polvo y 0,05% de lisado bacteriano de *E.coli*). Las tiras con antígeno se bloquean colocando las placas en un agitador durante 30 minutos a temperatura ambiente (20-22°C).
- iii) Se añade a los sitios adecuados una dilución 1/200 de los sueros de ensayo y de cada uno de los controles. Las tiras deben estar sumergidas por completo, mirando hacia arriba y mantenidas en esa posición durante todo el proceso.
- iv) Se incuban las tiras durante 60 minutos en un agitador a temperatura ambiente.
- v) Se elimina el líquido de las bandejas y cada tira de ensayo se lava tres veces con solución de lavado (50 mM Tris-HCl, pH 7,5; 150 mM NaCl y 0,2% Tween 20) con agitación durante 5 minutos.
- vi) Se añade a cada pocillo de la prueba la solución de suero de conejo anti-bovino conjugado con fosfatasa alcalina, y las tiras se incuban con agitación durante 60 minutos a temperatura ambiente.
- vii) Se elimina el líquido de las bandejas y cada tira se lava tres veces con solución de lavado como anteriormente.
- viii) En tampón de sustrato (100 mM NaCl; 5 mM MgCl₂; y 100 mM Tris-HCl, pH 9.3) se prepara la solución de sustrato (0,015% fosfato de bromocloroindol/0,03% de nitroazul tetrazolio) y se añade a cada pocillo de ensayo.
- ix) Las tiras se incuban colocando la bandeja de la prueba en un agitador orbital hasta que el control de corte muestre claramente cinco bandas distintas. Las tiras se lavan abundantemente con agua desionizada y se dejan secar al aire.
- x) *Interpretación de los resultados:* La prueba EITB se puede escanear con un densitómetro pero se considera que la lectura visual, aunque es más subjetiva, también resulta adecuada. Se presentan controles individuales de los sueros que exhiben un color mínimo pero repetitivo para cada uno de los cuatro antígenos. Una muestra de ensayo se considera positiva si los antígenos 3ABC, 3A, 3B y 3D ($\pm 2C$) muestran densidades de color iguales o mayores que las de sus controles adecuados. Una muestra se considera negativa si dos o más antígenos muestran densidades inferiores a las de sus sueros control. Las muestras que no encajan con estos modelos se consideran indeterminadas.

C. VACCINE MATCHING TESTS

1. Introducción

Recientemente, se ha revisado la selección de cepas vacunales (48). La vacunación contra un serotipo de la FA no proporciona protección cruzada contra otros serotipos e incluso puede darse el caso de que no proteja contra otras cepas del mismo serotipo. El método más directo y fiable para medir la protección cruzada es vacunar las especies diana pertinentes y a continuación desafiarlas mediante la exposición al aislamiento vírico contra el que se requiere la protección. Para eso se tendrá en cuenta la potencia y la reactividad cruzada. No obstante, ese enfoque es lento y caro, y debe evitarse el uso de animales en esos estudios utilizando alternativas *in vitro*.

Se pueden utilizar varios métodos serológicos *in vitro* para cuantificar las diferencias antigénicas entre las cepas de la FA y, a partir de ahí, estimar la probable protección cruzada entre una cepa vacunal y un aislamiento natural. La caracterización genética y el perfil antigénico también pueden revelar la emergencia de nuevas cepas para las que se requiera la concordancia vacunal, y, a la inversa, pueden indicar que un aislamiento dado es similar a otro para el que ya se dispone de información sobre concordancia vacunal.

La selección de la cepa vacunal adecuada constituye un elemento importante para el control de la FA y es necesaria para la aplicación de programas de vacunación en las regiones afectadas por la FA así como para el establecimiento y mantenimiento de reservas de antígenos que se puedan utilizar en caso de que surjan nuevos brotes de FA.

La potencia de la vacuna también contribuye al rango de cobertura antigénica proporcionado por una vacuna. Una vacuna de alta potencia que provoca una fuerte respuesta inmune puede proporcionar mayor protección contra un virus heterólogo que otra vacuna de reacción cruzada que provoque una respuesta inmune más débil. Es más, las dosis de desafío de una vacuna pueden aumentar la eficacia y la consiguiente cobertura antigénica proporcionada por la vacuna, aunque se retrase el inicio de la protección completa.

2. Selección de virus naturales para la concordancia de vacunas

Para que haya concordancia serológica de los aislamientos naturales con las cepas vacunales, es preciso que los aislamientos hayan sido serotipados y adaptados para el crecimiento en cultivos celulares. Normalmente, el serotipo se determina por ELISA o CFT utilizando reactivos específicos para tipo, aunque también se pueden utilizar métodos basados en anticuerpos monoclonales o la tipificación genética. Para la replicación *in-vitro* del virus, se utilizan normalmente cultivos celulares BHK o IB-RS-2. Para la concordancia vacunal es preferible evaluar al menos dos aislamientos a partir de cualquier brote, y deben observarse los resultados inconsistentes para determinar si se deben a diferencias antigénicas genuinas o a algún artefacto de la prueba.

Se pueden seleccionar los virus sobre la base de la información epidemiológica; por ejemplo, aislamiento en diferentes fases de una epidemia, en diferentes lugares o en diferentes hospedadores (4). Un criterio importante para la concordancia vacunal es la evidencia de campo relativa a una vacuna cuya eficacia es dudosa, como se demuestra por la protección aparentemente reducida.

El establecimiento del perfil antigénico mediante CFT o ELISA, o el análisis de secuencia del gen VP1, constituyen enfoques adecuados para la selección de aislamientos víricos representativos para la concordancia vacunal. El perfil antigénico se realiza por CFT utilizando paneles de sueros de cobaya hiperinmune obtenidos contra aislamientos de campo epidemiológicamente pertinentes (16), o por ELISA utilizando paneles de anticuerpos monoclonales bien caracterizados (5).

3. Selección de cepas vacunales concordantes

El serotipo del virus, la región de origen y cualquier otra información sobre las características del aislamiento natural pueden proporcionar pistas para averiguar qué cepa vacunal proporcionará concordancia antigénica. Los reactivos disponibles para la concordancia con cepas vacunales particulares puede limitar el alcance de las posibles pruebas. La caracterización antigénica tiene dos propósitos: en primer lugar, seleccionar la cepa vacunal más efectiva para utilizarse en circunstancias concretas, y, en segundo lugar, para analizar sobre la marcha, la adecuación de las cepas vacunales guardadas en reservas de antígeno estratégicas.

4. Elección de la prueba de concordancia vacunal

La relación serológica entre el aislamiento natural y el virus vacunal (valor 'r') se puede establecer por CFT, ELISA o VNT (40, 49, 55). Se recomienda una prueba simple (r_1) con un antisuero vacunal, en lugar de una prueba doble (r_2) para la que también se precisa de un antisuero contra el aislamiento natural para el cual se

busca la concordancia. Debido a la baja repetibilidad inherente de las pruebas empleadas, se han de repetir las pruebas para tener confianza en los resultados (56). La neutralización *In vitro* puede ser más relevante para la protección *in vivo* que otras medidas de interacción de los anticuerpos con el, aunque también pueden ofrecer protección los anticuerpos no neutralizantes (43). Las ventajas del ELISA son que la prueba es de ejecución rápida y en ella se utilizan volúmenes menores de sueros post-vacunación, que a menudo sólo están disponibles en cantidades limitadas. Se recomienda la utilización del ELISA y la CFT como métodos de análisis, mientras la VNT o el método del porcentaje de protección esperado (EPP) proporcionan resultados más definitivos. Para la VNT o el ELISA, los sueros post-vacunación deben derivarse de al menos cinco reses 21–30 días después de la inmunización. Para cada suero, se establece el título del anticuerpo anti-cepa vacunal. Los sueros se usan de forma individual o en grupo, tras excluir los de baja respuesta. En el método CFT se utilizan sueros de cobaya obtenidos contra cepas vacunales.

El método del Porcentaje de Protección Esperada (EPP) (4) permite una evaluación más completa, al medir la reactividad de un panel de antisueros post-vacunales mediante VNT o ELISA y relaciona los títulos serológicos con la probabilidad de protección, establecida mediante tablas de correlación, en las que se asocian los títulos de los anticuerpos con la protección frente a la cepa vacunal pertinente. Esas tablas de correlación se han elaborado a partir de pruebas de desafío específicas para vacuna y realizadas previamente. No obstante, actualmente no pueden cumplirse, en relación con una amplia variedad de cepas vacunales, los requisitos para un panel de antisueros y los datos de la prueba de desafío con la vacuna en cuestión que los acompañan.

a) Concordancia de vacunas mediante la prueba ELISA

En esta prueba se utiliza antisuero obtenido frente a la cepa vacunal. Los títulos de este suero de referencia contra antígenos obtenidos por ELISA de bloqueo se preparan a partir de la cepa vacunal heteróloga y se comparan con los correspondientes títulos del suero contra un aislamiento natural para determinar el grado de “similitud” antigénica entre el virus natural y el vacunal.

El procedimiento de la prueba es similar al del ELISA de bloqueo en fase líquida (véase la sección B.2.c). Los reactivos biológicos adicionales son: sueros vacunales bovinos de entre 21 y 30 días después de la vacunación (inactivados a 56°C durante 45–60 minutos); la cepa vacunal homóloga; y el virus de prueba, un aislamiento natural del mismo serotipo que la cepa vacunal

• Procedimiento de la prueba

- i) Se cultiva el aislamiento natural y la cepa vacunal en células BHK o IB-RS-2. El número de pases en cultivo celular debe ser mínimo (normalmente, menos de 4) a fin de evitar la selección de variantes antigénicas que no sean representativas de las del material original. Debe aparecer una cantidad suficiente de virus si los cultivos celulares muestran efecto citopático dentro de las 24 horas siguientes a la inoculación.
- ii) Se recogen y titulan los virus vacunales y los naturales utilizando un panel de antisueros de captura y antisueros de cobaya detectores obtenidos frente a los mismas cepas vacunales o frente a cepas muy relacionadas. Si es necesario, pueden inactivarse los antígenos víricos antes de su uso utilizando etileneimina binaria.
- iii) Se selecciona la combinación óptima de captador/detector y la dilución de trabajo del virus natural. Ésta no debe ser inferior a 1/6. Si no hay una combinación de captador/detector, debe realizarse una nueva titulación de la existencia de antígenos para confirmar la presencia de virus en cantidad suficiente. Si se confirma la presencia de virus natural a titulación alta, eso indica que ninguna de las cepas vacunales es adecuada.
- iv) Se titula suero de 21–30 días post-vacunación de una cepa vacunal escogida frente al aislamiento natural y la cepa vacunal homóloga. El título frente a la cepa vacunal no debe ser ni el doble ni la mitad del valor promedio para el stock de virus.
- v) Para determinar el título del suero, se calcula el promedio de la densidad óptica (OD) de los 24 pocillos de control de antígeno sin suero bloqueante. Esto representa el valor máximo de OD para la prueba, i.e. un valor de control del 100%. Se divide éste por dos para determinar el valor de inhibición del 50%. Los pocillos con suero de bloqueo se consideran positivos si la OD es menor o igual al 50%, y negativos, si el valor de OD es superior al mismo. El punto final se define como la dilución a la que la mitad de los pocillos muestran una inhibición del 50% o superior (i.e. la identidad de la dilución a la que uno de cada dos pocillos duplicados tiene una OD al 50% del control de antígeno). Si el punto final se halla entre dos diluciones, se le considera como el punto medio entre esas diluciones, calculándose el mismo por el método Spearman–Kärber.

Se deriva el valor de ‘r’, es decir, la relación entre la cepa natural y la vacunal, como:

$$r_1 = \frac{\text{título recíproco del suero de referencia frente al virus natural}}{\text{título recíproco del suero de referencia frente al virus vacunal}}$$

Se necesitan al menos dos resultados consistentes para su aceptación.

- vi) *Interpretación de los resultados:* Las directrices para interpretar los valores de r_1 derivados por ELISA son las siguientes (29):

0,4–1,0: Relación estrecha entre el aislamiento natural y la cepa vacunal. Es probable que una vacuna potente que contenga la cepa vacunal proporcione protección.

0,2–0,39: El aislamiento natural está relacionada antigénicamente con la cepa vacunal. La cepa vacunal puede ser adecuada para su uso en caso de no hallarse una concordancia más estrecha, a condición de que se use una vacuna potente y se inmunice a los animales más de una vez.

<0,2: El aislamiento natural tiene una relación lejana con la cepa vacunal y lo es probable que la cepa vacunal proporcione protección ante un desafío con la cepa natural.

b) Concordancia de vacunas mediante una prueba de neutralización bidimensional

En esta prueba también se utiliza un antisuero obtenido frente a una cepa vacunal. Se comparan los títulos de este suero frente a 100 TCID₅₀ de la cepa vacunal homóloga y la misma dosis de un aislamiento natural para determinar del grado de “similitud” antigénica del virus natural con la cepa vacunal.

El procedimiento es similar a la prueba de neutralización del virus en placas de microtitulación (véase la sección B.2.a). Los reactivos biológicos adicionales son: sueros vacunales bovinos de entre 21 y 24 días post-vacunación (inactivados a 56°C durante 45–60 minutos); la cepa vacunal homóloga; y el virus de prueba, un aislamiento natural con el mismo serotipo que la cepa vacunal.

- i) Los aislamientos naturales se pasan por cultivos celulares hasta que se produzca ECP del 100% en 24 horas. El número de pases debe ser mínimo. Una vez adaptados, se determina el título vírico (\log_{10} TCID₅₀/ml) mediante titulación a punto final.
- ii) Para cada prueba y virus vacunal, se realiza una titulación de doble entrada del virus frente al suero vacunal junto con una titulación de virus solo. Se añaden las células y se incuban a 37°C durante 48–72 horas, y, transcurrido ese tiempo se observan para el ECP.
- iii) Los títulos de anticuerpos del suero vacunal frente a la cepa vacunal y el aislamiento natural para cada dosis de virus utilizada se calculan por el método Spearman-Kärber. Entonces se puede estimar mediante regresión el título del suero vacunal frente a 100 TCID₅₀ de cada virus. Después, la relación entre el aislamiento natural y la cepa vacunal se expresa como un valor 'r', tal como se describió para la concordancia de vacunas por medio de ELISA.
- iv) *Interpretación de los resultados:* en el caso de la neutralización, los valores r_1 superiores a 0,3 indican que el aislamiento natural es bastante similar a la cepa vacunal y que es probable que el uso de la vacuna proporcione protección frente al desafío con el aislamiento natural (54). A la inversa, los valores inferiores a 0.3 nos sugieren que el aislamiento natural es tan distinto de la cepa vacunal que es probable que la vacuna no proporcione protección. En estos casos, o bien se debe examinar el aislamiento natural frente a cepas vacunales alternativas u, ocasionalmente, será necesario adaptar un aislamiento natural apropiado hasta convertirlo en una nueva cepa vacunal.
- v) Se deben repetir las pruebas más de una vez. La confianza con la que pueden tomarse los valores 'r' como indicadores de las diferencias entre cepas está relacionada con el número de veces que se repite el examen. En la práctica, es aconsejable repetirlo al menos tres veces.

D. REQUISITOS PARA LAS VACUNAS Y LOS MATERIALES DE DIAGNÓSTICO

Normalmente, el control de la FA es una responsabilidad nacional y, en muchos países, la vacuna solo puede utilizarse bajo el control de la autoridad competente.

Las normas para la producción de vacunas veterinarias se presentan en el Capítulo 1.1.7. *Principios de producción de vacunas veterinarias*. Las directrices que se indican aquí y en el Capítulo 1.1.7 son de carácter general y pueden suplementarse con requisitos nacionales y regionales. Son de aplicación diferentes requisitos relacionados con la calidad, inocuidad y eficacia en países o regiones concretas para que los fabricantes puedan obtener la autorización o licencia para una vacuna veterinaria. En la medida de lo posible, los fabricantes deben procurar la obtención de tales licencias o autorizaciones para sus vacunas contra la FA, lo que servirá como verificación independiente de la calidad de su producto.

Para producir vacunas contra la FA se deben emplear virus virulentos de la FA; por tanto, las instalaciones de producción de la vacuna contra la FA deben funcionar bajo normas y prácticas apropiadas de bioseguridad. Las

instalaciones deben cumplir los requisitos para patógenos del Grupo de Contención 4 como se indica en el capítulo 1.1.6 de este *Manual*.

La vacunación contra la FA se utiliza de forma rutinaria en muchos países o regiones reconocidas como libres de FA por vacunación y en países donde la enfermedad es endémica. En contraste, varios países que están libres de la enfermedad no han vacunado nunca su ganado y cuando se han presentado brotes prefieren utilizar controles estrictos del desplazamiento y el sacrificio de los animales infectados y los que han estado en contacto con ellos. No obstante, muchos países libres de la enfermedad mantienen la opción de vacunar y disponen de sus propias reservas estratégicas de preparaciones concentradas de virus inactivados. Tales reservas de antígeno suponen la posibilidad de suministrar vacunas a corto plazo en el caso de una "emergencia" (26).

Las vacunas contra la FA son preparaciones del virus químicamente inactivado derivado de cultivos celulares, que han sido mezcladas con un adyuvante adecuado. En el caso de vacunas destinadas a utilización en cerdos, se prefieren los adyuvantes oleosos.

Las vacunas para la FA pueden definirse como la formulación fijada que contiene cantidades definidas (límites) de una o más preparaciones de una cepa de virus de inóculo químicamente inactivadas y derivadas de cultivos celulares mezcladas con adyuvantes y excipientes adecuados. Las vacunas se formulan según su propósito específico, y, en el caso de vacunas destinadas a ser utilizadas en ganado porcino, se prefieren adyuvantes oleosos. Las vacunas con adyuvante oleoso también pueden utilizarse con rumiantes y pueden tener ventajas como una menor interferencia del anticuerpo materno y una mayor duración de la inmunidad. Las vacunas para la FA pueden clasificarse como "estándar" o como vacunas de potencia más alta. Las vacunas de potencia estándar se formulan de modo que contenga bastante antígeno para garantizar que alcanzan el nivel mínimo de potencia requerido (en la sección D.4.b se recomienda 3 PD₅₀ [dosis protectora del 50%]). Las vacunas de potencia más alta se formulan con una mayor cantidad de antígeno de forma que la potencia sobrepasa el mínimo requerido a fin de proporcionar propiedades concretas, como un inicio más rápido de la inmunidad y un espectro más amplio de inmunidad contra virus naturales relevantes. Las vacunas de potencia más alta son muy adecuadas para uso de emergencia: Las vacunas de FA vivas no son aceptables debido al peligro de reversión de la virulencia y porque su uso impediría la diferenciación entre animales infectados y animales vacunados.

Debido a la existencia de varios serotipos del virus, muchas vacunas contra la FA son multivalentes, y es común la práctica de preparar vacunas con dos o más cepas diferentes de virus. En algunas áreas donde la enfermedad se mantiene en búfalos de vida libre, se necesita, y es aconsejable, incluir más de un virus por serotipo para asegurar una cobertura antigénica amplia contra los virus predominantes.

1. Control del inóculo

a) Características del inóculo

En teoría, la selección de los virus del inóculo primario (MSV) debería basarse en su facilidad de crecimiento en cultivo celular, en la tasa de virus, en la estabilidad y en un amplio espectro antigénico (57). Los MSV se deben caracterizar y distribuir por laboratorios oficiales de control en regiones en los que tales laboratorios existan y deben seleccionarse de acuerdo con la importancia epidemiológica de cada variante.

b) Método de cultivo

Donde no existen cepas vacunales establecidas y adecuadas, se derivan nuevas cepas vacunales estableciendo los MSV que proceden de aislamientos locales naturales adaptándolos para crecimiento en suspensión o en monocapas, por pases seriados. Para eliminar el riesgo de cualquier virus contaminante que contenga lípidos en estos aislamientos naturales, se recomienda un tratamiento con un solvente orgánico antes de la adaptación, o durante ella. Es aconsejable mantener bajo el número de pases en cultivo celular, pues existen pruebas de que, durante estos procesos, el virus de la FA puede presentar una "deriva" antigénica.

c) Validación como cepa vacunal

Los virus del inóculo primario (MSV) deben estar caracterizados antigénicamente y, si es posible, genéticamente, y se debe demostrar que son puros y están libres de todos los agentes extraños declarados por la autoridad competente. Debe establecerse la homología con los aislamientos originales candidatos y debe demostrarse la efectividad contra las cepas circulantes de las que ellos se derivan. A menudo, esto supone varios métodos, siendo los más fiables los ensayos de protección cruzada *in vivo*. Alternativamente, también pueden utilizarse pruebas *in vitro* (de preferencia, la neutralización vírica), lo que requiere la disponibilidad de sueros post-vacunación contra esos inóculos primarios. Los virus de siembra se pueden guardar a -20°C con glicerina o a temperatura inferior sin glicerina (por ejemplo, a -70°C). Los virus del inóculo de trabajo se pueden amplificar por uno o varios pases del inóculo original y utilizarlos para infectar el cultivo celular final a una proporción aproximada de 1 PFU (unidades formadoras de placas o calvas) por

cada 100 células. En la medida de lo posible, se debe registrar la fuente exacta del aislamiento y se deben incluir detalles como la localización, la especie y el tipo de material del que procede el virus. Se debe registrar la historia de los pases *in-vitro* del virus. También debe procurarse la minimización del riesgo de transmisión de los agentes de la encefalopatía espongiforme transmisible (TSEs) garantizando que los materiales de riesgo de la TSE no son utilizados como fuente del virus o en ninguno de los medios utilizados en la propagación del virus.

2. Método de producción

El método de propagación del virus recomendado para la producción de antígeno es el crecimiento de virus de la FA en grandes cantidades de cultivos en suspensión o en monocapas utilizando líneas celulares en condiciones de esterilidad. En algunos países puede ser aceptable el cultivo de células primarias para la fabricación de vacunas, pero, sólo si el método de elaboración cumple a rajatabla con la Buena Práctica de Fabricación, se aplica un procedimiento validado para garantizar la inactivación de todo posible agente extraño y se llevan a cabo pruebas durante la fabricación y con el producto acabado a fin de garantizar la consistencia e inocuidad del producto final. En general, el virus de la FA se produce a gran escala en sistemas celulares en suspensión bajo condiciones asépticas. Es esencial que todas las tuberías y contenedores estén cuidadosamente esterilizados para asegurar que en el sistema no existen áreas que contengan microorganismos. Además de las condiciones generales de esterilidad, es importante destacar que el virus es vulnerable al ataque por enzimas proteolíticas, como las producidas por microorganismos (22). También resulta crítico el control del pH y de la temperatura debido a la labilidad del virus a estos factores (21). La temperatura óptima para el crecimiento celular y vírico, y para la desnaturalización, que suele ser de alrededor de 37°C y 26°C, respectivamente, debe controlarse con precisión. Durante otras fases de la producción, la temperatura debe reducirse a 4-6°C. Los virus deben mantenerse a un pH cercano a 7,6 y nunca por debajo de 7,0.

Se utiliza una cepa adecuada de virus para infectar una suspensión o monocapas de una línea celular establecida, como la BHK. Tales cultivos deben estar libres de microorganismos contaminantes. Resulta común mantener los stocks de células BHK en nitrógeno líquido y darles un pase cuando sea necesario. Después de el pase, se extienden en medio nutritivo en un volumen y a una densidad celular apropiados para sembrar el cultivo principal. Como una aproximación indicativa, se siembra el cultivo principal para dar una densidad inicial de 0,2-0,5 x 10⁶ células/ml, y se deja multiplicar hasta 2-3 x 10⁶ células/ml antes de infectarlo con el virus.

Cuando el virus alcanza su título máximo, lo cual se determina por infectividad, FC y otras pruebas, el cultivo se clarifica, a menudo tratándolo con cloroformo seguido de centrifugación y filtración. A continuación, el virus se inactiva añadiendo etilenimina (EI), normalmente en forma de etilenimina binaria (BEI). Esto se prepara disolviendo, a una concentración de 0,1 M, hidrobromuro de 2-bromoetilamina en una solución de hidróxido sódico 0,2 N, e incubando a 37°C durante 1 hora (9, 10). El BEI formado se añade luego a una suspensión de virus mantenida a 26°C, a una concentración final de 3 mM. Normalmente, la inactivación se prolonga durante 24 horas, seguida de una segunda dosis de BEI durante otras 24 horas. La duración del tratamiento con BEI y la temperatura utilizada para la inactivación debe validarse según las condiciones actuales y el equipo utilizado durante el tratamiento. Después de la inactivación, cualquier BRI residual en el producto se puede neutralizar añadiendo una suspensión de tiosulfato a una concentración final de 2%. Para disminuir la probabilidad de que en la segunda aplicación no entren en contacto virus vivos con la BEI, es importante transferir inmediatamente el contenido de los recipientes a un segundo recipiente estéril, donde se deja que la inactivación continúe hasta 48 horas.

El virus inactivado se puede concentrar por ultrafiltración, precipitación con polietilenglicol o adsorción con óxido de polietileno (1, 62); el virus concentrado e inactivado puede purificarse aún más por procedimientos como la cromatografía. Si es necesario, estos antígenos concentrados se pueden mantener a -70°C o a temperaturas más bajas durante muchos años, y, cuando se requiera, convertirlos en vacunas mediante dilución en un tampón adecuado y adición de adyuvantes (24).

Normalmente, las vacunas convencionales contra la FA se presentan en forma acuosa o con adyuvante oleoso. La vacuna acuosa, que es la con más frecuencia se utiliza en el ganado vacuno se prepara adsorbiendo el virus en gel de hidróxido de aluminio, que es uno de los adyuvantes de la preparación final de la vacuna. Otros componentes del producto final incluyen antiespumante, rojo de fenol (si está permitido en el país que necesita la vacuna), hidrolizado de lactalbúmina, caldo de triptosa con fosfato, aminoácidos, vitaminas y sales tamponadas. También se incorpora un segundo adyuvante, la saponina, derivada del árbol sudamericano *Quillaja saponaria mollina*, y también mertiolato/cloroformo como conservante.

Las vacunas con adyuvante oleoso se formula utilizando aceites minerales, como Marcol y Drakeol. Estas preparaciones tienen varias ventajas sobre la vacuna estándar con hidróxido de aluminio/saponina, sobre todo su eficacia en los cerdos. Se utilizan mucho en Sudamérica para vacunar ganado bovino debido a una mayor duración de la inmunidad. El aceite mineral se pre-mezcla, por lo general, con un agente emulsionante, como el monooleato de manosa, antes de añadir una proporción o el total de la fase acuosa de la vacuna, y emulsionar mediante un dispersador coloidal, o un emulsificador mecánico continuo o de flujo ultrasónico. Se pueden

producir emulsiones dobles más complejas (agua/aceite/agua) emulsionando de nuevo en una fase acuosa que contenga una pequeña cantidad de detergente, como Tween 80 (37).

Una alternativa adicional es la representada por los adyuvantes oleosos "listos para usar" ha supuesto un avance significativo en los últimos años. Los aceites con ésteres del ácido octadecenoico y 2,5 anhidro-d-manitol, por ejemplo, forman fácilmente emulsiones dobles o mezcladas (agua/aceite/agua) que son estables y de baja viscosidad sin que se necesite un equipo emulsionantes sofisticado (11, 26). Cuando se utilizan componentes novedosos, incluido el adyuvante oleoso, en cualquier vacuna, es importante tener en cuenta que debe evaluarse su estatus relativo a los residuos en productos derivados de especies usadas en la fabricación de alimentos para garantizarle a la autoridad expendedora de licencias la inocuidad para los consumidores. Este requisito limita de forma considerable la gama de adyuvantes que se pueden utilizar en especies utilizadas en los alimentos.

3. Control interno

En general, los títulos de virus alcanzan niveles óptimos a las 24 horas de la infección de los cultivos celulares. El tiempo escogido para recoger el cultivo se puede basar en ciertas pruebas; por ejemplo, la muerte celular. La concentración de virus se puede determinar por pruebas de infectividad, gradiente de densidad de sacarosa (23) o técnicas serológicas. Es preferible utilizar un método que mida masa antigénica, como el análisis en gradiente de densidad de sacarosa, junto con uno que mida infectividad, ya que las dos propiedades no coinciden necesariamente y los diferentes métodos pueden complementarse.

Durante la inactivación del virus se deben tomar muestras a intervalos de tiempo regulares para controlar la velocidad y linealidad del proceso de inactivación. Los títulos de virus en las muestras se determinan por inoculación de cultivos celulares que sean muy susceptibles al virus de la FA, por ejemplo, células BHK o de tiroides bovino. Dichos cultivos permiten la prueba de muestras estadísticamente significativas en condiciones reproducibles. Los valores Ig_{10} de la infectividad de las muestras se representan en función del tiempo, y el proceso de inactivación no se considera correcto a menos que la última parte de la pendiente de la línea sea recta y que la extrapolación indique que hay menos de una partícula infecciosa por cada 10^4 litros de preparación al final del período de inactivación.

4. Prueba sobre el producto final

a) Inocuidad

La forma más efectiva de realización de las pruebas de inocuidad (no infectividad) consiste en aplicarlas a la masa total de material vírico recogido, concentrado e inactivado (véanse las sesiones D.3 y D.5.b, más adelante). Aunque puede resultar factible la confirmación de la inocuidad mediante el ensayo del virus eluído de la vacuna, este procedimiento no es aplicable de forma universal a todas las formulaciones y no es tan fiables como el ensayo de antígenos concentrados. Por ejemplo, la saponina influye mucho en la elución del virus de las vacunas con hidróxido de aluminio/saponina (25). Si el procedimiento de elución es apropiado a una preparación particular, debe ser validado sembrando muestras paralelas de vacuna con pequeñas cantidades de virus vivo (12).

Para obtener la aprobación reguladora, se debe realizar una prueba de toxicidad local y sistémica sobre un lote de ensayo de vacuna por una vía de administración recomendada en una prueba *in-vivo* en un número adecuado de cabezas de ganado (27). Deben realizarse pruebas con dosis doble y dosis repetida utilizando vacunas formuladas para que contengan la mayor cantidad y número de antígenos permitida utilizando un protocolo similar al descrito más abajo para las pruebas de inocuidad de lotes.

b) Potencia

Se debe utilizar ganado de más de 6 meses de edad, obtenido de áreas sin FA, que no se hayan vacunado previamente contra la FA y que carezcan de anticuerpos frente a los diferentes tipos de virus de la FA. Se deben vacunar, por la ruta indicada por el fabricante, tres grupos de por lo menos cinco animales. La vacuna se debe administrar a diferentes dosis por cada grupo, inoculando diferentes volúmenes de la vacuna. Por ejemplo, si el prospecto señala que una inyección de 2 ml corresponde a la administración de una dosis de vacuna, 1/4 de dosis corresponderá a inyectar 0,5 ml y 1/10 de dosis a 0,2 ml. Estos animales, y un grupo control de otros dos no vacunados, se inoculan para desafío 3 semanas (presentación acuosa) y hasta 4 semanas (aceite) después de la inoculación con una suspensión de virus bovino completamente virulento y apropiado a los tipos de virus presentes en el vacuna ensayada, inoculando intradérmicamente el equivalente a un total de 10.000 ID_{50} (dosis infectiva bovina al 50%) en dos zonas de la superficie superior de la lengua (0,1 ml por zona). Los animales se observan durante por lo menos 8 días. Los animales control no protegidos mostrarán lesiones en otros sitios además de la lengua y desarrollarán lesiones en al menos tres patas. Del número de animales protegidos en cada grupo, se calcula la PD_{50} (dosis protectora media) que contiene la vacuna. Existen varios métodos para calcular la PD_{50} (31), pero se prefieren los procedimientos basados en el método de Kärber (38). La vacuna debe contener al menos 3

PD₅₀ por dosis para el ganado bovino cuando se emplea con fines profilácticos, aunque es preferible emplear 6 PD₅₀ por dosis. En ocasiones una vacuna de potencia elevada evita el desarrollo de lesiones locales en la lengua.

Para la prueba PGP (porcentaje de protección contra la infección generalizada de la pata) se vacuna con una dosis completa por la ruta recomendada por el fabricante a un grupo de 16 animales seronegativos a la FA, de al menos 6 meses de edad, con las mismas características que las descritas para la PD₅₀. Estos animales, y un grupo control de dos animales no vacunados, se inoculan en desafío 4 semanas o más después de la vacunación con una cepa de desafío, que es una asuspensión de virus bovino completamente virulento y apropiado a los tipos de virus presentes en la vacuna ensayada, inoculando intradérmicamente 10.000 BID₅₀ (dosis infectiva bovina al 50%) en al menos dos zonas de la superficie superior de la lengua. Los animales control no protegidos mostrarán lesiones en otros sitios, además de la lengua, en los 7 días posteriores a la inoculación y desarrollarán lesiones en al menos tres patas; para uso profiláctico rutinario, la vacuna debe proteger al menos a 12 de los 16 animales vacunados. Se observará a los animales a los 7-8 días del desafío (61).

Las pruebas de potencia en otras especies, como ovejas, cabras o búfalos, o son diferentes o no están estandarizadas. Se considera que, en general, una prueba correcta en ganado bovino es suficiente evidencia para garantizar su uso en otras especies. Cuando se produzca una vacuna para uso principal en otras especies no bovinas, puede ser más apropiado realizar las pruebas de potencia de la vacuna en esa misma especie. Sin embargo, teniendo en cuenta los datos limitados que se poseen sobre el búfalo africano o el asiático (*Bubalus bubalis*) y las ovejas, y la frecuente naturaleza subclínica de la enfermedad en estas especies, los resultados de la prueba de potencia en el ganado bovino pueden ser un indicador más fiable de la calidad de la vacuna que intentar una prueba basada en la detección de signos clínicos en esas otras especies.

Para la prueba de potencia de las vacunas contra la FA en cerdos, se puede adoptar un protocolo similar a la prueba en ganado bovino, utilizando tres grupos de cinco cerdos, de edad no inferior a dos meses y libres de anticuerpos que neutralicen los diferentes serotipos del virus de la FA. Se vacuna un grupo con la dosis completa recomendada por el fabricante, otro grupo con una dosis reducida, por ejemplo con 1/4 de la dosis y el tercer grupo con una dosis más reducida, por ejemplo, con 1/16 de la dosis. Tradicionalmente, la respuesta a las vacunas con aceite se deja desarrollar durante más tiempo, y el día 28 después de la vacunación se inyectan los tres grupos, más dos cerdos control no vacunados, en una prueba de desafío. No obstante, dependiendo de la formulación, este intervalo puede reducirse al intervalo utilizado en la prueba con el ganado. Es importante separar los diferentes grupos de dosis durante el ensayo y retirar los animales tan pronto como presenten FA generalizada a fin de evitar un desafío excesivo para los animales restantes. El desafío consiste en la inyección intradérmica en los bulbos del talón de una pata, de 10.000 DICCT₅₀ (0,2 ml), calculado por crecimiento en un cultivo celular porcino adecuado, de un virus virulento homólogo a una cepa utilizada en la vacuna y eso tiene como resultado una enfermedad generalizada. Alternativamente, puede administrarse el virus de desafío en una zona de la parte muscular del cuello detrás del cuello, utilizando una dosis de virus del que se sepa que causa una enfermedad generalizada por esa vía. Los animales se observan diariamente durante 10 días para vigilar la aparición de síntomas de FA. Los animales control deben desarrollar síntomas en más de una pata. Del número de animales protegidos en cada grupo, se calcula el contenido en PD₅₀ de la vacuna. Existen varios métodos para calcular la PD₅₀ (31), incluidos los procedimientos basados en el método de Kärber. La vacuna debe contener al menos 3 PD₅₀ por dosis para cerdos. También se puede adoptar para cerdos un protocolo similar a la prueba PGP en el ganado bovino, utilizando un grupo de 16 animales vacunados con una dosis completa de vacuna y dos animales control no vacunados. El desafío se hace por inyección intradérmica en los bulbos del talón de una pata con 10.000 BID₅₀ (0,2 ml) de un virus virulento homólogo a la cepa utilizada en la vacuna y se sabe que eso provoca signos clínicos en los cerdos.

Para establecer la potencia de una vacuna, se pueden utilizar otras pruebas indirectas, como la medida en cultivo celular de los anticuerpos neutralizantes del virus después de la vacunación, o de los anticuerpos por ELISA, o de los anticuerpos de protección en ratones lactantes, con tal de que se haya establecido estadísticamente una correlación satisfactoria entre los resultados obtenidos por la prueba con el serotipo particular de la vacuna y la prueba de potencia en el ganado (60). Por ejemplo, se utiliza el porcentaje esperado de protección para analizar los sueros de un grupo de al menos 16 animales y para expresar la probabilidad de que un animal resulte protegido midiendo los anticuerpos neutralizantes, los anticuerpos por ELISA o los anticuerpos de protección. En un grupo único al que se suministra una dosis completa de vacuna, el porcentaje medio de protección individual esperado sería igual o mayor que el 75% si se emplean 16 animales o igual o mayor que el 70% cuando se utilizan 30 animales en el grupo experimental.

La presencia en la vacuna de más de un serotipo no disminuye con la inducción de anticuerpos frente a otro serotipo o con la correlación del título de anticuerpos y la protección.

c) Pureza: prueba para anticuerpos frente a proteínas no estructurales

El *Código de Salud de la OIE para animales terrestres* estipula que un criterio para volver a establecer un estado de ausencia de FA después de un brote, si se utilizan vacunas, es probar a los animales vacunados para la presencia de anticuerpos contra NSP. De igual forma, los países que deseen ser reconocidos como libres de FA con la vacuna deben demostrar la ausencia de circulación del virus mostrando que los animales vacunados están libres de anticuerpos contra el contenido en NSP que surge como resultado de la infección. Por consiguiente, los antígenos para la FA usados para formular vacunas, que se utilicen en estas circunstancias deben estar purificados para reducir el contenido en NSP. Con las actuales técnicas de fabricación es posible excluir la mayoría de las NSP de forma que induzcan pocos anticuerpos específicos para NSP. En estas circunstancias, la detección de anticuerpos contra las NSP puede proporcionar evidencia de que los animales vacunados han estado expuestos al virus de la FA. Los fabricantes de vacunas podrían querer explotar este potencial proclamando que sus vacunas no inducen anticuerpos contra una o más proteínas no estructurales y pueden utilizarse en conjunción con una prueba de diagnóstico. Además de proporcionar documentación concluyente sobre los procesos que implica tal purificación, los fabricantes deben demostrar la ausencia de inmunogenicidad frente a las proteínas no estructurales como parte del procedimiento de obtención de una licencia para poder hacer esa reivindicación en la literatura. Un método de prueba que se puede utilizar es vacunar un número adecuado de terneros, de preferencia, con al menos una dosis doble de una combinación de ensayos de la vacuna que contenga el máximo número y cantidad de antígenos permitidos en la autorización (esos terneros pueden ser los mismos que se utilizaron en la prueba de inocuidad descrita en la sección D.4.a del presente capítulo). Los terneros deben vacunarse al menos tres veces durante un periodo de 3–6 meses y, a continuación, deben ensayarse 30–60 días después de la última vacunación para detectar la presencia de anticuerpos contra las NSP utilizando las pruebas descritas en la sección B.2.d del presente capítulo. Los resultados negativos de estas pruebas con NSP apoyan las afirmaciones de que la vacuna no induce anticuerpos contra las NSP.

Por lo que respecta a los lotes, puede demostrarse la confirmación de la pureza de la vacuna si se demuestra la ausencia de aumento de la reactividad contra las proteínas no estructurales de los sueros procedentes de los animales utilizados en la prueba de potencia obtenidos 30 días después de la primovacunación y antes del desafío, en comparación con los sueros de los mismos animales antes de la vacunación.

d) Duración de la inmunidad

Para establecer un nivel satisfactorio de inmunidad, lo normal es proceder a una primera fase de dos inoculaciones, separadas 2-4 semanas entre sí, seguida por una revacunación cada 4-12 meses. La frecuencia de revacunación dependerá de la situación epidemiológica y del tipo y calidad de la vacuna utilizada. Cuando el acceso a los animales resulta difícil, es preferible emplear vacunas con adyuvantes con aceite a los 4 meses y al año de edad, y después revacunar cada año. En la medida de lo posible, los fabricantes de vacunas deben demostrar la duración de la inmunidad para su formulación específica en cada especie para la que está indicada

En terneros nacidos de vacas vacunadas, se debe retrasar la primera vacunación lo máximo posible para permitir que descienda el nivel de anticuerpos maternos, pero no más allá de los 4 meses, tiempo al que se espera que una elevada proporción responda eficazmente a la vacunación. Con algunas vacunas, En terneros nacidos de vacas no vacunadas, la primera vacuna puede administrarse a la primera semana de edad (8).

e) Estabilidad

La caducidad de las vacunas convencionales contra la FA suele ser de 1-2 años a 4°C pero son sensibles a la temperatura y no deberían congelarse ni mantenerse por encima de 4°C. Se debe demostrar la estabilidad de todas las vacunas, pero sobre todo las vacunas con emulsión de aceite, como parte de los estudios de determinación de la caducidad.

f) Conservantes

Los conservantes más utilizados son cloroformo y mertiolato. Este último se utiliza a una concentración final de 1/30.000 (p/v).

g) Precauciones (riesgos)

Las vacunas actuales contra la FA son inocuas y no presentan riesgo tóxico para el usuario. Se debe tener cuidado para evitar la autoinyección de vacunas con vacunas que contienen emulsiones de aceite.

5. Control de lotes

a) Esterilidad

Tanto la masa total de antígeno inactivado, como los adyuvantes, los tampones de dilución, y el producto final deben someterse a pruebas de esterilidad. Esto se puede realizar directamente con los componentes de la vacuna y con el producto final, pero el método preferido es recoger cualquier microorganismo contaminante por filtración en membrana del material a examinar y detectarlo por incubación de la membrana en medios de cultivo. Este procedimiento permite la eliminación de conservantes y otras sustancias que puedan inhibir la detección de los microorganismos. En la Farmacopea Europea 2005 se describen normas sobre técnicas y medios de cultivo que permiten la detección de un amplio espectro de microorganismos (ref. 27; consúltese también el capítulo 1.1.5).

b) Inocuidad

La prueba de inocuidad es una prueba del proceso de fabricación que debe llevarse a cabo con cada lote de antígeno. Después de la inactivación se debería probar para ausencia del virus infeccioso una muestra de cada lote de antígeno inactivado, que represente por lo menos 200 dosis, por inoculación de monocapas celulares que sean sensibles, si es posible del mismo origen que las utilizadas para la producción del antígeno. Para hacer esto puede preferirse concentrar el antígeno, en cuyo caso se debe demostrar que el concentrado no interfiere con la sensibilidad o la estimación de la prueba. Las monocapas celulares se examinan diariamente durante 3 días, después de lo cual el medio gastado se transfiere a monocapas frescas y las originales se rellenan con medio nuevo. Empleando este método, se pueden amplificar trazas de virus vivo mediante pases y detección sobre la base del ECP observado. Normalmente, se emplean dos o tres pases de la preparación original del virus. Una variante de este método es congelar y descongelar las monocapas viejas para liberar el virus intracelular, que puede detectarse por pases sucesivos.

c) Seguridad

Esta prueba de seguridad del lote final del producto se realiza para detectar reacciones locales o sistémicas. La prueba también puede confirmar la inocuidad pero no es tan sensible como las pruebas *in-vitro* descritas anteriormente. Para la comercialización de los lotes, se inocula a al menos dos cabezas de ganado seronegativas sanas por la vía de administración recomendada con el doble de la dosis vacunal recomendada. Se observan los animales para reacciones locales y sistémicas a la vacuna durante no menos de 14 días. Si alguno de los animales manifestara signos clínicos de FA, eso significa que la vacuna no pasa la prueba de seguridad. De la misma forma, debe valorarse cualquier toxicidad atribuible a la vacuna, pues ésta constituiría un impedimento para la aceptación del lote. Lo ideal es que también se ensaye la seguridad de las vacunas preparadas para especies distintas al ganado en las especies a la que van destinadas, administrando una dosis doble de la vacuna siguiendo la vía dosis recomendada por el fabricante. Deben examinarse a diario los animales durante un mínimo de 14 días para evidencia de toxicidad o signos de FA.

d) Potencia

La potencia se examina sólo en el producto formulado (véase la sección D.5.b). La carga de antígeno puede utilizarse como un indicador indirecto de potencia, siempre que se haya establecido una correlación entre la carga de antígeno, la respuesta serológica, y la protección contra el desafío, y siempre que se haya realizado una prueba alternativa adecuada para medir la respuesta serológica a la inmunización con resultados satisfactorios.

6. Almacenamiento y control de los concentrados de antígeno

El proceso de almacenamiento de antígenos concentrados a temperatura muy baja para la formulación posterior de la vacuna de la FA se está convirtiendo en una solución cada vez más generalizada en la fabricación de vacunas. El almacenamiento no solo proporciona una reserva estratégica para casos de emergencia (véase el capítulo "Directrices para los Estándares Internacionales de los Bancos de Vacunas"), sino que permite el acceso del fabricante a muchas variedades de antígeno que se pueden formular y entregar al cliente de forma rápida. Ese almacenamiento acorta al máximo el tiempo que media entre un pedido y la correspondiente entrega, sobre todo cuando se pide una vacuna multivalente. Otra ventaja de este procedimiento es que la mayoría de las pruebas de calidad pueden completarse mucho antes del envío.

a) Criterios de pre-almacenamiento

Es preciso afirmar que los antígenos deben controlarse empleando las normas indicadas en las secciones D.1–4.

Debe prestarse una atención especial a los siguientes puntos:

- Ausencia de agentes extraños;

Debe demostrarse que los antígenos están libres de todos los agentes declarados por la autoridad competente.

- la sensibilidad de la línea celular utilizada para detectar restos de virus;

Las células empleadas para ensayar la ausencia de restos de virus vivos no son adecuadas en caso de que el uso de una cantidad de virus equivalente a 1 µg del antígeno 146S produce un título de menos de 106 CC ID50 (27).

- los procedimientos de emergencia para la aceptación provisional de nuevos virus del inóculo original (MSV), y la posterior comercialización de las vacunas formuladas.

En caso de invasión de una región por una cepa nueva que es antigénicamente distinta de las cepas vacunales existentes, puede que sea preciso elaborar una nueva cepa vacunal a partir de un aislamiento natural representativo. Antes de que se pueda aceptar un nuevo MSV, debe demostrarse que se han cumplido plenamente las directrices pertinentes dirigidas a demostrar la ausencia de cualquier agente extraño de los declarados por la autoridad competente mediante pruebas generales y específicas, y determinar la homología con los aislamientos originales candidatos. Puede resultar largo el tiempo necesario para obtener los antisueros específicos necesarios para neutralizar la nueva cepa que se usa en las pruebas generales de detección de agentes extraños y en la realización de otras pruebas específicas para las que se requieren técnicas especializadas. Por tanto, en situaciones de emergencia en las que no hay tiempo suficiente para realizar el ensayo completo del MSV, la aceptación provisional de la nueva cepa debe estar basada en un análisis del riesgo de una posible contaminación por agentes extraños del antígeno producido a partir del nuevo MSV con agentes extraños. Para la valoración de este riesgo, ha de tenerse en cuenta que debe emplearse un procedimiento validado para inactivar los virus con envoltura al determinar el MSV, y que el virus se inactiva mediante un inactivador químico con cinética de primer orden. Se obtiene una garantía adicional gracias a la obligación de supervisar y registrar la cinética de inactivación para cada lote de productos.

A fin de acelerar la salida al mercado de lotes de vacunas formuladas de forma que contengan nuevas cepas vacunales, puede ser aceptable que las pruebas de potencia de lotes se realicen usando un lote de antígeno intermedio en tanto se produzcan todos los lotes de antígeno que han de constituir el lote final de antígeno. Esto permitirá determinar la potencia del antígeno derivado de un nuevo MSV mientras que el fabricante continúa produciendo existencias de este nuevo antígeno.

b) Criterios de almacenamiento

• Instalaciones

Es importante que todos los aspectos relacionados con el almacenamiento de concentrados de antígeno cumplan plenamente con los estándares convencionales de la Buena Práctica de Fabricación.

• Contención de los antígenos guardados

Se ha de tener en cuenta el número o los volúmenes de dosis almacenados, sobre todo en las reservas compartidas por Países Miembros, y cada país tiene una apreciación distinta de la cantidad de dosis requerida en casos de emergencia. Es aconsejable almacenar el antígeno en unidades que resulten fáciles de manejar para permitir una mejor utilización del espacio de almacenamiento disponible y una capacidad de producir lotes de vacunas más pequeños. Los recipientes de entre uno y dos litros pueden alojar más de 30.000 dosis bovinas. Cuando se requiera una acumulación grande de reservas de una cepa vacunal concreta que solo se pueda producir en varias tandas, los directores del banco de vacunas deben ponderar la necesidad de formular cada lote en una mezcla final representativa con fines de ensayo o mezclar los lotes individuales, en el momento adecuado, para facilitar la formulación o el ensayo.

Es importante el tipo de recipiente utilizado para el concentrado de antígeno. En condiciones de temperatura muy baja, es importante el uso de recipientes que no sean quebradizos ni frágiles, como por ejemplo, botellas fabricadas con fluoro polímero. Las botellas fabricadas con polifluoralcoxi (PFA), por ejemplo, tienen un rango de resistencia a la temperatura de entre -270°C y +250°C.

• **Etiquetado de los antígenos almacenados**

Aunque existen normas nacionales e internacionales sobre el etiquetado obligatorio de productos médicos veterinarios, no existen tales normas para materiales de emergencia almacenados tales como el componente antigénico de las vacunas, ya que, en términos normativos es considerado como material “en proceso”. En condiciones de temperatura ultrabaja, el etiquetado debe ser duradero. Por experiencia, el sistema de etiqueta sujeta a la botella con alambre es la opción preferida, debiendo usarse una etiqueta metálica lo bastante grande para que en ella quepan los detalles precisos. Entre esos detalles debe incluirse el antígeno/la cepa vacunal, el número de lote, la fecha de recepción, y también debe incluir un número de recipiente o stock. Esa información debe ser claramente legible y anotada con rotulador imborrable. Con ese fin, se han utilizado etiquetas de aluminio, que están disponibles con recubrimiento de distintos colores para facilitar una mejor identificación y accesibilidad, sobre todo, cuando se guardan diferentes cepas antigénicas en un mismo recipiente. Además, en las etiquetas metálicas se puede grabar la información de forma permanente.

• **Supervisión**

Es de vital importancia que los concentrados de antígeno se conserven en condiciones óptimas y se supervisen de forma rutinaria para tener cierta garantía de que resultarán eficaces cuando se utilicen. Se debe establecer, por tanto, un sistema de control rutinario de estos concentrados de antígenos estableciendo si es preciso, a intervalos adecuados de tiempo, un régimen de pruebas para garantizar la integridad del componente antigénico la potencia aceptable del producto final. Por ejemplo, en los bancos de vacunas de FA normalmente se realiza un control de la temperatura de almacenamiento y una inspección periódica de las botellas de antígeno para detectar posibles roturas o escapes. También puede ser conveniente, según el tipo, volumen y forma de almacenamiento, pesa cada año los depósitos de antígeno para asegurarse de que éste no se haya liofilizado. Algunos bancos de vacunas de FA han incorporado pruebas físico-químicas, como los análisis del gradiente de la densidad de la sacarosa para controlar la integridad y consiguiente estabilidad del virus, y algunos incluso han realizado pruebas in-vivo. Sin embargo, como se ha demostrado que la validez de los concentrados de antígeno de FA pueden durar 15 años más allá de la fecha de caducidad, puede ser suficiente un enfoque físico-químico.

Se propone el siguiente calendario de pruebas como adecuado para la validación y revalidación de los antígenos almacenados.

Tiempo	Prueba
Al recibo (año 0) y, a partir de entonces, cada 5 años	Cuantificación del 146S * La prueba de potencia en ganado basada en técnicas serológicas en las que se ha correlacionado adecuadamente la potencia con la inmunogenicidad para el antígeno en cuestión, o, a discreción del propietario del banco, puede ser una prueba “truncada” ** para demostrar que la potencia mínima de la vacuna sigue siendo mayor que el mínimo requerido; no obstante, el trucaje puede conllevar una infravaloración de la potencia de la vacuna
Años 2 y 4, e inmediatamente antes de la formulación si es necesario	Cuantificación del 146S
Cada 5 años	Evaluación de todos los datos de los 5 años anteriores para valorar la necesidad de sustituir el antígeno

* Se han utilizado otras pruebas fisicoquímicas, como SDS-PAGE, para evaluar la integridad del VP1 pero no están lo bastante válidas para su utilización rutinaria.

** En una prueba truncada se asume que los animales del siguiente grupo de volumen inferior no han sido protegidos. De ahí que la prueba proporcione un valor PD₅₀ artificialmente bajo pero se reduce el número de animales requeridos.

Para apoyar estos requisitos de pruebas para los depósitos de antígeno, debería incluirse entre los concentrados una cantidad de pequeñas muestras que sean representativas de un stock más grande. Las alícuotas/stocks pequeños de antígeno de FA están tradicionalmente formados por un volumen que representa aproximadamente un miligramo de antígeno.

REFERENCIAS

1. ADAMOWICZ PH., LEGRAND B., GUERCHE J. & PRUNET P. (1974). Un nouveau procédé de concentration et de purification du virus. Application du virus de la fièvre aphteuse produit sur cellules BHK21 pour l'obtention des vaccins hautement purifiés. *Bull. OIE*, **81**, 1125–1150.
2. ALEXANDERSEN S., ZHANG Z., REID S.M., HUTCHINGS G.H., DONALDSON A.I. (2002). Quantities of infectious virus and viral RNA recovered from sheep and cattle experimentally infected with foot-and-mouth disease virus O UK 2001. *J. Gen. Virol.*, **83** (8), 1915–1923.
3. ALONSO F.A. (1986). Manual de Diagnostico de Laboratorio de las Enfermedades Vesiculares, Panaftosa, 1986.
4. ALONSO F.A., CASAS OLASCOAGA R.C., ASTUDILLO V.M., SONDAHL M.S., GOMES I. & VIANNA FILHO Y.L. (1987). Updating of foot-and-mouth disease virus strains of epidemiological importance in South America. *Bol. Centr. Panam. Fiebre Aftosa*, **53**, 11–18.
5. ALONSO A., GOMES M.D., RAMALHO A.K., ALLENDE R., BARAHONA H., SONDAHL M. & OSÓRIO F. (1993). Characterization of foot-and-mouth disease virus by monoclonal antibodies. *Viral Immunol.*, **6** (3), 219–228.
6. ALONSO A., MARTINS M.A., GOMES D.M.P., ALLENDE R. & SONDAHL M.S. (1992). Foot-and-mouth disease virus typing by complement fixation and enzyme-linked immunosorbent assay using monovalent and polyvalent antisera. *J. Vet. Diagn. Invest.*, **4**, 249–253.
7. AMAREL-DOEL C.M.F., OWEN N.E., FERRIS N.P., KITCHING R.P. & DOEL T.R. (1993). Detection of foot-and-mouth disease viral sequences in clinical specimens and ethyleneimine-inactivated preparations by the polymerase chain reaction. *Vaccine*, **11**, 415–421.
8. AUGÉ DE MELLO P., GOMES I. & BAHNEMANN H.G. (1989). The vaccination of young cattle with an oil adjuvant foot-and-mouth disease vaccine. *Bol. Centr. Panam. Fiebre Aftosa*, **55**, 3–14.
9. BAHNEMANN H.G. (1975). Binary ethyleneimine as an inactivant for foot-and-mouth disease virus and its application for vaccine production. *Arch. Virol.*, **47**, 47–56.
10. BAHNEMANN H.G. (1990). Inactivation of viral antigens for vaccine preparation with particular reference to the application of binary ethyleneimine. *Vaccine*, **8**, 299–303.
11. BARNETT P.V., PULLEN L., WILLIAMS L. & DOEL T.R. (1996). International bank for foot-and-mouth disease vaccine: assessment of Montanide ISA 25 and ISA 206, two commercially available oil adjuvants. *Vaccine*, **14**, 1187–1198.
12. BARTELING S.Z. & VREESWIJK Z. (1991). Developments in foot-and-mouth disease vaccines. *Vaccine*, **9**, 75–88.
13. BASTOS A.D.S. (1998). Detection and characterization of foot-and-mouth disease virus in sub-Saharan Africa. *Onderstepoort J. Vet. Res.*, **65**, 37–47.
14. BERGMANN I.E., MALIRAT V., NEITZERT E., PANIZUTTI N., SANCHEZ C. & FALCZUK A. (2000). Improvement of serodiagnostic strategy for foot and mouth disease virus surveillance in cattle under systematic vaccination: a combined system of an indirect ELISA-3ABC with an enzyme-linked immunoelectrotransfer blot. *Arch. Virol.*, **145**, 473–489.
15. BERGMANN I.E., NEITZERT E., MALIRAT V., ORTIZ S., COLLING A., SANCHEZ C. & CORREA MELO E. (2003). Rapid serological profiling by enzyme-linked immunosorbent assay and its use as an epidemiological indicator of foot-and-mouth disease viral activity. *Arch. Virol.*, **148**, 891–901.
16. BERGMANN I.E., TIRABOSCHI B., MAZZUCA G., FERNANDEZ E., MICHAILHOFF C.A., SCODELER E. & LA TORRE J.L. (1988). Serological and biochemical analysis of foot-and-mouth disease virus (serotype C3) isolated in Argentina between 1981 and 1986. *Vaccine*, **6**, 245.
17. BROCCHI E., BERGMANN I.E., DEKKER A., PATON D.J., SAMMIN D.J., GREINER M., GRAZIOLI S., DE SIMONE F., YADIN H., HAAS B., BULUT N., MALIRAT V., NEITZERT E., GORIS N., PARIDA S., SORENSEN K. & DE CLERCQ K. (2006). Comparative evaluation of six ELISAs for the detection of antibodies to the non-structural proteins of foot-and-mouth disease virus. *Vaccine* (submitted).

18. CALLAHAN J.D., BROWN F., CSORIO F.A., SUR J.H., KRAMER E., LONG G.W., LUBROTH J., ELLIS S.J., SHOULARS K.S., GAFFNEY K.L., ROCK D.L. & NELSON W.M. (2002). Use of a portable real-time reverse transcriptase-polymerase chain reaction assay for rapid detection of foot-and-mouth disease virus. *J. Am. Vet. Med. Assoc.*, **220** (11), 1636–1642.
19. CLARKE J.B. & SPIER R.E. (1980). Variation in the susceptibility of BHK populations and cloned cell lines to three strains of foot-and-mouth disease virus. *Arch. Virol.*, **63**, 1–9.
20. DE DIEGO M., BROCCHI E., MACKAY D. & DE SIMONE F. (1997). The use of the non-structural polyprotein 3ABC of FMD virus as a diagnostic antigen in ELISA to differentiate infected from vaccinated cattle. *Arch. Virol.*, **142**, 2021–2033.
21. DOEL T.R. & BACCARINI P.J. (1981). Thermal stability of FMDV. *Arch. Virol.*, **70**, 21–32.
22. DOEL T.R. & COLLEN T. (1982). Qualitative assessment of 146S particles of FMDV in preparations destined for vaccines. *J. Biol. Stand.*, **10**, 69–81.
23. DOEL T.R., FLETTON B. & STAPLE R.F. (1982). Further developments in the quantification of small RNA viruses by UV photometry of sucrose density gradients. *Dev. Biol. Stand.*, **50**, 209–219.
24. DOEL T.R. & PULLEN L. (1990). International bank for foot-and-mouth disease vaccines: stability studies with virus concentrates and vaccines prepared from them. *Vaccine*, **8**, 473–478.
25. DOEL T.R. & STAPLE R.F. (1982). The elution of FMDV from vaccines adjuvanted with aluminium hydroxide and with saponin. *J. Biol. Stand.*, **10**, 185–195.
26. DOEL T.R., WILLIAMS L. & BARNETT P.V. (1994). Emergency vaccination against foot-and-mouth disease. The rate of development of immunity and its implications for the carrier state. *Vaccine*, **12**, 592–600.
27. EUROPEAN PHARMACOPOEIA (2004). Fifth Edition. Monograph No. 63. Editions of the Council of Europe, Strasbourg, France.
28. FERRIS N.P. & DAWSON M. (1988). Routine application of enzyme-linked immunosorbent assay in comparison with complement fixation for the diagnosis of foot-and-mouth and swine vesicular disease. *Vet. Microbiol.*, **16**, 201–209.
29. FERRIS N.P. & DONALDSON A.I. (1992). The World Reference Laboratory for Foot and Mouth Disease: a review of thirty-three years of activity (1958–1991). *Rev. sci. tech. Off. int. epiz.*, **11** (3), 657–684.
30. FOOD AND AGRICULTURAL ORGANIZATION OF THE UNITED NATIONS (FAO) (1984). Emerging Diseases of Livestock. Vol. 1. The Diseases and their Diagnosis, Geering W.A., ed. FAO, Rome, Italy, 43–51.
31. FOOD AND AGRICULTURAL ORGANIZATION OF THE UNITED NATIONS (FAO) (1997). Potency assessment of inactivated viral vaccines. *In*: FAO Animal Production and Health Series No 35. Vaccine Manual. The Production and Quality Control of Veterinary Vaccines for use in Developing Countries, Mowat N. & Rweyemamu M., eds. FAO, Rome, Italy, 395–409.
32. GOLDING S.M., HEDGER R.S., TALBOT P. & WATSON J. (1976). Radial immunodiffusions and serum neutralisation techniques for the assay of antibodies to swine vesicular disease. *Res. Vet. Sci.*, **20**, 142–147.
33. GORIS N. & DE CLERCQ K. (2005). Quality assurance/quality control of foot and mouth disease solid phase competition enzyme-linked immunosorbent assay – Part I. Quality assurance: development of secondary and working standards. *Rev. sci. tech. Off. int. Epiz.*, **24** (3), 995–1004.
34. GORIS N. & DE CLERCQ K. (2005). Quality assurance/quality control of foot and mouth disease solid phase competition enzyme-linked immunosorbent assay – Part II. Quality control: comparison of two charting methods to monitor assay performance. *Rev. sci. tech. Off. int. Epiz.*, **24** (3), 1005–1016.
35. HAMBLIN C., BARNETT I.T.R. & HEDGER R.S. (1986). A new enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) for the detection of antibodies against foot-and-mouth disease virus. I. Development and method of ELISA. *J. Immunol. Methods*, **93**, 115–121.

36. HAMBLIN C., KITCHING R.P., DONALDSON A.I., CROWTHER J.R. & BARNETT I.T.R. (1987). Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) for the detection of antibodies against foot-and-mouth disease virus. 3. Evaluation of antibodies after infection and vaccination. *Epidemiol. Infect.*, **99**, 733–744.
37. HERBERT W.J. (1965). Multiple emulsions. A new form of mineral-oil antigen adjuvant. *Lancet*, **II**, 771.
38. KÄRBER G. (1931). Beitrag zur kollektiven behandlung pharmakologischer reihenversuche. Archive für Experimentelle Pathologie Pharmakologie, **162**, 480–483.
39. KITCHING R.P. & DONALDSON A.I. (1987). Collection and transportation of specimens for vesicular virus investigation. *Rev. sci. tech. Off. int. Epiz.*, **6**, 263–272.
40. KITCHING R.P., RENDLE R. & FERRIS N.P. (1988). Rapid correlation between field isolates and vaccine strains of foot-and-mouth disease virus. *Vaccine*, **6**, 403–408.
41. MACKAY D.K., BULUT A.N., RENDLE T., DAVIDSON F. & FERRIS N.P. (2001). A solid-phase competition ELISA for measuring antibody to foot-and-mouth disease virus. *J. Virol. Methods*, **97** (1–2), 33–48.
42. MACKAY D.K.J., FORSYTH M.A., DAVIES P.R., BERLINZANI, A., BELSHAM G.J., FLINT M. & RYAN M.D. (1997). Differentiating infection from vaccination in foot-and-mouth disease using a panel of recombinant, non-structural proteins in ELISA. *Vaccine*, **16**, 446–459.
43. MCCULLOUGH K.C., DE SIMONE F., BROCCHI E., CAPUCCI L., CROWTHER J.R. & KIHM U. (1992). Protective immune response against foot-and-mouth disease. *J. Virol.*, **66** (4), 1835–1840.
44. MINISTRY OF AGRICULTURE, FISHERIES AND FOOD (1986). Foot-and-mouth disease. Ageing of lesions. Her Majesty's Stationery Office, London, UK.
45. NEIZERT E., BECK E., AUGÉ DE MELLO P., GOMES I. & BERGMANN I.E. (1991). Expression of the aphthovirus RNA polymerase gene in *Escherichia coli* and its use together with other bioengineered non-structural antigens in detection of lager persistent infections. *Virology*, **184**, 799–804.
46. PAIBA G.A., ANDERSON J., PATON D.J., SOLDAN A.W., ALEXANDERSEN S., CORTEYN M., WILSDEN G., HAMBLIN P., MACKAY D.K. & DONALDSON A.I. (2004). Validation of a foot-and-mouth disease antibody screening solid-phase competition ELISA (SPCE). *J. Virol. Methods*, **115**, 145–158.
47. PANAFTOSA (PAN-AMERICAN FOOT-AND-MOUTH DISEASE CENTER) (2001). Final recommendations of the Seminario internacional de Control de Vacuna Antiaftosa, Panaftosa, Rio de Janeiro, Brazil, 10–14 September.
48. PATON D.J., VALARCHER J.-F., BERGMANN I., MATLHO O.G., ZAKHAROV V.M., PALMA E.L. & THOMSON G.R. (2005). Selection of foot-and-mouth disease vaccine strains – a review. *Rev. sci. tech. Off. int. epiz.*, **24**, 981–993.
49. PEREIRA H.G. (1977). Subtyping of foot and mouth disease virus. *Dev. Biol. Stand.*, **35**, 167–174.
50. REID S., FERRIS N.P., HUTCHINGS G.H., SAMUEL A.R. & KNOWLES N.J. (2000). Primary diagnosis of foot-and-mouth disease by reverse transcription polymerase chain reaction. *J. Virol. Methods*, **89**, 167–176.
51. REID S., FERRIS N.P., HUTCHINGS G.H., ZHANG Z., BELSHAM G.J., ALEXANDERSEN S. (2001). Diagnosis of foot-and-mouth disease by real-time fluorogenic PCR assay. *Vet. Rec.*, **149**, 621–623.
52. REID S. M., GRIERSON S.S., FERRIS N.P., HUTCHINGS G. H. & ALEXANDERSEN S. (2003). Evaluation of automated RT-PCR to accelerate the laboratory diagnosis of foot-and-mouth disease virus. *J. Virol. Methods*, **107** (2), 129–139.
53. ROEDER P.L. & LE BLANC SMITH P.M. (1987). The detection and typing of foot-and-mouth disease virus by enzyme-linked immunosorbent assay: a sensitive, rapid and reliable technique for primary diagnosis. *Res. Vet. Sci.*, **43**, 225–232.
54. RWEYEMAMU M.M. (1984). Antigenic variation in foot-and-mouth disease: studies based on the virus neutralization reaction. *J. Biol. Standards*, **12** (3), 323–337.
55. RWEYEMAMU M.M., BOOTH J.C., HEAD M.M. & PAY T.W.F. (1978). Microneutralisation tests for serological typing of foot and mouth disease virus strains. *J. Hyg.*, **8**, 107–102.

56. RWEYEMAMU M.M. & HINGLEY P.J. (1984). Foot and mouth disease virus strain differentiation: analysis of the serological data. *J. Biol. Stand.*, **12**, 225–229.
57. SAMUEL A.R., OULDRIDGE E.J., ARROWSMITH A.E.M., KITCHING R.P. & KNOWLES N.J. (1990). Serological analysis of type O isolates of FMD from the Middle East 1981–88. *Vaccine*, **8**, 390–395.
58. SKINNER H.H. (1960). Some techniques for producing and studying attenuated strains of the virus of foot and mouth disease. *Bull. OIE*, **53**, 634–650.
59. SORENSEN K.J., MADSEN K.G., MADSEN E.S., SALT J.S., NQUINDI J. & MACKAY D.K.J. (1998). Differentiation of infection from vaccination in foot-and-mouth disease by the detection of antibodies to the non-structural proteins 3D, 3AB and 3ABC in ELISA using antigens expressed in baculovirus. *Arch. Virol.*, **143**, 1461–1476.
60. STREBEL K., BECK E., STROHMAIER D. & SCHALLER H. (1986). Characterisation of foot-and-mouth disease virus gene products with antisera against bacterially synthesised fusion proteins. *J. Virol.*, **57**, 983–991.
61. VIANNA FILHO Y.L., ASTUDILLO V., GOMES I., FERNANDEZ G., ROZAS C.E.E., RAVISON J.A. & ALONSO A. (1993). Potency control of foot-and-mouth disease vaccine in cattle. Comparison of the 50% protective dose and protection against generalisation. *Vaccine*, **11–14**, 1424–1428.
62. WAGNER G.G., CARD J.L. & COWAN K.M. (1970). Immunochemical studies of foot-and-mouth disease virus. VII. Characterization of foot-and-mouth disease virus concentrated by polyethylene glycol precipitation. *Arch. Ges. Virusforsch.*, **30**, 343–352.
63. WOODBURY E.L., ILOTT M.C., BROWN C.C. & SALT J.S. (1995). Optimization of an in situ hybridization technique for the detection of foot-and-mouth disease virus in bovine tissues using the digoxigenin system. *J. Virol. Methods*, **51**, 89–94.

*
* *

NB: Existen laboratorios de referencia de la OIE para la fiebre aftosa (véase el cuadro en la parte 3 de este *Manual de Animales Terrestres* o consúltese la lista más actualizada en la página Web de la OIE: www.oie.int).