

CAPÍTULO 3.1.3.

LENGUA AZUL (INFECCIÓN POR EL VIRUS DE LA LENGUA AZUL)

RESUMEN

La lengua azul (LA) es una enfermedad vírica infecciosa y transmitida principalmente por vectores que afecta a rumiantes domésticos y salvajes, como ovejas, cabras, bovinos, búfalos, ciervos y a la mayoría de los antílopes africanos y de camélidos en cuanto a hospedadores vertebrados. Este virus se transmite principalmente entre hospedadores vertebrados susceptibles a través de especies competentes de mosquitos del género *Culicoides*, y la distribución mundial de la enfermedad viene determinada en gran medida por la distribución de los vectores competentes. La infección por el virus de la lengua azul (VLA) es latente en la gran mayoría de los animales, pero puede causar enfermedad mortal en algunas ovejas, ciervos y rumiantes salvajes infectados. En el ganado bovino, suele ser subclínica, con la excepción de una infección por VLA8. El ganado bovino es especialmente importante en la epidemiología de la enfermedad debido a la larga viremia que tiene lugar tras la infección. Cuando la enfermedad es clínica, los signos de la LA se atribuyen principalmente a un aumento de la permeabilidad vascular y consisten en fiebre, hiperemia, congestión, edema y hemorragias faciales, erosión de las mucosas, coronitis, laminitis, y hemorragias pleurales y pericárdicas.

Detección del agente: El VLA es el principal miembro del género *Orbivirus*, que pertenece a la familia *Reoviridae*. Existen 27 serotipos del VLA reconocidos, y otros, aislados recientemente, hasta ahora son solo cepas "atípicas" únicas sin clasificar. Clásicamente, la serotipificación del virus ha implicado su aislamiento y amplificación en huevos embrionados de pollo, células de *Culicoides* u otros cultivos tisulares, y la posterior aplicación de pruebas específicas para establecer el serogrupo y el serotipo, incluidas pruebas de neutralización del virus. La prueba de la reacción en cadena de la polimerasa con transcripción inversa (RT-PCR) ha permitido una amplificación rápida del ADNc del VLA en muestras clínicas, y ahora se trabaja de forma habitual con sistemas validados de RT-PCR en tiempo real para la detección del virus, lo cual permite un diagnóstico más rápido y sensible. La combinación de la amplificación mediante RT-PCR y de la secuenciación capilar o secuenciación de genoma completo (WGS) ofrece en la actualidad una identificación del agente relativamente rápida e inequívoca a nivel de genoma. En conjunto, estos procedimientos pueden potenciar las técnicas de la virología clásica proporcionando información sobre el serogrupo, el serotipo y el topotipo víricos.

Pruebas serológicas: Las respuestas serológicas aparecen a los 7-14 días de la infección. Los animales infectados producen anticuerpos anti-VLA tanto neutralizantes como no neutralizantes, que en general son duraderos. El ensayo de inmunoabsorción ligado a enzimas (ELISA) y la neutralización vírica (VN) son las pruebas serológicas más utilizadas. Un ELISA competitivo basado en anticuerpos monoclonales para detectar anticuerpos anti-VLA (específico de serogrupo) es la prueba recomendada para certificar animales como libres de infección antes de los desplazamientos; esta prueba es muy sensible y específica (en comparación con la inmunodifusión en gel de agar), rápida, barata y fiable. Sin embargo, el ELISA puede tener menos sensibilidad respecto a algunos serotipos. Los procedimientos para identificar y cuantificar anticuerpos específicos de serotipos del VLA son más complejos, y suelen basarse en pruebas de neutralización dependientes de cultivos celulares y de virus vivo.

Requisitos para las vacunas: La vacunación es el método preferido de control de la LA en las regiones endémicas. La vacunación se ha utilizado con éxito para reducir las pérdidas directas, minimizar la circulación del VLA, erradicar el VLA de países/regiones y permitir desplazamientos seguros de los animales. No obstante, el uso de vacunas vivas puede asociarse a resultados

adversos; así, las cepas vivas atenuadas de las vacunas pueden propagarse por vectores, terminando con una reversión a la virulencia o una recombinación de genes víricos vacunales con los de las cepas víricas naturales. En cuanto a las vacunas inactivadas, son más seguras, aunque requieren múltiples dosis para resultar eficaces y suponen un coste más elevado. Este tipo de vacunas han sido muy efectivas para combatir la propagación del VLA-8, el VLA-1 y el VLA-4 en Europa.

A. INTRODUCCIÓN

1. Descripción de la enfermedad

La lengua azul (LA) es una enfermedad vírica infecciosa transmitida principalmente por vectores, que afecta a rumiantes salvajes y domésticos. Mosquitos del género *Culicoides* (el insecto hospedador) de cada vez más especies y zonas geográficas (Carpenter *et al.*, 2015) suelen transmitir el virus de la lengua azul (VLA) entre los rumiantes susceptibles, habiéndose infectado al alimentarse de animales virémicos (el hospedador vertebrado). Se han documentado otras vías de transmisión, como la transmisión directa vertical, la oral y posiblemente la venérea, así como la transmisión indirecta a través de agujas reutilizadas; sin embargo, la relevancia epidemiológica de estas vías sigue siendo incierta (Belbis *et al.*, 2017; Darpel *et al.*, 2016; Kirkland *et al.*, 2004). Los serotipos reconocidos más recientemente, como VLA-25, VLA -26 y VLA -27, parecen transmitirse exclusivamente por estas vías independientes del vector y pueden provocar una infección persistente en cabras (Belbis *et al.*, 2017; MacLachlan *et al.*, 2015; Vogtlin *et al.*, 2013).

La distribución global del VLA viene determinada por sistemas epidemiológicos (episistemas) que, a su vez, están delimitados principalmente por especies de vectores específicas, la presencia de especies hospedadoras susceptibles y su historia natural colectiva. Las observaciones realizadas en Europa, India y EE. UU. indican que las cepas del VLA pueden moverse entre episistemas a través del desplazamiento de animales, la dispersión por el viento de los vectores infectados y adaptaciones de las especies de vectores y del virus (Carpenter *et al.*, 2015; Jacquot *et al.*, 2019; Maan *et al.*, 2015). La propagación mundial de la infección por el VLA ha sido notable, particularmente en los límites más septentrionales y meridionales de la distribución del VLA, con incursiones de múltiples serotipos en Europa, Australia, América del Norte y del Sur, y Asia, en países que previamente no habían comunicado infecciones por el VLA (MacLachlan *et al.*, 2015; 2019; MacLachlan y Mayo, 2013). Además de detectar y confirmar un número creciente de serotipos, el desarrollo de tecnologías de secuenciación, software de fenotipado y ensayos moleculares ha revelado que existen dos linajes ancestrales principales, uno occidental (África, Europa, las Américas) y oriental (Australia y Asia) que existen a nivel mundial (Maan *et al.*, 2015; Mertens *et al.*, 2007).

Los hospedadores vertebrados del VLA son rumiantes tanto domésticos como salvajes, como ovejas, cabras, ganado bovino, búfalos, ciervos, la mayoría de especies del antílope africano y otras del género *Artiodactyla*, como los camellos. Aunque en algunos carnívoros, rinocerontes negros y blancos y elefantes se han detectado anticuerpos contra antígenos, ácidos nucleicos del VLA, o contra el propio virus vivo, el papel que desempeñan las especies no rumiantes en la epidemiología del VLA se considera muy escaso. El efecto de la infección varía desde una manifestación subclínica en la gran mayoría de los animales infectados, especialmente en el ganado bovino, rumiantes y cabras salvajes africanos, hasta un resultado grave o mortal en algunas ovejas, cabras, ciervos y rumiantes salvajes infectados (Verwoerd & Erasmus, 2004). La infección en ganado bovino y en cabras suele ser subclínica, y estas especies se consideran hospedadores reservorio amplificadores en regiones endémicas, lo cual hace que las medidas de control del VLA en estos animales sean importantes. Sin embargo, se ha observado una mayor incidencia y gravedad de la enfermedad clínica en el ganado bovino nunca antes infectado por el VLA-8. Dado que las razas de ovejas tienen niveles variables de susceptibilidad a la enfermedad, las infecciones del ganado por el VLA pueden pasar desapercibidas o detectarse solamente con una vigilancia activa (Daniels *et al.*, 2004).

Los signos clínicos de la enfermedad en ovejas son de gravedad muy variable, y están influidos por el tipo o cepa del virus infectante, factores relacionados con el manejo de los animales, y su raza (Verwoerd & Erasmus, 2004). En los casos graves, hay una respuesta febril aguda caracterizada por la inflamación y congestión, que conduce a un edema de la cara, párpados y orejas, y a la aparición de hemorragias y ulceración de las mucosas. La lengua puede presentar una hiperemia intensa y un aspecto edematoso, sobresalir de la boca y, en los casos graves, volverse cianótica. La hiperemia se puede extender a otras partes del cuerpo, en particular a la banda coronaria de las pezuñas, las ingles, las axilas y el periné (MacLachlan & Mayo, 2013). Las ovejas que desarrollan

enfermedad crónica, a menudo presentan una degeneración muscular grave, y pueden sufrir roturas en la lana que se asocian a lesiones anatomopatológicas de los folículos. Es frecuente observar una intolerancia al movimiento, y en los casos graves puede aparecer torticolis (Maclachlan *et al.*, 2009). En los casos fatales, los pulmones pueden presentar hiperemia interalveolar con un edema alveolar grave y el árbol bronquial puede contener espuma. La cavidad torácica y el saco pericárdico pueden contener cantidades variables de un líquido parecido al plasma. En la mayor parte de los casos se presenta una hemorragia característica cerca de la base de la arteria pulmonar (Verwoerd & Erasmus, 2004). En los casos de transmisión vertical del VLA-8, el sistema nervioso central puede verse gravemente afectado, dando lugar a una falta de desarrollo de los hemisferios cerebrales (síndrome del ternero débil). En caso de infección por cepas virulentas, la infección en ovejas nunca antes expuestas al virus puede dar lugar a tasas de mortalidad de incluso el 70%.

El control del VLA en los animales se aborda en el Capítulo 8.3 del *Código Sanitario para los Animales Terrestres* de la OIE. Dado el alto porcentaje de infecciones subclínicas, viremia persistente y cambios en el control de los vectores, los métodos clásicos de control y erradicación del VLA, como los controles de los desplazamientos, el sacrificio sanitario o el control de vectores, no siempre logran controlar la enfermedad. Así pues, una vacuna segura y eficaz que cumpla con los objetivos de control, erradicación y prevención es un componente importante del control de la enfermedad en muchos contextos (MacLachlan y Mayo, 2013).

2. Naturaleza y clasificación del agente patógeno

Desde el punto de vista taxonómico, el VLA se clasifica como la especie principal del género *Orbivirus*, que pertenece a la familia Reoviridae, y es una de las 22 especies reconocidas en ese género, que también incluye los virus de la enfermedad hemorrágica epizootica (VEHE), la encefalosis equina y la peste equina africana. Existe una importante reactividad cruzada entre los miembros del serogrupo del VLA. Dentro de cada especie, cada VLA se diferencia por el genotipo y mediante pruebas de neutralización; actualmente se reconocen 27 serotipos del VLA, como el *Orbivirus Toggenburg* (VLA-25), el VLA-26 de Kuwait y el VLA-27 de Córcega. Estos serotipos detectados más recientemente y otros varios hasta ahora no serotipificados, considerados cepas únicas del VLA (Belbis *et al.*, 2017) pueden presentar modos bastante distintivos de transmisión asociados a sus respectivas capacidades de infectar a *Culicoides spp.* y a hospedadores rumiantes concretos (Breard *et al.*, 2018, Chaignat *et al.*, 2009, Maan *et al.*, 2015; Savini, 2015). Tanto las mutaciones como la deriva genética justifican la diversidad y la heterogenicidad de las cepas del VLA a nivel de campo (Pritchard *et al.*, 2004).

Las partículas del VLA están formadas por tres capas proteicas. La cápsida externa contiene dos proteínas, la VP2 y la VP5. La VP2 es el antígeno de neutralización más importante y el que determina la especificidad de serotipo. La eliminación de la capa externa de la VP2/VP5 deja una partícula central icosaédrica formada por dos capas que incluye una capa externa formada totalmente por capsómeros de VP7 y una cápsida interna completa (la capa subcentral) que incluye la VP3, que envuelve los 10 segmentos del genoma del ARNs y proteínas estructurales menores (VP1, VP4 y VP6). La VP7 es un determinante importante de la especificidad del serogrupo y el componente que contiene los epítomos que se utilizan en los ensayos inmunoanalíticos de competición (C-ELISA) para detectar los anticuerpos contra el VLA (Mertens *et al.*, 2005). La VP7 también puede ser la responsable de la unión del VLA a las células de los insectos.

La secuenciación de segmentos específicos del genoma del VLA y los avances hacia un análisis del genoma completo permiten una diferenciación adicional y el análisis de las cepas más allá del serotipado, con posibilidad de identificar múltiples clados distintos de cada segmento del genoma¹ (Gould, 1987; McColl & Gould, 1991; Pritchard *et al.*, 1995; Wilson *et al.*, 2000). Por lo tanto, incluso en el caso de las cepas pertenecientes a un mismo serotipo, es posible identificar su probable origen geográfico (topotipo) (Gould, 1987). La identificación de aparentes asociaciones entre ciertos genotipos de virus y ciertas especies de vectores ha conducido a un mayor desarrollo del concepto de los episistemas virus-vector (Daniels *et al.*, 2004). Movimientos de varios serotipos del VLA entre especies de vectores y a nuevas regiones geográficas, las cuales han conllevado múltiples recombinaciones y la aparición de cepas nuevas que contienen nuevas combinaciones de segmentos del genoma de distintos orígenes (Jacquot *et al.*, 2019; Nomikou *et al.*, 2015), indican que una identificación más completa de la composición genética de cada cepa contribuiría a conocer mejor la epidemiología del VLA.

1 Véase la base de datos BTV-Glue en <http://btv-glue.cvr.gla.ac.uk>

3. Potencial zoonótico y requisitos de bioseguridad y bioprotección

No existe riesgo conocido de infección humana por el VLA. Las medidas de biocontención deben determinarse en función del análisis del riesgo, como se describe en el Capítulo 1.1.4 *Bioseguridad y bioprotección: norma para la gestión del riesgo biológico en el laboratorio veterinario y en las instalaciones de los animales*.

4. Diagnóstico diferencial

En función de la presentación clínica, las especies afectadas y los datos epidemiológicos, los diagnósticos diferenciales en los casos sospechosos de VLA pueden incluir otras enfermedades infecciosas, como por ejemplo, aunque no únicamente, la enfermedad hemorrágica epizootica, la fiebre aftosa, la peste de los pequeños rumiantes, la viruela ovina y caprina, la estomatitis vesicular y el ectima contagioso. En los casos de síndrome del ternero débil, también debe tenerse en cuenta el virus de la diarrea vírica bovina. Asimismo, deben considerarse causas no infecciosas, como la fotosensibilización.

B. TÉCNICAS DE DIAGNÓSTICO

Tabla 1. Pruebas analíticas disponibles para el diagnóstico de la lengua azul y su propósito

Método	Propósito					
	Demostrar ausencia de infección en la población	Demostrar ausencia de infección en animales individuales antes de los desplazamientos	Contribuir a las políticas de erradicación	Confirmar casos clínicos	Determinar la prevalencia de la infección – vigilancia	Determinar el estado inmunitario en animales o poblaciones tras la vacunación
Detección del agente^(a)						
RT-PCR en tiempo real	–	+++	–	+++	++	–
RT-PCR	–	+++	–	+++	++	–
Aislamiento clásico del virus	–	+++	–	+++	–	–
Detección de la respuesta inmunitaria						
C-ELISA (específico de serogrupo)	+++	+++	++	–	+++	++
VN (específico de serotipo)	+	+	++	+	++	++
AGID	+	+	+	–	+	+

Clave: +++ = método recomendado; ++ = método idóneo;

+ = puede utilizarse en algunas situaciones; – = no adecuado para este propósito.

RT-PCR = reacción en cadena de la polimerasa con transcripción inversa; C-ELISA = enzimoimmunoanálisis de competición; VN = neutralización vírica; AGID = inmunodifusión en gel de agar.

^(a)Se recomienda combinar varios métodos de identificación del agente en la misma muestra clínica.

1. Detección del VLA

1.1. Cultivos *in vitro* e *in vivo*

Las muestras para el aislamiento del virus pueden consistir en sangre no coagulada (sangre completa tratada con heparina o EDTA [ácido etilendiaminotetraacético]) de animales en los que se sospeche

viremia, coágulos de sangre tras la separación del suero, bazo o ganglios linfáticos obtenidos en la necropsia de casos clínicos, o mosquitos del género *Culicoides*. Varios sistemas de aislamiento del virus son de uso frecuente en el VLA, como la inoculación de huevos de gallina embrionados (HGE) y la inoculación primaria de cultivos celulares, como la línea celular KC (una línea celular que deriva del mosquito del del género *Culicoides sonorensis*). Se ha comprobado que la línea celular KC es muy sensible (McHolland & Mecham, 2003), y desde el punto de vista de la ética animal es favorable porque reduce el uso de huevos embrionados. Los intentos de aislar el virus *in vitro* en sistemas de cultivo celular de mamífero pueden considerarse más adecuados, pero, con frecuencia, la probabilidad de éxito es mucho menor que la lograda mediante los sistemas de huevos de gallina embrionados y células KC. Se utilizan los mismos procedimientos de diagnóstico para rumiantes domésticos que para rumiantes salvajes. La inoculación de ovejas sigue utilizándose para el análisis *in vivo* y la amplificación del virus pero debe evitarse siempre que sea posible debido a lo descrito en el capítulo 7.8 del Código Sanitario para los Animales Terrestres.

1.1.1. Aislamiento en huevos embrionados de pollo

- i) Se recoge sangre de animales que se sospeche que son virémicos con un anticoagulante como la heparina, el EDTA (ácido etilendiaminotetraacético), o el citrato sódico, y las células sanguíneas se lavan tres veces con solución salina estéril tamponada con fosfato (PBS). Las células lavadas se vuelven a suspender en PBS o en cloruro sódico isotónico y se guardan a 4°C o se usan inmediatamente para intentar el aislamiento del virus. También puede prepararse una suspensión de tejido y mosquitos del género *Culicoides* y guardarse como se describe arriba o bien utilizarse de inmediato.
- ii) Para la conservación a largo plazo a 4°C cuando no es posible la refrigeración durante cortos periodos de tiempo, las muestras de sangre se recogen en oxalato-fenol-glicerina. Los eritrocitos lavados y los homogenados tisulares se pueden conservar directamente a –70°C. El virus no es estable a –20°C. El VLA ha permanecido viable durante varios meses e incluso años en sangre completa con anticoagulante almacenada a 4°C.
- iii) El bazo y los ganglios linfáticos son los órganos preferidos para los intentos de aislamiento del virus en los casos mortales. Los órganos y tejidos deben mantenerse a 4°C y transportarse a un laboratorio donde se homogeneizan en PBS o en solución salina isotónica, (1/10), se centrifugan a 1500 rpm durante 10 minutos y se filtran (0.2–0.4 µm). Las suspensiones tisulares se pueden utilizar como se describe más adelante para las células de la sangre.
- iv) Se vuelven a suspender a 1/1 en agua destilada las células sanguíneas lavadas (para alterar los eritrocitos enteros) y a continuación se diluyen a 1/10 en PBS para asegurar el equilibrio isotónico. Se inoculan 0,1 ml por vía intravascular en 5–12 HGE de 9–12 días de edad. Este proceso requiere pericia y práctica. El trabajo de Clavijo et al. contiene los detalles (2000).
- v) Los huevos se incuban en una cámara húmeda a 32–33,5°C y se observan diariamente al trasluz. Cualquier muerte embrionaria ocurrida en las primeras 24 horas post-inoculación se considera inespecífica.
- vi) Los embriones que mueren entre los días 2 y 7 y los embriones que siguen vivos a los 7 días se retienen a 4°C toda la noche antes de la recolección. Los embriones infectados pueden presentar un aspecto hemorrágico. Los embriones muertos y los que vivían el día 7 se homogeneizan por separado. Se homogeneizan los embriones completos, después de eliminar sus cabezas, u órganos combinados, como el hígado, el corazón, el bazo, los pulmones y los riñones, y los restos se eliminan por centrifugación a 1500 g durante 10 minutos.
- vii) El virus se puede identificar directamente en el sobrenadante como se describe en el apartado B.1.2 siguiente o después de su amplificación en cultivo celular, como se describe en el apartado B.1.1.2.

1.1.2. Aislamiento en cultivo celular

El aislamiento del virus se logra mejor mediante aislamiento primario (o amplificación) del virus en HGE, seguido de un pase por cultivo de células del clon C6/36 derivado del insecto *Aedes albopictus* (AA) o aislamiento primario en células derivadas de *Culicoides sonorensis* (libre de virus BT) y designadas KC o CuVa (McHolland y Mecham, 2003). A continuación, estos dos

pasos de amplificación van seguidos de un pase por líneas celulares de mamífero, como las de riñón de cría de hámster (BHK 21) o las de riñón de mono verde africano (Vero). Los pases por BHK21 y Vero permitirán una mayor replicación del virus y una confirmación visual del aislamiento del virus debido al efecto citopático (ECP).

Ha habido ocasiones en las que no se ha observado ECP en línea celular de mamífero, pero en las que sí se ha visualizado el antígeno del VLA al teñir por inmunofluorescencia directa. Las monocapas celulares se incuban a 37°C en CO₂ al 5% con humedad y se controlan para detectar posible aparición de ECP pasados 5–7 días. Si no aparece ECP, se lleva a cabo un segundo pase en cultivo de celular de mamífero.

Debe confirmarse mediante ELISA de detección de antígeno o técnicas de reacción en cadena de la polimerasa (PCR) la aparición de ECP, la detección de inmunofluorescencia o un resultado de cultivo celular negativo después de cada pase por HE, células KC o cultivo celular.

1.2. Detección y caracterización de los virus

El éxito de las técnicas de aislamiento vírico se evalúa comprobando si hay VLA en los sobrenadantes de cultivo celular o tejidos embrionarios empleando cualquiera de los muchos sistemas de detección. Los sistemas de detección de virus incluyen el ELISA de captura de antígeno, la inmunofluorescencia directa, la PCR con transcripción inversa (RT-PCR) o la RT-PCR en tiempo real, como se describe en el apartado B.1.3, abajo. Actualmente, el método de detección de referencia es el análisis de los medios de aislamiento mediante la RT-PCR en tiempo real.

La detección y caracterización suelen ser unos procesos escalonados, en los cuales, para detectar la presencia de un VLA se utilizan inicialmente pruebas específicas de serogrupo. La posterior identificación del genotipo y el serotipo de las cepas del VLA aporta una información epidemiológica de gran valor y es esencial para implementar vacunas o para desarrollarlas. Las pruebas de RT-PCR en las cuales se emplean cebadores específicos de serotipo aportarán la información más rápida y específica relativa al serotipo de la cepa (Mertens *et al.*, 2007). La genotipificación para la epidemiología molecular puede basarse en la RT-PCR y posterior secuenciación del amplicón. Varios laboratorios han estandarizado distintas secuencias génicas para este fin. Siempre que sea posible, también puede llevarse a cabo una secuenciación del genoma completo para determinar el serotipo, así como otros datos propios de la secuencia de las cepas aisladas.

Para la serotipificación también pueden emplearse procedimientos de neutralización utilizando antiseros contra serotipos concretos, aunque algunos serotipos presentan reacción cruzada y pueden dificultar la interpretación. En el caso de laboratorios sin instalaciones para la serotipificación, las cepas del VLA pueden enviarse a cualquiera de Laboratorios de Referencia de la OIE para la LA para que sean tipificadas allí.

1.2.1. Seroagrupación inmunológica de los virus

Las cepas de Orbivirus aisladas se suelen seroagrupar según su reacción frente a antiseros estándar específicos que detectan proteínas, como la VP7, que se conservan dentro de cada serogrupo. La reacción cruzada entre los miembros de los serogrupos LA y EHE plantea la posibilidad de que una cepa del VEHE pueda confundirse con VLA debido a una reacción de inmunofluorescencia débil con un antisuero policlonal anti-VLA. Los anticuerpos policlonales o monoclonales que se emplean para seroagrupar cepas del VLA deben caracterizarse adecuadamente para el propósito en cuestión. Existe una importante variación de la VP7 dentro del VLA, así como relación antigénica entre otros orbivirus estrechamente relacionados, como el VEHE, que influirá en la unión de anticuerpos en varios formatos analíticos (IFA, ELISA, AGID). Por esta razón, se puede usar un MAbs específico del serogrupo de la LA. Varios laboratorios han generado tales reactivos específicos de serogrupo. Los métodos más utilizados para la identificación de los virus a nivel de serogrupo son los siguientes.

i) *Inmunofluorescencia/tinción con inmunoperoxidasa*

Se infectan monocapas de células BHK o Vero en varios substratos de cultivo tisular (incluidos portas con cámara, cubres de vidrio, placas de 96 o 24 pocillos u otros formatos adecuados) con un virus adaptado al cultivo tisular o con virus de lisados en HGE. Después

de 24–48 horas a 37°C, o después de la aparición de un ECP incipiente, las células infectadas se fijan con agentes como el paraformaldehído, la acetona o el metanol, se dejan secar y el antígeno vírico se detecta utilizando un antisuero anti-VLA o anticuerpos monoclonales específicos contra el VLA y los procedimientos estándar para la inmunofluorescencia. También pueden utilizarse procedimientos de tinción con inmunoperoxidasa estándar cuando no se dispone de microscopios de fluorescencia para la lectura de la inmunofluorescencia, puesto que el antígeno teñido se puede leer a simple vista o empleando un microscopio óptico a 100× aumentos.

ii) *Enzimoimmunoanálisis de captura de antígeno*

Se puede detectar directamente el antígeno vírico en lisados de HGE, en medios de cultivo y en insectos infectados empleando un ELISA de captura de antígeno (Ag ELISA). En esta técnica, las proteínas derivadas del virus se capturan por el anticuerpo adsorbido a una placa de ELISA y los materiales unidos se detectan usando un segundo anticuerpo. El anticuerpo de captura puede ser policlonal o un MAb específico de serogrupo. Se han utilizado con éxito MAb y anticuerpos policlonales específicos de serogrupo generados contra proteínas VP7 o virus completo para detectar virus capturados. Con el Ag ELISA, la detección de antígeno de sangre completa no siempre funciona.

1.2.2. Serotipificación de cepas por neutralización del virus

Las pruebas de neutralización son específicas de tipo para los serotipos de VLA que se han aislado en cultivo actualmente reconocidos. Se pueden utilizar anticuerpos de referencia para serotipificar un virus. En el caso de una cepa no tipificada, la localización regional característica de los serotipos de VLA puede eliminar, por lo general, la necesidad de realizar la neutralización con antisueros contra todos los serotipos aislados, en particular cuando los serotipos endémicos se conocen bien.

Existe una serie de métodos disponibles que se basan en el cultivo celular para ayudar a tipificar las cepas. Las líneas celulares más utilizadas son BHK, Vero y L929. Más adelante se resumen tres métodos para serotipificar cepas aisladas del VLA. En el apartado B.2., abajo, se describen métodos de neutralización vírica para la tipificación de anticuerpos. También existe una prueba de inhibición de la fluorescencia, no descrita. Se ha descrito que los antisueros específicos de serotipo contra VLA generados por cobayas y conejos presentan menos reacción cruzada que los obtenidos en ganado bovino u ovino. Es importante incluir controles del antisuero.

i) *Reducción de placas (o calvas)*

El virus que se va a serotipificar se diluye hasta que contenga aproximadamente 100 unidades formadoras de placas (UFP) y se incuba sin suero (control) o con diluciones seriadas de antisueros individuales estándar de una serie de serotipos de VLA. Se añaden las mezclas de virus/antisuero a las monocapas celulares. Después de la adsorción y la eliminación del inóculo, las monocapas se cubren con agarosa o con carboximetilcelulosa (viscosidad del medio) para retirar con facilidad el agar semisólido antes de la tinción. Los títulos de anticuerpos neutralizantes se determinan como la inversa de la dilución del suero que da lugar a una reducción determinada (por ejemplo, del 80%) en el número de UFP. Se considera que el virus no identificado es serológicamente idéntico a un serotipo estándar cuando este último resulta neutralizado de forma similar si se realiza la prueba en paralelo con el virus problema.

ii) *Inhibición de placas (o calvas)*

Las pruebas se realizan en placas Petri de 90 mm de diámetro que contienen monocapas celulares confluentes que se infectan con aproximadamente 5×10^4 UFP de virus estándar y de virus no tipificado. Después de la adsorción y la eliminación del inóculo, las monocapas se cubren con agarosa. En discos individuales de papel de filtro se depositan antisueros estándar anti-VLA, que se colocan sobre la superficie de agarosa. Las placas se incuban durante por lo menos 4 días. Alrededor del disco que contenga el antisuero homólogo aparecerá una zona de neutralización del virus con la consiguiente supervivencia de la monocapa celular.

iii) *Neutralización en microtitulación*

En una placa de microtitulación con pocillos de fondo plano se depositan aproximadamente 100 DICT₅₀ (dosis infectivas en un 50% de los cultivos de tejidos) del virus estándar y del virus no tipificado en un volumen de 50 µl por pocillo, y se mezclan con el mismo volumen de antisuero estándar diluido de forma seriada con medio de cultivo de tejidos. Se depositan aproximadamente 10⁴ células por pocillo en un volumen de 100 µl, las placas se incuban durante un máximo de 7 días, en función del nivel de ECP observado en los pocillos de suero negativo de la prueba. Cuando aparece ECP hasta 4+ (100%) en los pocillos de suero control negativo de cada serotipo analizado, se leen los resultados de la prueba utilizando un microscopio invertido. Los pocillos se analizan respecto al grado de ECP observado. Los pocillos que contengan solo células o células y antisuero no deberían mostrar ECP. Por el contrario, los pocillos con células y virus deberían mostrar un ECP del 75–100%. Se considera que el virus no identificado es serológicamente idéntico al serotipo estándar de VLA si ambos resultan neutralizados en la prueba con un grado similar.

1.3. Métodos moleculares – detección del ácido nucleico

1.3.1. Detección del ácido nucleico

Las técnicas de RT-PCR aportan una identificación rápida del ácido nucleico vírico del VLA en la sangre y otros tejidos de los animales infectados. Es importante destacar que el diagnóstico basado en la RT-PCR debe interpretarse con cuidado porque la RT-PCR detecta ácido nucleico específico de virus una vez el virus ya no es viable y capaz de crear una nueva infección ni en insectos ni en hospedadores mamíferos. Por lo tanto, un resultado positivo en la RT-PCR no necesariamente indica la presencia del virus infeccioso. Asimismo, puede detectarse ARN procedente de cepas vacunales.

Existen varios formatos de RT-PCR que pueden emplearse para detectar el VLA específicamente para determinar el serogrupo de los orbivirus y para determinar el serotipo del VLA. Estos enfoques moleculares son mucho más rápidos que los métodos virológicos e inmunológicos tradicionales, que pueden tardar hasta 4 semanas en suministrar información sobre serogrupos y serotipos. Los avances en pruebas moleculares, nuevas tecnologías de secuenciación y software de fenotipado han detectado cantidades crecientes de nuevos serotipos, métodos de transmisión y patrones de susceptibilidad específicos de hospedador.

En el VLA, la secuencia nucleotídica de genes homólogos puede variar en función del área geográfica en la que se ha aislado el virus (Gould, 1987; Maan *et al.*, 2015). Esto supone una oportunidad única para complementar estudios epidemiológicos sobre el VLA, al suministrar información sobre el potencial origen geográfico de las cepas víricas aisladas, un proceso que se denomina genotipificación. Aunque la secuenciación de cepas del VLA de otras partes del mundo podría permitir una detección de distintos clados de cada segmento del genoma, lo cual podría conducir a una discriminación más fina del origen geográfico, la relación entre la secuencia y el origen geográfico no es absoluta en todos los casos. Así pues, esta información de secuenciación del VLA es esencial y todos los datos relativos a las secuencias de segmentos del VLA se deben hacer accesibles enviando datos adecuadamente validados a bases de datos reconocidas, como GenBank (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/>). La página web de BTV-Glue (<http://btv-glue.cvr.gla.ac.uk>) puede aportar los análisis de los árboles filogenéticos de las cepas del VLA basados en la secuencia de segmentos del ARN. Estos datos representarán un recurso para los estudios epidemiológicos y la identificación de nuevas cepas, y constituirán un respaldo en el análisis *in-silico* para el mantenimiento y la validación de RT-PCR existentes, así como el diseño de nuevos cebadores/sondas para el desarrollo de otras pruebas, como por ejemplo, para tipos/cepas del VLA novedosos o que constituyan variantes de los actualmente conocidos.

La capacidad de la RT-PCR para detectar cantidades muy pequeñas de moléculas de ácido nucleico indica que estas pruebas son exquisitamente sensibles a la contaminación por ácidos nucleicos externos que podrían conducir a la obtención de falsos positivos. Asimismo, también pueden producirse falsos negativos, debido, por ejemplo, a una mala preparación del ácido nucleico o al uso de cebadores inadecuados. Ello se explica en mayor detalle en el Capítulo 1.1.6 *Principios y métodos de validación de las pruebas de diagnóstico de las enfermedades infecciosas*.

En la actualidad se usan muchas pruebas RT-PCR en las que se utilizan diferentes métodos de extracción, transcriptasas inversas, enzimas de amplificación, cebadores y condiciones de ensayo. La tecnología está en continuo cambio. Además, la diversidad de los genes del VLA determina que la elección y la validación de las pruebas de RT-PCR estén condicionadas por su aplicación a un escenario regional determinado. Por lo tanto, los procedimientos indicados abajo son solo ejemplos.

Se presentan aquí dos pruebas de RT-PCR para el VLA: una prueba en tiempo real (Hofmann *et al.*, 2008), que tiene por objetivo el segmento del gen NS3, y una prueba anidada convencional que tiene por diana el segmento del gen NS1, en las que se usan cebadores diseñados por Katz *et al.* (1993). La prueba anidada se ha utilizado con éxito durante más de 20 años y permite detectar los serotipos 1 a 24 y el 26 (no hay informes de análisis de otros serotipos) de varias especies. La prueba anidada puede resultar ventajosa para laboratorios en los que no se disponga de instalaciones para RT-PCR en tiempo real. La RT-PCR en tiempo real indicada a continuación se ha ejecutado en varios países de todo el mundo y se ha observado que permite detectar los 27 serotipos del VLA (así como otras cepas del VLA recientemente detectadas), y que iguala o supera la sensibilidad de la prueba anidada, aportando al mismo tiempo una detección rápida y cuantitativa del VLA sin los riesgos de contaminación propios de la RT-PCR anidada.

1.3.1.1. Reacción en cadena de la polimerasa con transcripción inversa en tiempo real

Los métodos de la RT-PCR en tiempo real aportan una detección sensible y rápida del VLA en un procedimiento de un solo paso. Las ventajas de la PCR en tiempo real respecto de la clásica son la rapidez de análisis, la cuantificación del virus presente y la reducción de la probabilidad de contaminación, porque no es necesaria una manipulación posterior a la amplificación, como una electroforesis en gel. La RT-PCR en tiempo real es una prueba de elección para el diagnóstico.

El método aquí descrito es una adaptación de Hofmann *et al.* (2008) y permite detectar todos los serotipos y cepas conocidos del VLA actualmente en circulación. La prueba tiene por diana el segmento 10 del VLA (NS3). El procedimiento propuesto puede requerir alguna modificación para adaptarlo a los requisitos de cada laboratorio o del kit de RT-PCR.

- i) Extracción del ARN a partir de sangre, muestras de tejido y mosquitos del género *Culicoides*

Existe gran variedad de kits comerciales; el paso de extracción del ARN puede realizarse según los procedimientos especificados en cada kit.

- ii) Reacción en cadena de la polimerasa con transcripción inversa en tiempo real

Existen kits comerciales de PCR en tiempo real de un solo paso. A continuación se presentan algunos pasos básicos según la descripción de Hofmann *et al.* (2008), que pueden modificarse en función de los requisitos locales/específicos de cada caso, de los kits utilizados y del equipo del que se disponga.

Secuencias de los cebadores y la sonda para la detección de especies del VLA:

VLA_IVI_F 5'-TGG-AYA-AAG-CRA-TGT-CAA-A-3'

VLA_IVI_R 5'-ACR-TCA-TCA-CGA-AAC-GCT-TC-3'

VLA_IVI_P 5'FAM-ARG-CTG-CAT-TCG-CAT-CGT-ACG- C-3' BHQ1

- a) Las soluciones primarias de cebador se diluyen hasta una concentración de trabajo de 20 pmol/μl, mientras que la sonda se diluye hasta una concentración de trabajo de 5 pmol/μl.
- b) Debe diseñarse una distribución de placas de análisis e introducirse en el programa de la máquina de PCR en tiempo real. Empleando una distribución como guía, se añaden 0,5 μl de cada cebador primario de trabajo (20 pmol/μl) a cada pocillo, que después contendrá muestras de ARN, controles positivos o controles negativos. La placa se mantiene sobre hielo.

Nota: las placas de PCR se puede reemplazar por tubos o tiras según necesidad.

- c) Se añaden 2 µl de muestras de ARN, tanto de la muestra problema como de los controles positivo y negativo, a los pocillos adecuados de la placa siguiendo la distribución (nota: estos pocillos ya contienen cebadores desde el paso b).
- d) Desnaturalización por calor: 95°C durante 5 minutos, y se mantienen sobre hielo otros 3 minutos.
- e) Se prepara un volumen adecuado de la mezcla primaria de la RT-PCR de un solo paso en tiempo real, según el número de muestras a analizar y siguiendo las instrucciones del fabricante. La sonda debe incluirse en la mezcla primaria de tal modo que se obtenga una concentración final de 0.2 pmol/µl por muestra.
- f) Se distribuyen 22 µl de mezcla primaria en cada pocillo de la placa de PCR que contenga los cebadores desnaturalizados y ARN.
- g) La placa se sitúa en un termociclador de tiempo real programado para una transcripción inversa y amplificación/detección mediante fluorescencia del ADNc. El siguiente perfil térmico es un ejemplo:

	48°C	×30 minutos
	95°C	×2 minutos
50 ciclos:	95°C	×15 segundos
	56°C	×30 segundos
	72°C	×30 segundos

1.3.1.2. Reacción en cadena de la polimerasa con transcripción inversa – PCR en tiempo real

Se escogen los kits disponibles de RT-PCR (transcripción inversa y amplificación de primera fase) y de PCR (amplificación anidada) para llevar a cabo la prueba anidada. En la prueba que se presenta a continuación a modo de ejemplo se utilizan los parámetros relacionados con un kit concreto. Los parámetros de la PCR deben ajustarse según las recomendaciones del fabricante teniendo en cuenta los kits concretos que vayan a emplearse.

La prueba anidada incluye el uso de los siguientes cebadores:

Amplificación de primera fase (externa) (se diluye a 25 pmol/µl; la concentración final en la PCR es 0,6 µM para cada uno):

Directo: GTT-CTC-TAG-TTG-GCA-ACC-ACC

Inverso: AGC-CAG-ACT-GTT-TCC-CGA-T

Amplificación anidada (se diluye a 25 pmol/µl; la concentración final en la PCR es 0,5 µM para cada uno):

Directo: GCA-GCA-TTT-TGA-GAG-AGC-GA

Inverso: CCC-GAT-CAT-ACA-TTG-CTT-CCT

- i) Se prepara la primera amplificación de la prueba (kit de RT-PCR de un solo paso) de los siguientes reactivos (por muestra):

Agua libre de nucleasa	11,8 µl
Tampón 5x para RT-PCR de un solo paso	5,0 µl
Mezcla de dNTP	1,0 µl
Enzima	1,0 µl
Cebador directo (25 pmol/µl)	0,6 µl
Cebador inverso (25 pmol/µl)	0,6 µl

- ii) Se dispensan 20 µl de la mezcla en cada tubo de PCR incubado para la prueba. Se añaden 5 µl de muestra o ARN desnaturalizado control (se describe arriba) al tubo adecuado. Se colocan los tubos en un termociclador y se ejecuta el siguiente programa.

Transcripción inversa	50°C	30 minutos
Activación Taq	95°C	15 minutos
Seguido de 35 ciclos de:		
Desnaturalización:	94°C	45 segundos
Hibridación:	58°C	45 segundos
Extensión	72°C	60 segundos (extensión final 10 minutos)

- iii) Se prepara una mezcla de PCR anidada (kit de AND polimerasa HotStarTaq) de los siguientes reactivos (por muestra):

Agua libre de nucleasa	40,75 µl
Tampón HotStar 10x	5,0 µl
Mezcla de dNTP	1,0 µl
HotStarTaq	0,25 µl
Cebador directo n (25 pmol/µl)	1,0 µl
Cebador inverso n (25 pmol/µl)	1,0 µl

- iv) Se dispensan 49 µl de la mezcla en cada tubo de PCR. Se transfieren 1,0 µl del ADN amplificado de la reacción de la primera fase (paso 2) al tubo anidado correspondiente. Se realiza cambio de guantes entre muestras, y se procede con cuidado al transferir el ADN para evitar la contaminación cruzada de las muestras. Se colocan los tubos en un termociclador y se ejecuta el siguiente programa:

Activación Taq	95°C	15 minutos
Seguido de 28 programas de:		
Desnaturalización:	94°C	45 segundos
Hibridación:	62°C	45 segundos
Extensión:	72°C	1 minuto (extensión final 10 minutos)

Se realiza una electroforesis en gel seguida de métodos de gel moderno en el producto de la PCR anidada. El/los control/es positivo/s y todas las muestras positivas tendrán una banda de 101 pares de bases. Los controles negativos y las muestras negativas no deben tener ninguna banda visible. Las muestras positivas se pueden secuenciar, para verificarlas.

1.3.2. Secuenciación del ácido nucleico

Aunque los métodos basados en PCR pueden proporcionar una determinación prospectiva rápida del serotipo y genotipo de una cepa de VLA, se requiere la secuencia nucleica de segmentos del genoma del VLA específicos para una identificación inequívoca definitiva. A partir de la información proporcionada por la RT-PCR en tiempo real o la serología, y la actual amplia disponibilidad de bases de datos de secuencias del VLA que aportan mejor información para el diseño de cebadores, la combinación de amplificación por RT-PCR y secuenciación capilar de alto rendimiento puede constituir un método de diagnóstico con una confirmación relativamente rápida. La opción ahora económicamente más viable de secuenciación del genoma completo (WGS) también se está aplicando cada vez más de forma rutinaria al diagnóstico del VLA (Belbis et al., 2017). Sin embargo, la concentración de VLA en las cepas de campo puede limitar la efectividad de estos métodos de secuenciación y puede ser necesario el establecimiento previo del crecimiento en cultivo celular en algunas cepas. Se debe tener cuidado con la interpretación de los resultados obtenidos con muestras de virus cultivadas en cultivos tisulares, ya que el proceso de adaptación al cultivo celular implica inevitablemente la

selección de los virus que pueden infectar y replicarse en el sistema de cultivo utilizado. Por lo tanto, las secuencias generadas pueden no representar del todo la población de virus presente en la muestra original.

2. Pruebas serológicas

Las respuestas serológicas aparecen 7-14 días después de la infección por el VLA. Los animales infectados producen anticuerpos contra el VLA tanto neutralizantes como no neutralizantes que en general son duraderos. Los anticuerpos contra el VLA generados en animales infectados pueden detectarse mediante varios procedimientos, de diversas sensibilidades y especificidades. Se inducen anticuerpos específicos tanto de serogrupo como de serotipo y, si el animal no ha estado previamente expuesto al VLA, los anticuerpos neutralizantes que se generan son específicos del serotipo del virus infectante. Las infecciones múltiples con diferentes serotipos de VLA dan lugar a la producción de anticuerpos capaces de neutralizar los serotipos a los que el animal no ha estado expuesto.

2.1. Enzimoimmunoanálisis de competición

El ELISA de competición, o ELISA de bloqueo (C-ELISA) para la LA se desarrolló para medir los anticuerpos específicos contra el VLA sin detectar anticuerpos de reacción cruzada contra otros Orbivirus (Afshar et al., 1989; Lunt et al., 1988). La especificidad es el resultado de utilizar MAb con reactividad de serogrupo para la LA. Estos anticuerpos proceden de distintos laboratorios y, aunque poseen distintas propiedades o especificidades de epítipo, todos parecen unirse a la región amino-terminal de la principal proteína de la cápsida, VP7. En el C-ELISA, los anticuerpos de los sueros a analizar compiten con los MAb para unirse al antígeno. El siguiente procedimiento de C-ELISA se ha estandarizado después de llevar a cabo estudios comparativos en varios laboratorios internacionales. Es importante destacar que se ha observado que los formatos de ELISA de competición en los que se utilizan anticuerpos monoclonales no detectan todos los serotipos del VLA (sobre todo ciertos VLA-15). Así, el uso de estos ELISA requiere conocer para qué fines es idónea la prueba, y esta debe estar validada en consecuencia para evitar que pasen desapercibidos ciertos serotipos del VLA, como los de reciente descubrimiento.

2.1.1. Procedimiento analítico

Hay descritos varios procedimientos; este es un ejemplo de un ELISA para la LA.

- i) Durante una noche a 4°C o durante 1 hora a 37°C, se dejan recubiertos los 96 pocillos de las placas de microtitulación con 50-100 µl de antígeno derivado de cultivos celulares obtenido por sonicación o del antígeno principal de la cápsida VP7 expresado en Baculovirus (Oldfield et al., 1990) o levaduras (Martyn et al., 1990), y diluidos en tampón carbonato 0,05 M, pH 9,6.
- ii) Las placas se lavan cinco veces con PBST (PBS 0,01 M que contenga Tween 20 al 0,05% o 0,1%, pH 7,2).
- iii) A continuación, se añaden por duplicado 50 µl de sueros problema a una única dilución, 1/5 (Afshar et al., 1989) o 1/10 (Lunt et al., 1988), en PBST que contenga un 3% de seroalbúmina bovina (BSA).
- iv) Inmediatamente, se añaden a cada pocillo 50 µl de una dilución predeterminada de MAb diluido en PBST que contenga un 3% de BSA. Los pocillos de control de MAb contienen tampón de diluyente en vez de suero problema.
- v) Las placas se incuban 1 hora a 37°C o 3 horas a 25°C, con agitación continua.
- vi) Después de lavar como se indicó anteriormente, los pocillos se llenan con 100 µl de una dilución apropiada de anticuerpos anti IgG de ratón (H+L) generados en conejo y marcados con peroxidasa de rábano, realizada en PBST con un 2% de suero bovino normal.
- vii) Después de incubar 1 hora a 37°C, se elimina la solución del conjugado y las placas se lavan cinco veces con PBS o PBST. Los pocillos se llenan con 100 µl de solución de sustrato que contenga ABTS (2,2'-azino-bis-[3-etilbenzotiazolina-6 ácido sulfónico]) 1,0 mM, H₂O₂ 4 mM en citrato sódico 50 mM, pH 4,0, y las placas se agitan a 25°C durante 30 minutos.

(Se pueden utilizar otros sustratos y dejar que la reacción continúe agitándose durante un tiempo adecuado para permitir la aparición del color).

- viii) La reacción se detiene añadiendo un agente de parada, como azida sódica.
- ix) Después de poner a cero el lector de ELISA con los pocillos que solo contienen sustrato y agente bloqueante, se miden los valores de absorbancia a 414 nm. Los resultados se expresan como porcentajes de inhibición y derivan de los valores medios de absorbancia de cada muestra según la fórmula siguiente:

$$\% \text{ inhibición} = 100 - [(\text{Media de la absorbancia de la muestra problema}) / (\text{Media de la absorbancia del MAb control})] \times 100.$$

NB: Algunos laboratorios prefieren usar un suero control negativo que previamente se haya visto que tenga un porcentaje de inhibición igual a cero como alternativa al MAb control.

- x) Los porcentajes de inhibición >50% se consideran positivos. Una inhibición de entre el 40% y el 50% se considera sospechosa. Los resultados de los duplicados de los sueros a analizar pueden variar con tal de que los valores caigan dentro del intervalo considerado positivo.
- xi) En cada placa se deben incluir sueros positivos fuertes y débiles y un control de suero negativo. Un positivo débil debe dar un 60-80% de inhibición, y uno negativo menos del 40% de inhibición.

Ahora existen varios C-ELISA producidos comercialmente que se basan en la proteína VP-7 recombinante y en MAb anti-VP-7. Estos ensayos comerciales se utilizan sistemáticamente en muchos laboratorios de todo el mundo y se ha comprobado que se ajustan a los criterios exigidos en las pruebas del anillo (Batten *et al.*, 2008). La aceptación formal para fines comerciales dependerá de si el kit en cuestión es aceptado en el Registro de la OIE.

La divergencia genética de ciertas cepas del VLA (por ejemplo, distintos grupos regionales o topotipos) puede afectar al tipo de anticuerpos reactivos de serogrupo. Por lo tanto, es posible que las características diagnósticas para la detección de anticuerpos no sean las mismas para todos los virus que engloba el serogrupo. Los reactivos y kits de diagnóstico producidos en una región pueden no tener las mismas características de rendimiento que los que se utilicen en otra. Esto debe valorarse en cuanto a la idoneidad para el propósito en cuestión.

2.2. ELISA indirecto

Se ha observado que un ELISA indirecto de muestras de leche de tanque es fiable y útil para fines de vigilancia (Kramps *et al.*, 2008). Antes de utilizarlo debe validarse para los serotipos relevantes. Aunque el ELISA indirecto puede tener el inconveniente de la reactividad cruzada con virus emparentados, como el virus de la enfermedad hemorrágica epizootica (VEHE), tiene una sensibilidad analítica alta y en ciertas situaciones podría ser útil como prueba de cribado.

2.3. Serología de neutralización vírica

La serología de NV es útil para identificar anticuerpos neutralizantes específicos de serotipo, así como para determinar su título. Es otra prueba importante en zonas endémicas en las que es posible que haya múltiples serotipos. Su capacidad de identificar el serotipo involucrado en un brote es fundamental para aplicar medidas de control adecuadas, como la vacunación o restricciones a los desplazamientos de animales. También es útil para la vigilancia epidemiológica, para las pruebas de transmisión y para determinar la respuesta de anticuerpos ante la vacunación. Pueden aparecer anticuerpos de reacción cruzada en animales que hayan sufrido infección por el VLA. Es importante destacar que la infección por un segundo serotipo puede ampliar la respuesta de anticuerpos neutralizantes incluyendo anticuerpos contra serotipos a los cuales el animal no ha estado expuesto. La aplicación de la serología de NV a menudo es más útil junto con otras pruebas virológicas que, combinadas, pueden aportar una base más definitiva para determinar el perfil de serotipos. El uso de la prueba de reducción de placas (modificada en el apartado B. 1.2.2) puede mejorar la resolución en la detección de serotipos, cuando esto no está claro en una prueba de VN estándar debido a su naturaleza cuantitativa.

2.3.1. Procedimiento analítico

Se han descrito varios métodos para determinar el título y serotipo del VLA, y aquí se describe brevemente el procedimiento que se ha estandarizado tras estudios comparativos en distintos laboratorios internacionales. Las líneas celulares indicadoras que se usan con frecuencia son BHK y Vero. Es importante incluir en cada prueba antiseros de referencia positivo y negativo que estén bien caracterizados.

- i) Se añaden 50 µl de diluciones séricas seriadas, desde 1/10 a 1/1280, a cada pocillo problema de placas de microtitulación de fondo plano y cada pocillo se mezcla con un volumen igual de medio que contenga aproximadamente 100 DICT₅₀ de virus VLA de referencia bien caracterizados y adecuados. Obsérvese que el tipo de cepas de referencia que se utilice dependerá de los serotipos circulantes (o posiblemente circulantes) en la población analizada.
- ii) Las placas se incuban en una cámara húmeda a 37°C en CO₂ al 5%.
- iii) Tras 1 hora de incubación, se añaden unas 10⁴ células Vero o BHK-21 por pocillo a un volumen de 100 µl de los medios adecuados (que contengan antibióticos) capaces de tolerar el crecimiento de las células escogidas.
- iv) Se incuba a 37°C durante 7 días, en función del nivel de ECP obtenido en los pocillos de suero de la prueba. Cuando el ECP ha alcanzado un desarrollo del 100% en los pocillos de suero normal de cada serotipo analizado, la prueba se lee empleando un microscopio óptico a 100x aumentos para comprobar si hay ECP.
- v) Los pocillos se puntúan según el grado de ECP observado. Una muestra se considera positiva cuando se acerca a la neutralización total, y se permite la aceptación de trazas de ECP a la dilución más baja (1/10). La presencia de rastros de ECP puede indicar evidencia de neutralización parcial. En estas situaciones, el virus de referencia utilizado puede no ser representativo de los virus circulantes contemporáneos y puede ser necesario realizar más pruebas (por ejemplo, la prueba de neutralización por reducción de placas, que es superior para resolver la reactividad cruzada entre serotipos relacionados). El título de suero representa la dilución de suero más alta capaz de neutralizar casi por completo el 50% de los pocillos problema replicados. Una diferencia de cuatro veces en el título de punto final obtenido para diferentes serotipos analizados puede indicar el serotipo implicado en una infección. Se sabe que en la prueba VN se producen reacciones cruzadas entre serotipos incluso cuando sólo está involucrado un serotipo.

2.4. Inmunodifusión en gel de agar

Es importante reconocer que un inconveniente importante de la AGID que se emplea para la LA es su falta de especificidad, ya que no detecta exclusivamente anticuerpos contra serogrupos de la LA y la EHE, y por lo tanto no puede utilizarse de forma definitiva para detectar anticuerpos contra el VLA, ya que una reacción positiva puede ser consecuencia de una infección por otra especie de *Orbivirus*. Es importante destacar que la AGID es fácil de llevar a cabo y el antígeno utilizado en la prueba es relativamente fácil de producir. Desde 1982, la prueba ha sido uno de los procedimientos analíticos estándar para controlar los movimientos internacionales de rumiantes, aunque ya no se considera lo bastante exacta para utilizarla como apoyo al comercio internacional. Esta prueba desempeña un papel en el análisis de muestras que dan resultados inconcluyentes en otras pruebas. Los sueros positivos según la AGID deben volver a analizarse con una prueba específica de serogrupo de la LA si se requiere especificidad del VLA. El C-ELISA es una prueba de elección, y se describe en el apartado B.2.1.

C. REQUISITOS PARA LAS VACUNAS

1. Antecedentes

La vacunación con vacunas efectivas es el método preferido de control del VLA en los países endémicos. La vacunación se ha utilizado con éxito para la reducción de pérdidas directas, minimizar la circulación del VLA, erradicar el VLA de una región y permitir un desplazamiento seguro de los animales. Actualmente se utilizan

vacunas con el VLA atenuado y vacunas con el VLA inactivado en ovejas y cabras, respectivamente. Hay vacunas contra la LA recombinantes en proceso de desarrollo basadas en distintas estrategias (van Rijn, 2019), pero ninguna ha sido autorizada y tales vacunas no se consideran aquí.

Las vacunas vivas atenuadas son baratas de producir en grandes cantidades; generan inmunidad protectora tras una única inoculación y se ha comprobado que son efectivas para prevenir la LA clínica en las zonas en las que se han utilizado. En Sudáfrica, se han usado durante más de 50 años las vacunas vivas atenuadas y se sabe que inducen una inmunidad eficaz y duradera. Las vacunas vivas atenuadas se producen adaptando cepas naturales del VLA a crecer *in vitro* en cultivo de tejidos o en HGE mediante pases seriados. La estimulación de una fuerte respuesta de anticuerpos mediante estas vacunas se correlaciona directamente con su capacidad para crecer en el hospedador vacunado.

Sin embargo, las vacunas vivas atenuadas dan lugar a ciertos resultados adversos documentados o potenciales, como una disminución de la producción de leche, aborto/muerte embrionaria, teratogénesis y defectos congénitos, y se ha documentado que se propagan por vectores con alta probabilidad de reversión a la virulencia y de recombinación de los genes del virus de la vacuna con los de las cepas de virus de tipo natural (Ferrari *et al.*, 2005; Ranjin *et al.*, 2019; Savini *et al.*, 2014). También puede producirse una atenuación insuficiente, cuyo impacto puede variar según las diferentes razas de ovejas (Veronesi *et al.*, 2010), y la recombinación con otras cepas de vacunas y de campo (Nomikou *et al.*, 2015). La frecuencia y la importancia de estos acontecimientos siguen estando poco definidas, pero la transmisión de cepas vacunales por mosquitos del género *Culicoides* ya se ha documentado en EE.UU., Sudáfrica y Europa (Ferrari *et al.*, 2005).

Las vacunas inactivadas que contienen cepas de vacunas inactivadas químicamente y cultivadas en cultivos de tejidos son mucho más seguras, pero requieren múltiples dosis para ser eficaces y resultan más caras. Estas vacunas han sido muy eficaces para combatir la propagación del VLA-8 en Europa. Si bien las vacunas inactivadas (como las vivas) no son compatibles con las pruebas serológicas para la detección de infecciones en animales vacunados (estrategias DIVA), la vigilancia puede mantenerse después de su uso mediante pruebas basados en el ARN (RT-PCR).

Además, se ha descubierto que existen vacunas distintas de las del VLA dirigidas tanto a especies de destino como no de destino que están contaminadas con VLA y provocan abortos, insuficiencia cardíaca, dificultad respiratoria y muerte en especies no rumiantes. Estos inconvenientes han dado lugar a una gran cantidad de investigación y desarrollo de vacunas de contra el VLA que son seguras, eficaces contra múltiples serotipos, económicas, compatibles con una estrategia DIVA, que solo requieren una dosis única con inicio rápido de la inmunidad y que bloquean la viremia. Los esfuerzos recientes con la genética inversa y la tecnología molecular han dado lugar a vacunas de la próxima generación que equilibran estos requisitos, a menudo competitivos, al tiempo que satisfacen las necesidades específicas de la situación de campo.

Las directrices para la producción de vacunas veterinarias se exponen en el Capítulo 1.1.8 *Principios de producción de vacunas veterinarias*. Las directrices que se indican a continuación y las del capítulo 1.18 son de carácter general y pueden complementarse con los requisitos nacionales y regionales.

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

2.1. Características del inóculo

Véase el Capítulo 1.1.8 para consultar los requisitos generales para los inóculos primarios y los pases permitidos para la producción de vacunas.

2.1.1. Características biológicas del inóculo primario

Para las vacunas vivas atenuadas, el inóculo base o primario se prepara a partir de una placa o calva única de VLA atenuado que se ha cultivado por pases seriados. Los virus se atenúan por pases en HGE, cultivo celular de tejidos, o una combinación de ambos. Antes de fabricar la vacuna también debe comprobarse si los lotes de inóculo primario presentan transmisión y reversión a la patogenicidad. Se deben comprobar en las ovejas la apatogenicidad, la seguridad y la inmunogenicidad de muestras de la vacuna preparada a partir de inóculos víricos secundarios del máximo nivel de pases permitidos.

A las vacunas inactivadas no se aplica atenuación alguna, y la estrategia utilizada suele ser la de utilizar cepas naturales con pocos pases de cultivo para intentar lograr una elevada antigenicidad.

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

Los virus del inóculo primario deben estar libres de bacterias, virus, priones, hongos y micoplasmas contaminantes, evitando en particular la contaminación por pestivirus. A este respecto, se debe prestar atención al suero fetal bovino utilizado en los cultivos celulares, ya que puede estar contaminado. Los virus de siembra deben tener la especificidad serotípica deseada. El VLA que se utiliza en el lote del inóculo primario debe secuenciarse y los datos deben introducirse en las bases de datos reconocidas. Los lotes de inóculo secundario que se usan como inóculo en la producción de vacunas, no suelen tener más de tres pases de cultivo más que el lote de inóculo primario.

2.1.3. Validación como cepa para vacuna

Las vacunas atenuadas vivas contra la LA deben ser seguras y eficaces; a continuación, se presenta una breve descripción de las pruebas relacionadas con estos parámetros. Además, los virus atenuados no deben revertir a la condición de patógenos durante su replicación en animales vacunados ni ser capaces de transmitirse desde tales animales por insectos vectores. Este último criterio es muy importante, porque la transmisión de los virus atenuados mediada por los insectos desde los animales vacunados a los no inmunes, con los subsiguientes pasos replicativos en cada especie hospedadora, aumenta la probabilidad de reversión a la condición de patógenos. Aunque casi nunca se llevan a cabo pruebas de reversión a la condición de patógenos y de transmisión, se resumen los requisitos en una breve descripción.

Existe variabilidad en la susceptibilidad a la lengua azul entre las distintas razas de ovejas; es importante, a efectos de la validación de la vacuna, que se utilicen ovejas en las que se haya demostrado que son susceptibles a la infección por el VLA.

2.1.4. Procedimiento de urgencia para la aceptación provisional de un nuevo inóculo vírico primario (MSV) en caso de epizootia

En varias circunstancias (véase el Capítulo 1.1.10 *Bancos de vacunas*) y en caso de que un serotipo o variante del VLA nuevo o diferente dé lugar a una situación epizootica de emergencia que no pueda controlarse mediante las vacunas disponibles en ese momento, y cuando no se disponga de tiempo suficiente para analizar por completo si un nuevo MSV presenta o no cada uno de los agentes extraños, una aceptación provisional de la nueva cepa podría basarse en un análisis del riesgo de la posibilidad de contaminación con agentes extraños en el antígeno producido a partir del nuevo MSV. En esta evaluación del riesgo deben tenerse en cuenta las características del proceso, incluida la naturaleza y concentración del inactivante en el caso de las vacunas inactivadas, antes de permitir o no la liberación temprana del nuevo producto.

2.2. Método de producción

2.2.1. Procedimiento

La atenuación de cepas naturales de VLA inicialmente se llevó a cabo mediante pases seriados en HGE. Debido a la posibilidad de transmisión de los virus atenuados propagados en huevos, se ha recomendado que los animales inoculados con vacunas producidas en HGE no sean objeto de desplazamientos internacionales. Más recientemente, parece haber quedado aceptado que el pase por células en cultivo también induce la atenuación del poder patógeno. No se han realizado estudios para relacionar con precisión el número de pases con el grado de atenuación de cepas o serotipos víricos determinados. Para preparar virus atenuados, se adaptan cepas naturales a cultivo celular y se pasan *in vitro* hasta 40 veces o más. En teoría, en esta etapa se seleccionan varios virus purificados de placas o calvas y cada uno se examina para determinar el nivel de viremia que generan y su capacidad para inducir una respuesta inmunitaria de protección en las ovejas vacunadas. El virus ideal es el que se replica a bajo título pero que induce una respuesta inmunitaria protectora, y este puede constituir la fuente de virus para el inóculo primario de la vacuna.

Para las vacunas inactivadas, el VLA se produce a gran escala en cultivos celulares en suspensión en condiciones asépticas y controladas. Se utilizan líneas celulares adaptadas para su cultivo industrial a gran escala y que están libres de microorganismos contaminantes. Cuando la suspensión alcanza su título vírico máximo, seguida de alteración celular, se realiza la homogeneización celular y se clarifica y se filtra el cultivo. Después se lleva a cabo la inactivación según los procesos adoptados por el fabricante, como la adición de etilenimina binaria (BEI) u otros agentes inactivantes. El proceso debe cumplir con la legislación pertinente respecto al comercio, y debe superar la validación que asegure una inactivación completa y disponer de la documentación apropiada. El proceso de inactivación no debe alterar de modo significativo las propiedades inmunogénicas de los antígenos víricos. La purificación se realiza por cromatografía. A continuación, el virus inactivado se concentra mediante ultrafiltración y se almacena. Los antígenos inactivados del VLA, purificados por cromatografía y concentrados se convierten en vacuna mediante la dilución en una solución tampón y la adición de adyuvantes.

2.2.2. Requisitos para los ingredientes

En todos los componentes de origen animal, como el suero y las células, debe comprobarse si hay bacterias, virus, hongos o micoplasmas viables. Para más detalles, véase el capítulo 1.1.8 sobre datos generales relativos a los ingredientes de origen animal. Los ingredientes de origen animal deben proceder de un país con riesgo insignificante de encefalopatías espongiformes transmisibles (EET).

2.2.3. Controles durante el proceso

La concentración de virus en las vacunas atenuadas se determina mediante la infectividad y por pruebas ELISA.

En cuanto a las vacunas inactivadas, durante la inactivación del virus se toman muestras a intervalos periódicos con el fin de comprobar la velocidad y linealidad del proceso de inactivación. Los títulos víricos de las muestras se determinan mediante inoculación de células BHK-21 u otros cultivos celulares adecuados. Al final del proceso de inactivación, se comprueba que la vacuna no contenga ningún virus vivo.

2.2.4. Pruebas en el lote de producto final

i) Esterilidad

En cada lote de vacuna debe comprobarse si hay virus contaminantes o contaminación por bacterias, hongos o micoplasmas viables. En Sudáfrica, por ejemplo, se inocula un conjunto de diez ampollas seleccionadas al azar en caldo de soja y caldo de tioglicolato y se incuban a temperatura ambiente y a 37°C, respectivamente, durante 14 días. Si el cultivo aparece contaminado, el lote se desecha.

ii) Inocuidad

Se comprueba la inocuidad de cada lote de vacuna en ratones adultos y neonatos, en cobayas y en ovejas. Si se advierten reacciones adversas o signos notables, se repite la prueba. Cualquier incremento en la temperatura corporal del animal analizado por encima de la esperada para esa cepa de virus atenuado que se está analizando debe considerarse como sintomático. Si los resultados no son satisfactorios tras un segundo intento, el lote se desecha.

Las pruebas de inocuidad de las vacunas inactivadas se realizan en ovejas para asegurar la ausencia de efectos secundarios.

iii) Potencia

Cada lote se comprueba inoculando ovejas susceptibles. Los sueros de pre-vacunación y los de 21 y 28 días post-vacunación se analizan mediante ensayos de NV para determinar los niveles de anticuerpos neutralizantes. Para superar este aspecto, el título de anticuerpos debe ser igual o superior a unos valores establecidos por los estándares internacionales de vacunas.

iv) Duración de la inmunidad

Los estudios sobre vacunas con el VLA vivo atenuado han mostrado que, en las ovejas, los anticuerpos pueden aparecer antes del día 10 post-vacunación, alcanzan un máximo aproximadamente 4 semanas después y persisten durante bastante más de un año. Existe una relación temporal entre el aumento en el título de anticuerpos neutralizantes y la desaparición del virus de la circulación periférica. Las vacunas con VLA vivo atenuado se han usado durante más de 50 años y se sabe que inducen una inmunidad eficaz y duradera en ovejas (Verwoerd & Erasmus, 2004). En las áreas endémicas de Sudáfrica pueden presentarse muchos serotipos del VLA, y se usan vacunas polivalentes. La inclusión de 15 serotipos en tres vacunas polivalentes que se administran secuencialmente conlleva que en ocasiones no se genere una respuesta inmune eficaz frente a todos los serotipos, probablemente porque la masa antigénica de algunos antígenos individuales específicos de serotipo es pequeña. Para intentar ampliar la respuesta, se repite la vacunación anualmente.

Los estudios iniciales llevados a cabo con vacunas inactivadas indican que se pueden detectar anticuerpos contra el VLA a los 7 días de la vacunación, y que el título aumenta hasta los 14–21 días. Una segunda dosis de la vacuna aumenta el título. Se están consiguiendo datos para demostrar la duración esperable de la inmunidad.

v) Estabilidad

Se han elaborado procedimientos para las vacunas atenuadas. La estabilidad debe comprobarse a lo largo de un período de 2 años. Se considera que las vacunas en forma líquida o liofilizada tienen una caducidad de 1 y 2 años, respectivamente. Cada lote de vacuna se somete a una prueba acelerada de caducidad, guardándolos a 37°C durante 7 días. Luego se titulan y evalúan con arreglo a un procedimiento estándar, como se determina en las pruebas iniciales de la vacuna. Debe comprobarse periódicamente el periodo de validez de alícuotas de inóculo primario almacenadas a 4°C.

2.3. Requisitos de aprobación para el registro

2.3.1. Proceso de fabricación

Para el registro de vacunas, deben presentarse a las autoridades todos los datos relevantes en cuanto a la fabricación de la vacuna y las pruebas de control de calidad (véase el apartado C.2.1 y el C.2.2). Esta información debe facilitarse a partir de tres lotes consecutivos de vacuna con un volumen no inferior a 1/3 del volumen habitual de un lote industrial.

2.3.2. Requisitos de inocuidad

En todas las vacunas deben realizarse pruebas de inocuidad. Las pruebas de inocuidad para las vacunas atenuadas no abordan el problema de la teratogenicidad. Las vacunas con virus atenuado son teratógenas y no deben administrarse a ovejas gestantes durante la primera mitad de la gestación, ya que pueden causar anomalías fetales y muerte embrionaria.

i) Inocuidad en especies de destino y no de destino

En cuanto a las vacunas con virus vivo atenuado es necesario demostrar que no son patógenas. Se inoculan con el inóculo primario varias ovejas, seronegativas según una prueba serológica sensible adecuada (que será fiable para detectar anticuerpos incluso en animales vacunados). Las temperaturas se registran dos veces al día. Se realiza un seguimiento de los animales a intervalos periódicos a lo largo de un periodo de 28 días para saber si presentan signos clínicos y posibles reacciones locales o sistémicas, con el fin de asegurar que no son patógenas y que son inocuas. Se pueden utilizar muestras de sangre extraídas a intervalos periódicos para medir el nivel de viremia y las respuestas de anticuerpos. La prueba será válida si todas las ovejas vacunadas presentan signos de replicación vírica y ninguna presenta signos de enfermedad más allá de un trastorno transitorio leve. En Sudáfrica, para cada animal se calcula un índice de reacción clínica entre los días 4 y 14, y debe ser inferior a un valor estándar concreto.

ii) Reversión a la virulencia en vacunas atenuadas/vivas y consideraciones medioambientales

La transmisibilidad es un problema con las vacunas vivas atenuadas pero no con las vacunas muertas. Es difícil aplicar y analizar estadísticamente procedimientos para determinar si el virus atenuado puede ser transmitido por insectos que se alimenten en ovejas vacunadas virémicas, y por lo tanto este criterio de validación de las vacunas casi nunca se aplica. Los datos de laboratorio indican que los virus adaptados al laboratorio pueden ser transmitidos por insectos vectores (Ferrari *et al.*, 2005). Para que el procedimiento para determinar la transmisibilidad de un virus atenuado sea adecuado, deben vacunarse las ovejas y, durante la viremia, exponerlas a *Culicoides* competentes no infectados, a los cuales, a continuación, se les permite alimentarse en animales no infectados en los que se realiza un seguimiento para comprobar si presentan el VLA y anticuerpos contra el VLA. Dado que el título del virus atenuado en la sangre de ovejas vacunadas suele ser bajo, es posible que sean necesarias cantidades muy grandes de *Culicoides* y que solo una pequeña parte de estos resulten infectados y vivan lo suficiente como para alimentarse y llegar a transmitir el virus a otra oveja no infectada. Es difícil diseñar una prueba de laboratorio en la que se tenga en cuenta la gran cantidad de ovejas vacunadas y de insectos que habría en condiciones de campo. Aunque normalmente un título de virus en sangre inferior a 10^3 DICT₅₀/ml se ha considerado el umbral de “inocuidad”, se han observado casos auténticos de insectos que contraen el VLA por alimentarse en animales con títulos virémicos muy inferiores. Dada la compleja interacción entre el VLA, los vectores *Culicoides* y los animales hospedadores en el ciclo vital de la infección, los títulos víricos inducidos por la vacuna viva atenuada deben mantenerse en un mínimo absoluto, sobre todo si causa preocupación una transmisión de cepas vacunales en condiciones de campo.

Los datos actuales indican que durante la viremia y contrariamente a lo que ocurre con el virus natural, pueden hallarse cepas del VLA adaptadas al laboratorio en el semen de toros y carneros (Kirkland *et al.*, 2004). Las implicaciones de estas observaciones relativas a la transmisibilidad del virus no están del todo claras. En un estudio reciente del semen de carneros vacunados con vacuna preparada con VLA2 vivo atenuado se ha observado que aunque no se haya detectado el VLA en el semen, la vacuna ha causado una disminución de la calidad del mismo (Bréard *et al.*, 2007).

Los estudios de validación confirman que los virus atenuados no revierten a la virulencia en ovejas vacunadas. Sin embargo, si se pueden transmitir virus atenuados a partir de animales vacunados, la reversión a la virulencia tras varios ciclos de replicación en oveja-insecto resulta claramente posible. La única forma adecuada de comprobar si ha habido reversión a la virulencia en estas circunstancias es comparar la virulencia del virus vacunal con la del que se ha sometido a varios ciclos de replicación en oveja-insecto, como se ha descrito anteriormente. Como se ha indicado, es difícil de lograr. En consecuencia, no se ha determinado cuál es el efecto de pases en oveja-insecto sobre la virulencia de los virus atenuados. En Sudáfrica, se acepta que si la sangre de animales vacunados durante las fases virémicas se pasa de forma seriada tres veces por oveja y no revierte a la virulencia, la probabilidad de reversión en condiciones de campo será infinitamente baja. En Europa, se exigen cinco pases.

iii) Precauciones (peligros)

En los meses más fríos deben utilizarse vacunas atenuadas cuando las poblaciones de vectores *Culicoides* adultos están al mínimo. No deben utilizarse en ovejas durante la primera mitad de la gestación ni en carneros 2 meses antes de la estación reproductiva.

2.3.3. Requisitos de eficacia

Ovejas vacunadas y no vacunadas que se sepa que son susceptibles a la LA deben exponerse a un serotipo homólogo virulento. Se recomienda que el modelo de exposición utilice preferiblemente virus pasados solo por animales rumiantes y sin ECE o escaso, o por cultivo celular. El pase en este tipo de sistema de aislamiento da lugar a cultivos víricos que podrían inducir una LA clínica más leve que la enfermedad natural. Se comprueba si los animales presentan signos clínicos de enfermedad de la LA, se toman las temperaturas rectales dos

veces al día y se extraen muestras de sangre a intervalos periódicos para medir la viremia y las respuestas de anticuerpos. Las ovejas control no vacunadas deben presentar signos clínicos de la enfermedad de la LA y viremia. No obstante, es difícil estar seguro de la aparición de enfermedad clínica tras la inoculación de ciertos serotipos y cepas del VLA a la oveja, y en consecuencia, la evidencia de infección en ovejas control no vacunadas podría tener que basarse en un aumento de la temperatura por encima de los 40°C y una viremia. Para comprobar dicha infección, se analizan sueros tomados antes y después de la vacunación para determinar si presentan anticuerpos neutralizantes.

2.3.4. Vacunas que permiten una estrategia DIVA (detección de infección en animales vacunados)

Las vacunas vivas atenuadas y las inactivadas actualmente disponibles no permiten una estrategia DIVA mediante pruebas serológicas.

La RT-PCR se puede utilizar para aplicar la estrategia DIVA, lo que permite mantener la vigilancia durante las campañas de vacunación con cepas inactivadas. Las estrategias DIVA pueden utilizarse aplicando PCR a poblaciones en las que se han aplicado vacunas inactivadas. Las vacunas inactivadas pueden generar una señal muy débil en la RT-PCR, aunque esta desaparece unos días después de la vacunación. Por el contrario, los animales infectados suelen mantener una señal de RT-PCR elevada que puede durar de varias semanas a meses, incluso en presencia de anticuerpos neutralizantes, debido a la actividad de la hemaglutinina asociada a la proteína de la cápside externa VP2. Un método similar no es posible con las vacunas vivas atenuadas existentes actualmente. Si se utiliza esta estrategia, también se debe considerar la generación de una señal débil debido a una infección muy temprana.

2.3.5. Duración de la inmunidad

Para aprobar definitivamente una vacuna, deben llevarse a cabo estudios para determinar cuál es la duración mínima de la inmunidad. La duración de la inmunidad debe ponerse de manifiesto de manera similar a como se hace en el estudio original de eficacia, exponiendo animales al final del periodo de protección propuesto. En zonas con infecciones estacionales, la inmunidad deberá durar, como mínimo, lo mismo que la estación del mosquito del género *Culicoides*. Tal vez sea deseable demostrar una inmunidad más prolongada en animales con mayor riesgo y en zonas con presencia de mosquitos del género *Culicoides* a lo largo de todo el año.

2.3.6. Estabilidad

A las vacunas vivas se les suele asignar un periodo de validez de 18 meses, y a las inactivadas, de 24. Para confirmar la idoneidad de dichos periodos, es necesario llevar a cabo pruebas de estabilidad en tiempo real. En el etiquetado del producto deben especificarse las condiciones de almacenaje necesarias.

BIBLIOGRAFÍA

AFSHAR A., THOMAS F.C., WRIGHT P.F., SHAPIRO J.L. & ANDERSON J. (1989). Comparison of competitive ELISA, indirect ELISA and standard AGID tests for detecting bluetongue virus antibodies in cattle and sheep. *Vet. Rec.*, **124**, 136–141.

BATTEN C.A., BACHANEK-BANKOWSKA K., BIN-TARIF A., KGOSANA L., SWAIN A.J., CORTEYN M., DARPEL K., MELLOR P.S., ELLIOTT H.G. & OURA C.A.L. (2008). Bluetongue virus: European Community inter-laboratory comparison tests to evaluate ELISA and RT-PCR detection methods. *Vet. Microbiol.*, **129**, 80–88.

BELBIS G., ZIENTARA S., BREARD E., SAILLEAU C., CAIGNARD G., VITOUR D. & ATTOUI H. (2017). Bluetongue virus: From BTV-1 to BTV-27. *Adv. Virus Res.*, **99**, 161–197.

BREARD E., POZZI N., SAILLEAU C., CATINOT V., DURAND B., DUMONT P., GUÉRIN B. & ZIENTARA S. (2007). Transient effect of the attenuated bluetongue virus vaccine on the quality of the ram semen. *Vet. Rec.*, **160**, 431–435.

BREARD E., SHULZ C., SAILLEAU C., BERNELIN-COTTET C., VIAROUGE C., GUILLAUME B., CAIGNARD G., GORLIER A., ATTOUI H., GALLOIS M., HOFFMANN B., ZIENTARA S. & BEER M. (2018). Bluetongue virus serotype 27: Experimental infection of goats, sheep and cattle with three BTV-27 variants reveal atypical characteristics and likely direct contact transmission of BTV-27 between goats. *Transbound. Emerg. Dis.*, **65**, e251–e263.

CARPENTER S., VERONESI E., MULLENS B. & VENTER G. (2015). Vector competence of Culicoides for arboviruses: three major periods of research, their influence on current studies and future directions. *Rev. Sci. Tech.*, **34**, 97–112.

CHAIGNAT V., WORWA G., SCHERRER N., HILBE M., EHRENSPERGER F., BATTEN C., CORTYEN M., HOFMANN M. & THUER B. (2009). Toggenburg Orbivirus, a new bluetongue virus: initial detection, first observations in field and experimental infection of goats and sheep. *Vet. Microbiol.*, **138**, 11–19.

CLAVIJO A., HECKERT R.A., DULAC G.C. & AFSHAR A. (2000). Isolation and identification of bluetongue virus. *J. Virol. Methods*, **87**, 13–23.

DANIELS P.W., SENDOW I., PRITCHARD L.I., SUKARSIH & EATON B.T. (2004). Regional overview of bluetongue viruses in South-East Asia: viruses, vectors and surveillance. *Veterinaria Italiana*, **40**, 94–100.

DARPEL K.E., BARBER J., HOPE A., WILSON A.J., GUBBINS S., HENSTOCK M. & MERTENS P.P.C. (2016). Using shared needles for subcutaneous inoculation can transmit bluetongue virus mechanically between ruminant hosts. *Sci. Rep.*, **6**, 20627.

FERRARI G., DE LIBERATO C., SCAVIA G., LORENZETTI R., ZINI M., FARINA F., MAGLIANO A., CARDATI G., SHOLL F., GUIDONI M., SCICLUNA M.T., AMADDEO D., SCARAMOZZINO P. & AUTORINO G.L. (2005). Active circulation of bluetongue vaccine virus serotype-2 among unvaccinated cattle in central Italy. *Prev. Vet. Med.*, **68**, 10–13.

GOULD A.R. (1987). The complete nucleotide sequence of bluetongue virus serotype 1 RNA3 and a comparison with other geographic serotypes from Australia, South Africa and the United States of America, and with other orbivirus isolates. *Virus Res.*, **7**, 169–183.

HOFMANN M., GRIOT C., CHAIGNAT V., PERLER L. & THÜR B. (2008). Bluetongue disease reaches Switzerland. *Schweiz. Arch. Tierheilk.*, **150**, 49–56.

JACQUOT M., RAO P.P., YADAV S., NOMIKOU K., MAAN S., JYOTHI Y.K., REDDY N., PUTTY K., HEMADRI D., SINGH K.P., MAAN N.S., HEGDE N.R., MERTENS P. & BIEK R. (2019). Contrasting selective patterns across the segmented genome of bluetongue virus in a global reassortment hotspot. *Virus Evol.*, **5** (2):vez027. doi: 10.1093/ve/vez027.

KATZ J., GUSTAFSON G., ALSTAD D., ADLER K. & MOSER K. (1993). Colorimetric diagnosis of prolonged bluetongue viremia in sheep using an enzyme-linked oligonucleotide sorbent assay of amplified viral nucleic acids. *Am. J. Vet. Res.*, **54**, 2021–2026.

KIRKLAND P.D., MELVILLA L.F., HUNT N.T., WILLIAMS C.F. & DAVIS R.J. (2004). Excretion of bluetongue virus in cattle semen: a feature of laboratory adapted virus. *Vet. Ital.*, **40**, 497–501.

KRAMPS J.A., VAN MAANEN K., MARS M.H., POPMA J.K. & VAN RIJN P.A. (2008). Validation of a commercial ELISA for the detection of bluetongue virus (BTV)-specific antibodies in individual milk samples of Dutch dairy cows. *Vet. Microbiol.*, **130**, 80–87.

LUNT R.A., WHITE J.R. & BLACKSELL S.D. (1988). Evaluation of a monoclonal antibody blocking ELISA for the detection of group-specific antibodies to bluetongue virus in experimental and field sera. *J. Gen. Virol.*, **69**, 2729–2740.

MAAN S., MAAN N.S., BELAGANAHALLI M.N., RAO P.P., SINGH K.P., HEMADRI D., PUTTY K., KUMAR A., BATRA K., KRISHNAJYOTHI Y., CHANDEL B.S., REDDY G.H., NOMIKOU K., REDDY Y.N., ATTOUI H., HEGDE N.R. & MERTENS P.P. (2015). Full-Genome Sequencing as a Basis for Molecular Epidemiology Studies of Bluetongue Virus in India. *PLoS One*, **10**(6):e0131257. doi: 10.1371/journal.pone.0131257.

- MACLACHLAN N.J., DREW C.P., DARPEL K.E. & WORWA G. (2009). The pathology and pathogenesis of Bluetongue. *J. Comp. Pathol.*, **141**, 1–16.
- MACLACHLAN N.J. & MAYO C.E. (2013). Potential strategies for control of bluetongue, a globally emerging, *Culicoides*-transmitted viral disease of ruminant livestock and wildlife. *Antiviral Research*, **99**, 79–90.
- MACLACHLAN N.J., MAYO C.E., DANIELS P.W., SAVINI G., ZIENTARA S., GIBBS E.P. (2015). Bluetongue. *Rev Sci Tech* **34**, 329–340.
- MARTYN C.J., GOULD A.R. & EATON B.T. (1990). High level expression of the major core protein VP7 and the non-structural protein NS3 of bluetongue virus in yeast: use of expressed VP7 as a diagnostic, group-reactive antigen in a blocking ELISA. *Virus Res.*, **18**, 165–178.
- MAYO C., MULLENS B., GIBBS E.P. & MACLACHLAN N.J. (2016). Overwintering of Bluetongue virus in temperate zones. *Vet. Ital.*, **52**, 243–246.
- McHOLLAND L.E. & MECHAM J.O. (2003). Characterization of cell lines developed from field populations of *Culicoides sonorensis* (Diptera: Ceratopogonidae). *J. Med. Entomol.*, **40**, 348–351.
- MERTENS P.P., MAAN N.S., PRASAD G., SAMUEL A.R., SHAW A.E., POTGIETER A.C., ANTHONY S.J. & MAAN S. (2007). Design of primers and use of RT-PCR assays for typing European bluetongue virus isolates: differentiation of field and vaccine strains. *J. Gen. Virol.*, **88**, 2811–2823.
- MERTENS P.P.C., MAAN S., SAMUEL A. & ATTOUI H. (2005). Orbiviruses. In: *Virus Taxonomy. Classification and Nomenclature of Viruses*; Fauquet C.M., Mayo M.A., Maniloff J., Desselberger U. & Ball L.A., eds., Elsevier Academic Press, Amsterdam, Netherlands, 466–483.
- NOMIKOU K., HUGHES J., WASH R., KELLAM P., BREARD E., ZIENTARA S., PALMARINI M., BIEK R. & MERTENS P. (2015). Widespread Reassortment Shapes the Evolution and Epidemiology of Bluetongue Virus following European Invasion. *PLoS Pathog.*, **11** (8): e1005056. doi: 10.1371/journal.ppat.1005056.
- OLDFIELD S., ADACHI A., URAKAWA T., HIRASAWA T. & ROY P. (1990). Purification and characterization of the major group-specific core antigen VP7 of bluetongue virus synthesized by a recombinant baculovirus. *J. Gen. Virol.*, **71**, 2649–2656.
- PRITCHARD L.I., DANIELS P.W., MELVILLE L.F., KIRKLAND P.D., JOHNSON S.J., LUNT R. & EATON B.T. (2004). Genetic diversity of bluetongue viruses in Australia. *Vet. Ital.*, **40**, 438–445.
- RANJIN, K., PRASAD, M., BRAR, B., LAMBE, U., KUMAR, R., GHOSH, M. & PRASAD, G. (2019). Bluetongue virus vaccine: conventional to modern approach. *Acta virologica*, **63**, 3–18.
- SAVINI G. (2015). Bluetongue: a disease that does not speak ‘one tongue’ only. *Vet. Ital.*, **51**, 247–248.
- SAVINI G., LORUSSO A., PALADINI C., MIGLIACCIO P., DI GENNARO A., DI PROVVIDO A., SCACCHIA M. & MONACO F. (2014). Bluetongue serotype 2 and 9 modified live vaccine viruses as causative agents of abortion in livestock: a retrospective analysis in Italy. *Transbound. Emerg. Dis.*, **61**, 69–74.
- VAN RIJN P. (2019). Prospects of next-generation vaccines for bluetongue. *Front. Vet. Sci.*, **6**. Article 407.
- VERONESI E., DARPEL K.E., HAMBLIN C., CARPENTER S., TAKAMATSU H.H., ANTHONY S.J., ELLIOTT H., MERTENS P.P. & MELLOR P.S. (2010). Viraemia and clinical disease in Dorset Poll sheep following vaccination with live attenuated bluetongue virus vaccines serotypes 16 and 4. *Vaccine*, **28**, 1397–403. doi: 10.1016/j.vaccine.2009.10.107. Epub 2009 Nov 4.
- VERWOERD D.W & ERASMUS B.J. (2004). Bluetongue. In: *Infectious Diseases of Livestock, Second Edition*, Coetzer J.A.W. & Tustin R.C., eds. Oxford University Press Southern Africa, Cape Town, South Africa, 1201–1220.

VÖGTLIN A., HOFMANN M.A., NENNIGER C., RENZULLO S., STEINRIGL A., LOITSCH A., SCHWERMER H., KAUFMANN CH. & THÜR B. (2013). Long-term infection of goats with bluetongue virus serotype 25. *Vet. Microbiol.*, **166**, 165–173. doi: 10.1016/j.vetmic.2013.06.001. Epub 2013 Jun 18.

*
* *

NB: Existen Laboratorios de Referencia de la OIE para la lengua azul
(puede consultarse la página web de la OIE:

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

Por favor, contacte con los Laboratorios de Referencia de la OIE para información adicional sobre pruebas de diagnóstico, reactivos y vacunas para la lengua azul

NB: ADOPTADO POR PRIMERA VEZ EN 1991. ÚLTIMAS ACTUALIZACIONES ADOPTADAS EN 2021.