

FIEBRE AFTOSA (INFECCIÓN POR EL VIRUS DE LA 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 los animales ungulados de pezuña hendida. Existen siete serotipos del VFA, 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, la estomatitis vesicular y el exantema vesicular. El diagnóstico de laboratorio en los casos de sospecha de la FA es por tanto, un asunto urgente.

*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 leves a graves y pueden ocasionar la muerte, en especial a los animales jóvenes. En algunas especies, la infección puede ser subclínica, como en el búfalo africano (*Syncerus caffer*). El tejido de elección para el diagnóstico es el epitelio de vesículas intactas o recién rotas o del líquido vesicular. Cuando no es posible tomar esta muestra, la sangre y/o de líquido faringoesofágico tomadas con sonda en los rumiantes o por frotis de garganta en el caso de los cerdos, son las fuentes alternativas de obtención del virus. En los casos de muerte se puede enviar tejido del miocardio o sangre, pero, si están presentes, son preferibles las vesículas.*

Es importante que el transporte de muestras de los casos sospechosos sea seguro y adaptado a las normas internacionales. Solo deben enviarse a los 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 el diagnóstico la detección de anticuerpos específicos contra el virus y pueden utilizarse anticuerpos contra las proteínas no estructurales (NSP) 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 del 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 con un adecuado nivel de biocontención, el cual vendrá determinado por un análisis del riesgo que se realizará según lo establecido en el Capítulo 1.1.4 Bioseguridad y bioprotección: Normas para la gestión del riesgo biológico en los laboratorios veterinarios y en las instalaciones para animales.*

El enzimoimmunoanálisis (ELISA) puede utilizarse para detectar antígenos víricos de la FA y para la serotipificación. Los dispositivos de flujo lateral (LFD) también se están utilizando cada vez más y también sirven para detectar antígenos víricos. El ELISA ha sustituido a la fijación del complemento (CF) en la mayoría de laboratorios, ya que es más específico y sensible y no se ve afectado por los factores pro- ni anti-complementarios. Si la muestra es inadecuada o el diagnóstico es incierto, será necesario inocular los materiales de prueba pueden analizarse mediante reacción en cadena de la polimerasa de transcripción inversa (RT-PCR) y/o puede realizarse el aislamiento del virus utilizando cultivos celulares susceptibles a fin de amplificar cualquier ácido nucleico o virus vivo que esté presente. Los cultivos deberían ser preferentemente cultivos primarios de tiroides bovino (ternera), aunque se pueden utilizar células de riñón de cerdo, cordero o ternero, o líneas celulares con una sensibilidad comparable. Cuando en los cultivos se

haya completado un efecto citopático (ECP), se puede comprobar si los líquidos recogidos contienen VFA mediante las pruebas de la CF o el ELISA o mediante la RT-PCR.

Pruebas serológicas: La demostración de los anticuerpos específicos contra proteínas estructurales en los animales no vacunados que presenten una manifestación vesicular es indicativa de infección previa por el VFA. Esto resulta particularmente útil en los casos benignos o cuando no se puede tomar tejido epitelial. Las pruebas para anticuerpos contra algunas NSP del VFA proporcionan una 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 del 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 detectar los anticuerpos contra las proteínas estructurales se emplean como pruebas serológicas específicas de serotipo. Las pruebas de NV dependen de los cultivos de tejidos y, por tanto, son más propensas a la variabilidad de los 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 del ELISA se puede llevar a cabo con antígenos inactivados o recombinantes, lo que requiere, por tanto, menos servicios restrictivos de biocontención.

Requisitos para las vacunas y el material 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 concentra. El antígeno se suele mezclar con adyuvante oleoso o acuoso para la formulación de la vacuna. Muchas vacunas contra la FA son polivalentes con el fin de proporcionar protección contra los diferentes serotipos, o bien para ofrecer adaptación a la diversidad antigénica que sea más probable de 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 bovino vacunado para establecer la DP₅₀ (dosis protectora del 50%) o protección contra la infección podal generalizada (PGP), aunque una prueba serológica se considera satisfactoria cuando se establece una correlación válida entre la protección y la respuesta del anticuerpo específico.

Los servicios de producción de la vacuna contra la FA deben disponer de un nivel de biocontención adecuado, que vendrá determinado por un análisis del riesgo según lo establecido Capítulo 1.1.4 Bioseguridad y bioprotección: norma para la gestión del riesgo biológico en el laboratorio veterinario y en las instalaciones de los animales.

Los reactivos para diagnóstico y de referencia se pueden obtener en los laboratorios de referencia de la OIE para la FA o en el Laboratorio de Referencia mundial para la FA de la FAO (Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación) (el Instituto de Pirbright, Reino Unido).

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 a los animales de pezuña hendida. La infección con un serotipo determinado no confiere inmunidad contra otros. Dentro de los serotipos, se pueden identificar muchas cepas mediante pruebas bioquímicas e inmunológicas.

De las especies domésticas, el ganado bovino, porcino, ovino, caprino y el búfalo acuático (*Bubalus bubalis*) resultan susceptibles a la FA (Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura [FAO]; 1984). Además, pueden infectarse muchas especies salvajes de pezuña hendida, y el virus también se ha hallado ocasionalmente en otras especies. De los camélidos, los camellos bactrianos y los camellos americanos han sido los más susceptibles (Larska *et al.*, 2009). En África, a menudo son los búfalos africanos (*Syncerus*

caffer) los que mantienen los serotipos SAT del VFA. Se produce una propagación periódica de la infección al ganado doméstico o a especies salvajes de pezuña hendida simpátricas. En otras partes del mundo, el ganado bovino suele ser el principal reservorio de los VFA, aunque en algunos casos los virus involucrados parecen estar específicamente adaptados a los cerdos (como la cepa Cathay del tipo O del VFA adaptada al cerdo, que requiere células de origen porcino para el aislamiento primario). Los pequeños ruminantes pueden desempeñar un importante papel en la diseminación del VFA, pero no está claro si el virus puede mantenerse en estas especies durante largos periodos de tiempo en ausencia de infección en ganado bovino. Se han aislado a partir de los cerdos salvajes, antílopes y ciervos cepas del VFA que infectan al ganado bovino. La evidencia indica que, en el pasado, la infección del ciervo derivaba de un contacto, directo o indirecto, con animales domésticos infectados, y que aparte del búfalo africano, las especies salvajes hasta ahora no han podido mantener VFA de forma independiente durante más de unos pocos meses.

La infección de los animales susceptibles con el VFA puede provocar la aparición de vesículas en las patas, dentro y alrededor de la cavidad oral, y en las glándulas mamarias de las hembras. Las vesículas se rompen y a continuación cicatrizan, y las lesiones de los rodetes coronarios pueden provocar bandas de interrupción del crecimiento que avanzan distalmente por el lateral de la pezuña. La antigüedad de las lesiones puede estimarse a partir de estas alteraciones, puesto que sirven de indicador del tiempo transcurrido desde el comienzo de la infección (Ministerio de Agricultura, Pesca y Alimentación del Reino Unido, 1986). La mastitis es una secuela común de la FA en las vacas lecheras. También se pueden presentar vesículas en otras zonas, como en el interior de los ollares y en los puntos de presión de los miembros, especialmente en los 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. 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 los animales jóvenes: también puede presentarse miositis en otros lugares.

Cuando se presenta un historial con muertes repentinas en el ganado joven de pezuña hendida, el examen de los animales adultos revela con frecuencia la presencia de lesiones vesiculares, en caso de que se trate de la FA. La presencia de vesículas en los casos fatales es variable.

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

Los virus pueden presentarse en todas las secreciones y excreciones de los animales con infección aguda, incluyendo el aire espirado. Generalmente, la transmisión tiene lugar por contacto directo entre los animales infectados y susceptibles o, más raramente, por exposición indirecta de los animales susceptibles a las secreciones y excreciones de los animales con infección aguda, o a productos cárnicos crudos. Después de la recuperación de la fase aguda de la infección, los virus infecciosos desaparecen con excepción de unos bajos niveles que pueden persistir en la orofaringe de algunos ruminantes. Se puede seguir recuperando virus vivo o ARN vírico de los líquidos faringoesofágicos y de células recogidas con una sonda esofágica. También se ha observado que el VFA persiste en una forma no replicativa en ganglios linfáticos (Juleff *et al.*, 2008). 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 se convierten en 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 los animales susceptibles en contacto directo con ellos: se desconoce el mecanismo implicado. 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 el búfalo africano, 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. Las ovejas y las cabras no suelen portar VFA durante más de unos pocos meses, y existe poca información sobre la duración del estado de portador en especies y subespecies del búfalo asiático.

La FA se considera una enfermedad de riesgo zoonótico insignificante. No obstante, debido a la naturaleza altamente contagiosa en los animales y a la importancia económica de la FA, todas las manipulaciones de laboratorio que tengan lugar con cultivos víricos vivos o material que pueda estar infectado/contaminado, como muestras de tejidos o sangre, debe realizarse a un nivel de contención adecuado, que vendrá determinado por un análisis del riesgo biológico según lo indicado en el Capítulo 1.1.4 *Bioseguridad y bioprotección: norma para la gestión del riesgo biológico en el laboratorio veterinario y en las instalaciones de los animales*). Los países sin acceso a instalaciones de contención adecuadas deben enviar las muestras a un Laboratorio de Referencia de la OIE para la FA. Las instalaciones de producción de vacunas también deben cumplir los requisitos de contención.

Los reactivos estándar y para el diagnóstico se pueden obtener como preparados comerciales o como productos individuales proporcionados por los Laboratorios de Referencia de la OIE para la FA. El uso de antígenos inactivados en el enzoinmunoanálisis (ELISA), como controles en las pruebas de detección del antígeno o para

reaccionar con los sueros problema en las pruebas ELISA de bloqueo en fase líquida o las de competición en fase sólida, reduce el riesgo de enfermedad existente en comparación con el uso de los virus vivos. Los reactivos se suministran liofilizados, 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. Existen muchos preparados comerciales a la venta para la detección de antígenos víricos o anticuerpos contra el virus.

B. TÉCNICAS DE DIAGNÓSTICO

Tabla 1. Métodos analíticos disponibles para el diagnóstico de la fiebre FA 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
Identificación del agente¹						
Aislamiento del virus	–	+	+++	+++	–	–
ELISA de detección de antígeno	–	–	+++	+++	–	–
CF	–	–	+	+	–	–
LFD	–	–	+++	+++	–	–
RT-PCR en tiempo real	+	+	+++	+++	+	–
RT-PCR	+	+	+++	+++	+	–
Detección de respuesta inmunitaria						
ELISA para NSP Ab	+++	++	+++	+++	+++	–
ELISA para SP Ab ^(a)	++	++	+++	+++	++	+++
VN ^(a)	++	++	+++	+++	++	+++
AGID	+	+	+	+	+	–

Clave: +++ = método recomendado, validado para este propósito; ++ = método idóneo pero que puede precisar una posterior validación; + = puede utilizarse en algunas situaciones, pero el coste, la fiabilidad y otros factores limitan mucho su aplicación; – = no adecuado para este propósito; n/a = no aplicable.

ELISA = enzimoimmunoanálisis; CF = fijación del complemento; LFD: dispositivo de flujo lateral; RT-PCR = reacción en cadena de la polimerasa con transcripción inversa; AGID = inmunodifusión en gel de agar; ELISA para NSP Ab= ELISA para anticuerpos contra proteínas no estructurales; ELISA para SP Ab = ELISA para anticuerpos contra proteínas estructurales; VNT = prueba de neutralización vírica

^(a)Esta prueba no permite distinguir entre animales infectados y vacunados

Las mejores muestras para el diagnóstico son el tejido epitelial o el líquido vesicular. Idealmente, se debe obtener 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 obtiene las muestras, así como para el cuidado a los animales, se recomienda sedarlos antes de la toma de muestras.

Las muestras de epitelio se deben colocar en un medio para el 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], micostatina [100 UI]). Si no se

1 Se recomienda aplicar una combinación de métodos de identificación a una misma muestra clínica.

dispone de tampón fosfato 0,04 M, se pueden utilizar medios de cultivos de tejidos o solución salina tamponada con fosfato (PBS), pero es importante que el pH final de la mezcla glicerol/tampón esté comprendido entre 7.2–7.6. El VFA es extremadamente lábil en pH bajo y el tampón 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 convalecientes, o cuando se sospecha la infección en ausencia de síntomas clínicos, se pueden tomar muestras de líquido faringoesofágico por medio de una sonda esofágica (esputos) (o en cerdos, por frotis de la garganta) para su envío a un laboratorio a fin de proceder al aislamiento del virus o para la PCR de transcripción inversa. También se puede detectar la viremia mediante el examen de muestras de suero por medio de la PCR de transcripción inversa o por el aislamiento del virus. Para la toma de frotis de la garganta en los cerdos, los animales deberán colocarse de 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 obtener las muestras faringoesofágicas del ganado bovino o de los grandes rumiantes (como los búfalos), se deben añadir, a un recipiente de unos 5 ml de capacidad y con capacidad de resistir la congelación por hielo seco (dióxido de carbono sólido) o por nitrógeno líquido, 2 ml de líquido de transporte (formado por tampón fosfato 0,08 M que contenga albúmina de suero bovino al 0,01%, rojo fenol al 0,002%, antibióticos [1.000 unidades/ml de penicilina, 100 unidades/ml de micostatina, 100 unidades/ml de neomicina y 50 unidades/ml de polimixina], ajustado a pH 7,2) (Kitching & Donaldson, 1987).

Las muestras faringoesofágicas se toman insertando una sonda esofágica por encima de la lengua en la zona orofaríngea y luego se frota con energía hacia atrás y hacia delante de 5 a 10 veces entre la primera porción del esófago y la parte posterior de la faringe. El objetivo es tomar el líquido orofaríngeo y, especialmente las 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 obtener el líquido faringoesofágico mediante una sonda, el contenido se vierte en un frasco transparente de boca ancha de unos 20 ml de capacidad. Se examina el líquido, que debería contener algún material celular visible. Este líquido se añade a un volumen aproximadamente igual de líquido de transporte, asegurándose de 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 procedente del rumen pueden ser inadecuadas para el cultivo y las que contienen sangre tampoco son del todo 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 (p.ej. ácido cítrico al 0,5% [p/v] en agua corriente) y después aclarando todo el desinfectante con agua corriente antes de utilizarla con el siguiente animal.

Las muestras faringoesofágicas de pequeños rumiantes se obtienen poniendo 2 ml del líquido de transporte en un frasco 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 hielo seco o por nitrógeno líquido (Kitching & Donaldson, 1987).

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 situándolas sobre hielo seco 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 hielo seco, pues la introducción de CO₂ en la muestra faringoesofágica hace que descienda el pH, inactivando cualquier VFA 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, mantenidas con una cadena de frío fiable durante todo el transporte.

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. Estos se resumen en el Capítulo 1.1.2 *Recogida, presentación y almacenamiento de muestras para el diagnóstico* y el Capítulo 1.1.3 *Transporte de material biológico*. Los formularios y directrices sobre el envío de muestras y especificaciones de fabricación de sondas esofágicas se encuentran en la página web del Laboratorio de Referencia de la OIE de Pirbright <http://www.wrlfmd.org/>. Los procedimientos para la obtención y envío de muestras de campo para el diagnóstico

de enfermedades vesiculares y sus diagnósticos diferenciales se indican en la página web del Laboratorio de Referencia Panamericano de la OIE para la FA <http://www.panaftosa.org.br>.

1. Identificación del agente

Se pueden examinar distintos tipos de muestras, como el epitelio, muestras faringoesofágicas, la leche y el suero mediante el aislamiento del virus y la RT-PCR. Por contra, el ELISA, la CF y el dispositivo de flujo lateral son adecuados para el examen de las suspensiones del epitelio, los líquidos vesiculares o el sobrenadantes de cultivos celulares, pero no son lo bastante sensibles para el análisis directo de las muestras orofaríngeas o el suero.

1.1. Aislamiento del virus

La muestra de epitelio se extrae de la mezcla PBS/glicerol, se transfiere sobre un papel absorbente para reducir el contenido en glicerol, que es tóxico para los cultivos celulares, y a continuación se pesa. Se debe preparar una suspensión homogeneizando 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 cantidad de medio hasta un volumen final que sea 9 veces superior al de la muestra epitelial añadida, obteniéndose una suspensión al 10%. Esta se clarifica en una centrifuga de sobremesa a 2.000 **g** durante 10 minutos. Una vez clarificadas, las suspensiones de las muestras sospechosas de contener el VFA se inoculan en cultivos celulares. 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. Se debería comprobar la sensibilidad de cualquiera de las células utilizadas mediante preparaciones estandarizadas de VFA. La utilización de células IB-RS-2 sirve de ayuda para distinguir entre el virus de la enfermedad vesicular porcina (VEVP) y el VFA (puesto que el VEVP solamente crece en células de origen porcino) y es a menudo esencial para el aislamiento de las cepas aisladas en el ganado porcino, como O Cathay. Debe examinarse el efecto citopático (ECP) durante 48 horas en los cultivos celulares. Si no se detecta ECP, las células se deben congelar y descongelar, y utilizar para inocularlas en cultivos frescos, que se examinan para el ECP durante otras 48 horas. En el caso de los líquidos faringoesofágicos, el tratamiento preliminar con un volumen igual de clorofluorocarbonos puede mejorar la tasa de detección del virus liberando el virus de los complejos inmunitarios.

1.2. Métodos inmunológicos

1.2.1. Enzimoimmunoanálisis

El mejor procedimiento para la detección del antígeno vírico de la FA y para la identificación de los serotipos víricos es el ELISA (Ferris & Donaldson, 1992; Roeder & Le Blanc Smith, 1987). Se trata de una prueba indirecta de tipo 'sándwich' en la que las diferentes filas de las placas multipocillo están recubiertas con antisuero de conejo a cada uno de los siete serotipos del VFA. Estos son los sueros de 'captura'. A cada una de las filas se añaden suspensiones de las muestras problema, incluyendo los controles adecuados. Después se añade el antisuero de cobaya a cada uno de los serotipos del VFA, y a continuación suero anti-cobaya de conejo conjugado con un enzima. Entre paso y paso, se lava cuidadosamente para eliminar los reactivos no fijados. Una reacción coloreada después de la adición del substrato del enzima y el cromógeno indica una reacción positiva. Las reacciones positivas fuertes son evidentes a simple vista, pero los resultados también pueden leerse mediante espectrofotometría a la longitud de onda adecuada. En este caso, una lectura de absorbancia superior a 0,1 sobre el fondo indica una reacción positiva; también se puede identificar el serotipo del VFA. Los valores próximos a 0,1 deben confirmarse por repetición o por amplificación del antígeno mediante pases en cultivo celular y la prueba del sobrenadante después de que se haya desarrollado el ECP. Más adelante se presentará un protocolo adecuado. Actualmente se encuentran disponibles otros protocolos con formatos y criterios de interpretación ligeramente distintos (Alonso *et al.*, 1993).

Dependiendo de la especie y del origen geográfico de las muestras, puede ser apropiado realizar pruebas simultáneas para detectar el VEVP o el VEV. En teoría, se debería hacer un diagnóstico diferencial completo ante cualquier manifestación vesicular.

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

Los antígenos control se preparan a partir de cepas seleccionadas de cada uno de los siete serotipos del VFA (más el VEVP o el VEV si fuera necesario), que se cultivan en monocapas de células BHK-21 (células IB-RS-2 para el VEVP o el VEV). Se utilizan los sobrenadantes sin purificar y se pre-titulan 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 Tween 20 al 0,05% y rojo fenol como indicador (PBST).

Como anticuerpos de detección se utilizan antisueros de cobaya preparados por inoculación de cobayas con antígeno 146S de uno de los siete serotipos del VFA (más el VEVP si fuera necesario) y bloqueados previamente con suero bovino normal (NBS). Se preparan concentraciones óptimas predeterminadas en PBS con un Tween 20 al 0,05% y leche en polvo desnatada al 5% (PBSTM).

Se utiliza una inmunoglobulina de conejo (o de oveja) anti-cobaya conjugada con peroxidasa de rábano y pre-bloqueada con NBS, a una concentración óptima predeterminada en PBSTM. Como alternativa a los antisueros de cobaya o de conejo, se pueden utilizar anticuerpos monoclonales (MAb) adecuados unidos a las placas ELISA como anticuerpos de captura o conjugados con peroxidasa como anticuerpos de detección. Existe un kit listo para usar y validado que funciona con anticuerpos monoclonales preseleccionados y que permite detectar y serotipar seis de los siete serotipos del VFA.

1.2.2. Procedimiento analítico

- 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 VEVP o VEV (opcional). En países de regiones en las que nunca han circulado los serotipos SAT y Asia 1, estos serotipos no se incluyen de manera sistemática.
- ii) Se dejan toda la noche a 4°C en posición estática o en un agitador a 100–120 revoluciones por minuto en una incubadora a 37°C durante 1 hora.
- iii) Se prepara la suspensión de la muestra problema (suspensión de la muestra original al 10% o con los sobrenadantes clarificados y sin diluir de los cultivos celulares).
- iv) Se lavan cinco veces las placas ELISA con PBS.
- v) En cada placa, se cargan los pocillos de las columnas 4, 8 y 12 con 50 µl de PBS. Además, se añaden 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 VEVP o VEV (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 12,5 µl del pocillo 3 (de las filas A hasta H) (esto da diluciones seriadas de 1/5 de cada antígeno control). Solo se requiere cambiar las puntas de las micropipetas entre antígenos. El resto de la placa se puede rellenar con muestra o muestras problema. Se añaden 50 µl de la muestra uno a los pocillos 5, 6 y 7 de las filas A hasta las H. La segunda muestra se coloca de modo similar en las columnas 9, 10 y 11 de las filas A hasta las H.

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

Se depositan 50 µl de PBST en los pocillos (en las filas A hasta las 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 problema se pueden añadir en volúmenes de 50 µl en las columnas A hasta la H a las columnas 1, 2, 3; 5, 6, 7; 9, 10, 11, respectivamente.

- vi) Se cubre con las tapas y se coloca en un agitador orbital a 37°C durante 1 hora.
- vii) Se lavan las placas por inundación con PBS –se lavan tres veces como anteriormente y se vacía el líquido residual. Se secan las placas con papel secante.
- viii) Se pasan 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 las H, reciben respectivamente los antisueros contra los serotipos O, A, C, SAT1, SAT2, SAT3, Asia1 y contra el VEVP o VEV (opcional).

- ix) Se cubren con las tapas y se colocan en un agitador orbital a 37°C durante 1 hora.
- x) Se lavan de nuevo las placas tres veces y se añaden 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) Se lavan de nuevo las placas tres veces y se añaden a cada pocillo 50 µl de solución de sustrato 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.

1.2.3. Prueba del dispositivo de flujo lateral

Existen dispositivos de flujo lateral (LFD) para la detección de antígenos del VFA a la venta (Ferris *et al.*, 2009), pero la OIE todavía no ha recibido el dossier de validación de estas pruebas. En cuanto reciba el dossier, el fabricante podría solicitar ser incluido en el registro de pruebas de la OIE.

1.2.4. Prueba de la fijación del complemento

Por lo general, la técnica ELISA es preferible a la prueba de la fijación del complemento (CF) porque es más sensible y no se ve afectada por los factores pro y anti-complementarios (Ferris & Dawson, 1988). No obstante, si se carece de los reactivos para el ELISA, o si el objetivo es la subtipificación, se puede utilizar la prueba de la CF del siguiente modo:

El protocolo de la CF50% en tubos se utiliza mucho en Suramérica para la tipificación, subtipificación y establecimiento de las relaciones serológicas (valores r), del siguiente modo: se coloca en tubos independientes 0,2 ml de antisuero contra cada uno de los serotipos de la FA diluidos a una dilución óptima predeterminada en tampón veronal (VBD) o solución borato salina (BSS). A estos, se añaden 0,2 ml de suspensión de muestra problema, seguido de 0,2 ml de una dilución de complemento que contenga 4 unidades de complemento. El sistema se incuba a 37°C durante 30 minutos antes de añadir 0,4 ml de eritrocitos de oveja (SRBC) estandarizados al 2% en VBD o BSS y sensibilizados con anti-SRBC de conejo. Los reactivos se incuban a 37°C durante otros 30 minutos y después se centrifugan los tubos y se leen. Las muestras con menos de un 50% de hemólisis se consideran positivas.

Existen otros protocolos que se llevan a cabo en microplacas del siguiente modo: se diluyen antisueros contra cada uno de los siete tipos de VFA en VBD en pasos de dilución a 1/5 a partir de una dilución inicial de 1/16 para depositar 25 µl de diluciones antisuero sucesivas en pocillos en forma de U por toda una placa de microtítulo. A estos se añaden 50 µl de 3 unidades de complemento, seguidos de 25 µl de suspensión/es de la muestra problema. El sistema de la prueba se incuba a 37°C durante 1 hora antes de añadir 25 µl de SRBC estandarizados al 1,4% en VBD y sensibilizados con anti-SRBC de conejo. Los reactivos se incuban a 37°C durante otros 30 minutos y a continuación se centrifugan y leen las placas. Se incluyen controles adecuados para la/s suspensión/es de la prueba, los antisueros, las células y el complemento. Los títulos de CF se expresan como la inversa de la dilución de suero que haya producido un 50% de hemólisis. Un título de CF ≥ 36 se considera una reacción positiva. Un título de 24 se debe confirmar volviendo a analizar un antígeno que haya sido amplificado mediante el pase por un cultivo celular.

1.3. Métodos de reconocimiento del ácido nucleico

Se puede utilizar la RT-PCR para amplificar los fragmentos del genoma del VFA en material para el diagnóstico, incluyendo epitelio, leche, suero y muestras faringoesofágicas. La RT-PCR de tiempo real tiene una sensibilidad comparable a la del aislamiento de virus y los procedimientos automatizados mejoran el rendimiento de la muestra (Reid *et al.*, 2003). También se han desarrollado cebadores de serotipado (Vangryspere y De Clercq, 1996). Se están elaborando procedimientos simplificados para su posible utilización en trabajos de campo (Callahan *et al.*, 2002).

1.3.1. Prueba RT-PCR basada en el gel de agarosa

Se describe el procedimiento de una RT-PCR basada en gel (Reid *et al.*, 2000). La 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 la PCR del producto de la RT y (iv) detección de los productos de la PCR por electroforesis en gel de agarosa.

1.3.2. Procedimiento analítico

- i) Se añaden 200 µl de la muestra de prueba a 1 ml de reactivo para la extracción de ARN en un tubo esterilizado. Se conserva 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 un 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 sedimento del fondo del tubo.
- ix) Se seca al aire cada tubo a temperatura ambiente durante 2–3 minutos.
- x) Se resuspende cada sedimento añadiendo al tubo 20 µl de agua exenta de nucleasa.
- xi) Se conservan con hielo las muestras de ARN si se va a realizar pronto la fase de la transcripción inversa (RT). Si no es así, se conservan a -70°C.

NOTA: Como alternativa al fenol/cloroformo, la extracción del ARN se puede realizar empleando kits comerciales basados en la lisis de sales caotrópicas y en la afinidad del ARN al sílice.

- xii) A cada una de las muestras que se han de ensayar, se le añaden 2 µl de hexámeros tomados al azar (20 µg/ml) y 5 µl de agua exenta de nucleasa a un tubo estéril de microcentrífuga de 0,5 ml. Se recomienda preparar la dilución completa para el total de las muestras a analizar, pero preparando para 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 alternativamente arriba y 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 completa de la reacción en un tubo de microcentrífuga estéril de 1,5 ml para el número de muestras que se han de ensayar más una muestra extra.

Tampón de primera cadena, conc. 5× (4 µl); albúmina de suero bovino (acetilada) a una concentración de 1 mg/ml (2 µl); las dNTP, dATP, dCTP, dGTP, dTTP, cada una a una concentración 10 mM (1 µl); DTT 1 M (0,2 µl); transcriptasa inversa del virus de la leucemia murina de Moloney, 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.
- xix) 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 conservan 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 la PCR 10x (5 µl); MgCl₂ 50 mM (1,5 µl); cada una de las dNTPs, dATP, dCTP, dGTP y dTTP, 10 mM (1 µl); cebador 1, a 10 pmoles/µl (1 µl); cebador 2, a 10 pmoles/µl (1 µl); Taq polimerasa, a 5 unidades/µl (0,5 µl).

- xxi) Se añaden 45 µl de la mezcla para la PCR a un pocillo de una placa para PCR o a un tubo de microcentrífuga por cada muestra que se ha de analizar 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 la 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.Es posible que los tiempos y temperaturas deban adaptarse a los enzimas, reactivos y equipos de PCR que se utilicen en cada laboratorio.
- xxiv) Se mezcla una alícuota de 20 µl de cada producto de reacción por la 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 VFA de la región 5' no traducida del genoma.

1.3.3. Soluciones base

- i) Se encuentran disponibles en el mercado el agua exenta de nucleasa, el reactivo para extracción de ARN, cloroformo, glucógeno, alcohol isopropílico (propan-2-ol), etanol, cebadores de hexanucleóticos aleatorios, tampón para la primera hebra, BSA (acetilado), dNTP, DTT, transcriptasa inversa del virus de la leucemia murina de Moloney, tampón (10x) para reacción por PCR, MgCl₂ y Taq Polimerasa.
- ii) 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).

1.3.4. Prueba de la RT-PCR en tiempo real

En la prueba de la RT-PCR se utiliza el mismo procedimiento de extracción de ARN total de las muestras de prueba o de control, seguida de la transcripción inversa del 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 del ácido nucleico total de las muestras seguido de programas de pipeteo automático para los pasos de la PCR y la RT (Reid *et al.*, 2003). La amplificación del producto del RT por la PCR se lleva a cabo mediante un procedimiento diferente. También se ha descrito un método más sencillo de un solo paso para combinar las etapas de RT y PCR (Shaw *et al.*, 2007) y se utiliza mucho en los laboratorios. No es necesaria la detección de los productos de la PCR en geles de agarosa tras la amplificación en tiempo real.

- i) Se toman los productos de RT del paso xix (véase más arriba).
- ii) Se prepara la mezcla para la PCR descrita más adelante para cada muestra. Una vez más, se recomienda preparar la mezcla completa 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 la PCR, 2x conc. (12,5 µl); cebador directo para la PCR en tiempo real, 10 pmoles/µl (2,25 µl); cebador inverso para PCR en tiempo real, 10 pmoles/µl (2,25 µl); sonda marcada, 5 pmoles/µl (1 µl).
- iii) Se añaden 24 µl de la 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.
- iv) Se centrifuga la placa durante un minuto en una centrífuga adecuada para mezclar los contenidos de cada pocillo.

- v) 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.

Es posible que los tiempos y temperaturas deban adaptarse a los enzimas, reactivos y equipos de PCR que se utilicen en cada laboratorio.

- vi) *Lectura de los resultados:* se asigna un valor de ciclo umbral (CT) a cada reacción de la 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; (Parida *et al.*, 2007). Los valores de corte utilizados para clasificar las muestras como positivas o negativas al VFA deben ser establecidos por cada laboratorio utilizando el 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 >50,0. Las muestras de prueba positivas y las muestras control positivas deben tener un valor de corte <40. Las muestras con valores de corte situadas en el intervalo 40–50 se las considera 'dudosas' y pueden volver a procesarse. Las muestras muy positivas a la FA tienen un valor de corte inferior a 20,0 (Reid *et al.*, 2001).

1.3.5. Soluciones base para la prueba de la PCR en tiempo real

- i) Están disponibles en el mercado el agua exenta de nucleasa y las mezclas base de reacción para la PCR en tiempo real.
- ii) Para la PCR en tiempo real del VFA, se puede utilizar uno de los dos siguientes juegos de cebadores y sondas:

5'UTR (Reid *et al.*, 2001) cebador directo: CACYT YAAGR TGACA YTGRT ACTGG TAC; cebador inverso: CAGAT YCCRA GTGWC ICITG TTA y la sonda marcada: CCTCG GGGTA CCTGA AGGGC ATCC.

3D (Callahan *et al.*, 2002) cebador directo: ACTGG GTTTT ACAA CCTGT GA; cebador inverso: GCGAG TCCTG CCACG GA y la sonda marcada: TCCTT TGCAC GCCGT GGGAC.

1.3.6. Epidemiología molecular

La epidemiología molecular de la FA se basa en la comparación de las diferencias genéticas entre los 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 las secuencias derivadas del gen 1D (que codifica la proteína vírica VP1) (Knowles & Samuel, 2003; véase también <http://www.wrlfmd.org/>). La comparación de las secuencias del genoma completo puede proporcionar una mayor discriminación entre los virus estrechamente relacionados y ayudar a recrear las vías de transmisión entre las granjas dentro de los brotes (Cottam *et al.*, 2008). La amplificación por la PCR de transcripción inversa (RT-PCR) del ARN del VFA, 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 6.000 secuencias parciales.

El método recomendado es el siguiente:

- i) Extraer el ARN del virus directamente de las suspensiones epiteliales, o de pasajes bajos en cultivo celular.
- ii) Realizar una RT-PCR del gen 1D completo (o, si solo 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).

Existe un protocolo completo con secuencias de cebadores (Knowles *et al.*, 2016) o se puede bajar de la siguiente página web: <http://www.wrlfmd.org/> y <http://bvs.panaftosa.org.br/>

2. Pruebas serológicas

Las pruebas serológicas para la FA tienen cuatro objetivos principales: 1) la certificación individual de los animales antes de su importación o exportación (i.e. con fines comerciales); 2) confirmar los casos sospechosos de FA; 3) comprobar la ausencia de la infección; 4) demostrar la eficacia de la vacunación. Para concretar la ausencia de la infección, se requieren diferentes enfoques dependiendo de si la población está o no está 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 y las interpretaciones de sus resultados 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 la 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 relativamente específicas de serotipo y detectan a los anticuerpos producidos por la vacunación y la infección; por ejemplo, la prueba de neutralización vírica (NV) (Golding *et al.*, 1976), el ELISA de competición en fase sólida (SPCE; Brocchi *et al.*, 1990; Chenard *et al.*, 2003; Mackay *et al.*, 2001; Paiba *et al.*, 2004) y el ELISA de bloqueo en fase líquida (LPBE; Hamblin *et al.*, 1986; 1987). Estas pruebas son muy sensibles siempre que el virus o antígeno usado en la prueba sea casi igual que la cepa natural. Son las pruebas que se utilizan para certificar animales antes de sus desplazamientos, como en el caso del comercio internacional, y son adecuadas para confirmar una infección anterior o actual en los animales no vacunados, así como para comprobar la inmunidad proporcionada por la vacunación en el campo. La prueba de neutralización vírica precisa de instalaciones para cultivos celulares, la utilización de virus vivos y entre 2 y 3 días para obtener resultados. Los ELISA son pruebas de bloqueo o de competición en las que se utilizan anticuerpos policlonales o monoclonales específicos de serotipo, son más rápidas de realizar y no dependen del uso de sistemas de cultivos celulares ni de virus vivos. Del uso de cualquiera de los formatos ELISA se puede esperar una proporción baja de sueros de título bajo con reacciones positivas falsas. Una combinación de análisis por el 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 para la FA están disponibles en el Laboratorio de Referencia de la OIE, en Pirbright.

La detección de anticuerpos contra las proteínas no estructurales (NSP) del VFA se puede utilizar para identificar infecciones pasadas o actuales con algunos de los siete serotipos del virus, independientemente de que el animal también haya sido vacunado. Por tanto, las pruebas pueden utilizarse para confirmar los casos sospechosos de FA y para comprobar la prevalencia de la infección o bien la ausencia de la infección a nivel de 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 mediante el desafío con virus vivos y con infección persistente, pueden pasar sin ser detectados en algunas pruebas anti-NSP, originando resultados negativos falsos (Brocchi *et al.*, 2006). Estas pruebas miden los anticuerpos contra las NSP utilizando los 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 la infección (Mackay *et al.*, 1997). En los 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 (Bergmann *et al.*, 2000; Mackay *et al.*, 1997). Sin embargo, la pureza de la vacuna es un factor importante a tener en cuenta ya que la presencia de NSP en algunas preparaciones de vacunas puede originar una clasificación errónea en los animales que han sido vacunados repetidamente. En el apartado D de este Capítulo se explican los procedimientos para evaluar la pureza de la vacuna.

Se han elaborado sueros internacionales estándar para las pruebas con NSP en ganado bovino y están disponibles en los Laboratorios de Referencia de la OIE, en Brasil y Reino Unido (Campos *et al.*, 2008). En el futuro también se podrá disponer de sueros estándar para las ovejas y los cerdos. Se han establecido conjuntos de sueros bovinos para comparar la sensibilidad de las pruebas con NSP (Parida *et al.*, 2007).

2.1. Prueba de la neutralización del virus

La microprueba cuantitativa de la NV para el anticuerpo contra el VFA 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 conservan 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 problema 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.

En la prueba se utilizan volúmenes idénticos de 50 µl.

2.1.1. Procedimiento analítico

- i) Comenzando con la dilución 1/4, se diluyen los sueros a la mitad en diluciones seriadas por toda la placa, utilizando al menos dos filas de pocillos por suero, preferiblemente cuatro filas, y un volumen de 50 µl.
- ii) Se añade el virus previamente titulado; cada 50 µl de suspensión vírica debe contener aproximadamente 100 DICT₅₀ (dosis infectiva del 50% en cultivo de tejidos) dentro de un margen aceptable (por ejemplo, 32–320 DICT₅₀).
- iii) Los controles incluyen un antisuero estándar de título conocido, 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) Se incuba a 37°C durante 1 hora con las placas cubiertas.
- v) Se prepara una suspensión celular de 10⁶ células/ml en medio que contenga suero bovino al un 10% (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 con cinta sensible a la presión 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 con un 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 formol al 10% en solución salina durante 30 minutos. Para la tinción, las placas se sumergen en azul de metileno al 0,05% con formalina al 10% durante 30 minutos. Una alternativa de la fijación y la 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 del suero y el virus donde el 50% de los pocillos está protegido (Kärber, 1931). 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 respecto a los 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 del suero y el virus se considera positivo. Un título de menos de 1/16 se considera negativo. 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 realizar más pruebas. Los resultados se consideran positivos, si la segunda muestra presenta un título de 1/16 o superior. Cuando el objetivo es la serovigilancia del rebaño 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 los resultados de la prueba de potencia con la vacuna y especie de destino pertinentes.

2.2. Enzoinmunoanálisis de competición en fase sólida

El método descrito (Paiba *et al.*, 2004) puede utilizarse para la detección de anticuerpos contra cada uno de los siete serotipos del VFA. Como alternativa a los antisueros de cobaya o de conejo, pueden utilizarse MAbs adecuados con los que se recubrirán placas ELISA a modo de anticuerpos de captura, o bien anticuerpos conjugados con peroxidasa a modo de anticuerpos de detección (Brocchi *et al.*, 1990). Existen kits comerciales que funcionan con anticuerpos monoclonales para el serotipo O (Chenard *et al.*, 2003), el serotipo A, el serotipo Asia 1 y el serotipo SAT 2 con un formato distinto pero con unas características de realización similares.

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

Los antígenos se preparan inactivando a los virus procedentes de cultivos celulares con etilenimina, 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 un PBS que contenga Tween 20 al 0,05%, suero bovino normal (NBS) al 10%, suero normal de conejo al 5% y el indicador rojo fenol (tampón de bloqueo).

Como anticuerpos de detección, se utilizan antisueros de cobaya, preparados mediante la inoculación de las 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 contenga un Tween 20 al 0,05% y leche desnatada en polvo al 5% (PBSTM).

Se utiliza inmunoglobulina anti cobaya generada en conejo (u oveja) conjugada a peroxidasa de rábano y prebloqueada con NBS una concentración óptima predeterminada en tampón de bloqueo PBSTM conjugada co.

Los sueros problema se diluyen en tampón de bloqueo PBST.

El ELISA de competición en la fase sólida es más específico que el ELISA de bloqueo en la fase líquida, pero de sensibilidad similar (Mackay *et al.*, 2001; Paiba *et al.*, 2004). Se han descrito métodos para la elaboración de los sueros estándar de trabajo y secundarios (Goris y De Clercq, 2005a) y para esquematizar la realización de la prueba (Goris y De Clercq, 2005b).

2.2.1. Procedimiento analítico

- i) Las placas ELISA se recubren con 50 µl/pocillo de antisuero de conejo homólogo contra el antígeno que se está utilizando, diluido en tampón carbonato/bicarbonato, pH 9,6, y se deja toda la noche a 4°C en una cámara húmeda.
- ii) Se lavan las placas ELISA tres veces con PBS.
- iii) A continuación se añaden a cada pocillo de la placa de ELISA 50 µl del antígeno del VFA diluido en tampón de bloqueo. (Tampón de bloqueo: Tween 20 al 0,05% [p/v], NBS al 10% [v/v] y suero de conejo normal al 5% [v/v]). 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 problema (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 VFA diluido en tampón de bloqueo, obteniendo una dilución final del suero de 1/10.
- vi) Se tapan las placas 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 conjugado de inmunoglobulina anti-cobaya conjugada (pre-bloqueada mediante su incubación durante una 1 hora a temperatura ambiente con un volumen igual de NBS), diluida en tampón de bloqueo. Se tapan las placas 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 contenga un 0,05% de H₂O₂ más ortofenilén diamina o un cromógeno alternativo adecuado.
- ix) La reacción se para a los 10 minutos añadiendo 50 µl de ácido sulfúrico 1 M. Las placas se leen a 492 nm en un espectrofotómetro acoplado a un ordenador.
- x) *Controles:* Se utilizan dos pocillos por cada placa para los controles del conjugado (sin suero de cobaya), cuatro pocillos para los sueros positivos fuertes y débiles, dos pocillos para los sueros negativos y cuatro pocillos para la competición nula (sin suero problema).
- xi) *Interpretación de los resultados:* Para cada pocillo, se calcula un porcentaje de inhibición, visualmente o mediante un programa adecuado de ordenador ($100 - [\text{densidad óptica de cada valor analítico o control} / \text{densidad óptica media del resultado de competición nula}] \times 100\%$) que represente la competición entre el suero problema y el antisuero de cobaya contra el VFA en la placa de ELISA. Los laboratorios deben validar la prueba en términos de valores de corte por encima de los cuales los sueros deban considerarse positivos en relación a (i) los serotipos particulares y las cepas del virus investigado, (ii) el objetivo de

la prueba y (iii) la población analizada, utilizando los métodos descritos en el Capítulo 1.1.6 *Principios y métodos de validación de las pruebas de diagnóstico de las enfermedades infecciosas*. 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 en una población nunca antes expuesta al virus, se considera positiva una inhibición superior al 60% (Paiba *et al.*, 2004). 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%.

2.3. Enzimoimmunoanálisis de bloqueo en fase líquida

Los antígenos se preparan a partir de cepas seleccionadas del VFA cultivados en monocapas de células BHK-21. Se utilizan los sobrenadantes sin purificar y se pre-titulan 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 Tween 20 al 0,05% y rojo fenol como indicador (PBST). Los otros reactivos utilizados en la prueba son los mismos que para el ELISA de bloqueo en fase sólida. A continuación se describe un ejemplo del procedimiento analítico. La temperatura y el tiempo de incubación pueden variar dependiendo del protocolo.

2.3.1. Procedimiento analítico

- i) Las placas ELISA se recubren con 50 µl/pocillo de antisuero de conejo homólogo al antígeno utilizado 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 problema, comenzando con la 1/8. A cada pocillo, se le 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 de suero y 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 NBS y diluido en PBST que contenga un 5% de leche en polvo 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 (pre-bloqueado con NBS y diluido en PBST que contenga un 5% de leche en polvo desnatada). 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 a 492 nm 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 solo 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 anticuerpos 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, 1931). 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 o iguales a 1/90 se consideran

positivos. Los títulos inferiores a 1/40 se consideran negativos. Para la certificación de los 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 de suero para la prueba. 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 a la que se destine.

2.4. Pruebas de anticuerpos contra las proteínas no estructurales (NSP)

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. En estos ELISA se utilizan antígenos purificados que se adsorben directamente en microplacas o emplean PAbs o MAbs para capturar antígenos específicos de preparaciones semi-purificadas (Bergmann *et al.*, 2000; De Diego *et al.*, 1997; Mackay *et al.*, 1997; Sorensen *et al.*, 1998). Más adelante se describe detalladamente el método de análisis de índices utilizado en Panaftosa. Se ha observado que otras pruebas de ELISA indirectos y de competición para detección de anticuerpos contra 3ABC tienen procedimientos de realización del diagnóstico equivalentes (Brocchi *et al.*, 2006). Este mismo estudio corrobora 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 bovino, el ovino y el porcino. También existen a la venta kits validados para la detección de anticuerpos contra NSP del VFA en ganado bovino y en otras especies.

2.4.1. Enzimoanálisis indirecto

a) Preparación de los antígenos recombinantes

Véase el apartado B.2.4.2. *Prueba de la enzimoanálisis indirecto.*

b) Procedimiento analítico

- 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 enzimoanálisis indirecto) (Neizert *et al.*, 1991).
- ii) Se lavan las placas seis veces con PBS, pH 7,2, que contenga Tween 20 al 0,05% (PBST).
- iii) Se añaden los sueros problema (100 µl por pocillo) a una dilución 1/20 en tampón de bloqueo que consiste en PBS, Tween 20 al 0,05%, leche en polvo desnatada al 5%, suero de caballo al 10% y lisado de *Escherichia coli* al 0,1%. 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 (H₂SO₄) 0,5 M. La absorbancia se lee a 450 nm y a 620 nm para la corrección de fondo.
- viii) *Interpretación de los resultados:* Los resultados se expresan como el porcentaje relativo de positividad respecto al control positivo fuerte [(densidad óptica del pocillo problema o control/densidad óptica del control positivo fuerte) × 100], o alternativamente, como prueba para controlar el índice (T/C) relativo al control del corte (i.e. umbral positivo). El perfil de los niveles de reactividad de los anticuerpos para NSP en rebaños, junto con la estratificación de edad y vacunación, ayuda a interpretar el estado infeccioso del rebaño en las poblaciones vacunadas (Bergmann *et al.*, 2003). Los valores de corte, con y sin zonas de sospecha, se determinan en función de la finalidad de la prueba y de la población que es el objetivo del análisis. Cuando los resultados no son concluyentes pueden utilizarse pruebas confirmatorias repitiendo el EITB o un segundo ELISA para NSP (teniendo presente la dependencia condicional de las dos pruebas). Para ello debe

tenerse en cuenta la sensibilidad y la especificidad del sistema completo de pruebas cuando se diseñen programas de serovigilancia. Aunque no se trate de una prueba prescrita para el comercio, el ELISA para NSP puede ser un complemento en circunstancias en las que se desconoce el serotipo o subtipo de virus en el país originario.

2.4.2. Prueba de la enzimoimmunotransferencia (EITB)

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

a) Preparación de las tiras problema con los antígenos recombinantes

- i) Las cinco NSP del VFA 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 (McCullough *et al.*, 1992), 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 (Strebel *et al.*, 1986).
- 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 (electroforesis en gel de poliacrilamida con dodecilsulfato de sodio) preparativa al 10%. La banda de proteínas de fusión se separa del gel y se electroeluye (McCullough *et al.*, 1992).
- 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 (McCullough *et al.*, 1992).

b) Procedimiento analítico

- 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 (Tris-HCl 50 mM, pH 7,5; NaCl 150 mM; Tween 20 al 0,2%; leche desnatada en polvo al 5% y lisado bacteriano de *E. coli* al 0,05%). 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 problema 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 problema se lava tres veces con una solución de lavado (Tris-HCl 50 mM, pH 7,5; NaCl 150 mM y Tween 20 al 0,2%) 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) Se prepara la solución de sustrato (fosfato de bromocloroindol al 0,015%/ nitroazul tetrazolio al 0,03%) en tampón de sustrato (NaCl 100 mM; MgCl₂ 5 mM y Tris-HCl 100 mM, pH 9.3) y se añade a cada pocillo problema.
- 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 los sueros controles individuales que exhiben un color mínimo pero repetitivo para cada uno de los cinco antígenos. Una muestra problema 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. REQUISITOS PARA LAS VACUNAS

El control de la FA es una responsabilidad nacional y regional y, en muchos países, la vacuna solo puede utilizarse bajo el control de las Autoridades Veterinarias.

Las directrices para la producción de las vacunas veterinarias se presentan en el Capítulo 1.1.8. *Principios de producción de vacunas veterinarias*. Las directrices que se indican aquí y en el Capítulo 1.1.8 son de carácter general y pueden suplementarse con requisitos nacionales y regionales. Se aplican diferentes requisitos relacionados con la calidad, la inocuidad y la 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.

Las instalaciones de producción de la vacuna contra la FA deben funcionar bajo normas y prácticas apropiadas de bioseguridad y contención indicadas 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*.

La vacunación contra la FA se utiliza de forma rutinaria en muchos países o regiones reconocidas como libres de la FA por vacunación y en los 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 movimiento pecuario 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". (Véase también el Capítulo 1.1.10 *Bancos de vacunas*).

Las vacunas para la FA tradicionales 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. Véase el Capítulo 1.1.8. para vacunas derivadas de la ingeniería genética, como las vacunas recombinantes o basadas en péptidos.

Los bancos de antígenos se pueden definir como un acopio de componentes antigénicos, registrados o con licencia según la vacuna acabada, y que pueden conservarse a temperaturas ultra-bajas durante bastante tiempo para su posterior formulación en forma de vacuna del modo y en el momento necesarios.

Las vacunas se formulan según su fin específico, y, en el caso de las vacunas destinadas a ser aplicadas en el ganado bovino, pueden utilizarse tanto las vacunas adyuvantadas con hidróxido de aluminio y saponina como las que contienen adyuvantes oleosos. Para el ganado porcino, se prefieren las adyuvantadas con emulsiones oleosas dobles, debido a su eficacia.

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 contengan suficiente antígeno y adyuvante como para garantizar que alcanzan el nivel mínimo de potencia requerido (se recomiendan 3 DP₅₀ [dosis protectora del 50%]; 75% de EPP (porcentaje esperado de protección) o 12 animales protegidos de entre los 16 animales vacunados y expuestos, según la prueba PGP [protección contra la infección podal generalizada]) para cubrir la duración del periodo de validez que indica el fabricante. Este tipo de vacuna suele ser adecuada para su uso en campañas sistemáticas de vacunación. En el caso de la vacunación de poblaciones nunca antes expuestas al virus, para el control de los brotes de FA se recomiendan vacunas de mayor potencia (por ejemplo, de > 6 DP₅₀ durante todo el periodo de validez indicado por el fabricante), por tener un espectro de inmunidad más amplio y por su rápido inicio de la protección.

Debido a la existencia de varios serotipos del virus, es común la práctica de preparar vacunas con dos o más serotipos diferentes de virus. En algunas zonas puede ser aconsejable incluir más de una cepa vírica por serotipo para asegurar una cobertura antigénica amplia contra los virus predominantes.

1. Control del inóculo vírico

1.1. Características del inóculo vírico

En teoría, la selección de los virus iniciales de siembra (MSV) debe basarse en su facilidad de crecimiento en un cultivo celular, en el rendimiento del virus, en la estabilidad antigénica a nivel industrial y en que presenten un amplio espectro antigénico. Las cepas para la preparación del MSV se deben caracterizar y distribuir, preferiblemente, en los Laboratorios de Referencia de la OIE para la FA; deben seleccionarse de acuerdo con la importancia epidemiológica regional de cada cepa.

La fuente exacta del aislamiento debe ser registrada y debe incluir detalles tales como la ubicación, las especies y el tipo de material del que se derivó el virus. Se debe utilizar una nomenclatura única para identificar la cepa de FMDV. El historial de pases *in vitro* del virus y los detalles de los ingredientes deben registrarse de acuerdo con el Capítulo 1.1.8. El nivel de pases del inóculo vírico debe mantenerse al mínimo para evitar cambios antigénicos o genéticos.

1.2. Método de cultivo

Los métodos de cultivo deben cumplir los requisitos del Capítulo 1.18. Donde no existen cepas vacunales establecidas y adecuadas, se derivan nuevas cepas vacunales estableciendo los MSV que proceden de cepas locales naturales, adaptándolas para el crecimiento en suspensión o en monocapas, por pases seriados. Para eliminar el riesgo de cualquier virus contaminante que contenga lípidos en estas cepas naturales, se recomienda un tratamiento con un solvente orgánico validado antes de la adaptación, o durante ella.

1.3. Validación como cepa vacunal

Los MSV deben estar bien caracterizados tanto antigénica como genéticamente, y se debe demostrar que son puros y están libres de todos los agentes del Capítulo 1.1.9 *Pruebas de esterilidad y ausencia de contaminación en los materiales biológicos de uso veterinario* y los indicados por las autoridades competentes. Debe establecerse la homología con las cepas originales candidatas y debe demostrarse la eficacia contra las cepas circulantes de las que derivan. Esto implica la frecuente utilización de varios métodos, siendo las más fiables las pruebas de protección cruzada *in vivo*. Alternativamente, también se pueden utilizar pruebas *in vitro* (de preferencia, la de neutralización vírica), lo que requiere la disponibilidad de sueros post-vacunación contra esos inóculos primarios (véase el apartado D de este capítulo).

Los virus inóculo se pueden conservar a bajas temperaturas (por ejemplo, a -70°C) o liofilizados. 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.

También debe procurarse la minimización del riesgo de transmisión de los agentes de la encefalopatía espongiiforme transmisible (EET) garantizando que los materiales de riesgo de la EET no son utilizados como fuente del virus o en ninguno de los medios utilizados en la propagación del virus.

1.4. Procedimientos de urgencia para la aceptación provisional de nuevos MSV, y la posterior liberación de vacunas formuladas

En caso de que en una zona aparezca una nueva cepa frente a la cual no se haya generado protección con las cepas vacunales preexistentes, puede ser necesario desarrollar una nueva cepa vacunal a partir de una cepa natural representativa. Antes de que pueda aceptarse el nuevo MSV, debe comprobarse que se cumplen estrictamente las directrices pertinentes, para demostrar la ausencia de cada uno de los agentes extraños de la lista proporcionada por las autoridades competentes, utilizando pruebas tanto generales como específicas, y para establecer homología respecto a las cepas candidatas originales. Es posible que se tarde bastante en generar los antisueros específicos necesarios para neutralizar la nueva cepa que va a utilizarse en las pruebas generales para la detección de agentes extraños y para llevar a cabo otras pruebas específicas que requieren técnicas especializadas. Por tanto, en situaciones de emergencia en que no se disponga de tiempo suficiente para llevar a cabo un análisis completo del MSV, la aceptación provisional de la nueva cepa debe basarse en un análisis del riesgo de la posibilidad de contaminación del antígeno producido a partir del nuevo MSV con agentes extraños. Esta evaluación del riesgo debe tener en cuenta que el virus se inactiva utilizando una sustancia química inactivante con cinética de primer orden. El requisito de llevar a cabo un seguimiento de la cinética de inactivación y de registrarlo en cada lote de producción proporciona mayor seguridad.

2. Método de producción

El método de propagación del virus recomendado para la producción de antígeno es el crecimiento de VFA en grandes cantidades de cultivos en suspensión o en monocapas utilizando líneas celulares en condiciones de esterilidad.

El epitelio de la lengua de ganado bovino en condiciones de supervivencia en un medio con sales pero sin productos de origen biológico puede resultar aceptable para la producción de vacuna, pero solo si el método de producción cumple estrictamente con los requisitos estándar indicados en el capítulo 1.1.8. Asimismo, con el fin de eliminar el riesgo de presencia de virus con envoltura lipídica contaminantes, la suspensión de virus recogida debe someterse a un tratamiento con disolvente orgánico validado antes de la inactivación con BEI/EI. Se aplica un procedimiento validado para asegurar la inactivación de todos los agentes extraños posibles y cada lote se analiza por separado en un laboratorio oficial para comprobar que no contiene agentes extraños. Se llevan a cabo pruebas suficientes durante el proceso y en el producto final para garantizar la uniformidad y la inocuidad del producto final. También debe minimizarse el riesgo de transmisión de agentes causantes de encefalopatías espongiiformes transmisibles (es decir, EEB y EET) garantizando que el epitelio proceda de un origen seguro.

Se utiliza una cepa adecuada de virus para infectar una suspensión o monocapas de una línea celular establecida, como la BHK-21. Tales cultivos deben estar libres de microorganismos contaminantes.

Cuando se espera que el virus alcance su máxima producción, el cultivo se clarifica, a menudo con centrifugación y/o filtración. A continuación, se inactiva el virus añadiendo un inactivante de primer orden, normalmente etilénimina (EI), en forma de etilénimina binaria (BEI) (Bahnemann, 1990). Es importante respetar estrictamente las precauciones de seguridad necesarias para trabajar con BEI/EI. La BEI se añade a una suspensión de virus, para obtener una concentración final predeterminada. La inactivación debe validarse y documentarse para mostrar la cinética de inactivación y los resultados de los controles de inactivación. La duración del tratamiento con BEI y la temperatura utilizada para la inactivación deben validarse según las condiciones actuales y el equipo utilizado durante el tratamiento. Para disminuir la probabilidad de que en la segunda aplicación no entren en contacto virus vivos con el inactivante, por ejemplo la EI/BEI, es fundamental transferir inmediatamente el contenido de los recipientes a un segundo recipiente estéril, donde se deja que la inactivación continúe hasta que termine, según la cinética de inactivación validada y teniendo en cuenta posibles requisitos reguladores para tiempos de espera adicionales.

Durante la inactivación, se realiza un seguimiento del título vírico mediante una técnica sensible y reproducible. Tras la inactivación, toda EI/BEI residual en la recolección debe neutralizarse, por ejemplo añadiendo exceso de solución de tiosulfato de sodio a una concentración final del 2%.

El virus inactivado se concentra por ultrafiltración. El virus concentrado e inactivado puede purificarse aún más por procedimientos como la cromatografía. Estos antígenos concentrados y purificados se pueden formular creando vacunas, o conservarse a bajas temperaturas durante muchos años, y cuando se requiera, convertirlos en vacunas mediante dilución en un tampón adecuado y adición de adyuvantes (Doel y Pullen, 1990).

Normalmente, las vacunas convencionales contra la FA se presentan en forma acuosa o con adyuvante oleoso. Las vacunas con adyuvante oleoso se suelen formular en forma de emulsiones agua-en-aceite utilizando aceites minerales. El aceite mineral se premezcla, por lo general, con un agente emulsionante 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. Ahora existen a la venta adyuvantes oleosos listos para su uso para distintos tipos de emulsión.

La vacuna acuosa se prepara adsorbiendo el virus a gel de hidróxido de aluminio, uno de los adyuvantes que constituyen la mezcla de la vacuna final. La mezcla de la vacuna final puede incluir otros componentes, como antiespumante, hidrolizado de lactoalbúmina, caldo triptosa fosfato, aminoácidos, vitaminas, sales tampón y otras sustancias. Además de los conservantes, normalmente también se añade un adyuvante, como las saponinas.

Cuando se utilizan componentes novedosos, como adyuvantes o conservantes, 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 o conservantes que se pueden utilizar en especies de abasto.

3. Control interno

En general, los títulos de virus alcanzan niveles óptimos en un plazo de entre 18 y 24 horas tras la infección de los cultivos celulares, según el serotipo. El tiempo escogido para obtener el cultivo se puede basar en ciertas pruebas; por ejemplo, la muerte celular. La concentración de virus se puede determinar mediante pruebas de infectividad, gradiente de densidad de sacarosa o CsCl o técnicas serológicas. Es preferible utilizar más de un método, puesto que pueden complementarse.

3.1. Cinética de inactivación

Durante la inactivación del virus se deben tomar muestras a intervalos regulares de tiempo 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 VFA, por ejemplo, células BHK. 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.

3.2. Control de la inactivación

La prueba de inocuidad se realiza durante el proceso y debe llevarse a cabo en cada lote de antígeno. Las células que se utilizan para comprobar la ausencia de virus vivo residual deben someterse a una prueba de sensibilidad para comprobar si son adecuadas para la replicación del virus. Tras la inactivación, debe tomarse una muestra de cada lote de antígeno inactivado que represente al menos 200 dosis de antígeno vacunal y debe comprobarse la ausencia de virus infecciosos mediante inoculación de cultivos celulares de monocapas sensibles, preferiblemente del mismo origen que los utilizados para la producción de antígeno. Para ello, puede ser necesario concentrar el antígeno, en cuyo caso debe demostrarse que el material concentrado no interfiere con la sensibilidad ni la lectura de la prueba. Las capas celulares se examinan a diario durante un período de 2-3 días, tras el cual el medio agotado se transfiere a monocapas nuevas y las monocapas originales vuelven a llenarse con medio nuevo. Aplicando este procedimiento, pueden amplificarse los restos de virus vivo mediante pases y detectarse en base al ECP observado. Normalmente se utilizan dos a tres pases de la preparación vírica original. Una variante de este método es congelar y descongelar las monocapas antiguas para liberar el virus intracelular, que podrá detectarse en el pase posterior.

4. Pruebas en lotes de producto final

4.1. Prueba de inocuidad

El antígeno inactivado a granel y el producto final formulado deben someterse a pruebas de inocuidad para comprobar la ausencia de virus infeccioso. En el producto final, debe extraerse el antígeno separándolo del adyuvante siguiendo un método validado adecuado. Debe emplearse una muestra de al menos 200 dosis de vacuna (incluidas todas las presentaciones del producto) para comprobar la ausencia de virus infeccioso mediante inoculación de monocapas de cultivo celular sensible. Tras la elución, el antígeno puede concentrarse mediante inoculación en monocapas celulares. El procedimiento analítico es el mismo que el descrito en el apartado C.3.2 *Control de la inactivación*.

4.2. Prueba de esterilidad

El antígeno inactivado a granel, el concentrado de antígeno y el producto final formulado deben someterse a pruebas de esterilidad. Las normas relativas a las técnicas y medios de cultivo, que permiten la detección de una gran variedad de microorganismos, se describen en el Capítulo 1.1.9.

4.3. Prueba de identidad

El antígeno inactivado a granel, el concentrado de antígeno y el producto final formulado deben someterse a pruebas de identidad para comprobar que el producto contiene las cepas correspondientes. En la vacuna no debe hallarse ningún otro serotipo del virus de la FA registrado en el lugar de fabricación, lo cual debe garantizarse mediante pruebas adecuadas, como RT-PCR específicas de serotipo.

4.4. Prueba de pureza

La pureza es el nivel de NSP del VFA en el producto final, lo cual no incluye anticuerpos que puedan interferir con las pruebas serológicas que se utilicen para la serovigilancia de la circulación del virus en las poblaciones vacunadas. En los productos para los que se indique pureza de NSP, se debe demostrar su nivel de purificación. En el producto final, debe comprobarse la ausencia de reactividad (véase el apartado C.5. *Requisitos para el registro de vacunas*). En los casos en los que se haya comprobado la uniformidad de la purificación y se haya autorizado en el expediente de registro, y cuando se haya aprobado la uniformidad del proceso de producción según las normas establecidas en el Capítulo 1.1.8, la Autoridad Veterinaria puede aceptar la omisión de esta prueba en el producto final.

La confirmación de la pureza de la vacuna puede obtenerse analizando sueros de animales vacunados al menos dos veces con el lote en cuestión y comprobando que no presentan anticuerpos contra NSP.

4.5. Prueba de seguridad

La seguridad del producto final debe comprobarse lote por lote. Las pruebas de seguridad se llevan a cabo para detectar posibles reacciones adversas anómalas, locales o sistémicas. En los casos en los que se haya comprobado la uniformidad de la seguridad y se haya autorizado en el expediente de registro, y cuando se haya aprobado la uniformidad del proceso de producción según las normas establecidas en el Capítulo 1.1.8, la Autoridad Veterinaria puede aceptar la omisión de esta prueba en el producto final.

La seguridad se puede comprobar en animales que se utilicen para pruebas de potencia.

Se inocula a los animales, por la vía de administración recomendada, la dosis recomendada de vacuna. Cuando la potencia se evalúa mediante PGP o EPP, se comprueba en todos los animales si presentan reacciones locales o sistémicas a la vacunación durante los 30 días que dura la prueba de potencia. Cuando se usa la prueba de la DP₅₀, se comprueba, al menos en dos animales de la especie de destino sanos, seronegativos e inoculados según se ha descrito arriba, si presentan reacciones locales o sistémicas a la vacunación durante al menos 14 días. Debe examinarse toda reacción indebida atribuible a la vacuna, que podría impedir la aceptación del lote.

4.6. Prueba de potencia

La potencia se comprueba en el producto formulado final, o bien, en el caso de los bancos de antígenos, en un lote representativo de la vacuna preparado a partir del mismo antígeno inactivado a granel.

La prueba de potencia estándar es la prueba de desafío con vacunación. Sin embargo, en el caso de la liberación del lote también pueden utilizarse pruebas indirectas por cuestiones de practicidad y bienestar animal, siempre que se haya validado una correlación respecto a las expectativas de protección en la especie de destino. Las pruebas indirectas de potencia a menudo incluyen titulación de anticuerpos tras la vacunación de la especie de destino. También pueden utilizarse métodos alternativos si están adecuadamente validados.

Lo ideal es que las pruebas indirectas se lleven a cabo en cada cepa de una especie y en cada formulación de vacuna para establecer correlación entre los resultados de las pruebas indirectas y la eficacia de la vacuna.

4.6.1. Porcentaje esperado de protección (EPP) (Maradei *et al.*, 2008; Periolo *et al.*, 1993)

El EPP estima la probabilidad de que el ganado bovino quede protegido contra un desafío de 10.000 dosis infectivas bovinas tras una sola vacunación.

- i) Son necesarios sueros individuales obtenidos 30–60 días post-vacunación utilizando una dosis completa de la vacuna, extraídos de un grupo de 16 o 30 animales de ganado bovino de 18–24 meses de edad.
- ii) Este conjunto de sueros y sueros de reses control se analizar para comprobar los títulos de anticuerpos contra la cepa vacunal homóloga de la FA en un LPB-ELISA o prueba de VN (véanse los apartados B.2.1 *Prueba de la neutralización del virus* y B.2.3 *Enzoinmunoanálisis de bloqueo en fase líquida*).

- iii) Los antígenos utilizados en el ELISA pueden investigarse utilizando BEI.
- iv) El EPP se determina consultando tablas predeterminadas de correlación entre títulos serológicos y protección clínica² (Maradei *et al.*, 2008; Periolo *et al.*, 1993).
- v) Se considera que los lotes con un EEP de al menos el 75% (con 16 reses vacunadas) o al menos el 70% (con 30 reses vacunadas) presentan una potencia satisfactoria.

La presencia de más de un serotipo en una vacuna no disminuye la inducción de anticuerpos contra otro serotipo ni la correlación del título de anticuerpos con la protección.

4.6.2. Otros métodos para evaluar la protección

Se publicaron otras pruebas utilizando distintos ELISA y VN para evaluar indirectamente la protección conseguida con las vacunas. Sus resultados podrían aceptarse solo si se demuestra científicamente una correlación válida con la protección en relación a la cepa vacunal que se está analizando y el método serológico utilizado.

5. Requisitos para el registro de vacunas

5.1. Proceso de fabricación

Para el registro de las vacunas, todos los detalles relevantes relativos a la fabricación de la vacuna y a las pruebas de control de calidad (véanse los apartados C.1–4) deben enviarse a la Autoridad Veterinaria Nacional. Esta información debe extraerse de tres lotes consecutivos de vacuna con un volumen de no menos de 1/3 del volumen mínimo permitido de lote industrial en el país de origen.

5.2. Seguridad

Para obtener la aprobación reguladora, se debe realizar una prueba de toxicidad local y sistémica en un lote problema de vacuna por una vía de administración recomendada en una prueba *in-vivo* en al menos ocho animales de cada especie de destino. Se recomienda realizar pruebas de dosis doble (por ejemplo, dos inyecciones) y de dosis única repetida (pasados 14 días) utilizando vacunas formuladas para contener la máxima carga y número de antígenos permitidos. Los animales reciben un total de tres inyecciones. Se comprueba si los animales presentan reacciones locales o sistémicas a la vacunación durante no menos de 14 días tras cada inyección. Toda reacción indebida atribuible a la vacuna debe evaluarse y podría impedir la aceptación de la vacuna por parte de la Autoridad Veterinaria Nacional.

5.3. Eficacia

La eficacia de la vacuna se estima en animales vacunados de forma directa, evaluando su resistencia al desafío con un virus vivo o indirectamente mediante pruebas *in-vitro* empleando correlaciones conocidas. La incertidumbre de la medición con las pruebas debe tenerse en cuenta al interpretar su importancia (Goris *et al.*, 2008). La eficacia de la vacuna debe establecerse para cada cepa que se desee autorizar como cepa vacunal.

En ciertas circunstancias, los Laboratorios de Referencia de la OIE para la FA de la región y la Autoridad Veterinaria Nacional disponen de virus vivos de referencia de la FA correspondientes a las principales cepas víricas vacunales de la zona. Estos virus de referencia se conservan a temperaturas ultrabajas y se envían respetando estrictamente la normativa de envíos.

La reserva de virus de desafío que va a distribuirse en alícuotas se prepara a partir de lesiones, recolectadas de al menos dos terneros de más de 6 meses de edad que hayan sido reconocidos como libres de anticuerpos contra el VFA. Se administra tranquilización a estos animales, y a continuación se les inocular intradérmicamente en la lengua la suspensión en unos 20 puntos, a razón de 0,1 ml en cada uno. La lengua u otras partes del cuerpo vesiculadas y el líquido vesicular correspondiente se recolectan en el momento del pico de las lesiones, unos 2 días después.

El tejido recolectado se macera y se prepara una suspensión al 2%, se filtra por un filtro de 0,2 µm, se distribuye en alícuotas y se congela rápidamente en la fase gaseosa de nitrógeno líquido; esto constituye la reserva de virus de desafío. Los títulos infectivos de esta reserva se determinan tanto en cultivo celular (DICT₅₀) como en dos reses (BID₅₀). A dos terneros tranquilizados se les inyectan por vía intradérmica en la lengua diluciones decimales (de entre 1/10 y 1/10.000), empleando cuatro

2 El Laboratorio de Referencia de la OIE de Brazil puede proporcionar tablas previa petición.

puntos por dilución. Las titulaciones de los terneros se leen pasados 2 días. Los títulos suelen ser superiores a las 10^6 DICT₅₀ por 0,1 ml y superiores a las 10^5 BID₅₀ por 0,1 ml, calculados según el método de Spearman-Kärber. La dilución para emplear en la prueba de desafío en ganado bovino es de 10.000 DIB₅₀ en un volumen total de $2 \times 0,1$ ml, y se inyecta por vía intradérmica en la cara superior de la lengua tanto en la DP₅₀ como en la PGP.

5.3.1. Prueba de la DP₅₀

El número de dosis protectoras de una vacuna se estima a partir de la resistencia al virus infeccioso en caso de desafío en grupos de animales que han recibido distintas cantidades de la vacuna. Se debe utilizar ganado bovino 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 contra el VFA. Se deben vacunar, por la vía indicada por el fabricante, tres grupos de al menos, cinco animales. La vacuna se debe administrar a diferentes dosis por cada grupo, inyectando 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 por vía intradérmica el equivalente a un total de 10.000 BID₅₀ (dosis infectiva bovina al 50%) en dos zonas de la superficie superior de la lengua (0,1 ml por zona). Se observan los animales 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 DP₅₀ que contiene la vacuna. Existen varios métodos para calcular la DP₅₀, pero al interpretar las estimaciones de DP₅₀ basadas en este método en general se prefieren los procedimientos basados en el método de Kärber (1931). Para el ganado bovino, la vacuna debe contener al menos 3 DP₅₀ por dosis.

5.3.2. Prueba PGP (protección contra la infección podal generalizada)

En este método se vacuna con una dosis completa por la vía y con el volumen recomendados por el fabricante a un grupo de 16 animales seronegativos a la FA de 18-24 meses de edad, con las mismas características que las descritas para la DP₅₀. Estos animales, y un grupo control de dos animales no vacunados, se inocula 4 semanas o más después de la vacunación una suspensión de virus bovino muy virulento y apropiado a los tipos de virus presentes en la vacuna ensayada. La prueba de desafío se lleva a cabo inoculando por vía intradérmica el equivalente a total de 10.000 BID₅₀ en dos puntos de la cara superior de la lengua (0,1 ml por punto). Se observa a los animales durante 7-8 días. Los animales no protegidos presentan lesiones en las patas en un plazo máximo de 7 días tras la inoculación. Los animales control deben presentar lesiones al menos en tres patas; para el uso profiláctico sistemático, la vacuna debe proteger al menos a 12 de los 16 animales vacunados. Esta prueba no aporta una estimación de cuántas dosis protectoras hay en una dosis única de vacuna, pero la comparación entre pruebas indica que 12 animales protegidos de entre los 16 vacunados y expuestos es una cifra que se correlaciona con 3 DP₅₀ (Vianna Filho et al., 1993).

5.3.3. Estimación de la eficacia mediante pruebas indirectas

Cuando no se dispone de pruebas de desafío directo para realizar una estimación de la eficacia, la Autoridad Veterinaria Nacional puede optar por usar pruebas indirectas (como la VN o la LPB-ELISA), siempre que se conozca la correlación existente entre el nivel de anticuerpos y el nivel de protección contra el desafío con 10.000 DIE₅₀ (dosis infectivas en el 50% de embriones de pollo expuestos).

5.3.4. Eficacia en otras especies

Las pruebas de eficacia en otras especies, como las ovejas, las cabras, los cerdos o los búfalos, o son diferentes o todavía no están estandarizadas. Se considera que, en general, una prueba correcta en ganado bovino es una prueba suficiente de la calidad de una vacuna para garantizar su uso en otras especies. Cuando se produzca una vacuna para el uso principal en otras especies no bovinas, puede ser más adecuado realizar las pruebas de potencia de la vacuna en esa misma especie. Respecto a las ovejas, las cabras y el búfalo africano (*Syncerus caffer*) o asiático (*Bubalus bubalis*), debido a 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.

5.4. Pureza: prueba para los anticuerpos frente a las proteínas no estructurales

La circulación del virus en una población dada puede comprobarse determinando si presenta anticuerpos contra las NSP. Asimismo, el *Código Sanitario para los Animales Terrestres* de la OIE estipula que un criterio para volver a establecer un estado de ausencia de FA después de un brote, si se utilizan vacunas, es la ausencia, en animales vacunados, de anticuerpos contra NSP. De igual forma, los países que deseen ser reconocidos como libres de FA con 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 empleados para formular vacunas, que se utilicen en estas circunstancias deben estar purificados para reducir el contenido en NSP. Además de proporcionar una documentación de apoyo sobre los procesos que implica tal purificación, los fabricantes deben demostrar la ausencia de inmunogenicidad frente a las NSP como parte del procedimiento de obtención de una licencia para poder incluir esta reivindicación en la literatura. Cuando las pruebas de pureza incluyen el uso de dosis de vacuna completas, al menos deben revacunarse 8 reses a los 28-30 días de la primera vacunación, y deben realizarse pruebas de pureza 28-30 días después. Puede aceptarse un máximo de un animal reactivo 28-30 días tras la revacunación. Si resultan reactivos más de dos animales 28-30 días tras la revacunación, el lote debe rechazarse. Si resultan reactivos dos animales, los fabricantes tienen la opción de solicitar un nuevo análisis del lote. Un método analítico recomendado que se puede utilizar consiste en vacunar no menos de 8 terneros nunca antes expuestos al virus con una dosis completa de vacuna que contenga el número máximo de cepas y de cantidades de antígenos permitidas en la autorización. El ganado bovino debe vacunarse al menos dos veces a intervalos de entre 21 y 30 días y a continuación analizarse antes de cada revacunación y 30-60 días después de la última vacunación para comprobar si presenta anticuerpos contra las NSP, utilizando las pruebas descritas en el apartado B.2.4 *Pruebas de anticuerpos contra las proteínas no estructurales* del presente Capítulo. Los resultados negativos de estas pruebas con NSP pueden respaldar las afirmaciones de que la vacuna no induce anticuerpos contra las NSP aplicando el número de inyecciones probado. Este ganado bovino puede ser el mismo que el que se utilice para la prueba de inocuidad descrita en el apartado C.5.2 *Seguridad*.

5.5. Duración de la inmunidad

La duración de la inmunidad (DOI) de una vacuna contra la FA dependerá de la eficacia (formulación y carga antigénica). Como parte del procedimiento de autorización, debe exigirse al fabricante que demuestre la DOI de una vacuna dada por desafío o uso de una prueba alternativa validada, como la serología, utilizando la prueba y los animales descritos en el apartado C.5.3. *Eficacia* al final del periodo indicado de protección, en cumplimiento del apartado C.5.3 *Eficacia*. Deben llevarse a cabo estudios de la DOI en cada una de las especies en las que está indicada la vacuna, o bien el fabricante deberá indicar que la DOI de la especie en cuestión no se conoce. De igual forma, el fabricante debe demostrar la eficacia de la pauta recomendada de revacunación en línea con estas directrices, normalmente midiendo la magnitud y la cinética de la respuesta serológica observada.

5.6. Estabilidad

Como parte de los estudios de determinación del periodo de validez efectuados con vistas a la autorización, debe demostrarse la estabilidad de todas las vacunas, incluidas las de emulsión oleosa.

El periodo de validez de las vacunas convencionales contra la FA suele ser de 1-2 años a 2–8°C. Las vacunas nunca deben congelarse, y tampoco conservarse a temperaturas superiores a la indicada.

La estabilidad debe comprobarse empleando los métodos descritos en el apartado C.5.3 *Eficacia*, pero vacunando a los animales al final del periodo de validez del producto.

5.7. Precauciones (riesgos)

Las vacunas actuales contra la FA son inocuas y no presentan ningún riesgo tóxico para el operario que las administra. Los fabricantes deben indicar las advertencias suficientes de que debe buscarse ayuda médica en caso de auto-inyección de una vacuna.

6. Conservación y control de los concentrados de antígeno

En el Capítulo 1.1.10 se aportan las normas internacionales aplicables a los bancos de vacunas.

El proceso de conservación de los antígenos concentrados a temperatura muy baja para la formulación posterior de la vacuna de la FA, como se describe en el apartado C.2 es un procedimiento bien establecido de conservación de reservas de material inmunógeno listo para ser formulado en forma de vacunas en caso de necesidad. La conservación no solo proporciona una reserva estratégica para los casos de emergencia, sino que permite el acceso del fabricante a muchas variedades de antígeno que se pueden formular y entregar al cliente de forma rápida (Lombard y Fussel, 2007). Esta conservación 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. Es necesario recordar que los antígenos concentrados deben controlarse aplicando las normas indicadas en los apartados C.1–4.

6.1. Criterios de conservación

6.1.1. Instalaciones

Es importante que todos los aspectos relacionados con la conservación de concentrados de antígeno cumplan plenamente con los requisitos internacionalmente aceptados, como los indicados en el Capítulo 1.1.8. El alojamiento, las instalaciones y los procedimientos deben garantizar la seguridad del antígeno conservado e impedir que sea manipulado, contaminado o dañado.

6.1.2. Contención de los antígenos conservados

Se ha de tener en cuenta el número o los volúmenes de dosis conservadas, sobre todo en las reservas compartidas por Miembros de la OIE, y cada país tiene una apreciación distinta de la cantidad de dosis requerida en casos de emergencia. 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 analíticos o mezclar los lotes individuales, en el momento adecuado, para facilitar la formulación y/o la prueba.

Es importante el tipo de recipiente utilizado para el concentrado del antígeno. En condiciones de temperatura muy baja, es importante el uso de recipientes que no se vuelvan quebradizos ni frágiles, a un intervalo de temperaturas que permita la esterilización por calor y la conservación en refrigeración.

6.1.3. Etiquetado de los antígenos conservados

Los concentrados de antígeno no tienen que etiquetarse según los requisitos de vacuna final o terminada, y pueden etiquetarse como materiales utilizados “durante el proceso”.

En condiciones de temperatura ultra-baja, el etiquetado debe ser duradero. Por experiencia, el sistema de etiqueta sujeta al frasco con un alambre es la opción preferida, debiendo usarse una etiqueta metálica/plástica 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 una rotulación imborrable. Deben mantenerse cuidadosamente los registros de conservación y las posiciones de los contenedores.

6.1.4. Seguimiento de los concentrados de antígeno conservados

Es de vital importancia que los concentrados de antígeno se conserven en condiciones óptimas y se supervisen de forma rutinaria para tener la 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 y de la potencia aceptable del producto final.

Para realizar un seguimiento de los bancos de antígenos de la FA pueden utilizarse estudios de cuantificación del 146S, de serología de la vacunación o de desafío con vacunación. Es recomendable llevar a cabo estas pruebas en el momento de recibir las muestras (año 0) y cada 5 años a partir de ese momento.

Para apoyar estos requisitos de las 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/reservas pequeñas de antígeno de FA están tradicionalmente

formadas por un volumen que representa aproximadamente un miligramo de antígeno. Estas alícuotas deben conservarse al lado del antígeno a granel.

7. Liberación de emergencia de vacunas preparadas a partir de concentrados de antígeno

En situaciones de extrema urgencia y previa autorización por parte de la Autoridad Veterinaria Nacional, un lote de vacuna puede liberarse antes de terminar las pruebas y de determinar su potencia si se ha llevado a cabo una prueba de esterilidad en el antígeno inactivado a granel y todos los demás componentes de la vacuna, y si se han llevado a cabo la prueba de inocuidad y la determinación de la potencia en un lote representativo de la vacuna preparada a partir del mismo antígeno inactivado a granel. En este contexto, un lote no se considera representativo a no ser que se haya preparado no superior de antígeno o antígenos y con la misma formulación que el lote a liberar.

D. PRUEBAS DE DETERMINACIÓN DE LA CONCORDANCIA VACUNAL

1. Introducción

La selección de una cepa vacunal adecuada es un factor importante en el control de la FA y es necesaria para la aplicación de programas de vacunación en zonas afectadas por la FA, así como para establecer y mantener reservas de antígeno vacunal que puedan utilizarse en caso de nuevos brotes de FA. La decisión de cambiar o incluir nuevas cepas en las formulaciones vacunales es un proceso multifacético en el que deben tenerse en cuenta, entre otros aspectos, datos experimentales, epidemiológicos y de campo.

La vacunación contra un serotipo del VFA no proporciona una 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 de destino pertinentes y, a continuación, desafiarlas mediante la exposición a la cepa vírica contra la que se requiere la protección. Para eso se tendrá en cuenta la potencia y la reactividad cruzada.

No obstante, este enfoque requiere la utilización del VFA vivo y deben aplicarse procedimientos y prácticas de bioseguridad adecuados. Las instalaciones deben cumplir con un nivel de biocontención adecuado, que vendrá determinado por un análisis del riesgo según se establece 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.* Además de suponer una preocupación en cuanto a la seguridad, este procedimiento es lento y caro y requiere experiencia específica, de la que se dispone principalmente en los Laboratorios de Referencia de la OIE. Siempre que sea posible debe evitarse el uso de animales en esos estudios, empleando 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 una cepa natural. La caracterización genética y el perfil antigénico, junto con los datos epidemiológicos, también pueden revelar la emergencia de nuevas cepas para las que se requiera la concordancia vacunal y, a la inversa, pueden indicar que una cepa dada es similar a otra para la que ya se dispone de información sobre concordancia vacunal. Estas pruebas deben llevarse a cabo en laboratorios que trabajen según la norma especificada en los Capítulo 1.1.4 y Capítulo 1.1.5 *Gestión de calidad en los laboratorios de pruebas veterinarias*, preferiblemente Laboratorios de Referencia de la OIE para la FA.

El envío de las muestras debe realizarse según lo indicado en el Capítulo 1.1.3 *Transporte de material biológico*.

La potencia de la vacuna y las dosis de revacunación pueden contribuir al rango de cobertura antigénica proporcionado por una vacuna. Una vacuna de alta potencia que provoca una fuerte respuesta inmunitaria puede proporcionar protección frente a virus heterólogos. 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 (Pay, 1984).

2. Selección de virus naturales para determinar la concordancia vacunal

Para determinar la concordancia vacunal, de cualquier brote preferiblemente debe evaluarse más de una cepa representativa.

Deben escogerse virus en base a la información epidemiológica, por ejemplo realizando aislamientos en distintas fases de un brote, de distintas zonas geográficas, o de distintos hospedadores (Alonso *et al.*, 1987). Las pruebas de campo que sugieran falta de calidad de la vacuna, manifestada por una escasa protección aparente, constituyen un importante criterio para establecer si existe concordancia vacunal, pero también deben

examinarse a fondo otros posibles motivos de fracaso aparente de la vacuna (cobertura insuficiente, cadena de frío no respetada, revacunación insuficiente, falta de medidas de control complementarias, etc.).

El serotipo de la cepa natural suele determinarse mediante ELISA o CF utilizando reactivos serológicos específicos de tipo, aunque también pueden utilizarse métodos basados en MAbs o genotipificación. Si el número de virus supera la capacidad del laboratorio de llevar a cabo los métodos descritos en el apartado D.4 *Determinación de la concordancia vacunal*, debe realizarse una pre-selección de cepas.

Con el fin de minimizar el riesgo de no tomar una muestra importante, la pre-selección debe realizarse empleando todas las cepas recibidas por el laboratorio. El enfoque recomendado es emprender métodos serológicos validados de determinación del perfil antigénico utilizando ELISA con MAb o CF. La secuenciación del gen VP1 debe utilizarse para verificar la homogeneidad genética de la población de cepa vírica y su distancia genética respecto a las cepas vacunales disponibles.

La aparición de una nueva cepa vírica puede caracterizarse por una diseminación rápida y el surgimiento de muchos brotes, de tal forma que las cepas de tales epidemias constituyen una prioridad para las pruebas de concordancia vacunal. Además, las cepas prevalentes dentro de dichos brotes son las mejores candidatas a las pruebas de concordancia vacunal. Las cepas que presentan diferencias importantes respecto a las cepas vacunales pero que no son prevalentes en el brote deben seguirse de cerca mediante una vigilancia de campo activa.

3. Selección de las cepas vacunales en las que se realizarán pruebas de concordancia

El serotipo del virus, la región de origen y cualquier otra información sobre las características de la cepa natural y, según corresponda, la cepa vacunal utilizada en la zona de origen podrían dar pistas sobre las cepas vacunales que hay que escoger para las pruebas de concordancia vacunal. Los reactivos disponibles para la concordancia con cepas vacunales particulares pueden limitar el alcance de las posibles pruebas. Para evitar este problema, es esperable que los fabricantes de vacuna proporcionen, previa petición por parte del comprador de vacunas y de los Laboratorios de Referencia de la OIE, sueros post-vacunación producidos durante las pruebas de potencia realizadas en lotes de producto final. También se recomienda que los Laboratorios de Referencia de la OIE garanticen la disponibilidad de sueros post-vacunación de referencia producidos con cepas vacunales relevantes. Los métodos aplicados a las pruebas de concordancia vacunal tienen dos objetivos: el primero, orientar la elección de la cepa vacunal para que sea la efectiva en cada circunstancia de campo, ya se trate de una vacunación profiláctica de rutina o de un uso de emergencia, en cuyo caso los requisitos de concordancia no necesariamente serán los mismos; y el segundo, analizar sobre la marcha la idoneidad de las cepas vacunales conservadas en las reservas de antígeno estratégicas.

4. Pruebas de concordancia vacunal

La relación serológica entre una cepa natural y un virus vacunal (valor 'r') se puede establecer mediante VN, ELISA o CF. 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 la cepa natural para la que se busca la concordancia. La neutralización *in vitro* puede ser más relevante para la predicción de la protección *in vivo* que proporcionará la vacuna que otras medidas de interacción de los anticuerpos con el virus. Puede llevarse a cabo una VN con el método de titulación por doble entrada o bien otra distribución según la experiencia del laboratorio. El uso del ELISA dependerá de la disponibilidad de anticuerpos de captura y detectores adecuados para las cepas naturales, pero es más reproducible que la VN y puede realizarse con virus inactivado. La CF puede usarse como método de cribado para escoger cepas que posteriormente se analizarán con VN o ELISA. La reproducibilidad de los resultados de la VN puede mejorarse incorporando diluciones víricas múltiples a la prueba de tal forma que pueda determinarse con exactitud el título vírico mediante regresión logística.

Tanto en la VN como en el ELISA, los sueros post-vacunación deben derivar de al menos cinco reses que se hallen en los días 21 a 30 tras la vacunación primaria y/o en los días 21 a 30 tras la revacunación. Para cada suero, se establece el título del anticuerpo anti-cepa vacunal. Los sueros se utilizan de forma individual o en grupo, tras excluir los de baja respuesta Mattion *et al.*, 2009).

4.1. Relación entre la cepa natural y la cepa vacunal

La prueba estándar recomendada es la VN. También puede usarse el ELISA si se dispone de los reactivos adecuados o bien como prueba de cribado. La CF es adecuada como prueba de cribado para escoger las cepas que posteriormente se analizarán mediante VN o ELISA.

4.1.1. Concordancia vacunal según la prueba de la neutralización bidimensional (de doble entrada)

En esta prueba también se utiliza antisuero obtenido frente a una cepa vacunal. Se comparan los títulos de este suero frente a 100 DICT_{50%} de la cepa vacunal homóloga y la misma dosis de una cepa natural para estimar la cobertura inmunológica de la cepa vacunal en relación al virus natural. En esta prueba, cada 100 µl de mezcla de virus/suero contiene 100 DICT₅₀ del virus estudiado.

i) Procedimiento analítico

El procedimiento es similar al de la VN (véase el apartado B.2.1 *Prueba de la neutralización del virus*).

Otros reactivos biológicos son los siguientes: sueros bovinos monovalentes obtenidos 21-30 días post-vacunación (inactivados a 56°C durante 40–60 minutos), la cepa vacunal homóloga, y el virus problema, una cepa natural del mismo serotipo que la cepa vacunal.

- a) Las cepas naturales se pasan por cultivos celulares hasta que se produzca un ECP del 100% en 24 horas. El número de pases debe ser mínimo. Una vez adaptadas, se determina el título vírico (log₁₀ DICT₅₀/ml) mediante titulación a punto final.
- b) 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, transcurrido este tiempo se comprueba si presentan ECP.
- c) Los títulos de los anticuerpos del suero vacunal frente a la cepa vacunal y la cepa natural para cada dosis de virus utilizada se calculan por el método Spearman–Kärber. Entonces se puede estimar mediante una regresión el título del suero vacunal frente a 100 DICT₅₀ de cada virus. Después, la relación entre la cepa natural y la cepa vacunal se expresa como un valor "r":

$$r_1 = \frac{\text{inversa del título aritmético del suero de referencia contra el virus natural}}{\text{inversa del título aritmético del suero de referencia contra el virus vacunal}}$$

ii) Interpretación

Interpretación de los resultados de las pruebas de reactividad cruzada: En general, se acepta que en caso de neutralización los valores r₁ superiores a 0,3 indican que la cepa natural es bastante similar a la cepa vacunal y que es probable que el uso de una vacuna basada en esta cepa proporcione protección frente al desafío con la cepa natural. No obstante, la protección depende tanto de la reactividad cruzada de los anticuerpos generados por la vacuna como de la potencia de la respuesta inmunitaria. Y esta última está influida por la potencia de la vacuna y por el número de dosis administradas.

Para decidir si usar o no vacunas cuyos valores r₁ sean inferiores a 0,3, los factores a tener en cuenta son la disponibilidad de cepas vacunales con mejor concordancia, la potencia de la vacuna y la posibilidad de aumentar esta última para proporcionar respuestas heterólogas, así como la posibilidad de usar más dosis de revacunación y si el control de la enfermedad va a complementarse con otras medidas zoonosanitarias o bien dependerá exclusivamente de la vacunación. El efecto combinado de la potencia y de la concordancia puede estimarse a partir del título serológico del antisuero vacunal contra el virus natural, aunque para correlacionar con precisión este valor con la protección es necesaria una prueba de protección cruzada.

Como alternativa, podría adaptarse una cepa natural adecuada para convertirla en una nueva cepa vacunal.

Las pruebas siempre deben realizarse más de una vez. La confianza que se puede tener en los valores "r" como indicadores de diferencias entre cepas está relacionada con el número de veces que se haya repetido la prueba. En la práctica, se aconseja llevar a cabo un mínimo de tres repeticiones.

4.1.2. Concordancia vacunal según el porcentaje esperado de protección (EPP) determinada por la prueba de la neutralización bidimensional

La determinación de la concordancia vacunal a partir de la prueba EPP se lleva a cabo con mucha frecuencia en Sudamérica, donde se dispone de tablas de correlación para las cepas

vacunales que se utilizan en aquella región. En esta prueba se utiliza antisuero generado contra una cepa vacunal (primovacunación y revacunación). Se comparan los títulos de los sueros contra 100 DICT₅₀/100 µl de mezclas de sueros/virus de la cepa vacunal homóloga con los títulos de los sueros contra la misma dosis de una cepa natural, con el fin de estimar la cobertura inmunológica de la cepa vacunal respecto al virus natural.

i) Procedimiento analítico

Este procedimiento es similar al de la VN (véase el apartado B.2.1 *Neutralización del virus*).

Los reactivos biológicos adicionales son los siguientes: sueros bovinos monovalentes obtenidos 21-30 días post-vacunación, y/o 21-30 días post-revacunación (inactivados a 56°C durante 45–60 minutos); la cepa vacunal homóloga; y el virus problema, una cepa natural del mismo serotipo que la cepa vacunal. En las regiones en las que se usan vacunas polivalentes, es aconsejable utilizar conjuntos de sueros generados contra la vacuna que se acostumbre a utilizar en el programa de vacunación.

- a) Las cepas naturales se pasan por cultivos celulares hasta que se adapten para dar un ECP del 100% en 24 horas. Los pases deben ser los mínimos posibles. Una vez adaptadas, se determina el título vírico (log₁₀ DICT₅₀/ml) mediante titulación a punto final.
- b) Para cada virus problema y virus vacunal se lleva a cabo una titulación de anticuerpos contra una cantidad fija de virus (100 DICT₅₀ de virus/100 µl de mezcla de sueros/virus), junto con una titulación por retroceso del virus de trabajo. Las mezclas de sueros/virus y la titulación vírica por retroceso se incuban a 37 °C durante 60 minutos y después se inoculan en microplacas con monocapas celulares previamente formadas. Cada dilución sérica se inocula en cuatro pocillos y se usa un mínimo de seis sueros. Las microplacas se incuban a 37 °C durante 48 horas en una atmosfera de CO₂, después de cuyo periodo se comprueba el ECP.
- c) Se calculan los títulos de anticuerpos del suero vacunal contra la cepa vacunal y la cepa natural empleando el método de Spearman–Kärber. A continuación, se puede estimar el título del suero vacunal contra 100 DICT₅₀ de cada virus y expresarse por ml. Se determinan los valores de EPP individuales de cada título de neutralización empleando tablas de correlación predefinidas, y después se calcula la media del EPP de cada grupo de sueros (vacunados y revacunados). La cobertura inmunológica de la cepa vacunal se expresa en valores de EPP.

ii) Interpretación

Interpretación de los resultados: Para interpretar los resultados es necesario conocer la correlación entre los títulos *in vitro* y la protección ante el desafío *in vivo* con 10.000 DIE₅₀ de virus vacunal. Según la experiencia de PANAF-TOSA con programas de control y erradicación del VFA en Sudamérica, un valor medio de EPP del 75% en animales revacunados indica que es adecuado utilizar la cepa vacunal junto con medidas de campo apropiadas para controlar los brotes con la cepa natural en estudio (se pueden solicitar tablas de correlación para O1, A24 y C3 a PANAF-TOSA).

4.1.3. Concordancia vacunal según el ELISA

De forma similar, el ELISA de bloqueo en fase líquida descrito en el apartado B.2.3 se recomienda para determinar la concordancia vacunal a partir del valor r₁ o del EPP.

i) Procedimiento analítico

Este procedimiento es similar al descrito para el LPBE (véase el apartado B.2.3 *Enzimoanálisis de bloqueo en fase líquida*).

Los reactivos biológicos adicionales son los siguientes: sueros bovinos monovalentes obtenidos 21-30 días post-vacunación, y/o 21-30 días post-revacunación (inactivados a 56°C durante 45–60 minutos); la cepa vacunal homóloga; y el virus problema, una cepa natural del mismo serotipo que la cepa vacunal. En las regiones en las que se usan vacunas polivalentes, es aconsejable utilizar conjuntos de sueros generados contra la vacuna que se acostumbre a utilizar en el programa de vacunación.

) **Interpretación**

Interpretación de los resultados de r_1 : Se ha propuesto que en el caso del LPBE, los valores de r_1 superiores a 0,4 indican que la cepa natural es suficientemente similar a la cepa vacunal como para que el uso de una vacuna con esta cepa pueda conferir protección contra el desafío con la cepa natural. No obstante, la protección depende tanto de la reactividad cruzada de los anticuerpos generados por la vacuna como de la potencia de la respuesta inmunitaria. Esta última está influida por la potencia de la vacuna y por el número de dosis administradas. Para decidir si usar o no vacunas cuyos valores r_1 sean inferiores a 0,4, los factores a tener en cuenta son la disponibilidad de cepas vacunales con mejor concordancia, la potencia de la vacuna y la posibilidad de aumentar las respuestas heterólogas, así como la posibilidad de usar más dosis de revacunación y si el control de la enfermedad va a complementarse con otras medidas zoonosanitarias o bien dependerá exclusivamente de la vacunación.

Interpretación de los resultados de EPP: Para interpretar los resultados es necesario conocer la correlación entre los títulos *in vitro* y la protección ante el desafío *in vivo* con 10.000 DIE₅₀ de virus vacunal. Según la experiencia de PANAF-TOSA con programas de control y erradicación del VFA en Sudamérica, un valor medio de EPP del 75% en animales revacunados indica que es adecuado utilizar la cepa vacunal junto con medidas de campo apropiadas para controlar los brotes con la cepa natural en estudio (se pueden solicitar tablas de correlación para O1, A24 y C3 a PANAF-TOSA).

4.1.4. Concordancia vacunal según la CF

Es preferible realizar la prueba de la FC en un tubo. Esta prueba se puede usar como prueba de cribado para determinar qué animales serán posteriormente analizados mediante VN o ELISA. Esta prueba se realiza como se describe en el apartado B.1.2.4. Los reactivos biológicos adicionales son sueros hiperinmunes de cobaya contra cepas vacunales. El título de anticuerpos sérico se determina contra virus homólogo y cepas naturales. El valor r_1 se calcula como se ha descrito anteriormente:

$$r_1 = \frac{\text{título aritmético recíproco del suero de referencia contra el virus natural}}{\text{título aritmético recíproco del suero de referencia contra el virus vacunal}}$$

Interpretación de los resultados: En general, se acepta que los valores r_1 iguales a 0,25 o superiores indican que la cepa natural es suficientemente similar a la cepa vacunal. Debe aplicarse la VN o el ELISA a las cepas escogidas para confirmar el resultado obtenido con la CF.

4.2. Comprobación de la aptitud de una vacuna para su uso previsto

El valor "r" no debe utilizarse aisladamente para escoger la cepa vacunal más adecuada para su uso en condiciones de campo. Especialmente cuando este valor sugiere una concordancia insuficiente de una cierta cepa vacunal, la idoneidad de una vacuna basada en dicha cepa vacunal podría demostrarse mediante una prueba de desafío de protección cruzada heteróloga llevada a cabo como se describe en el apartado C.4.2 *Pruebas de identidad* en animales vacunados con una vacuna conocida y expuestos al virus natural (heterólogo). Se vacunan al menos siete reses sin anticuerpos contra la FA, con una dosis comercial de la vacuna actual a utilizar en la zona. Entre 28 y 30 días después, se revacunan todos estos animales con una segunda dosis comercial en las mismas condiciones y se vacuna un segundo grupo de al menos siete animales con la misma dosis vacunal y por la misma vía. Se exponen los dos grupos más dos animales control (no vacunados) 30 días después al equivalente de un total de 10.000 dosis bovinas infectivas al 50% de la nueva cepa natural debidamente tituladas. Los resultados son válidos si ambos animales control presentan lesiones podales en al menos tres patas. Los resultados finales se presentan en forma del número de animales protegidos (sin lesión podal) respecto al número total de animales por grupo, o en forma de porcentaje de protección, donde 100% es el número total de animales utilizados por grupo. Si los resultados del grupo de reses vacunadas una vez indican un nivel de protección inferior al 50%, y en el grupo de reses vacunadas dos veces una protección inferior al 75%, se recomienda pasar a una cepa vacunal más adecuada (Henderson, 1949).

Se puede utilizar el método del porcentaje esperado de protección (EPP) cuando se ha determinado la correlación de la cepa vacunal. El método del EPP ha demostrado ser útil en ciertas regiones del mundo cuando se ha aplicado teniendo en cuenta los datos epidemiológicos y se ha aplicado una vigilancia activa sobre el terreno. Este método mide la reactividad de un conjunto de antisueros post-vacunación empleando la VN o el ELISA y relaciona los títulos serológicos con la probabilidad de

protección, establecidos mediante tablas de correlación que asocian los títulos de anticuerpos a la protección contra un desafío con 10.000 D₅₀ de la cepa vacunal homóloga (Robiolo *et al.*, 2010).

BIBLIOGRAFÍA

- AHL R., HAAS B., LORENZ R.J. & WITTMANN G. (1990). Alternative potency test of FMD vaccines and results of comparative antibody assays in different cell systems and ELISA. Report of the European Commission for the Control of Foot-and-Mouth Disease (Session of the Research Group of the Standing Technical Committee) Lindholm, Denmark (AGA: EUFMD/RG/90); FAO, Rome, Italy, pp 51–60.
- 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.
- ALONSO A., GOMES M.D., RAMALHO A.K., ALLENDE R., BARAHONA H., SONDHAL M. & OSÓRIO F. (1993). Characterization of foot-and-mouth disease virus by monoclonal antibodies. *Viral Immunol.*, **6**, 219–228.
- AUGE 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.
- BAHNEMANN H.G. (1990). Inactivation of viral antigens for vaccine preparation with particular reference to the application of binary ethylenimine. *Vaccine*, **8**, 299–303.
- 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.
- 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.
- 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*, **24**, 6966–6979.
- BROCCHI E., DE SIMONE F., BUGNETTI M., GAMBA D. & CAPUCCI L. (1990). Application of a monoclonal antibody-based competition ELISA to the measurement of anti-FMDV antibodies in animal sera. Report of the European Commission for the Control of Foot-and-Mouth Disease (Session of the Research Group of the Standing Technical Committee) Lindholm, Denmark, Appendix 14; FAO, Rome, Italy.
- 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**, 1636–1642.
- CAMPOS R.M., MALIRAT V., NEITZERT E., GRAZIOLI S., BROCCHI E., SANCHEZ C., FALCZUK A.J., ORTIZ S., REBELLO M.A. & BERGMANN I.E. (2008). Development and characterization of a bovine serum evaluation panel as a standard for immunoassays based on detection of antibodies against foot-and-mouth disease viral non-capsid proteins. *J. Virol. Methods*, **151**, 15–23.
- CHENARD G., MIEDEMA K., MOONEN P., SCHRIJVER R.S. & DEKKER A. (2003). A solid-phase blocking ELISA for detection of type O foot-and-mouth disease virus antibodies suitable for mass serology. *J. Virol. Methods*, **107**, 89–98.
- COTTAM E.M., WADSWORTH J., SHAW A.E., ROWLANDS R.J., GOATLEY L., MAAN S., MAAN N.S., MERTENS P.P.C., EBERT K., LI Y., RYAN E.D., JULEFF N., FERRIS N.P., WILESMITH J.W., HAYDON D.T., KING D.P., PATON D.J. & KNOWLES N.J. (2008). Transmission pathways of foot-and-mouth disease virus in the United Kingdom in 2007. *PLoS Pathog.*, **4** (4), e1000050.

- 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.
- 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.
- 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.
- 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**, 657–684.
- FERRIS N.P., NORDENGRABH A., HUTCHINGS G.H., REID S.M., KING D.P., EBERT K., PATON D.J., KRISTERSSON T., BROCCHI E., GRAZIOLI S. & MERZA M. (2009). Development and laboratory validation of a lateral flow device for the detection of foot-and-mouth disease virus in clinical samples. *J. Virol. Methods*, **155**, 10–17.
- 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.
- 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.
- 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.
- GORIS N. & DE CLERCQ K. (2005a). 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**, 995–1004.
- GORIS N. & DE CLERCQ K. (2005b). 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**, 1005–1016.
- GORIS N., MARADEI E., D'ALOIA R., FONDEVILA N., MATTION N., PEREZ A., SMITSAART E., NAUWYNCK H.J., LA TORRE J., PALMA E. & DE CLERCQ K. (2008). Foot-and-mouth disease vaccine potency testing in cattle using homologous and heterologous challenge strains: precision of the “Protection against Podal Generalisation” test. *Vaccine*, **26**, 3432–3437.
- 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.
- 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.
- JULEFF N., WINDSOR M., REID E., SEAGO J., ZHANG Z., MONAGHAN P., MORRISON I.W. & CHARLESTON B. (2008). Foot-and-mouth disease virus persists in the light zone of germinal centres. *PLoS One*, **3** (10), e3434.
- KÄRBER G. (1931). Beitrag zur kollektiven behandlung pharmakologischer reihenversuche. *Archive für Experimentelle Pathologie Pharmakologie*, **162**, 480–483.
- 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.
- KNOWLES N.J. & SAMUEL A.R. (2003). Molecular epidemiology of foot-and-mouth disease virus. *Virus Res.*, **91**, 65–80.
- KNOWLES N.J., WADSWORTH J., BACHANEK-BANKOWSKA K. & KING D.P. (2016). VP1 sequencing protocol for foot and mouth disease virus molecular epidemiology. *Rev. sci. tech. Off. int. Epiz.*, **35**, 741–755.

- LARSKA M., WERNERY U., KINNE J., SCHUSTER R., ALEXANDERSEN G. & ALEXANDERSEN S. (2009). Differences in the susceptibility of dromedary and Bactrian camels to foot-and-mouth disease virus. *Epidemiol. Infect.*, **137**, 549–554.
- LOMBARD M. & FUESSEL A.E. (2007). Antigen and vaccine banks: technical requirements and the role of the European antigen bank in emergency foot and mouth disease vaccination. *Rev. sci. tech. Off.int. Epiz.*, **26**, 117–134.
- 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.
- 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.
- MARADEI E., LA TORRE J., ROBIOLO B., ESTEVES J., SEKI C., PEDEMONTE A., IGLESIAS M, D'ALOIA R. & MATTION N. (2008). Updating of the correlation between IpELISA titers and protection from virus challenge for the assessment of the potency of polyvalent aphtovirus vaccines in Argentina. *Vaccine*, **26**, 6577–6586.
- MATTION N., GORIS N., WILLEMS T., ROBIOLO B., MARADEI E., BEASCOECHEA C.P., PEREZ A., SMITSAART E., FONDEVILA N., PALMA E., DE CLERCQ K. & LA TORRE J. (2009). Some guidelines for determining foot-and-mouth disease vaccine strain matching by serology. *Vaccine*, **27**, 741–747.
- 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**, 1835–1840.
- MINISTRY OF AGRICULTURE, FISHERIES AND FOOD (1986). Foot-and-mouth disease. Ageing of lesions. Her Majesty's Stationery Office, London, UK.
- NEIZERT E., BECK E., AUGÉ DE MELLO P., GOMES I. & BERGMANN I.E. (1991). Expression of the aphtovirus 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.
- 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.
- PARIDA S., FLEMING L., GIBSON D., HAMBLIN P.A., GRAZIOLI S., BROCCHI E. & PATON D.J. (2007). Bovine serum panel for evaluating foot-and-mouth disease virus non-structural protein antibody tests. *J. Vet. Diagn. Invest.*, **19**, 539–544.
- PAY T.W.F (1984). Factors influencing the performance of foot-and-mouth disease vaccines under field conditions. In: Applied Virology, Kurstak E. ed., Academic Press Inc., New York, USA, 73–86.
- PERIOLO O., SEKI C., GRIGERA P., ROBIOLO B., FERNANDEZ G., MARADEI E., D'ALOIA R. & LA TORRE J.L. (1993). Large-scale use of liquid-phase blocking sandwich ELISA for the evaluation of protective immunity against aphtovirus in cattle vaccinated with oil adjuvanted vaccines in Argentina. *Vaccine*, **11**, 754–776.
- REID S.M., 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.
- REID S.M., 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.
- 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**, 129–139.
- 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.
- SHAW A.E., REID S.M., EBERT K., HUTCHINGS G.H., FERRIS N.P. & KING, D.P. (2007). Protocol: Implementation of a one-step real-time RT-PCR protocol for diagnosis of foot-and-mouth disease. *J. Virol. Methods*, **143**, 81–85.

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.

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.

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.

VANGRYSPERRE W. & DE CLERCQ K. (1996). Rapid and sensitive polymerase chain reaction based detection and typing of foot-and-mouth disease virus in clinical samples and cell culture isolates, combined with a simultaneous differentiation with other genomically and/or symptomatically related viruses. *Arch. Virol.*, **141**, 331–344.

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.

*

* *

NB: Existen Laboratorios de Referencia de la OIE para la Fiebre aftosa

(puede consultarse la lista actualizada en la Tabla de la Parte 4 de este *Manual Terrestre* o en la página web de la OIE, <http://www.oie.int/es/nuestra-experiencia-cientifica/laboratorios-de-referencia/lista-des-laboratorios/>)

Por favor, contacte con los Laboratorios de Referencia de la OIE para más información sobre las pruebas de diagnóstico, los reactivos y las vacunas para la Fiebre aftosa.

NB: ADOPTADO POR PRIMERA VEZ EN 1990; ÚLTIMAS ACTUALIZACIONES ADOPTADAS EN 2017.