

CAPÍTULO 3.1.19.

FIEBRE DEL VALLE DEL RIFT (INFECCIÓN POR EL VIRUS DE LA FIEBRE DEL VALLE DEL RIFT)

RESUMEN

Descripción e importancia de la enfermedad: La fiebre del Valle del Rift (FVR) es una zoonosis aguda o hiperaguda de los rumiantes domésticos. El virus está confinado al continente africano y algunas islas del océano Índico, incluidos Madagascar y la Península Arábiga. Se pueden consultar datos actuales sobre la distribución en la plataforma WAHIS¹. Esta enfermedad está causada por un único serotipo de un virus de la familia Bunyaviridae (género Phlebovirus), transmitido por mosquitos. Se presenta en condiciones climáticas que favorecen la reproducción de los mosquitos vectores y se caracteriza por abortos, mortalidad neonatal y lesiones hepáticas. La enfermedad es más grave en las ovejas, las cabras y el ganado bovino. Los animales adultos no gestantes, aunque son susceptibles a la infección, son más resistentes a los signos clínicos de la enfermedad. Existe una amplia variación en la susceptibilidad a la FVR entre los animales de distintas especies. Los camellos, inicialmente descritos como especie de susceptibilidad baja con infecciones subclínicas, actualmente se consideran una especie totalmente susceptible y que sufre muertes súbitas, mortalidad neonatal y tasas de abortos que pueden ser tan altas como las del ganado bovino.

Los humanos resultan sensibles al VFVR y resultan infectados principalmente por el contacto con material derivado de animales infectados (líquidos o tejidos corporales) o por las picaduras de mosquitos infectados. El VFVR también ha causado infecciones graves en personal de laboratorio y debe ser manipulado con medidas de bioseguridad y bioprotección estrictas, empleando equipo de protección personal adecuado.

Detección e identificación del agente: el VFVR representa un único serotipo de Phlebovirus y tiene las propiedades morfológicas y fisicoquímicas típicas de este género.

La identificación del VFVR puede lograrse mediante el aislamiento del virus, un enzoinmunoanálisis (ELISA) o la inmunohistoquímica. El ARN vírico se puede detectar mediante la reacción en cadena de la polimerasa.

El virus se puede aislar de plasma/suero/sangre durante la fase febril de la enfermedad, o de órganos (por ejemplo, tejido hepático, esplénico o encefálico) de los animales muertos o de los órganos de los fetos abortados. Los aislamientos primarios se hacen normalmente en cultivos celulares de varios tipos, tales como células de riñón de mono verde africano (células Vero) o células de riñón de hámster neonato (BHK).

Pruebas serológicas: La identificación de anticuerpos específicos se logra principalmente mediante un ELISA o la prueba de la neutralización del virus.

Requisitos para las vacunas: Pueden utilizarse vacunas vivas atenuadas o inactivadas en países donde la FVR es endémica o existe riesgo de que sea introducida. Estas vacunas preferiblemente deben prepararse a partir de cepas atenuadas del VFVR cultivadas en cultivos celulares.

En los países que están libres del virus de la FVR, las vacunas y las pruebas de diagnóstico preferiblemente deben limitarse a aquellas en las que se utiliza el virus inactivado. El trabajo con el virus vivo debe realizarse personal con formación y en instalaciones con biocontención siguiendo los procedimientos de bioseguridad apropiados.

1 <https://wahis.woah.org/#/home>

Existen dos Laboratorios de Referencia de la OMSA para la FVR².

A. INTRODUCCIÓN

La fiebre del Valle del Rift (FVR) es una enfermedad febril zoonótica, aguda o hiperaguda, transmitida por mosquitos y causada por un virus de la familia *Bunyaviridae*, género *Phlebovirus*. Normalmente se presenta en forma epizootica en áreas extensas de un país después de fuertes lluvias e inundaciones, y se caracteriza por las altas tasas de abortos y de mortalidad neonatal que causa, principalmente en las ovejas, las cabras, el ganado bovino y los camellos. La susceptibilidad a la FVR puede variar considerablemente en función de la especie y la raza. Algunos animales pueden presentar solo infecciones asintomáticas, mientras que otros sufren una sintomatología clínica grave con mortalidad y aborto. Los animales susceptibles no gestantes y de mayor edad a menudo no muestran los signos de la enfermedad.

Los signos de la enfermedad tienden a ser poco específicos, lo que hace difícil el reconocimiento de casos individuales durante las epidemias (Swanepoel y Coetzer, 1994). Sin embargo, es característica de la FVR que cause numerosos abortos y mortalidad entre animales de corta edad, así como signos clínicos de la enfermedad en los humanos, y en relación con las condiciones climáticas. La FVR tiene un período de incubación corto, de unas 12–36 horas en los corderos. Puede aparecer una fiebre bifásica de hasta 41°C, y la temperatura corporal permanece alta hasta poco antes de la muerte. Los animales afectados muestran abatimiento, intolerancia al movimiento o a la ingesta y pueden presentar inflamación de los ganglios linfáticos superficiales y signos de dolor abdominal. Los corderos raramente sobreviven más de 36 horas tras la aparición de los signos de la enfermedad. Los animales mayores de 2 semanas pueden morir con signos agudos o hiperagudos, o bien recuperarse o desarrollar una infección asintomática. Algunos animales pueden regurgitar la ingesta y presentar una diarrea hemorrágica o sanguinolenta de olor nauseabundo junto con una rinorrea mucopurulenta con restos de sangre. A veces se puede observar la presencia de ictericia, especialmente en los bóvidos. Además de estos signos, el ganado adulto puede presentar lagrimeo, salivación y problemas en la producción de leche. En las ovejas gestantes, la mortalidad y la frecuencia del aborto varían entre el 5% y casi el 100% según el brote y la manada. La tasa de mortalidad en el ganado vacuno es normalmente inferior al 10%. Los camellos se han visto afectados con frecuencia en las epidemias de la FVR del este de África, Egipto y, más recientemente, Mauritania. En camellos se han observado signos clínicos como muertes súbitas, abortos y algunas muertes post-natales. El diagnóstico diferencial incluye: lengua azul, enfermedad de Wesselsbron, enterotoxemia de la oveja, fiebre efímera, brucelosis, vibriosis, tricomonosis, enfermedad ovina de Nairobi, cowdriosis, aborto enzoótico ovino, plantas tóxicas, septicemias bacterianas, peste de los pequeños rumiantes, carbunco bacteriano y la enfermedad de Schmollenberg.

Las lesiones hepáticas de la FVR son muy similares en todas las especies, variando principalmente según la edad del individuo infectado (Swanepoel y Coetzer, 1994). Las lesiones más notables se presentan en los fetos abortados y en los corderos recién nacidos, y consisten en un incremento moderado o grande del tamaño del hígado, que se presenta blando y sin consistencia, con un color que varía del marrón amarillento al marrón rojizo y con manchas irregulares debidas a la congestión. En el parénquima, siempre se presentan numerosos focos necróticos de color blanco grisáceo, que pueden no ser fácilmente discernibles. En la oveja adulta, las lesiones son menos graves y aparecen focos necróticos de color rojizo o blanco grisáceo distribuidos por todo el parénquima. Por lo general, la pared de la vesícula biliar presenta hemorragias y edema. Las lesiones hepáticas en los corderos se acompañan casi siempre de numerosas hemorragias pequeñas en la mucosa del abomaso. El contenido del intestino delgado y del abomaso puede ser de color chocolate oscuro debido a la presencia de sangre digerida de forma parcial. En todos los animales, el bazo y los ganglios linfáticos periféricos pueden aumentar de tamaño, estar edematosos y presentar petequias.

Microscópicamente, la lesión más evidente de la FVR visualizada en el microscopio, tanto en los animales como en los humanos, es la necrosis hepática. En los fetos y neonatos del ganado vacuno y ovino, los focos necróticos consisten en agregados densos de restos celulares y nucleares, algo de fibrina y unas cuantas células inflamadas. Existe una importante necrosis lítica en la mayoría de los hepatocitos, que conduce a la desaparición la arquitectura normal del hígado. En casi el 50% de los hígados afectados, se encuentran cuerpos de inclusión intranuclear que son eosinófilos y ovales o bacilares. También se observa una mineralización de los hepatocitos necrosados. En los

2 [Laboratorios de Referencia - OMSA - Organización Mundial de Sanidad Animal \(woah.org\)](http://www.woah.org)

animales adultos, la necrosis hepática es menos difusa, y la ictericia es más frecuente en las ovejas que en los corderos (Swanepoel y Coetzer, 1994).

En los humanos, las infecciones por la FVR son normalmente asintomáticas o van asociadas a unos signos no letales similares a los de la gripe que varían de moderados a graves (Madani *et al.*, 2003). Una minoría de los pacientes puede desarrollar lesiones retinianas, encefalitis o una enfermedad hepática grave con hemorragias que, por lo general, es letal. En los humanos, el virus de la FVR (VFVR) ha causado una infección grave entre el personal de laboratorio. Ese personal debe trabajar bajo estrictas condiciones de bioseguridad y bioprotección, que exigirán el uso de equipos de protección personal correctos para protegerse contra toda posible infección. No obstante, no está autorizada ni se comercializa. Se ha utilizado a nivel experimental para proteger al personal veterinario y de laboratorio con riesgo alto de exposición a la FVR. Se puede obtener más información sobre la enfermedad y la vacunación en personas consultando los datos de la OMS³. El VFVR debe manipularse a un nivel de bioseguridad y de contención adecuado, que se determinará a partir de un análisis del riesgo biológico (véase el Capítulo 1.1.4. *Bioseguridad y bioprotección: norma para la gestión del riesgo biológico en el laboratorio veterinario y en las instalaciones de los animales*). Debe prestarse especial atención a las medidas de precaución al trabajar con animales infectados y al realizar los exámenes postmórtem.

El VFVR consiste en un solo serotipo de la familia *Bunyaviridae* (género *Phlebovirus*) y tiene las propiedades morfológicas y fisicoquímicas características de los bunyavirus. Es un virus con envoltura, esférico y de 80–120 nm de diámetro. Se proyectan espículas de glucoproteína a través de la envoltura lipídica bicapa. El virus se inactiva fácilmente mediante disolventes lipídicos y en condiciones ácidas, a pH por debajo de 6. El VFVR tiene un genoma de ARN trisegmentado, monocatenario y de polaridad negativa, formado por los siguientes segmentos: L (grande), M (mediano) y S (pequeño), cada uno de los cuales está contenido en una nucleocápsida dentro del virión. El segmento S tiene ambas polaridades, es decir, tiene una codificación bidireccional (Bird *et al.*, 2007).

No se ha demostrado ninguna diferencia antigénica significativa entre las cepas de VFVR y las cepas cultivadas en los laboratorios de muchos países, pero se han hallado diferencias relacionadas con la patogenicidad entre linajes genéticos del virus (Bird *et al.*, 2007b).

El VFVR es endémico en muchos países de África y puede afectar a varios países de la región al mismo tiempo o propagarse progresivamente a nivel geográfico a lo largo de unos pocos años. Además de los de África, se han observado grandes brotes en la Península Arábiga y en algunas islas del océano Índico. Estos signos en general, aunque no exclusivamente, siguen los ciclos periódicos de lluvias inusualmente fuertes, que pueden tener lugar a intervalos de varios años, o bien los ciclos de inundaciones de grandes zonas, que favorecen la proliferación de mosquitos.

Las lluvias facilitan la eclosión de los huevos del mosquito. Los mosquitos *Aedes* contraen el virus al alimentarse en animales infectados, y puede llegar a transmitirlo verticalmente, de tal modo que pueden nacer nuevas generaciones de mosquitos infectados a partir de sus huevos (Bergren *et al.*, 2021). Ello proporciona un posible mecanismo de mantenimiento del virus en la naturaleza, puesto que los huevos de estos mosquitos pueden sobrevivir durante periodos de hasta varios años en condiciones de sequedad. Una vez el ganado está infectado, gran variedad de especies de mosquitos pueden actuar como vectores para la transmisión del VFVR y pueden propagar la enfermedad.

En los períodos que transcurren entre las epizootias puede presentarse un nivel bajo de la FVR. Se debe sospechar de la existencia de la FVR cuando a inundaciones excepcionales y las subsiguientes poblaciones abundantes de mosquitos les siguen abortos junto con una enfermedad letal caracterizada por la necrosis y las hemorragias hepáticas, que afecta sobre todo a los corderos, los cabritos y los terneros neonatos, y que puede ser paralela a la aparición de una enfermedad semejante a la gripe en los trabajadores de las explotaciones y en el personal que manipula carne cruda. Los casos sospechosos se deben confirmar con una prueba de diagnóstico.

Cuando se sospeche de un brote de FVR, se deben aplicar las medidas preventivas adecuadas para proteger a los trabajadores contra la infección si van a manipularse animales o productos de animales que puedan estar infectados por el VFVR.

3 <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs207/en/>

B. TÉCNICAS DE DIAGNÓSTICO

La obtención de muestras y su transporte deben cumplir con lo establecido en el Capítulo 1.1.2 *Recogida, presentación y almacenamiento de muestras para el diagnóstico* y en el Capítulo 1.1.3 *Transporte de material biológico* de este Manual Terrestre.

Para que el diagnóstico sea el adecuado, siempre deben emplearse varias técnicas, dependiendo de los antecedentes, la finalidad de las pruebas en sí, el estadio de la supuesta infección y las muestras existentes. Para una interpretación definitiva, deben evaluarse cuidadosamente datos epidemiológicos, clínicos y de laboratorio.

Todos los métodos analíticos descritos a continuación deben estar validados en cada uno de los laboratorios que los utilice (véase el Capítulo 1.1.6 *Validación de las pruebas de diagnóstico de las enfermedades infecciosas de animales terrestres*). Es necesario contactar con los Laboratorios de Referencia de la OMSA para la FVR para solicitar apoyo técnico. En la Tabla 1 se proporciona un resumen orientativo general sobre el uso de métodos analíticos para el diagnóstico. En las descripciones de las pruebas, más adelante, se ofrecen aspectos más detallados.

Tabla 1. Métodos analíticos disponibles para el diagnóstico de la fiebre del Valle del Rift y su finalidad

Método	Finalidad					
	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 ^(a)	Determinar la prevalencia de la infección – vigilancia	Determinar el estado inmunitario en animales o poblaciones tras la vacunación
Detección e identificación del agente^(b)						
Aislamiento del virus en cultivo celular	–	–	–	+++	+	–
RT-PCR	–	++	–	+++	+	–
Detección del antígeno	–	++	+	++	+	–
Histopatología con inmunohistoquímica	–	–	–	++	–	–
Detección de la respuesta inmunitaria específica de agente patógeno						
ELISA	+++	++	+++	++	+++	+++
VN/PRNT	+++	+++	+++	++	++	+++

Clave: +++ = método recomendado para esta finalidad; ++ = método recomendado, pero tiene limitaciones;

+ = método adecuado en muy pocas situaciones; – = no adecuado para esta finalidad;

RT-PCR = reacción en cadena de la polimerasa con transcripción inversa;

ELISA = enzimoanálisis; VN = neutralización del virus; PRNT = prueba de neutralización por reducción de placas.

^(a)La confirmación de laboratorio de los casos clínicos debe requerir una combinación de al menos dos resultados positivos de dos métodos de diagnóstico diferentes: positivo para virus o ARN vírico y anticuerpos contra el virus, o positivo para IgM e IgG con demostración de títulos crecientes entre muestras de suero pareadas recogidas con un intervalo de 2-4 semanas.

Dependiendo de la fase de la enfermedad, se detectará el virus o los anticuerpos.

^(b)Se recomienda aplicar varios métodos de detección del agente patógeno a la misma muestra clínica.

1. Detección e identificación del agente

El VFVR se puede aislar del suero, aunque preferiblemente debe aislarse de plasma o sangre recogida con anticoagulante durante la fase febril de la enfermedad en animales vivos, o del hígado, del bazo o del encéfalo de

los animales muertos, o de los fetos abortados. Normalmente el aislamiento primario se realiza en cultivos celulares de varios tipos.

1.1. Obtención de muestras

Empleando un equipo de protección adecuado para asegurar la bioseguridad del personal, se extraen unos 5 ml de sangre con anticoagulante (preferiblemente ácido etilendiaminotetraacético [EDTA]) durante la fase febril de la enfermedad o bien alrededor de 1 cm³ de hígado, bazo, encéfalo o productos de un aborto o postmortem, y se envían a aislamiento vírico. Estas muestras deben mantenerse a 0-4°C durante el transporte. Si el transporte al laboratorio puede durar más de 24 horas, deberán congelarse y enviarse sobre hielo o un bloque de congelador. En el caso de las muestras de sangre, debe obtenerse plasma y congelarse para el transporte.

1.2. Aislamiento en cultivo celular

Para el cultivo del virus de la FVR pueden utilizarse varias líneas celulares en monocapa, entre las que se incluyen células de riñón de mono verde africano (Vero), de riñón de hámster neonato (BHK), y células de mosquito AP61 (Digoutte *et al.*, 1989). Se inoculan con una dilución a 1/10 de la muestra y se incuban a 37°C durante 1 hora (con las líneas celulares de mosquito, la incubación debe realizarse a 27°C durante 1 hora). Es aconsejable inocular también algunos cultivos con otra dilución a 1/100 del inóculo. Ello evita la producción de partículas defectuosas, lo cual tiene lugar al utilizar un inóculo vírico de título muy alto. El inóculo se retira y la monocapa se lava con solución salina tamponada con fosfato (PBS) o medio de cultivo. La solución de lavado se retira, se sustituye por medio de cultivo nuevo y células incubadas a la temperatura adecuada. Los cultivos se observan durante 5-6 días. Es preferible utilizar líneas celulares de mamífero porque en estas el VFVR siempre induce un efecto citopático (ECP), que se caracteriza por un ligero redondeamiento de las células seguido de la destrucción de la monocapa celular entera en un plazo de 12-48 horas. La confirmación del aislamiento del virus debe realizarse preferiblemente utilizando inmunotinción o reacción en cadena de la polimerasa con transcripción inversa (RT-PCR).

1.3. Reacción en cadena de la polimerasa con transcripción inversa

También se puede conseguir un diagnóstico rápido mediante la detección del ARN vírico (Sall *et al.*, 2001) utilizando una prueba RT-PCR convencional o en tiempo real validada (Drosten *et al.*, 2002; Sall *et al.*, 2001). Estas técnicas fueron muy útiles durante los brotes de FVR. También pueden utilizarse para detectar ARN del VFVR en muestras combinadas de mosquitos (LaBeaud *et al.*, 2011).

A continuación, se proponen protocolos para la RT-PCR convencional y en tiempo real. Para más información sobre los procedimientos específicos, consúltense los Laboratorios de Referencia de la OMSA.

1.3.1. RT-PCR basada en gel de agarosa

Este procedimiento se utiliza en algunos de los Laboratorios de Referencia de la OMSA. La RT-PCR consiste en los cuatro pasos sucesivos de (a) extracción de ARN molde de la muestra problema o control seguida de (b) RT del ARN extraído, (c) amplificación por PCR del producto de la RT y (d) detección de los productos de la PCR con electroforesis en gel de agarosa.

i) Procedimiento analítico

Se extrae ARN mediante un método químico o de partícula magnética apropiado según el procedimiento recomendado por el fabricante del kit comercial que suela utilizarse en el laboratorio. Cuando se ha finalizado, se mantienen las muestras del ARN extraído sobre hielo si el paso de la RT está a punto de realizarse. Si no es así, se conserva la muestra de ARN a -70°C. En el caso de la RT-PCR, se aplica el protocolo de la RT-PCR anidada de Sall *et al.* (2001) empleando dos pasos. Para el primer paso de la RT-PCR, se utilizan los cebadores NSca (5'-CCT-TAA-CCT-CTA-ATC-AAC-3') y NSng (5'-TA-TCA-TGG-ATT-ACT-TTC-C-3'). Se ofrecen datos sobre los volúmenes de reactivos y los tiempos de ciclado a modo orientativo, pero pueden tener que adaptarse en función de las recomendaciones de cada fabricante.

- a) Se prepara la mezcla para la PCR descrita a continuación para cada muestra. Se recomienda preparar la mezcla en cantidad suficiente para el número de muestras que se analizarán, más una muestra adicional.

Agua libre de nucleasa (15,5 µl); tampón para la RT-PCR 5× (10 µl); MgCl₂ 25 mM (1 µl); una mezcla de las dNTPs (cada una a una concentración de 10 mM) siguientes: dATP, dCTP, dGTP y dTTP (1 µl); cebador NSca 10 µM (2,5 µl); cebador NSng 10 µM (2,5 µl); mezcla enzimática de transcriptasa inversa/polimerasa Taq, 5 unidades/µl (0,25 µl).

- b) Se añaden 40 µl de la mezcla para la reacción de la PCR a un pocillo de una placa de PCR o a un tubo de microcentrifuga para cada muestra seguidos de 10 µl del ARN (preparado en el paso i) para obtener un volumen final de reacción de 50 µl.
- c) Se centrifuga la placa o los tubos durante 1 minuto en una centrifuga adecuada para mezclar el contenido de cada pocillo.
- d) Se coloca la placa en un termociclador para amplificación por PCR y se ejecuta el siguiente programa:

45°C durante 30 minutos: 1 ciclo;

95°C durante 2 minutos: 1 ciclo;

94°C durante 30 segundos, 44°C durante 30 segundos, 72°C durante 1 minuto: 40 ciclos;

72°C durante 5 minutos: 1 ciclo.

- e) Se mezcla una alícuota de 20 µl de cada producto de la PCR con 4 µl de tinción de carga y se carga en un gel de agarosa al 1,2% que contenga tinción altamente sensible para la visualización del amplicón en agarosa. También se carga una escala de ADN, que ayudará a estimar el tamaño del producto. Tras la electroforesis, el resultado positivo será la presencia de una banda de 810 pb (banda de 242 pb en el caso de la cepa Clone 13) correspondiente a la secuencia del VFVR en la región codificadora NSs del segmento S del genoma.

Para el paso de la RT-PCR anidada, se utilizan NS3a (5'-ATG-CTG-GGA-AGT-GAT-GAG-CG-3') y NS2g (5'-GAT-TTG-CAG-AGT-GGT-CGT-C-3').

- f) Se prepara la mezcla de la PCR descrita abajo para cada muestra. Se recomienda preparar la mezcla en cantidad suficiente para el número de muestras que se analizará más una muestra adicional.

Agua libre de nucleasa (36,5 µl); tampón para la reacción RT-PCR 10× (5 µl); MgCl₂ 25 mM (1,25 µl); una mezcla de las dNTP (cada una a una concentración de 10 mM) siguientes: dATP, dCTP, dGTP, dTTP (1 µl); cebador NS3a (5'-ATG-CTG-GGA-AGT-GAT-GAG-CG-3') 10 µM (2,5 µl); cebador NS2g (5'-GAT-TTG-CAG-AGT-GGT-CGT-C-3') 10 µM (2,5 µl); mezcla enzimática de transcriptasa inversa/polimerasa Taq 5 unidades/µl (0,25 µl).

- g) Se añaden 49 µl de la mezcla de reacción para la PCR a un pocillo de una placa de PCR o a un tubo de microcentrifuga para cada muestra seguidos de 1 µl del amplicón obtenido mediante la reacción RT-PCR con NSca y NSng para obtener un volumen final de reacción de 50 µl.

- h) Se centrifuga la placa o los tubos durante 1 minuto en una centrifuga adecuada para mezclar el contenido de los pocillos.

- i) Se coloca la placa en un termociclador para la amplificación por PCR y se ejecuta el siguiente programa:

95°C durante 2 minutos: 1 ciclo;

94°C durante 1 minuto, 55°C durante 1 minuto, 72°C durante 1 minuto: 25 ciclos;

72°C durante 5 minutos: 1 ciclo.

- j) Se mezcla una alícuota de 20 µl de cada producto de la PCR con 4 µl de tinción de carga y se carga en un gel de agarosa al 1,2% que contenga tinción altamente sensible para la visualización del ADN en agarosa. También se carga una escala de ADN, que ayudará a estimar el tamaño del amplicón. Tras la electroforesis, el resultado positivo será la presencia

de una banda de 668 pb (banda de 129 pb en el caso de la cepa Clon 13) correspondiente a la secuencia del VFVR en la región codificadora NSs del segmento S del genoma

1.3.2. RT-PCR en tiempo real

Para la RT-PCR en tiempo real pueden utilizarse los mismos procedimientos de extracción de ARN total de la muestra problema o control seguidos de la RT del ARN extraído, igual que en procedimiento convencional. El protocolo está adaptado de Drosten *et al.* (2002). Si se utilizan kits comerciales, deben seguirse las instrucciones del fabricante.

i) Procedimiento analítico

- a) Se prepara la mezcla para PCR descrita a continuación para cada muestra. De nuevo, se recomienda preparar la mezcla en cantidad suficiente para el número de muestras que se analizará más una muestra adicional

Agua libre de nucleasa (2,8 µl); mezcla madre para reacción RT-PCR 2× (10 µl); cebador directo para PCR en tiempo real **RVS**: 5'-AAA-GGA-ACA-ATG-GAC-TCT-GGT-CA-3' 10 µM (2 µl); cebador inverso para PCR en tiempo real **RVAs**: 5'-CAC-TTC-TTA-CTA-CCA-TGT-CCT-CCA-AT-3' 10 µM (2 µl); **RVP**: **FAM** 5'-AAA-GCT-TTG-ATA-TCT-CTC-AGT-GCC-CCA-A-3' **TAMRA** 20 µM (0,2 µl).

- b) Se añaden 17 µl de mezcla para la reacción PCR a un pocillo de una placa para PCR en tiempo real para cada muestra seguidos de 3 µl del ARN preparado para obtener un volumen final de reacción de 20 µl.
- c) Se centrifuga la placa durante 1 minuto en una centrífuga adecuada para mezclar el contenido de los pocillos.
- d) Se coloca la placa en una máquina de PCR en tiempo real para la amplificación por PCR y se ejecuta el siguiente programa:
- 45°C durante 30 minutos: 1 ciclo;
- 95°C durante 5 minutos: 1 ciclo;
- 95°C durante 5 segundos, 57°C durante 35 segundos: 45 ciclos.
- e) Interpretación de los resultados: se asigna un valor de ciclo umbral (Ct) a cada reacción de PCR según los gráficos de amplificación (señal de fluorescencia frente a número de ciclos); tal vez sean apropiados distintos valores de corte en función del tipo de muestra. Los valores de Ct empleados para clasificar las muestras como positivas o negativas al VFVR debe definirse en cada laboratorio utilizando material interno de referencia apropiado.

Existen otros métodos que tienen por diana los segmentos S y L (Bird *et al.*, 2007a; Wilson *et al.*, 2013).

1.4. Detección del antígeno

El antígeno VRVfV puede detectarse mediante ELISA (Madani *et al.*, 2003; Munyua *et al.*, 2010) o pruebas a pie de establo rápidas (dispositivo de flujo lateral: LFD) (Cetre-Sossah *et al.*, 2019).

El ensayo inmunológico (ELISA) de detección de antígeno es una prueba de inmunocaptura. Las muestras se analizan a distintas diluciones con controles positivos y negativos adecuados. Esta prueba se utilizó para muestras humanas y animales durante los brotes de Arabia Saudita y de Kenia (Madani *et al.*, 2003; Munyua *et al.*, 2010).

1.4.1. Procedimiento para el ELISA de detección de antígeno

Los controles y los antisueros que se utilizan en esta prueba deben haber sido tratados por el fabricante para inactivar toda posible partícula vírica viable del VFVR. Estos productos son seguros dentro de los límites de la capacidad de detectar partículas víricas replicantes viables. El material en el que se debe comprobar si hay antígeno vírico del VFVR puede estar contaminado por VFVR viable o por otros agentes para los cuales se intenta una detección diferencial. Las muestras deben analizarse aplicando una inactivación adecuada mediante detergente y calor (56°C durante 1 hora en presencia de Tween 20 al 0,5% [v/v]).

i) El principio se basa en una prueba de captura de tipo sándwich de anticuerpo doble, en la que el antígeno es capturado por un anticuerpo en una fase sólida que, a su vez, es detectado por un segundo anticuerpo. Se utiliza un tercer anticuerpo, junto con un sistema de detección en el que se utiliza peroxidasa de rábano (HRPO)–ABTS (2,2'-acino-di-(3-etil-benziazolina)-6-ácido sulfónico), para determinar qué proporción de segundo anticuerpo ha sido retenida en la fase sólida del sistema.

a) Anticuerpo de captura (de recubrimiento) (diluido a 1/2 000 en PBS [sin Tween], pH 7,4 que se mantiene toda la noche a 4°C; los pocillos control se recubren con una dilución similar de líquido normal)

Las placas se recubren con un anticuerpo antivírico específico (disponible en los Laboratorios de Referencia de la OMSA o de la OMS) capaz de capturar antígeno vírico de la muestra problema. En este caso, puede tratarse o bien un líquido ascítico de ratón hiperinmune (HMAF, por las siglas en inglés de *hyperimmune mouse ascitic fluid*) policlonal, o bien de anticuerpos monoclonales específicos contra el VFVR. Se añade suero normal a las filas que servirán de control empleadas para determinar el fondo o ruido inespecífico del sistema. Se incuba durante 1 hora a 37°C. Se enjuaga tres veces con PBS/Tween 20 al 0,1%.

b) Muestras sospechosas y antígeno control (diluidos a 1/4 y luego diluidos a 1/4 sucesivamente en la placa)

Las muestras sospechosas y el antígeno control se añaden a diluyente de suero para que los antígenos víricos específicos se unan al anticuerpo de captura. El diluyente del suero (PBS 0,01 M, pH 7,4, con o sin tiomersal) contiene leche desnatada al 5% y Tween 20 al 0,1% para reducir la unión inespecífica. Se incuba durante 1 hora a 37°C. Se enjuaga tres veces con PBS/Tween 20 al 0,1%.

c) Segundo anticuerpo específico contra el VFVR

Se añade suero con anticuerpo, de título alto para el antígeno vírico específico, para detectar el antígeno vírico unido. En esta prueba, se trata de un suero de conejo hiperinmune anti FVR (disponible en los Laboratorios de Referencia de la OMSA y de la OMS) que tiene un título alto contra el FVR. Se incuba durante 1 hora a 37°C. Se enjuaga tres veces con PBS/Tween 20 al 0,1%.

d) Suero de anticuerpos de detección anti- anticuerpos de FVR generados en conejo y conjugados a HRPO (producto comercial)

Se utiliza para detectar el anticuerpo de conejo anti-FVR que se une al antígeno. Se enjuaga seis veces con PBS/Tween 20 al 0,1%.

e) Se añade sustrato/cromógeno ABTS. Se incuba durante 30 minutos en la oscuridad a 22-25°C. La hidrólisis de ABTS por HRPO provoca la aparición de color verde en los pocillos negativos.

f) Se detiene la reacción añadiendo dodecilsulfato sódico (SDS) al 1% en agua destilada. Se lee la placa a 405 nm.

g) Criterios para determinar los positivos

Se ha proporcionado un antígeno control estándar que se analizará en una serie de diluciones estándar. Ello permite obtener una curva estándar que determinará los límites de detección de la prueba. Se analiza un conjunto de tejidos o muestras normales, no contaminados por el antígeno, para determinar el fondo de la prueba y el límite al cual el estándar es positivo. Los valores de estos controles normales se utilizan para calcular la media y la desviación estándar del fondo aleatorio esperable con las muestras negativas. Una muestra se considera positiva si su densidad óptica (DO) supera la media más 3 desviaciones estándar respecto a estos controles normales.

1.4.2. Pruebas a pie de establo rápidas (dispositivo de flujo lateral)

Existe un LFD comercial para el antígeno de la FVR disponible para su uso sobre el terreno. Ha sido producido y validado por Cetre-Sossah et al. (2019). Las tiras reactivas están diseñadas bajo el principio de la tecnología de flujo lateral de inmunocromatografía que emplea anticuerpos monoclonales (MAbs) marcados con oro coloidal. Se toman muestras de suero de animales sospechosos y el tampón suministrado se aplica a un extremo de una tira cromatográfica. La

muestra se mezcla con un MAb específico del VFVR de captura que reconoce cualquier antígeno del VFVR presente en la muestra sospechosa. El flujo del tampón se desplaza a lo largo de la tira cromatográfica. Si la muestra contiene algún antígeno del RVFV, el complejo MAb de captura/antígeno es capturado por el MAb de detección anti-RVFV, que está marcado con oro, formando una línea coloreada para indicar un resultado positivo. La prueba ha sido validada frente a cepas aisladas del RVFV de diferentes orígenes geográficos con una especificidad diagnóstica del 98,81% y una sensibilidad diagnóstica del 100% en pruebas de laboratorio. Como era de esperar, el límite de detección de este LFD, que es una prueba de interés para su uso sobre el terreno como método de diagnóstico de primera línea, ha resultado ser inferior al de la RT-PCR. La prueba dura 20 minutos y no requiere equipo adicional, pero debe realizarse con el equipo de protección adecuado para garantizar la bioseguridad del personal. Un diagnóstico de primera línea realizado mediante LFD debe confirmarse mediante pruebas confirmativas (por ejemplo, RT-PCR o aislamiento del virus).

1.5. Histopatología e inmunohistoquímica

El examen histopatológico del hígado, el bazo, el riñón o los pulmones de los animales afectados revelará una citopatología característica, y la tinción por inmunohistoquímica, especialmente del hígado o el bazo, permitirá una identificación específica del antígeno del VFVR en los tejidos (Odendaal *et al.*, 2018). Esta es una herramienta diagnóstica importante, porque el hígado y otros tejidos que se mantienen en formaldehído tamponado neutro en el campo se inactivan (dependiendo del grosor de la muestra y del tiempo de fijación) y no requieren una cadena de frío, lo cual facilita la manipulación y el transporte desde zonas alejadas.

2. Pruebas serológicas

Las muestras obtenidas de animales para las pruebas de anticuerpos pueden contener virus vivo, y deben aplicarse los pasos de inactivación correspondientes. Puede ser necesaria una combinación de inactivación térmica y química. Se siguen utilizando pruebas de inmunofluorescencia, aunque pueden producirse reacciones cruzadas entre el VFVR y otros flebovirus. Técnicas como la inmunodifusión en gel de agar (AGID), el radioinmunoanálisis, la inhibición de la hemaglutinación (HI) y la fijación del complemento ya no se utilizan.

Existen varias técnicas para detectar anticuerpos anti VFVR en gran variedad de especies animales. Actualmente, la más utilizada es el ELISA para detectar isotipos de IgM e IgG. También se han utilizado pruebas de neutralización del virus (VN), como la prueba de neutralización por reducción de placas (PRNT), para detectar anticuerpos neutralizantes contra el VFVR en el suero de gran variedad de especies. Las VN son las pruebas serológicas de diagnóstico más específicas, pero requieren el uso de virus vivo y, por lo tanto, no se recomiendan fuera de las zonas endémicas o de laboratorios con instalaciones de bioseguridad adecuadas y personal vacunado. No obstante, se están desarrollando y validando pruebas alternativas de neutralización que no requieren una manipulación de VFVR altamente virulento y no exigen una contención alta.

2.1. Enzimoimmunoanálisis

El ELISA es una prueba fiable y sensible para detectar anticuerpos contra el VFVR. Se dispone de ELISA de IgG y de IgM para la mayoría de las especies. El ELISA de captura de IgM permite el diagnóstico de infecciones recientes.

Existen varios ELISA disponibles en formatos comerciales, y otros que están en desarrollo (Cettre-Sossah *et al.*, 2009; Munyua *et al.*, 2010; Paweska *et al.*, 2005; Williams *et al.*, 2011). Se utilizan por rutina en muchos países para el diagnóstico de casos aislados, la gestión de brotes y los programas de vigilancia. A continuación, se describen ejemplos de ELISA de bloqueo, indirecto y de captura de anticuerpo:

2.1.1. ELISA de IgG de bloqueo

Esta prueba ELISA puede utilizarse en muestras de suero o de plasma, humano o de rumiantes (Paweska *et al.*, 2005). Es posible que cada laboratorio que realice la prueba deba optimizar las diluciones de reactivos indicadas en el procedimiento de la prueba que figura a continuación. La inactivación del RVFV es necesaria por motivos de seguridad. Para los tampones de enjuague, bloqueo y diluyente se utilizan, respectivamente, PBS y Tween 20 al 0,1%, leche desnatada en

polvo al 10% en PBS y leche desnatada en polvo al 2% en PBS. A menos que se indique lo contrario, los volúmenes utilizados son de 100 µl/pocillo, y todos los enjuagues se realizan tres veces durante 15 segundos utilizando 300 µl de tampón de enjuague por pocillo. Nota: Durante el paso ii), los sueros y el antígeno se mezclan en una placa separada o en tubos de dilución, no en la placa ELISA.

- i) Se recubren las placas con 100 µl de anticuerpo de captura policlonal generado en ovejas anti-RVF diluido a 1/500 en PBS y se incuban las placas tapadas a 4°C durante toda la noche. Se enjuagan las placas.
- ii) Se añaden 200 µl/pocillo de tampón de bloqueo y se incuban durante 1 hora en cámara húmeda a 37°C. Se enjuagan las placas. Durante la fase de bloqueo, se añaden 21 µl de cada suero problema y control sin diluir en pocillos de dilución que contengan 189 µl de virus o antígeno control pre-diluido a 1/10. (NOTA: Estos volúmenes son para el análisis de muestras por duplicado - para el ensayo de muestras individuales, se ajustan los volúmenes en consecuencia). Para el conjugado control, se usa tampón diluyente sin aditivos.
- iii) Se añaden 100 µl de suero problema y control/mezcla de antígeno vírico a las filas A-D 1-12 y 100 µl de suero problema y control /mezcla de antígeno control a las filas E-H 1-12 y se incuban durante 1 hora en cámara húmeda a 37°C. Se enjuagan las placas.
- iv) Se añaden 100 µl/pocillo de anticuerpo anti rN vírico generado en conejo y diluido a 1/2000 en tampón diluyente y se incuban durante 1 hora en cámara húmeda a 37°C. Se enjuagan las placas.
- v) Se añaden 100 µl/pocillo de anticuerpo anti-IgG generado en conejo y conjugado a HRPO diluido a 1/6000 en tampón diluyente y se incuban durante 1 hora en cámara húmeda a 37°C. Se enjuagan las placas seis veces.
- vi) Se añaden 100 µl/pocillo de sustrato de peroxidasa ABTS. Se dejan las placas durante 30 minutos a temperatura ambiente (22–25°C) en la oscuridad. Se añaden 100 µl/pocillo de solución de parada SDS concentrada 1x y se lee la densidad óptica a 405 nm.
- vii) Se calcula la actividad específica de cada suero (DO neta) restando la DO de fondo inespecífica en los pocillos con antígeno control de la DO específica en los pocillos con antígeno del virus. Los resultados se expresan como porcentaje de inhibición (PI); las lecturas medias de DO de las pruebas repetidas se convierten en valores de PI mediante la ecuación: $[100 - (DO \text{ neta media de la muestra problema} / DO \text{ neta media del control negativo}) \times 100]$.

Los ELISA indirectos de captura de IgG (Paweska *et al.*, 2003) y de IgM (Williams *et al.*, 2011) mencionados abajo se utilizan en suero y plasma de rumiantes. Ambas pruebas emplean leche desnatada al 10%/Tris salino con Tween (NFM/TST) como tampón de bloqueo y dilución, y tampón TST (Tris 50 mM; NaCl 150 mM; Tween 20 al 0,1%) como tampón de lavado (pH 8,0). Las reacciones se detienen con H₂SO₄ 2 N.

La nucleoproteína recombinante (rN) del VFVR se produce y purifica como describen Williams *et al.* (2011). La conjugación de la proteína a HRPO se lleva a cabo siguiendo el protocolo de Nakane y Akira Kawaoi (1974). El antígeno rN es estable durante un máximo de 1 año a 4°C.

Para preparar las placas para su uso inmediato, se lleva a cabo una titulación en tablero de ajedrez del anticuerpo de captura o del antígeno contra el conjugado en una placa de ELISA de 96 pocillos para determinar la concentración mínima de reactivo que daría un valor de DO de 0,5–0,6 al leerla a 650 nm tras un periodo de incubación de 20 minutos. Ello determinará cómo deben diluirse el anticuerpo/antígeno y el conjugado para recubrir las placas y detectar la unión de antígeno/anticuerpo en la prueba.

2.1.2. ELISA de captura de IgM

- i) Se recubren todos los pocillos de las placas de ELISA de 96 pocillos con 100 µl del anticuerpo de captura (anticuerpo de afinidad purificado generado en conejo anti-IgM de oveja) diluido a 1 µg/ml en PBS (que es una dilución a 1/1 000 si así se ha determinado en la titulación), y se incuban durante toda la noche a temperatura ambiente en una cámara húmeda.

- ii) Se lavan las placas tres veces con el tampón de lavado.
- iii) Se bloquean las placas con 300 µl de tampón de bloqueo y se incuban 1 hora a 37°C.
- iv) Se lavan las placas de nuevo tres veces con tampón de lavado.
- v) Se diluyen tanto el suero control (positivo y negativo) como el problema a 1/100 en tampón de bloqueo y se añade cada suero a un pocillo designado a volúmenes de 100 µl/pocillo.
- vi) Se incuban las placas 1 hora a 37°C. Se evita el secado colocando las placas en una cámara húmeda.
- vii) Tras el paso de incubación, se lavan las placas de ELISA con tampón de lavado tres veces.
- viii) Se diluye el conjugado rN-HRP a 1/6 000 y se añaden 100 µl de esta dilución a cada pocillo. Se utiliza tampón de bloqueo como control del conjugado.
- ix) Las placas se incuban 60 minutos a 37°C.
- x) Las placas se lavan, como en el paso b. A continuación, se transfiere tetrametilbencidina (TMB) lista para ser utilizada a volúmenes de 100 µl a cada pocillo, y las placas se dejan reposar a temperatura ambiente durante 15-30 minutos, hasta que aparezca un cambio de color a azul o valores de DO de 0,5 cuando las placas se lean a 605 nm. Debe evitarse la exposición a la luz directa.
- xi) Se detiene la reacción con 100 µl de solución de parada (ácido sulfúrico 0,16 M), y se leen los valores de DO empleando un lector de placa de ELISA a 450 nm.
- xii) Interpretación de los resultados: los resultados se expresan como porcentaje respecto al suero control positivo (PP) empleando la siguiente fórmula:

$$(\text{DO media del suero problema duplicado})/(\text{DO media del suero positivo}) \times 100$$

donde los valores de corte que determinarán el positivo y el negativo se determinan mediante un análisis de la curva de la característica operativa del receptor (ROC).

Es importante destacar que el valor de corte de un ELISA puede ajustarse en función de la población de destino, así como del propósito de la prueba.

2.1.3. ELISA indirecto de IgG

- i) Se recubren los pocillos de una placa de ELISA de 96 pocillos con 100 µl de rN diluido en tampón carbonato 50 mM (pH 9,6) empleando el porcentaje de dilución determinado por una titulación previa, como se explica arriba; se incuban toda la noche a temperatura ambiente en una cámara húmeda.
- ii) Se lavan las placas tres veces con unos 300 µl de tampón de lavado por pocillo.
- iii) Se bloquean las placas con unos 300 µl de tampón de bloqueo y se incuban 1 hora a 37°C.
- iv) Se lavan las placas de nuevo tres veces con unos 300 µl de tampón de lavado por pocillo.
- v) Se diluyen los sueros control (positivo y negativo) y problema a 1/100 en tampón de bloqueo.
- vi) Se añade 100 µl de los sueros diluidos a los pocillos designados, por duplicado.
- vii) Se incuban las placas 1 hora a 37°C. Se evita el secado colocando las placas en una cámara húmeda.
- viii) Tras el paso de la incubación, se lavan las placas de ELISA con tampón de lavado tres veces.
- ix) Se diluye el conjugado G-HRP a 1/32 000 en tampón de bloqueo y se añaden 100 µl del conjugado a cada pocillo.
- x) Se incuban 60 minutos a 37°C.
- xi) Las placas se lavan, como en el paso b. A continuación, se transfiere sustrato TMB lista para ser utilizada a cada pocillo, y las placas se dejan reposar a temperatura ambiente durante unos minutos, evitando la exposición a la luz directa. Las placas se leen a 605 nm para determinar si se ha alcanzado una DO de 0,4-0,6.

- xii) Se detiene la reacción con 100 µl de solución de parada (ácido sulfúrico 0,16 M), y se leen las placas empleando un lector de placa de ELISA a 450 nm.
- xiii) Interpretación de los resultados: los resultados se expresan como porcentaje respecto al suero control positivo (PP) empleando la siguiente fórmula:

$$(\text{DO media del suero problema duplicado})/(\text{DO media del control positivo}) \times 100$$

donde los valores de corte que determinarán el positivo y el negativo se determinan mediante un análisis de la curva de la característica operativa del receptor (ROC).

Es importante destacar que el valor de corte de un ELISA puede ajustarse en función de la población de destino, así como del propósito de la prueba.

2.2. Prueba de neutralización por reducción de placas

La prueba de neutralización por reducción de placas (PRNT) se puede utilizar para determinar la presencia de anticuerpos neutralizantes en animales infectados por vía natural y en animales vacunados. Debe ejecutarse en instalaciones de alta biocontención y por parte de personal formado. La prueba es muy específica y se puede utilizar para analizar sueros de cualquier especie. Normalmente se utiliza para medir la eficacia de la vacuna. La cepa Smithburn del VFVR altamente atenuada neurotrópica para encéfalo de ratón (Smithburn, 1949) o cualquier otra, preferiblemente atenuada, se utiliza como virus de desafío. El virus se conserva a -80°C o bien a 4°C en forma liofilizada.

La PRNT₈₀ (es decir, la prueba de reducción del 80%) que se lleva a cabo en un sistema de cultivo celular en general se acepta como prueba estándar para la determinación cuantitativa de la actividad de anticuerpos neutralizantes en muestras de suero. La PRNT se puede ejecutar en placas de plástico de 6, 12, 24 o 96 pocillos. En la siguiente técnica se describe con 12 pocillos y cuatro diluciones de sueros problemas a 1/4.

2.2.1. Procedimiento analítico

- i) Se diluyen los sueros problema a 1/10 en medios de cultivo celular y se inactivan durante 30 minutos en un baño de agua a 56°C (0,500 ml [0,050 ml de suero + 0,450 ml de medio de cultivo celular]).
- ii) Se llevan a cabo cinco diluciones seriadas a ¼ en tubos (por ejemplo, {0,1 ml de Suero diluido + 0,3 ml de medio de cultivo celular) empezando con 1:40 y terminando con 1:10240 en medios de cultivo. Se añaden sueros control que se sepa que son positivos y negativos.
- iii) Se prepara una suspensión del virus, calculada para generar alrededor de 100 unidades formadoras de placa por 0,1 ml. Se añaden 0,4 ml de la suspensión vírica a todos los tubos de dilución de suero y a los tubos control positivo y negativo. Los tubos se tapan y conservan en refrigeración durante una noche a 4°C.
- iv) Se marca una placa de plástico de 12 pocillos que contenga monocapas celulares con el número de identificación de cada muestra problema correspondiente a la hoja de trabajo: titulación vírica por retroceso, y pocillos duplicados para las diluciones a 10, 40, 160, 640, 2560 y 10240. Las placas se ponen en una incubadora (37°C y 5% de CO₂) hasta la inoculación.
- v) Llegado el momento, los medios de cultivo se desechan. Empezando por la dilución máxima de la mezcla de suero-virus (1:10240), se inoculan 0,1 ml (100 µl) a los dos pocillos marcados con 1:10240 que contengan monocapas celulares confluentes. Se siguen inoculando pocillos hasta la dilución 1:10 incluida. Se dejan absorber las placas inoculadas durante al menos 1 hora a 37°C en una atmósfera humidificada con un 5% de CO₂. Las placas se balancean cada 15 minutos.
- vi) En primer lugar se recubren los medios con nutriente-agarosa. Se recubren las células inoculadas con 1,5 ml de nutriente-agarosa (volumen equivalente de mezcla de medio esencial de Eagle (EBME) 2x y agarosa al 2% derretida) y se dejan reposar a temperatura ambiente. Las placas se invierten cuando la agarosa se haya solidificado y se ponen en una incubadora a 37°C con un 5% de CO₂.

- vii) Veinticuatro horas antes del recuento de las placas, se recubren de nuevo todos los pocillos problema (0,75 ml) con tinción roja neutra. Se deja que este recubrimiento solidifique durante 15 minutos a temperatura ambiente (evitando que les toque la luz). Las placas se invierten y se ponen en una incubadora a 37°C con un 5% de CO₂.
- viii) Unas 24 horas después del Segundo recubrimiento, se cuentan todas las placas correspondientes a los controles del virus, los paneles y los controles positivos y negativos. El título se expresa como la dilución máxima de suero que causa una reducción del 80% en comparación con el recuento control del virus.

El título del control positivo dependerá del formato de dilución que se utilice en cada prueba. Si los sueros se han diluido a 1/4, el título del control positivo debe ser como máximo cuatro veces y como mínimo una cuarta parte (+ o -) del título control positivo determinado previamente. El título que se considerará positivo para anticuerpos contra el VFVR dependerá del propósito de la prueba. Si el propósito es medir la inmunogenicidad de una vacuna, servirá un umbral de 1/80 o 1/100. Si se trata de comprobar la circulación del VFVR en una población, un título de 1/10 o 1/20 en un animal puede considerarse un resultado positivo.

2.3. Neutralización del virus

La prueba de neutralización del virus (VN) puede utilizarse para determinar la presencia de anticuerpos neutralizantes en animales naturalmente infectados y vacunados. Debe realizarse en instalaciones de bioseguridad de alta contención por personal formado. La prueba es muy específica y puede utilizarse para analizar suero de cualquier especie. Como virus de desafío puede utilizarse cualquier virus de la FVR caracterizado, preferiblemente atenuado. Lo ideal es almacenar el virus a -80°C o a 4°C en forma liofilizada. La VN se realiza en un sistema de cultivo celular y se acepta generalmente como uno de los sistemas de ensayo estándar para la determinación cuantitativa de anticuerpos neutralizantes en muestras de suero. La prueba se realiza normalmente en formato de microneutralización en placas de cultivo tisular de plástico de 96 pocillos. La técnica que se describe a continuación describe la prueba realizada utilizando diluciones dobles de sueros problema (Lubisi et al., 2019).

2.3.1. Protocolo analítico

- i) Se prepara una dilución a 1/5 de sueros problema en medio de cultivo tisular y se inactiva a 56 °C durante 30 minutos en un baño de agua, y dejar enfriar.
- ii) Se preparan ocho diluciones secuenciales a la mitad en medio de cultivo tisular, empezando por 1/10 y terminando por 1/1280. Se incluyen sueros control positivo y negativo de composición conocida. Se dispensan 50 µl de la dilución más alta (1/10) a la más baja (1/1280) de cada suero por la columna de una placa de 96 pocillos por duplicado.
- iii) Se prepara una suspensión de virus, calculada para producir aproximadamente 100–300 DICT₅₀ (dosis infectiva en el 50% de los cultivos tisulares expuestos) por ml. Se añaden volúmenes iguales de suspensión de virus (50 µl) a todos los pocillos que contengan diluciones de sueros problema, positivos y negativos. Se incuba la placa a 37°C durante 1 hora en una cámara húmeda con un 5% de CO₂.
- iv) Cuando estén listos, se desechan los medios de cultivo. Empezando por la dilución más alta de la mezcla de suero/virus (1/10240), se inoculan 0,1 ml (100 µl) en cada uno de los dos pocillos marcados con 1/10240 que contengan monocapas celulares confluentes. Se sigue con la inoculación de los pocillos hasta la dilución 1/10 incluida. Se deja que las placas inoculadas absorban durante al menos 1 hora a 37°C en una atmósfera humidificada con un 5% de CO₂. Se inclinan las placas cada 15 minutos.
- v) Se añaden 100 µl de células Vero o BHK a una concentración de 3–4 × 10⁵ células por ml y se incuban en las mismas condiciones que antes durante 3–5 días. Se incluye una titulación del virus que consista en el virus problema a la dilución de trabajo, y al menos una dilución por encima y por debajo, y controles celulares en la misma placa o en otra placa, dependiendo del número de muestras analizadas.
- vi) Se supervisa diariamente la placa con un microscopio invertido y, cuando el virus a la dilución de trabajo en los pocillos de valoración del virus muestre un efecto citopático (ECP)

del 80–100% y las monocapas estén intactas en los pocillos control celular, las placas estarán listas para su lectura.

Se registran todos los ECP observados en los pocillos que contengan sueros problema. Para confirmar los resultados, las placas pueden fijarse con formalina al 10% que contenga violeta cristal al 0,05%, y volver a visualizarse al microscopio.

Los títulos de anticuerpos séricos se toman como el recíproco de la dilución a la cual se observa la ausencia de ECP (0%) o la presencia de ECP muy escaso (~10%). Cada laboratorio determinará los títulos de corte para definir valores positivos y negativos en función del resultado de su validación interna de la prueba.

C. REQUISITOS PARA LAS VACUNAS

1. Antecedentes

Las vacunas contra la FVR actualmente disponibles son vacunas vivas atenuadas o bien vacunas inactivadas (Dungu *et al.*, 2018). Las autoridades reguladoras pueden aconsejar acerca de la disponibilidad en cada país.

Tabla 2. Resumen de las cepas de las vacunas actuales contra la FVR

	Vacunas con la cepa Smithburn viva atenuada	Vacuna con la cepa Clone-13 viva atenuada	Vacunas con la cepa MP-12 atenuada	Vacunas con virus inactivado
Origen de la cepa	Cepa de mosquito, Uganda, 1948	Cepa humana, 1974	Cepa humana egipcia ZH548, 1977	Cepas naturales (Sudáfrica y Egipto) utilizadas
Atenuación	Más de 200 pases en encéfalo murino	Delección natural en el gen NSs	Atenuación dirigida por mutágeno (23 mutaciones)	No es aplicable
Sustrato para la producción	Línea celular BHK	Línea celular Vero	Línea celular Vero E6	Línea celular BHK
Especie de destino	Ganado	Ganado	Ganado	Ganado
Estrategia DIVA	No	No	No	No

1.1. La vacuna viva atenuada Smithburn contra la FVR

El virus de esta vacuna deriva de la cepa neurotrópica original Smithburn. Esta cepa no es letal para el ratón adulto inoculado por vía intraperitoneal y es segura para su uso en todas las razas bovinas, ovinas y caprinas (Barnard, 1979; Smithburn, 1949). No obstante, puede causar anomalías fetales o abortos en hembras gestantes. La vacuna Smithburn contra la FVR se ha utilizado durante décadas para el control de la FVR en el este y el sur de África y en Oriente Medio, y sigue utilizándose en varias regiones endémicas.

1.2. La vacuna con la cepa Clone 13 contra la FVR

Clone 13 es una cepa atenuada de forma natural que se caracteriza por una gran delección del gen que codifica el principal factor de virulencia, el NSs (Dungu *et al.*, 2018). El riesgo de reversión se considera improbable. No se han observado abortos ni efectos secundarios en ensayos experimentales realizados con la vacuna (Dungu *et al.*, 2018; Hunter y Bouloy, 2001). Recientemente se ha introducido en Sudáfrica para ser utilizada en ovejas y ganado vacuno empleando una pauta de inyección única.

1.3. La vacuna con la cepa MP-12 contra la FVR

La cepa MP-12 del virus de la FVR deriva del aislamiento en placa de la cepa ZH548 del brote egipcio de 1977-1978. Su genoma codifica 23 mutaciones nucleotídicas (Ikegami *et al.*, 2015), es decir, cuatro mutaciones en el segmento S, nueve mutaciones en el segmento M y diez mutaciones en el segmento L.

Se han generado lotes de inóculo primario y de vacunas a partir de la cepa MP-12, y su inocuidad y eficacia se han evaluado en rumiantes (Morrill *et al.*, 1997), camélidos (Rissmann *et al.*, 2017) y primates no humanos (Morrill *et al.*, 2003; 2011a; 2011b). Aunque la cepa MP-12 es altamente inmunogénica en rumiantes, hay una falta de conocimiento sobre el mecanismo de atenuación de MP-12.

1.4. La vacuna inactivada contra la FVR

Las vacunas inactivadas con formalina que se producen actualmente derivan de una cepa natural del VFVR adapta a crecer en cultivo celular (Barnard, 1979). Estas vacunas actualmente se adyuvantan en hidróxido de aluminio. No obstante, las vacunas inactivadas contra la FVR precisan una segunda dosis 3-6 meses después de la inicial, seguida de revacunaciones anuales. La vacuna inactivada contra la FVR también se utiliza en situaciones de brote, y en animales gestantes, porque la vacuna Smithburn atenuada no es adecuada para este grupo de animales.

Se están desarrollando o evaluando muchas otras vacunas candidatas en especies de destino o bien se encuentran en las primeras fases del desarrollo.

Existen varias características del producto que serían deseables para que una vacuna contra la FVR sea efectiva y segura, y que deben tenerse en cuenta al definir el perfil del producto que se pretende desarrollar. Preferiblemente, los elementos del perfil de un producto en desarrollo destinado a ser una vacuna contra la FVR deben cumplir la recomendación 2 del informe de la reunión de la FAO de 2011 (FAO, 2011), que se indican más adelante.

El principal objetivo de una vacuna contra la FVR es prevenir epizootias y epidemias en especies de interés económico (especies pecuarias susceptibles [rumiantes] y, posiblemente, camélidos) y reducir el impacto en la sanidad animal y la salud pública. Además del posible impacto económico, podría tener también algunas implicaciones en los desplazamientos internacionales de animales. Es necesario distinguir entre los requisitos específicos para regiones endémicas y los aplicables a las regiones libres de la enfermedad.

1.5. Región endémica

El objetivo es la prevención y el control de epizootias y epidemias en zonas endémicas y contribuir a la mejora de la producción pecuaria en zonas endémicas. Por orden de prioridades, las características de las vacunas son las siguientes:

- i) preferiblemente una dosis, que dé lugar a una inmunidad duradera, de al menos 1 año;
- ii) preferiblemente una inmunidad de por vida tras un número bajo de dosis.

1.6. Región libre o no endémica

Las vacunas deben utilizarse para la prevención del virus o para responder a una introducción de este. Las características esperables de las vacunas son: que sean seguras con un inicio rápido de la inmunidad protectora y de la protección en animales de todas las edades y estados fisiológicos. Aunque el poder aplicar una estrategia DIVA (detección de infección en animales vacunados) es importante para cualquier futura vacuna, el exigir esta propiedad no debe impedir u obstaculizar el desarrollo ni la licencia de una vacuna efectiva contra la FVR.

En todos los casos, las vacunas deben:

- i) Ser seguras para el personal involucrado en la producción de las vacunas y para los usuarios, seguras en todos los estados fisiológicos de los animales, y conllevar un riesgo muy bajo de introducción en el medio ambiente (posibles vectores);

- ii) Ser protectoras en múltiples especies y, si es posible, en todas las especies susceptibles de importancia económica, para prevenir la infección y la transmisión;
- iii) Ser rentables para los productores y usuarios, preferiblemente con una vacunación de una sola dosis;
- iv) Ser fáciles de utilizar (por ejemplo, preferiblemente de administración sin aguja), adecuadas para el almacenamiento (por ejemplo, en bancos de vacunas) y rápidamente disponibles.

El personal que manipule VFVR virulento debe trabajar preferiblemente en instalaciones con alta contención y estar vacunado, en el caso de que se disponga de vacuna para uso humano, para minimizar el riesgo de infección.

Las directrices para la producción de vacunas veterinarias se indican en el Capítulo 1.1.8. *Principios de producción de vacunas veterinarias*. Las directrices aquí indicadas y las del capítulo 1.1.8 son de carácter general y pueden tener que complementarse con requisitos de ámbito nacional o regional.

En la siguiente descripción de la producción de vacunas, se ofrece información sobre la producción de vacunas vivas e información sobre la producción de vacunas inactivadas.

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

2.1. Características del inóculo vírico

2.1.1. Características biológicas del inóculo vírico primario

Debe registrarse la procedencia exacta de la cepa, incluido el tipo de material del cual deriva el virus. El historial de pases *in vitro* y los datos sobre los ingredientes deben registrarse también, conforme al capítulo 1.1.8. El inóculo vírico primario (MSV) debe someterse a pruebas de identidad, pureza (ausencia de agentes extraños) e inocuidad. La caracterización del MSV debe realizarse empleando parámetros biológicos o genéticos, según corresponda.

Suponiendo que la inmunogenicidad es suficiente y por motivos evidentes de seguridad, para producir vacunas inactivadas es muy recomendable utilizar cepas víricas atenuadas. El número de pases del virus desde la reserva de MSV hasta el producto final no puede ser superior a cinco (Farmacopea Europea, 2012).

2.1.2. Criterios de calidad

La pureza del MSV y de las células que se utilicen para producir la vacuna debe mantenerse a lo largo de todo el proceso. El inóculo vírico debe estar libre de agentes extraños, bacterias y *Mycoplasma*, lo cual debe comprobarse utilizando pruebas que se sepa que son sensibles en la detección de estos microorganismos (véase el Capítulo 1.1.9 *Pruebas de esterilidad y ausencia de contaminación en los materiales biológicos de uso veterinario*). La alícuota a analizar debe ser representativa de un título suficiente para la producción de la vacuna, pero no tan alto como para que los sueros hiperinmunes sean incapaces de neutralizar el inóculo vírico durante la prueba de pureza. El inóculo vírico se neutraliza con antisuero mono-específico o anticuerpo monoclonal contra un VFVR distinto del inóculo vírico, y la mezcla virus/anticuerpo se cultiva en varios tipos de monocapas de líneas celulares. Deben pasarse cultivos neutralizados y comprobarse si presentan virus extraños que pudieran haber infectado las células o el inóculo vírico durante los pases previos. Por ejemplo, el virus de la diarrea viral bovina (VDVB) es un posible contaminante introducido a través del uso de suero fetal bovino en sistemas de cultivo celular. Se recomienda una línea celular altamente permisiva para el VDVB de los tipos 1 y 2 como una de las líneas celulares escogidas para la evaluación del MSV. Los productos de origen bovino deben obtenerse de países con un riesgo insignificante de encefalopatía espongiiforme bovina.

2.1.3. Validación como cepa vacunal

Debe comprobarse que la vacuna derivada del MSV es satisfactoria respecto a la inocuidad y a la eficacia en las especies a las que va destinada.

2.2. Método de fabricación

2.2.1. Procedimiento

i) Vacunas vivas

Las vacunas deben producirse de acuerdo con lo establecido en el Capítulo 1.1.8 *Principios de producción de vacunas veterinarias*. El inóculo vírico se produce en cultivo celular, véase la Tabla 2, arriba. El número de pases desde el MSV debe ser como máximo de cinco. La dosis de virus que se utilice para inocular el cultivo celular debe mantenerse al mínimo para reducir la posibilidad de que interfieran partículas víricas defectuosas. Cuando el virus ha alcanzado su título adecuado, lo cual vendrá determinado por el ECP u otra técnica aprobada, el material recogido podrá clarificarse. En general, la vacuna se liofiliza, preferiblemente en presencia de un estabilizador adecuado.

ii) Vacunas inactivadas

Los antígenos que se utilizan en las vacunas inactivadas en general se preparan de forma similar a como se hace con las vacunas vivas. El virus presente en el medio de mantenimiento del virus se inactiva empleando un método validado de inactivación, y a continuación puede terminar concentrándose/purificándose y formulándose como adyuvante apropiado.

En el caso de que se utilice un VFVR virulento para producir una vacuna inactivada, el personal que manipule el virus vivo deberá estar vacunado, si se dispone de vacuna para uso humano, y las instalaciones y las prácticas deberán ser acordes a un nivel alto de contención que minimice el riesgo de infección del personal y de liberación al medio ambiente.

2.2.2. Requisitos para los ingredientes

Deberá comprobarse que las líneas celulares que se utilicen para el cultivo celular están libres de agentes extraños. Todos los productos de origen animal que se empleen en la producción y mantenimiento de las células (es decir, tripsina, sueros fetales bovinos) y en el cultivo del virus deberán estar libres de agentes extraños, y deberá prestarse especial atención a la presencia del VDVB.

2.2.3. Controles durante el proceso

El rendimiento se puede evaluar empleando pruebas de masa antigénica o de infectividad. La esterilidad de los antígenos debe comprobarse a lo largo de todo el proceso.

Se utiliza un método de control de la inactivación validado para asegurar una inactivación completa del material a granel de cada lote. En el caso de las vacunas inactivadas, las muestras tomadas a intervalos de tiempo periódicos durante la inactivación, y a continuación inoculadas en una línea celular susceptible (como la que se utiliza para la producción) deben indicar una pérdida completa del título al llegar a los 2/3 de la duración total del proceso de inactivación.

Para las pruebas en cultivos celulares, se inocula en al menos 150 cm² de monocapa de cultivo celular 1,0 ml del material recogido inactivado. El producto supera la prueba si no hay indicios de que esté vivo ningún virus ni ningún otro microorganismo observado.

Al final de la producción, el contenido en antígeno se mide para establecer que en el producto a granel se han logrado los títulos mínimos o la masa antigénica mínima.

2.2.4. Pruebas en lotes de producto final

i) Esterilidad

Los productos finales deberán someterse a pruebas de ausencia de bacterias, *Mycoplasma* y contaminación fúngica (véase el capítulo 1.1.9).

ii) Identidad

El virus vivo atenuado o el antígeno inactivado del producto a granel, así como el producto final formulado (liofilizado o líquido) deben someterse a pruebas de identidad antes de ser liberados, para comprobar que contienen la cepa del VFVR correspondiente.

iii) Inocuidad

La prueba de inocuidad en el lote de producto final está diseñada para detectar posibles reacciones adversas anómalas, ya sean locales o sistémicas.

Deberá inocularse a un mínimo de dos animales sanos seronegativos y de la especie de destino la dosis recomendada de la vacuna, por la vía de administración recomendada, a al menos dos animales. Estos animales se observarán para comprobar si presentan reacciones locales o sistémicas a la vacunación, durante como mínimo 14 días. Toda reacción adversa atribuible a la vacuna deberá evaluarse, y podría impedir la aceptación del lote. Si se realiza la prueba de potencia en la especie de destino, la observación de la seguridad durante esta prueba también podría considerarse una alternativa a la prueba de seguridad del lote aquí descrita.

iv) Potencia del lote

En el caso de las vacunas vivas, la potencia suele basarse en el título del virus vivo. Para la liberación de lotes de vacunas inactivadas, pueden utilizarse pruebas indirectas por motivos de viabilidad y de bienestar animal, siempre que se haya validado una correlación con el porcentaje de protección en el animal de destino. A menudo, las pruebas indirectas de potencia consisten en una titulación de anticuerpos tras la vacunación de especies susceptibles. Pueden utilizarse otros métodos (masa antigénica) si están adecuadamente validados.

v) Contenido en humedad

El contenido en humedad de la vacuna atenuada liofilizada no puede superar el 5%.

2.3. Requisitos para la aprobación del registro

2.3.1. Proceso de fabricación

Para el registro de la vacuna, deben presentarse a las autoridades todos los datos pertinentes relativos a la fabricación de la vacuna y a las pruebas de control de calidad (véanse los apartados C.2.2.1 a C.2.2.4 de este capítulo). Esta información debe corresponder a tres lotes consecutivos de vacuna de un volumen no inferior a 1/3 del volumen habitual de un lote industrial.

Los controles durante el proceso forman parte del proceso de fabricación

2.3.2. Requisitos de inocuidad

A los efectos de conseguir la autorización, las siguientes pruebas de inocuidad deben dar resultados satisfactorios. Además de estas pruebas, las vacunas deben someterse a pruebas de inocuidad en el campo (véase el capítulo 1.1.8 sobre pruebas de campo [inocuidad y eficacia]).

i) Vacunas vivas

Las vacunas deben someterse a pruebas de posibles efectos patógenos en cada una de las especies de destino indicadas en la ficha técnica.

a) Prueba de inocuidad (sobredosis) en animales de corta edad

La prueba se lleva a cabo por cada una de las vías de administración recomendadas empleando animales de la especie de destino de corta edad, no mayores de la edad mínima recomendada para la vacunación. Se emplea virus vacunal al nivel de pases atenuados mínimo que presentará en un lote de la vacuna.

Se utilizan como mínimo ocho animales sanos y de corta edad de la especie de destino, sin anticuerpos contra el VFVR. Se administra a cada animal una cantidad del virus vacunal equivalente a como mínimo 10 veces el título vírico máximo que puede encontrarse en 1 dosis de la vacuna. Se observa a los animales a diario durante al menos 14 días. Se registra la temperatura corporal de cada animal vacunado durante al menos 3 días antes de la administración de la vacuna, en el momento de administrarla, 4 horas después, y a continuación a diario durante al menos 14 días. La vacuna supera la prueba si el aumento medio de la temperatura corporal entre todos los animales no supera los 1,5°C, si ningún animal presenta un aumento de temperatura superior a 1,5°C durante un periodo superior a 3 días consecutivos, y si ninguno presenta signos destacables de enfermedad o muere por causas atribuibles a la vacuna.

b) Inocuidad en hembras gestantes

Para que el producto se pueda utilizar en hembras gestantes, debe comprobarse que es inocuo en todas las etapas de la gestación.

La prueba se lleva a cabo con una vacunación por una vía recomendada empleando un número de animales seronegativos de la misma edad y procedencia suficiente para dar un nivel determinado de certidumbre estadística respecto a la probabilidad de efectos secundarios. Deben analizarse ocho animales en cada trimestre de la gestación (es decir, 24 animales en total), teniendo en cuenta que el riesgo teratogénico de la FVR es máximo en los dos primeros tercios de la gestación (Botros et al., 2006). Se utiliza un virus vacunal que se encuentre al mínimo nivel de pases atenuados que habrá en un lote de la vacuna.

Se administra a cada grupo una cantidad del virus vacunal equivalente a no menos del título vírico máximo que puede haber en 1 dosis de la vacuna. Los animales se observan a diario hasta el día del parto para registrar los posibles signos clínicos. Deben tomarse muestras de sangre de animales neonatos antes de que ingieran calostro.

La prueba se invalida si el animal no seroconvierte antes del parto. El virus vacunal supera la prueba si no se observan anomalías en la gestación ni en las crías, y si ninguna reproductora presenta signos destacables de enfermedad ni muere por causas atribuibles a la vacuna.

En las muestras de sangre de los neonatos no debe haber virus vacunal.

c) Ausencia de transmisibilidad

Esta prueba debe realizarse en la especie de ganado más susceptible a la FVR, que es la oveja.

Se mantienen juntos para la prueba no menos de 12 corderos sanos de la edad mínima recomendada para la vacunación y del mismo origen, que no tengan anticuerpos contra el VFVR. Se utiliza virus vacunal al mínimo nivel de pases atenuados que habrá entre el lote de MSV y un lote de la vacuna. Se administra por una vía recomendada a no menos de seis corderos una cantidad del virus vacunal equivalente a no menos del título vírico máximo que puede haber en 1 dosis de la vacuna.

Se mantienen no menos de seis corderos como controles de contacto. La mezcla de corderos vacunados y lechones de contacto se realiza 24 horas después de la vacunación.

Pasados 45 días, se sacrifican todos los corderos por medios humanitarios. Se realizan en los corderos pruebas apropiadas de detección de anticuerpos contra el VFVR y en los corderos control pruebas de detección del VFVR en el bazo y el hígado. La vacuna supera la prueba si se hallan anticuerpos en todos los corderos vacunados y si no se hallan ni anticuerpos ni virus en los corderos control.

d) Reversión a la virulencia

Esta prueba se lleva a cabo utilizando el lote de inóculo primario; se utilizan las especies, la edad y la vía de inoculación más susceptibles. Si no se dispone de la cantidad de lote de inóculo primario suficiente como para llevar a cabo la prueba, puede utilizarse el material con el mínimo número de pases utilizado para la producción del que se disponga en cantidad suficiente. En el momento de la inoculación, los animales de todos los grupos serán de una edad adecuada para recuperar la cepa. Se llevan a cabo pases seriados en animales de destino empleando cinco grupos de animales, a no ser que haya alguna justificación para

realizar más pases o que la cepa desaparezca antes del animal analizado. Para expandir el inóculo del pase no puede utilizarse una propagación *in vitro*.

Los pases se realizan utilizando animales lo más apropiados posible para el riesgo que se está evaluando.

Inicialmente se administra la vacuna por la vía recomendada que con más probabilidad dé lugar a una reversión a la virulencia, empleando un inóculo inicial que contenga el título de liberación máximo. Después, se llevan a cabo como mínimo cuatro pases seriados más por animales de la especie de destino. Estos pases se realizan por la vía de administración que con mayor probabilidad dé lugar a una reversión a la virulencia. Si las propiedades de la cepa permiten un pase secuencial por propagación natural, este método puede utilizarse, de lo contrario, el pase del virus se realizará y se comprobará si el virus que se recupera en el pase final presenta un aumento de la virulencia. En el caso de los primeros cuatro grupos, se utilizan como mínimo dos animales. El último grupo consiste en un mínimo de ocho animales. En cada pase, debe comprobarse la presencia de virus vacunal vivo en el material que se utilice para el pase. Debe tenerse cuidado de evitar una contaminación por virus de pases previos. Cuando no se recupera virus de ningún pase *in vivo* intermedio, el pase se repite en diez animales utilizando material pasado *in vivo* del último pase en el que se recuperó virus. El virus recuperado se utiliza como inóculo para el siguiente pase. Si el virus vacunal no se recupera, la prueba se considera finalizada con la conclusión de que el virus vacunal no presenta un aumento de la virulencia.

Durante el estudio se realizan observaciones clínicas generales. Los animales del último grupo se observan durante 21 días a no ser que se justifique lo contrario. Estas observaciones incluyen todos los parámetros relevantes propios de la enfermedad que podrían indicar un aumento de la virulencia. Se comparan los signos clínicos y otros parámetros relevantes con los observados en los animales que se utilizan en la prueba de seguridad en la que se administra 1 dosis. Si el último grupo de animales no presenta evidencias de un aumento de la virulencia, no se precisa realizar ninguna otra prueba. De lo contrario, el material utilizado para el primer pase y el virus recuperado en el nivel de pase final se utilizan en una prueba independiente empleando al menos ocho animales por grupo, para comparar directamente los signos clínicos y otros parámetros relevantes. Este estudio se lleva a cabo empleando la vía de administración que se utilizó para los pases previos. Puede utilizarse otra vía de administración si está justificada.

A no ser que se justifique lo contrario y que se autorice, el producto supera la prueba si ningún animal muere ni presenta signos atribuibles a la cepa vacunal y no se observan evidencias de un aumento de la virulencia en los animales del último grupo.

e) Aspectos medioambientales

Debe prepararse una evaluación del riesgo cuando sea posible una propagación o exista un riesgo de que las vacunas vivas lleguen a especies no de destino o se propaguen mediante un vector.

f) Precauciones (peligros)

Las vacunas de virus vivo modificado pueden suponer un peligro para el personal que las administra en función de la cepa y del nivel de atenuación del virus. Los fabricantes deben proporcionar suficientes advertencias de que debe acudir al médico en caso de auto-inyección de la vacuna.

ii) Vacunas inactivadas

a) Prueba de inocuidad (a dosis única o repetida)

Para conseguir la aprobación de las autoridades reguladoras, en un lote provisional de la vacuna debe comprobarse si la vacuna genera toxicidad local o sistémica por cada una de las vías de administración recomendadas, aplicando una prueba *in vivo* con 8 animales de cada una de las especies de destino. Deben realizarse pruebas de dosis única y de dosis repetida con vacunas formuladas que contengan la máxima carga permitida. La prueba de la dosis repetida debe corresponder al programa de vacunación primaria (por ejemplo, dos inyecciones) más la primera revacunación (es decir, un total de tres inyecciones). Se comprueba si los animales presentan reacción local o sistémica a la vacunación durante al

menos 14 días tras cada inyección. Debe evaluarse toda reacción inesperada atribuible a la vacuna, que podría impedir la aceptación de esta.

b) Pruebas de inocuidad en hembras gestantes

Si el producto va a utilizarse en hembras gestantes, deben realizarse pruebas de inocuidad en las distintas etapas de la gestación.

Se lleva a cabo la prueba con vacunación por una vía recomendada empleando al menos 16 animales sanos de la misma edad y origen y sin anticuerpos contra el VFVR: ocho en el primer tercio de la gestación, y ocho en el segundo tercio (son los periodos de tiempo durante los cuales el riesgo teratogénico de la FVR es máximo [Botros, 2006]).

Se administra a cada grupo una cantidad de la vacuna equivalente a como mínimo la masa antigénica máxima que podrá contener 1 dosis de la vacuna. Los animales se observan hasta el momento del parto para comprobar si presentan signos clínicos.

La prueba se invalida si el animal no seroconvierte antes del parto. La vacuna supera la prueba si no se observan anomalías en la gestación ni en las crías, y si ninguna reproductora presenta signos destacables de enfermedad ni muere por causas atribuibles a la vacuna.

c) Precauciones (peligros)

Las vacunas inactivadas contra el VFVR no constituyen ningún peligro para el personal que las administra, aunque una inoculación accidental podría dar lugar a una reacción adversa causada por el adyuvante y los componentes secundarios de la vacuna. Los fabricantes deben proporcionar las advertencias suficientes de que es necesario buscar atención médica en caso de auto-inyección de la vacuna.

2.3.3. Requisitos de eficacia

La eficacia de la vacuna se estima en animales vacunados directamente evaluando su resistencia a la exposición al virus vivo a partir de un estudio controlado de vacunación-desafío de animales hospedadores. En las situaciones en las que no es posible llevar a cabo un estudio controlado de vacunación-desafío de animales hospedadores, la aparición de anticuerpos neutralizantes del virus a partir de la vacunación se considera un indicio de eficacia, puesto que los anticuerpos neutralizantes se consideran protectores; no obstante, el título protector mínimo variará en función del tipo de prueba de neutralización que se emplee y del virus que se utilice. El título protector puede determinarse llevando a cabo un estudio de vacunación-desafío de animales hospedadores junto con mediciones de los anticuerpos neutralizantes, relacionando así el título con la eficacia. En general, si se supera una prueba realizada en corderos, se considera evidencia suficiente de la calidad de una vacuna para extender su uso a otras especies. En circunstancias en las que una vacuna se ha producido para ser utilizada inicialmente en una especie distinta del cordero, puede ser más adecuado comprobar la eficacia de la vacuna en la misma especie. No obstante, excepto en el caso del ganado vacuno, todavía no se han desarrollado pruebas de eficacia en otras especies de destino, como las cabras o los camélidos.

i) Pruebas de inmunogenicidad en animales de corta edad

La siguiente prueba es aplicable a las ovejas. Si debe usarse en otras especies, podrían realizarse las modificaciones pertinentes.

Se lleva a cabo una prueba para cada vía y método de administración recomendado para la vacunación utilizando en cada caso corderos de la edad mínima recomendada. La cantidad de vacuna a administrar a cada cordero cuando se trata de una vacuna viva no es superior al título vírico mínimo que se indica en la ficha técnica y el virus está al nivel mínimo de pases atenuados que tendrá en un lote de la vacuna. Si se trata de vacunas inactivadas, debe utilizarse una dosis antigénica mínima acorde al programa de vacunación recomendado.

Para esta prueba se utilizan como mínimo 16 corderos sin anticuerpos contra el VFVR.

En el caso de la vacuna viva, se obtienen sueros de los corderos antes de la vacunación, 7 y 14 días después de la vacunación y justo antes del desafío. En el caso de la vacuna

inactivada, se obtienen sueros de los corderos antes de la primera y de la segunda inyección de la primovacunación y en el momento del desafío.

Se vacunan al menos ocho corderos, según la pauta recomendada. Se mantienen no menos de ocho corderos como controles. En el caso de las vacunas vivas, se expone a cada cordero, pasados 20-22 días y por una vía adecuada, a un VFVR virulento. En el caso de las vacunas inactivadas, se expone a cada cordero 14 días después de terminar la primovacunación. Se observa a los corderos al menos una vez al día durante 14 días tras el desafío y se realiza un seguimiento de los posibles signos clínicos y de la carga vírica mediante un aislamiento del virus y una RT-PCR cuantitativa con muestras de sangre.

La prueba se invalida si la presencia de anticuerpos contra el VFVR en los sueros de los animales control indica que hubo infección concomitante por el virus durante la prueba.

La vacuna supera la prueba si durante el periodo de observación tras el desafío hay una reducción considerable de la duración del título de viremia, así como una reducción considerable en los signos clínicos (si el virus de desafío utilizado produce los mismos signos) en los corderos vacunados en comparación con los corderos control.

ii) Pruebas de inmunogenicidad en hembras gestantes

A no ser que en una monografía nacional específica se indique lo contrario, debe comprobarse la inmunogenicidad en animales gestantes. La siguiente prueba es aplicable a las ovejas. En otras especies deberán aplicarse las modificaciones correspondientes.

Se lleva a cabo una prueba para cada vía y método de administración recomendados para la vacunación, empleando, en cada caso, ovejas gestantes de la edad mínima recomendada. En el caso de las vacunas vivas, la cantidad de vacuna a administrar a cada oveja no debe ser superior al título vírico mínimo que se indique en la ficha técnica y el virus debe encontrarse en el nivel de pases atenuados máximo que se hallará en un lote de vacuna. En el caso de las vacunas inactivadas, deberá utilizarse una dosis antigénica mínima según el programa de vacunación recomendado.

Para esta prueba se utilizará un mínimo de 8 ovejas gestantes sin anticuerpos contra el VFVR.

En el caso de la vacuna viva, se obtienen sueros de las ovejas antes de la vacunación, 7 y 14 días después de la misma, y justo antes del desafío. En el caso de la inactivada, se obtienen sueros de los corderos antes de la primera y segunda inyecciones de la primovacunación y en el momento del desafío.

Se vacuna a un mínimo de ocho ovejas según el programa recomendado. Se mantiene un mínimo de ocho ovejas más como controles. En el caso de la vacuna viva, se expone a cada oveja, pasados 20-22 días, y por una vía adecuada, a un VFVR virulento. En el caso de las vacunas inactivadas, se expone a las ovejas 14 días después de terminar la primovacunación. Se observa a las ovejas al menos a diario durante 14 días tras el desafío y se realiza un seguimiento de los signos clínicos y de la carga vírica mediante aislamiento vírico y RT-PCR cuantitativa en sangre.

La prueba se invalidará si la presencia de anticuerpos contra el VFVR en los sueros de los animales controles indican que durante la prueba ha habido infección intercurrente por el virus.

La vacuna supera la prueba si durante el periodo de observación tras la exposición hay una reducción significativa de la duración y del título virémico y una notable reducción de los signos clínicos (si el virus de desafío utilizado causa tales signos) en las ovejas vacunadas respecto a las ovejas control.

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

Actualmente no se dispone de ninguna estrategia DIVA para las vacunas existentes contra el VFVR.

2.3.5. Duración de la inmunidad

Como parte del procedimiento de autorización, el fabricante debe demostrar la duración de la inmunidad en una vacuna dada mediante desafío o utilizando una prueba alternativa validada, como la serología al final del periodo de protección indicado. La inmunidad debe durar por lo menos 1 año cuando la vacuna se administre al principio de la estación de los mosquitos.

2.3.6. Estabilidad

Como parte de los estudios de determinación del periodo de validez para la autorización, debe demostrarse la estabilidad de todas las vacunas.

El periodo de validez de un lote de vacuna liofilizada o un lote de vacuna inactivada líquida contra el VFVR no debe ser inferior a 1 año.

BIBLIOGRAFÍA

BARNARD B.J.H. (1979). Rift Valley fever vaccine – antibody and immune response in cattle to a live and an inactivated vaccine. *J. S. Afr. Vet. Assoc.*, **50**, 155–157.

BERGREN N.A., BORLAND E.M., HARTMAN D.A. & KADING R.C. (2021). Laboratory demonstration of the vertical transmission of Rift Valley fever virus by *Culex tarsalis* mosquitoes. *PLoS Negl. Trop. Dis.*, **15**, e0009273. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0009273>

BIRD B.H., BAWIEC D.A., KSIAZEK T.G., SHOEMAKER T.R. & NICHOL S.T. (2007a). Highly sensitive and broadly reactive quantitative reverse transcription-PCR assay for high-throughput detection of Rift Valley fever virus. *J. Clin. Microbiol.*, **45**, 3506–3513. doi: 10.1128/JCM.00936-07.

BIRD B.H., KHRISTOVA M.L., ROLLIN P.E. & NICHOL S.T. (2007b). Complete genome analysis of 33 ecologically and biologically diverse Rift Valley fever virus strains reveals widespread virus movement and low genetic diversity due to recent common ancestry. *J. Virol.*, **81**, 2805–2816.

BOTROS B., OMAR A., ELIAN K., MOHAMED G., SOLIMAN A., SALIB A., SALMAN D., SAAD M. & EARHART K. (2006). Adverse response of non-indigenous cattle of European breeds to live attenuated Smithburn Rift Valley fever vaccine. *J. Med. Virol.*, **78**, 787–791.

CETRE-SOSSAH C., BILLECOCQ A., LANCELOT R., DEFERNEZ C., FAVRE J., BOULOY M., MARTINEZ D. & ALBINA E. (2009). Evaluation of a commercial competitive ELISA for the detection of antibodies to Rift Valley fever virus in sera of domestic ruminants in France. *Prev. Vet. Med.*, **90**, 146–149.

CETRE-SOSSAH C., PÉDARRIEU A., JUREMALM M., JANSEN VAN VUREN P., BRUN A., OULD EL MAMY A.B., HÉRAUD J.-M., FILIPPONE C., RAVALOHERY J.-P., CHAABIHI H., ALBINA E., DOMMERGUES L., PAWESKA J. & CARDINALE E. (2019). Development and validation of a pen side test for Rift Valley fever. *PLoS Negl. Trop. Dis.*, **13**: e0007700. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0007700>.

DIGOUTTE J.P., JOUAN A., LEGUENNO B., RIOU O., PHILIPPE B., MEEGAN J.M., KSIAZEK T.G. & PETERS C.J. (1989). Isolation of the Rift Valley fever virus by inoculation into *Aedes pseudoscutellaris* cells: comparison with other diagnostic methods. *Res. Virol.*, **140**, 31–41.

DROSTEN C., GOTTIG S., SCHILLING S., ASPER M., PANNING M., SCHMITZ H. & GUNTHER S. (2002). Rapid detection and quantification of RNA of Ebola and Marburg viruses, Lassa virus, Crimean–Congo hemorrhagic fever virus, Rift Valley fever virus, Dengue virus, and Yellow fever virus by real-time reverse transcription-PCR. *J. Clin. Microbiol.*, **40**, 2323–2330.

- DUNGU B., LUBISI B.A. & IKEGAMI T. (2018). Rift Valley fever vaccines: current and future needs. *Curr. Opin. Virol.*, **29**, 8-15, <https://doi.org/10.1016/j.coviro.2018.02.001>.
- EUROPEAN PHARMA COPIEIA (2012). Version 7.5. Editions of the Council of Europe, Strasbourg. France.
- FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION OF THE UNITED NATIONS (FAO) (2011). Rift Valley fever vaccine development, progress and constraints. Proceedings of the GF-TADs meeting, Rome, Italy, FAO Animal Production and Health Proceedings, No 12.
- HUNTER P. & BOULOY M. (2001). Investigation of C13 RVF mutant as a vaccine strain. Proceedings of 5th International sheep veterinary congress, 21–25 January 2001, Stellenbosch, South Africa. University of Pretoria, South Africa.
- IKEGAMI T., HILL T.E., SMITH J.K., ZHANG L., JUELICH T.L., GONG B., SLACK O.A.L., LY H.J., LOKUGAMAGE N. & FREIBERG A.N. (2015). Rift Valley fever virus MP-12 vaccine is fully attenuated by a combination of partial attenuations in the S, M, and L segments. *J. Virol.*, **89**, 7262–7276. doi:10.1128/JVI.00135-15.
- LABEAUD A.D., SUTHERLAND L.J., MUIRURI S., MUCHIRI E.M., GRAY L.R., ZIMMERMAN P.A., HISE A.G. & KING C.H. (2011). Arbovirus prevalence in mosquitoes, Kenya. *Emerg. Infect. Dis.*, **17**, 233–241.
- LUBISI B.A., NDOUVHADA P.N., NEIFFER D., PENRITH M-L., SIBANDA D. & BASTOS A.D.S (2019). Evaluation of a Virus Neutralisation Test for Detection of Rift Valley Fever Antibodies in Suid Sera. *Trop. Med. Infect. Dis.*, **4**, 52. <https://doi.org/10.3390/tropicalmed4010052>
- MADANI T.A., AL-MAZROU Y.Y., AL-JEFFRI M.H., MISHKHA A.A., AL-RABEAH A.M., TURKISTANI A.M., AL-SAYED M.O., ABODAHISH A.A., KHAN A.S., KSIAZEK T.G. & SHOBOKSHI O. (2003). Rift Valley fever epidemic in Saudi Arabia: epidemiological, clinical, and laboratory characteristics. *Clin. Infect. Dis.*, **37**, 1084–1092.
- MORRILL J.C. & PETERS C.J. (2003). Pathogenicity and neurovirulence of a mutagen- attenuated Rift Valley fever vaccine in rhesus monkeys. *Vaccine*, **21**, 2994–3002. [http://dx.doi.org/10.1016/S0264-410X\(03\)00131-2](http://dx.doi.org/10.1016/S0264-410X(03)00131-2).
- MORRILL J.C. & PETERS C.J. (2011a). Mucosal immunization of rhesus macaques with Rift Valley fever MP-12 vaccine. *J. Infect. Dis.*, **204**, 617–625. <http://dx.doi.org/10.1093/infdis/jir354>.
- MORRILL J.C. & PETERS C.J. (2011b). Protection of MP-12-vaccinated rhesus macaques against parenteral and aerosol challenge with virulent Rift Valley fever virus. *J. Infect. Dis.*, **204**, 229–236. <http://dx.doi.org/10.1093/infdis/jir249>.
- MUNYUA P., MURITHI R.M., WAINWRIGHT S., GITHINJI J., HIGHTOWER A., MUTONGA D., MACHARIA J., ITHONDEKA P.M., MUSAA J., BREIMAN R.F., BLOLAND P. & NJENGA M.K. (2010). Rift Valley fever outbreak in livestock in Kenya, 2006–2007. *Am. J. Trop. Med. Hyg.*, **83**, 58–64.
- NAKANE P.K. & AKIRA KAWAOI A. (1974). Peroxidase-labeled antibody. A new method of conjugation. *J. Histochem. Cytochem.*, **22**, 1084–1091.
- ODENDAAL L., CLIFT S.J., FOSGATE G.T. & DAVIS A.S. (2018). Lesions and Cellular Tropism of Natural Rift Valley Fever Virus Infection in Adult Sheep. *Vet. Pathol.*, **56**, 61–71. [doi:10.1177/0300985818806049](https://doi.org/10.1177/0300985818806049)
- PAWESKA J.T., BURT F.J., ANTHONY F., SMITH S.J., GROBBELAAR A.A., CROFT J.E., KSIAZEK T.G. & SWANEPOEL R. (2003). IgG-sandwich and IgM-capture enzyme-linked immunosorbent assay for the detection of antibody to Rift Valley fever virus in domestic ruminants. *J. Virol. Methods*, **113**, 103–112.
- PAWESKA J.T., MORTIMER E., LEMAN P.A. & SWANEPOEL R. (2005). An inhibition enzyme-linked immunosorbent assay for the detection of antibody to Rift Valley fever virus in humans, domestic and wild ruminants. *J. Virol. Methods*, **127**, 10–18.
- RISSMANN M., ULRICH R., SCHRÖDER C., HAMMERSCHMIDT B., HANKE D., MROZ C., GROSCHUP M.H. & EIDEN M. (2017). Vaccination of alpacas against Rift Valley fever virus: Safety, immunogenicity and pathogenicity of MP-12 vaccine. *Vaccine*, **35**, 655–662. doi:10.1016/j.vaccine.2016.12.003

SALL A.A., THONNON J., SENE O.K., FALL A., NDIAYE M., BAUDES B., MATHIOT C. & BOULOY M. (2001). Single-tube and nested reverse transcriptase-polymerase chain reaction for the detection of Rift Valley fever virus in human and animal sera. *J. Virol. Methods*, **91**, 85–92.

SMITHBURN K.C. (1949). Rift Valley fever; the neurotropic adaptation of the virus and the experimental use of this modified virus as a vaccine. *Br. J. Exp.*, **30**, 1–16.

SWANEPOEL R. & COETZER J.A.W. (1994). Rift Valley fever. *In: Infectious Diseases of Livestock with Special Reference to Southern Africa*. Vol. 1, Coetzer J.A.W., Thomson G.R. & Tustin R.C., eds. Oxford University Press, UK.

WILLIAMS R., ELLIS C.E., SMITH S.J., POTGIETER C.A., WALLACE D., MARELEDWANE V.E. & MAJIWA P.A. (2011). Validation of an IgM antibody capture ELISA based on a recombinant nucleoprotein for identification of domestic ruminants infected with Rift Valley fever virus. *J. Virol. Methods*, **177**, 140–146.

WILSON W.C., ROMITO M., JASPERSON D.C., WEINGARTL H., BINEPAL Y.S., MALULEKE M.R., WALLACE D.B., VAN VUREN P.J. & PAWESKA J.T. (2013). Development of a Rift Valley fever real-time RT-PCR assay that can detect all three genome segments. *J. Virol. Methods*, **193**, 426–431. doi: 10.1016/j.jviromet.2013.07.006.

*
* *

NB: Existen Laboratorios de Referencia de la OMSA para la fiebre del Valle del Rift
(puede consultarse la página web de la OMSA:

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

Por favor, contacte con los Laboratorios de Referencia de la OMSA para más información sobre pruebas de diagnóstico, reactivos y vacunas para la fiebre del Valle del Rift

NB: ADOPTADO POR PRIMERA VEZ EN 1989. ÚLTIMAS ACTUALIZACIONES ADOPTADAS EN 2023.