

PESTE BOVINA (INFECCIÓN POR EL VIRUS DE LA PESTE BOVINA)

RESUMEN

En el pasado, la peste bovina era una enfermedad vírica aguda del ganado bovino doméstico, de los yaks, de los búfalos africanos (Syncerus caffer) y de los búfalos acuáticos (Bubalus bubalis y B. arnee). Se caracterizaba por altas tasas de morbilidad y mortalidad. También podía afectar a las ovejas, cabras, cerdos y ungulados salvajes. Entre 2002 y 2011, no hubo ningún caso notificado de peste bovina. La campaña de erradicación terminó en 2011 con una declaración internacional de ausencia de peste bovina a nivel mundial.

Las colecciones existentes de virus virulento y atenuado de la peste bovina permanecerán retenidas en laboratorios de investigación, diagnóstico y autorizados para la fabricación de la vacuna. Para proteger contra una posible fuga accidental fuera de las instalaciones de dichos laboratorios, la FAO¹ y la OIE están colaborando para establecer el principio de supervisión y regulación internacional de las instalaciones que guarden el virus de la peste bovina (VPB). Todas las pruebas de diagnóstico, la producción de vacunas y las actividades relacionadas con la investigación en las que se utiliza VPB vivo o material que contenga VPB vivo deben realizarse en una instalación específicamente destinada a la peste bovina y autorizada por la OIE/FAO.

La peste bovina sigue siendo una enfermedad de declaración obligatoria, y deben mantenerse sistemas de vigilancia suficientes para la detección precoz de casos clínicos por si hubiera un escape accidental del virus. La OIE (junto con la FAO) asegurará la permanente disponibilidad de material de formación en el que se muestren los signos clínicos asociados a los casos de peste bovina en los animales vivos.

Descripción de la enfermedad: *El reconocimiento clínico de la peste bovina clásica se basa en el hallazgo un animal muerto o de pequeños grupos de animales extremadamente enfermos que presenten dos o más de los siguientes signos: fiebre, falta de apetito, depresión, caquexia, erosiones superficiales en el labio superior e inferior y en las encías, erosiones o descamaciones de las papilas de los carrillos, secreción ocular serosa o mucopurulenta y/o rinorrea, diarrea y postración terminal. Es más que probable que en el grupo haya varios animales muertos con estas lesiones. El apartado introductorio de este capítulo aporta una descripción más detallada.*

Identificación del agente: *La confirmación en el laboratorio se exige y se basa en la demostración de la presencia del virus, de ARN o antígeno vírico en muestras de bazo, amígdalas, ganglios linfáticos, leucocitos o secreciones nasales u oculares de animales con una infección en fase aguda.*

Pruebas serológicas: *Los anticuerpos contra el VPB se pueden detectar en suero de animales que hayan estado infectados por el virus natural o vacunados contra la peste bovina. Dicha detección puede llevarse a cabo con una estimación de los anticuerpos neutralizantes a partir de los resultados de un ensayo inmunoanalítico de competición (C-ELISA). Las pruebas que se utilicen deben ser altamente específicas del VPB. Estas pruebas solo pueden llevarse a cabo en instalaciones destinadas a la peste bovina autorizadas como tales por la FAO-OIE, puesto que requieren del uso de VPB vivo (pruebas de neutralización) o de un antígeno derivado del virus vivo (C-ELISA).*

Requisitos para las vacunas: *Se dispone de una vacuna viva atenuada en cultivos celulares. Según lo establecido en la Resolución nº 21 de las Directrices sobre la Retención del Virus de la*

1 FAO: Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura

Peste Bovina (adoptada por la Asamblea Mundial de la OIE en mayo de 2017), que regula la era post-erradicación, no se permite inocular a ningún animal vacuna contra la peste bovina sin una autorización previa de la OIE y la FAO.

Con el fin de prepararse para la posibilidad de una reaparición o liberación, la FAO y la OIE, en colaboración con países miembros, han desarrollado un Plan de Acción Mundial contra la Peste Bovina para la era post-erradicación que incluye un plan internacional de contingencia, la designación de un mínimo de Laboratorios/Centros de Referencia y un marco de funcionamiento para repositorios de vacuna para casos de emergencia con el fin de estar preparados. La retención y posterior manipulación de los virus inóculo vacunales está regulada conjuntamente por la FAO y la OIE.

A. INTRODUCCIÓN

En el pasado, la peste bovina clásica se consideró una enfermedad vírica aguda del ganado vacuno doméstico, de los yaks, de los búfalos africanos (*Syncerus caffer*) y de los búfalos acuáticos (*Bubalus bubalis* y *B. arnee*) salvajes. Se caracterizaba por una alta morbilidad y mortalidad. Las ovejas, cabras, cerdos y ungulados salvajes también podían resultar afectados. (Taylor & Barrett, 2007). La peste bovina no es una enfermedad zoonótica, pero el virus o los materiales que hayan contactado con el virus, deben manipularse de acuerdo con estrictos procedimientos de biocontención, que se describen en el Capítulo 1.1.4 *Bioseguridad y bioprotección: norma para la gestión del riesgo biológico en el laboratorio veterinario y en las instalaciones de los animales*, y de conformidad con las Directrices sobre la Retención del Virus de la Peste Bovina.

Entre 2002 y 2011 no hubo ningún caso notificado de peste bovina. Además, hasta enero de 2011, la Comisión Científica de la OIE para las Enfermedades Animales estudio una exhaustiva lista de solicitudes de todo el mundo (basadas en la evidencia e históricas) de reconocimientos nacionales de ausencia de peste bovina. Este proceso terminó en 2011 con una declaración internacional de ausencia de peste bovina a nivel mundial. En el futuro inmediato, se mantendrán retenidas en laboratorios de investigación y en laboratorios autorizados para la fabricación de la vacuna las colecciones existentes de virus virulentos y atenuados de la peste bovina. Para proteger contra una posible fuga accidental fuera de las instalaciones de dichos laboratorios, la FAO y la OIE están colaborando para establecer el principio de supervisión y regulación internacional de las instalaciones que guarden el virus de la peste bovina (VPB), partiendo de una minimización del número de almacenes. Todas las pruebas de diagnóstico, la producción de vacunas y las actividades relacionadas con la investigación en las que se utiliza VPB vivo o material² que contenga VPB vivo de la peste bovina deben realizarse en una instalación específicamente destinada a la peste bovina y tras la autorización de la actividad por la OIE y la FAO.

La peste bovina sigue siendo una enfermedad de declaración obligatoria, y deben mantenerse sistemas de vigilancia suficientes para la detección precoz de casos clínicos por si hubiera un escape accidental del virus. La OIE (junto con la FAO) asegurará la permanente disponibilidad de material de formación en el que se muestren los signos clínicos asociados a los casos de peste bovina en los animales vivos. Existe un informe reciente de la historia de la peste bovina, su erradicación y su impacto socioeconómico (Roeder y Rich, 2009).

La peste bovina está causada por un virus con ARN de sentido negativo, que pertenece al género *Morbillivirus*, dentro de la familia *Paramyxoviridae*. Este virus tiene un solo serotipo con al menos tres clados geográficamente restringidos: Estirpe africano 1 y 2, y estirpe asiático 3, que presentan protección cruzada total y solo se diferencian por caracterización molecular.

Aunque algunas cepas de peste bovina evolucionaron para producir una enfermedad infecciosa del ganado bovino leve y no fatal, todas las cepas retienen dos atributos muy peligrosos. El primero es una casi segura capacidad de experimentar modulaciones de la virulencia, y el segundo, su capacidad para infectar a especies salvajes y de causar una infección aguda asociada a mortalidad elevada en los búfalos africanos, antílopes elands (*Taurotragus oryx*), jirafas, kudús y jabalíes verrugosos.

En el Atlas de Enfermedades Animales Transfronterizas de la OIE (Fernández y White, 2010) se describe la enfermedad de forma ilustrada. La peste bovina clásica tiene un período de incubación entre 1 y 2 semanas. Una forma hiperaguda se caracteriza por una pirexia alta y una muerte súbita en neonatos o animales de corta edad. La enfermedad aguda se caracteriza por un acceso febril agudo en el que se pueden distinguir fases prodrómicas y erosivas. El período prodrómico dura aproximadamente 3 días, en los que los animales afectados desarrollan fiebre de 40–41,5°C junto con anorexia parcial, estreñimiento, congestión de las mucosas visibles, rinorrea y una secreción ocular serosa, depresión y sequedad del morro. Sin embargo, no puede hacerse un diagnóstico clínico preliminar de la peste bovina hasta el comienzo de la fase erosiva y el desarrollo de las lesiones bucales necróticas. En el pico febril aparecen, en el labio inferior y en la encía, manchas de epitelio

2 Véase el Capítulo 8.16 del *Código Terrestre* de la OIE para consultar la definición de “materiales que contienen virus de la peste bovina”.

necrótico y, en una sucesión rápida, pueden extenderse a la encía superior y a la almohadilla dental, a la parte inferior de la lengua, a los carrillos y a las papilas de los carrillos y al paladar. Mediante el aumento de las lesiones existentes y el desarrollo de nuevos focos, la extensión de la necrosis oral puede aumentar notablemente en los 2 ó 3 días siguientes. Gran parte del material necrótico se desprende, originando erosiones no hemorrágicas y superficiales de las mucosas. También pueden hallarse lesiones necróticas en las narinas, la vulva, la vagina y la vaina prepucial.

La diarrea es otra propiedad característica, que se desarrolla 1–2 días después de la aparición de las lesiones bucales. Al principio es copiosa y acuosa, pero después puede contener mucosidades, sangre y restos de epitelio, y, en los casos graves, puede estar acompañada por espasmos. Aparece anorexia, el morro se seca por completo, el animal muestra depresión y caquexia, el aliento es fétido y aparecen secreciones oculares y nasales mucopurulentas.

Se producen muertes, pero dependiendo de la cepa involucrada, la raza bovina infectada y las condiciones ambientales, la mortalidad puede oscilar entre el 100% (cepas agudas en razas europeas) y el 20–30% (cepas agudas en cebúes) o el 0% (cepas leves en cebúes). Tanto con las cepas agudas como con las leves, puede esperarse que la mortalidad aumente a medida que el virus tiene acceso a más animales susceptibles. En las fases terminales de la enfermedad, los animales muestran postración 24–48 horas antes de la muerte. Algunos animales mueren con lesiones necróticas graves, fiebre alta, caquexia y diarrea, pero otros lo hacen después de un descenso súbito de la temperatura corporal, a menudo a valores inferiores a los normales. En los animales supervivientes, la fiebre podría remitir ligeramente hacia la mitad del período erosivo y, 2–3 días más tarde, alcanzar la temperatura normal con una rápida resolución de las lesiones bucales, detención de la diarrea e inicio de una convalecencia sin complicaciones.

En los casos en que se sospecha de peste bovina, durante el examen postmórtem hay que prestar especial atención al abomaso, que puede estar ingurgitado o presentar un color gris; a las placas de Peyer, que pueden presentar necrosis linfóide; y a la aparición de ingurgitación lineal y ennegrecimiento de las crestas de los pliegues del ciego, el colon y el recto.

Una característica de los canales de los animales muertos es que se encuentran deshidratadas, escuálidas y sucias. La nariz y los carrillos muestran signos de rinorrea mucopurulenta, los ojos están hundidos y la conjuntiva congestionada. En la cavidad oral suele haber una extensa descamación del epitelio necrótico, que siempre aparece bien delimitado respecto a las zonas adyacentes de mucosa sana. Las lesiones se extienden a menudo al paladar y pueden afectar a la faringe y a la porción superior del esófago; normalmente, los pre-estómagos y el abomaso no se encuentran afectados, aunque ocasionalmente aparecen placas necróticas en los pilares del rumen. El abomaso, y especialmente la región pilórica, están muy afectados y muestran congestión, petequias y edema de la submucosa. La necrosis epitelial confiere un color grisáceo a la mucosa. Por lo general, el intestino delgado no suele estar afectado, excepto por alteraciones considerables en las placas de Peyer, donde la necrosis linfóide y la descamación dejan la estructura orgánica ingurgitada o ennegrecida. En el intestino grueso las alteraciones afectan a la válvula ileocecal, la amígdala cecal y las crestas de los pliegues longitudinales de las mucosas del ciego, el colon y el recto. Los pliegues están muy ingurgitados en los casos de muerte aguda y con color oscuro en los casos duraderos; en ambos casos las lesiones se conocen como “bandas de cebra”.

Los principales diagnósticos diferenciales en el ganado bovino son el complejo diarrea vírica bovina/enfermedad de las mucosas y la fiebre catarral maligna; la diferenciación entre estas enfermedades requiere del uso de pruebas de laboratorio adecuadas. Actualmente, el diagnóstico definitivo de la peste bovina solo puede lograrse en los Laboratorios de Referencia de la OIE para la peste bovina.

En la forma leve de la peste bovina, que se asoció a cepas del virus del estirpe africano 2 hallado en zonas endémicas de África oriental, en el ganado bovino el período de incubación podría durar entre 1 y 2 semanas y la enfermedad clínica posterior poco más que un episodio febril hiperagudo. La fiebre tenía una duración variable; duraba poco (3–4 días) y era baja (38–40°C). La depresión que caracterizaba las formas más agudas de la peste bovina no se observaba en animales con la enfermedad leve, y por tanto no perdían el apetito y seguían pastando, bebiendo agua y comportándose como los animales no afectados. La diarrea, cuando la había, no era destacada. Un examen más detallado podía revelar alguna congestión leve de las mucosas visibles y pequeñas áreas focales, levantadas y de color blanquecino, de necrosis epitelial en la encía inferior – a veces de tamaño no superior a una cabeza de alfiler – junto con unas cuantas papilas erosionadas en los carrillos. En algunos animales no se apreciaban en absoluto estas erosiones, cuya aparición era efímera. Otros podían mostrar una ligera secreción serosa ocular o nasal pero que, a diferencia de las formas más graves de la enfermedad, no llegaba a ser mucopurulenta.

Aunque las infecciones por peste bovina leve podían pasar inadvertidas en el ganado bovino, el virus seguía siendo muy infeccioso para las especies salvajes, y en las especies consideradas muy susceptibles (especies de tragelafinos, como el kudú menor y el eland, el búfalo africano y la jirafa) aparece fiebre, rinorrea, estomatitis erosiva típica, gastroenteritis y muerte. Kock (2006) observó además que los búfalos africanos infectados por la estirpe 2 tenían los ganglios linfáticos periféricos aumentados de tamaño, lesiones de la piel con placas queratinizadas y queratoconjuntivitis. Los kudús menores se infectaban de modo similar, pero aunque la ceguera fue frecuente – causada por una queratoconjuntivitis aguda – la diarrea no era un signo frecuente. Los elands

también presentaban necrosis y erosiones en la mucosa bucal junto con deshidratación y extenuación. Por tanto, en las presentes circunstancias, el diagnóstico de la peste en cualquiera de estas especies indica probablemente la transmisión simultánea del virus al ganado circundante, aunque a un nivel subclínico, y la posible diseminación de la infección mediante el comercio de animales vivos.

B. TÉCNICAS DE DIAGNÓSTICO

Tabla 1. Métodos analíticos disponibles para el diagnóstico de la peste bovina y su propósito

Método	Propósito					
	Demostrar ausencia de infección en la población	Demostrar ausencia de infección en animales individuales antes de los desplazamientos	Demostrar ausencia de infección en la población	Confirmar casos clínicos	Demostrar ausencia de infección en la población	Determinar el estado inmunitario en animales o poblaciones tras la vacunación
Identificación del agente³						
Aislamiento del virus	–	–	+	+++	–	–
Detección de antígeno (AGID)	–	–	+	+	+	–
RT-PCR en tiempo real	–	+++	+++	+++	+	–
Detección de respuesta inmunitaria						
AGID	+	+	+	–	+	+
C-ELISA	+++	–	+++	–	+++	+++
VN	+++	–	+++	–	+++	+++

Clave: +++ = método recomendado; ++ = método idóneo; + = puede utilizarse en algunas situaciones, pero el coste, la fiabilidad u otros factores limitan mucho su aplicación; – = no adecuado para este propósito. Aunque no todas las pruebas indicadas como +++ o ++ han pasado una validación formal, el hecho de que se hayan utilizado de forma sistemática y con gran frecuencia sin haber dado resultados dudosos las hace aceptables para este fin.

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

Nota especial post-erradicación: no existen pruebas de diagnóstico ni para el VPB ni para anticuerpos contra el VPB, para los cuales existe un control positivo que no se incluye en la definición de la FAO-OIE de Material que Contiene Virus de la Peste Bovina (RVCM – Rinderpest Virus Containing Material). Para que un laboratorio pueda conservar de manera continua RVCM es necesario que el secretariado de la FAO-OIE para la Peste Bovina lo autorice como Instalación Apta para la Manipulación de RVCM; el uso de RVCM para cualquier fin, incluida la validación de pruebas de diagnóstico, requiere un permiso explícito de la FAO y la OIE.

Seguirán apareciendo casos sospechosos, es decir, animales con signos clínicos similares a los que se observan en caso de infección por el VPB, los cuales deberán analizarse para detectar a tiempo posibles reapariciones o escapes del VPB. Para el análisis inicial de muestras de casos sospechosos, se recomienda a los laboratorios que no cuenten con el reconocimiento de la FAO y la OIE como Instalación Apta para la Manipulación de Virus de la Peste Bovina que utilicen la reacción en cadena de la polimerasa con transcriptasa inversa (RT-PCR) (en gel o en tiempo real) empleando los cebadores establecidos. Esta prueba se puede ejecutar sin control positivo para el VPB; se pueden emplear pruebas paralelas utilizando el virus de la peste de los pequeños rumiantes (VPPR) (vacuna o virus natural) y los cebadores publicados para el VPPR como control para la mayoría de estadios de la prueba (extracción de ARN, reactivos para la transcripción inversa y la PCR); como alternativa, se pueden utilizar los cebadores de la actina bovina paralelamente como control interno de la reacción. Para un diagnóstico definitivo, las muestras deben enviarse a una de las Instalaciones Aptas para la Manipulación de Virus de la Peste Bovina aprobadas por la FAO y la OIE.

En ningún caso se requerirán pruebas de anticuerpos contra el VPB, a no ser que se produzca una reaparición o escape del virus.

3 Se recomienda aplicar varios métodos de identificación del agente a la misma muestra clínica.

1. Identificación del agente

Toda sospecha de peste bovina debe considerarse una posible amenaza para la bioseguridad internacional y debe confirmarse o diferenciarse rápidamente. La RT-PCR es la prueba más rápida y específica. Si se confirma el VPB, deben ponerse en marcha rápidamente medidas de rastreo. Además, las muestras deben enviarse a un Laboratorio de Referencia de la OIE para la peste bovina para una confirmación final del diagnóstico, y debe determinarse el origen del virus secuenciándolo y comparándolo con el genoma del VPB. Si es posible, debe aislarse el virus (Anderson *et al.*, 1996), aunque esto solo debe intentarse en una Instalación Apta para la Manipulación de Virus de la Peste Bovina aprobado por la FAO y la OIE.

1.1. Aislamiento del virus

El VPB puede cultivarse a partir de la fracción de leucocitos de la sangre completa recogida con heparina o EDTA (ácido etilendiaminotetraacético) a una concentración final de 10 unidades internacionales (UI)/ml y 0,5 mg/ml, respectivamente. Las muestras deben mezclarse cuidadosamente y llevarse al laboratorio con hielo, pero no congeladas. De media, el inicio de la viremia precede ligeramente al inicio de la pirexia, y puede continuar durante 1–2 días después de que la pirexia empiece a remitir. En consecuencia, los animales que presentan pirexia probablemente sean virémicos y, por lo tanto, su sangre es la mejor para intentar el aislamiento del virus. No obstante, dado que los animales con pirexia ocasional tal vez ya no sean virémicos, deben obtenerse muestras de sangre de varios animales febriles. El virus también puede aislarse a partir de muestras de las amígdalas, el bazo o de ganglios linfáticos pre-escapulares o mesentéricos de animales muertos; estas muestras pueden congelarse para su transporte; el transporte debe llevarse a cabo en condiciones de bioseguridad en cumplimiento de las normas para el transporte internacional descritas en el Capítulo 1.1.2 *Recogida, presentación y almacenamiento de muestras para el diagnóstico*, en el Capítulo 1.1.3 *Transporte de material biológico* y en las Directrices sobre la Retención del Virus de la Peste Bovina.

Para aislar el virus en la sangre, se centrifuga sangre no coagulada a 2.500 **g** durante 15 minutos hasta producir una capa leucocitaria en la interfase entre el plasma y los eritrocitos. Esta capa se extrae tan limpiamente como sea posible, se mezcla con 20 ml de solución salina fisiológica y se vuelve a centrifugar en un proceso de lavado diseñado para eliminar cualquier anticuerpo neutralizante presente en el plasma. El sedimento celular resultante se suspende en un medio de mantenimiento para cultivo celular y se distribuye en alícuotas de 2 ml sobre monocapas establecidas en tubos rotatorios con células primarias de riñón de cordero, células linfoblastoides B95a de mono tití, linfoblasto T bovino transformado por *Theileria* o células de riñón de mono verde africano (Vero), preferiblemente células Vero que expresen el receptor SLAM de morbilivirus. Estas células pueden cultivarse en tubos rotatorios, frascos de cultivo o placas multipocillo.

Como alternativa, se pueden emplear suspensiones al 20% (p/v) de tejido post-mortem. Estas se deben hacer homogenizando los tejidos sólidos con medio de mantenimiento de los cultivos sin suero y utilizando técnicas normalizadas de homogenización o de corte e inoculando las monocapas como antes. La liberación de virus de los tejidos sólidos puede realizarse de varios modos. Tal vez el método más sencillo sea el mortero, pero esta técnica requiere utilizar arena estéril como abrasivo. Como alternativa, el tejido puede homogenizarse sin abrasivo utilizando homogeneizadores de vidrio, como por ejemplo uno de tipo Ten Broek. También se aplican técnicas de corte empleando homogeneizadores. Las suspensiones que contienen los virus se clarifican por centrifugación a velocidad baja. El volumen del inóculo no es importante, y el volumen de trabajo más frecuente está entre 1 y 2 ml. Los antibióticos más empleados son la penicilina y la estreptomina combinadas, cada uno de ellos a una concentración de 100 IU/ml o 100 µg/ml. Un espectro de cobertura similar se logra con neomicina a 50 µl/ml. Se debe incluir amfotericina B a razón de 2,5 µg/ml.

El inóculo debe retirarse pasadas 1–2 horas y reponerse con medio nuevo. A partir de este momento, el medio de mantenimiento del cultivo debe decantarse y reponerse cada 2 o 3 días y la monocapa debe observarse al microscopio para comprobar si aparecen efectos citopáticos (ECP), que suelen ser refractilidad, redondeamiento de las células, retracción de las células con bordes citoplásmicos alargados (células estrelladas) y/o formación de sincitio. La rapidez con la que aparece el ECP varía en función del sustrato y probablemente de la cepa vírica. Debe dejarse hasta 12 días en el caso de las células primarias, una semana en el de las Vero y 2–5 días en el caso de las células B95a. Se pueden intentar pases a ciegas antes de declarar una muestra importante como negativa. Se pueden identificar parcialmente las cepas víricas demostrando precipitinógenos específicos de morbilivirus en detritus celulares infectados, o se pueden identificar por completo mediante RT-PCR utilizando cebadores específicos del VPB (véase abajo) o demostrando inmunofluorescencia específica empleando un anticuerpo monoclonal específico del VPB.

1.2. Detección de antígeno por inmunodifusión en gel de agar

Las pruebas de inmunodifusión en gel de agar (AGID) pueden hacerse en placas Petri o en portas de vidrio para microscopio (Foreman *et al.*, 1983). En cualquier caso, la superficie se cubre con agar hasta un grosor de unos 4 mm utilizando una solución acuosa de agar o agarosa al 1% de alta calidad. Se excavan los pocillos en disposición hexagonal, con seis pocillos periféricos alrededor de un único pocillo central. En el caso de los portas, los pocillos deben tener 3 mm de diámetro y estar separados 2 mm. En las placas Petri, los pocillos pueden pasar a ser de 4 mm de diámetro y la distancia entre los pocillos, de 3 mm. Cuanto más juntos se sitúen entre sí, menor será el tiempo de reacción.

Con una pipeta de pequeño volumen, se coloca en el pocillo central un suero de conejo hiperinmune contra la peste bovina. En ausencia de control positivo que contenga el virus de la peste bovina, puede utilizarse VPPR (por ejemplo, preparaciones de virus vacunal) como control, que deberá colocarse en pocillos alternos periféricos (es decir, uno, tres, y cinco). El antígeno control negativo se pone en el pocillo cuatro. Los antígenos problema se obtienen de exudados de un corte del bazo o de ganglios linfáticos enviados como muestra para análisis; alternativamente, si no puede conseguirse exudado, se homogeneiza un pequeño trozo de la muestra en solución salina. Las secreciones oculares se pueden exprimir directamente de los hisopos u obtenerse por compresión en una micropunta (debe quitarse el algodón del hisopo, y colocarlo en el extremo ancho de una punta desechable de plástico de pipeta 50–250 µl; luego, con la varilla del hisopo, se comprime el algodón y se fuerza hasta que salga un pequeño volumen del exudado por el extremo delgado de la punta de pipeta). Las muestras problema se añaden a los pocillos dos y seis. Las pruebas se desarrollan mejor a 4°C o a temperatura ambiente baja. El área de reacción debe inspeccionarse a partir de las 2 horas para comprobar si aparecen líneas de precipitación bien definidas entre los pocillos, formando una línea de identidad con los controles. Si no se obtiene resultado en 24 horas, las pruebas se desechan. Los resultados no son válidos si no se obtiene también reacciones de precipitación que den una línea de identidad con la preparación de control positivo de antígeno.

Aunque la prueba no es muy sensible ni muy específica, es robusta y adaptable a las condiciones de campo. Una reacción positiva en un rumiante doméstico grande debe considerarse como peste bovina. En los pequeños rumiantes, un resultado positivo debe considerarse como derivado de un caso de peste de los pequeños rumiantes (PPR) aunque se recomienda un análisis posterior, dada la falta de especificidad de esta prueba.

1.3. Detección y caracterización del ácido nucleico

Se han desarrollado técnicas de RT-PCR basadas en la amplificación de partes de los genes de la proteína N o F para el diagnóstico específico del VPB (Forsyth & Barrett, 1995). Esta técnica es extremadamente sensible, específica y puede detectar VPB en ganado bovino apenas dos días después de la infección, con la ventaja de que los resultados se obtienen en 5 horas, incluida la extracción de ARN. Los dos protocolos más utilizados se indican a continuación con cierto detalle. Los productos de la PCR se analizan en un gel de agarosa al 1,5% (p/v) junto con un marcador de ADN adecuado para identificar el producto de ADN específico.

Carrillo *et al.* (2010) describieron una RT-PCR en tiempo real para el diagnóstico del VPB. Se ha demostrado que este ensayo es sensible para detectar cepas representativas de todos los linajes filogenéticos conocidos del virus y para diferenciar claramente el VPB del virus de la PPR y otras enfermedades clínicamente similares (virus de la fiebre aftosa, virus de la diarrea vírica bovina, herpesvirus bovino o virus de la estomatitis vesicular). La comparación de muestras de animales infectados experimentalmente mostró que los glóbulos blancos y los hisopos conjuntivales son la muestra de elección para esta prueba, lo que permite la detección preclínica de la enfermedad 2–4 días después de la infección. En caso de brote de VPB, esta RT-PCR en tiempo real con formato de un solo tubo tiene la capacidad de diagnóstico preclínico, lo que ayuda a prevenir una mayor transmisión de la enfermedad. Sin embargo, debe tenerse en cuenta que el ensayo se desarrolló después del último caso de VPB y nunca se utilizó en la práctica para el diagnóstico de VPB. Se recomienda a los laboratorios distintos de los de Referencia de la OIE que deseen llevar a cabo sus propias pruebas de casos sospechosos que realicen una RT-PCR basada en gel utilizando los controles disponibles.

Para los métodos de PCR tanto en gel como en tiempo real, debe incluirse un control positivo, tal como VPPR (con sus cebadores específicos) o actina bovina, y un control negativo, usando agua destilada estéril en lugar de ARN. Las reacciones positivas con un conjunto de cebadores específicos del VPB deben confirmarse mediante el uso de conjuntos de cebadores específicos del VPB adicionales o mediante el análisis de la secuencia del producto de ADN.

1.3.1. Extracción de ADN de muestras de campo

El ARN vírico se puede purificar a partir de muestras de bazo (no es ideal debido a su alto contenido sanguíneo), ganglio linfático o amígdala (ideal), linfocitos de sangre periférica (PBL) o hisopos de lesiones oculares o bucales, o bien del bazo (no es ideal debido a su alto contenido de sangre). Las muestras de tejido deben extraerse con tiocianato de guanidinio fenol acidificado (Forsyth & Barrett, 1995) usando una de las preparaciones comerciales existentes. Los tejidos sólidos (0,5–1,0 g) se picaron y se homogeneizaron con 10 ml de reactivo, los hisopos de ojo y boca se extrajeron con 1,0 ml, y los PBL purificados (de 5 ml de sangre completa) se homogeneizaron con 1,0 ml; el ARN se purifica de acuerdo con el procedimiento del fabricante. En el caso de los PBL o de los hisopos, las columnas de centrifugado de extracción de ARN también son adecuadas. El ARN resultante se conserva a -70°C o -20°C hasta que se requiera.

La síntesis de cDNA y la PCR se llevan a cabo usando una reacción combinada de un solo tubo. Los reactivos adecuados los venden ciertos fabricantes, además de los que figuran en el protocolo de ejemplo. Los productos de la PCR se analizan en un gel de agarosa al 1,5% (p/v) junto con un marcador de ADN adecuado para identificar los productos de ADN específicos. Se debe incluir un control positivo interno, como los cebadores de beta-actina, para validar la etapa de extracción de ARN y los reactivos de RT-PCR; si es posible, debe llevarse a cabo una extracción paralela del VPPR y debe identificarse el ARN vírico usando cebadores específicos del VPPR (Capítulo 3.7.9, Sección 2.4). Se debe incluir un control negativo usando agua destilada estéril en lugar de ARN en cada conjunto de reacciones. Las reacciones positivas con cualquiera de los conjuntos de cebadores específicos del VPB deben confirmarse mediante el análisis de la secuencia del producto de ADN. Además, las muestras positivas deben enviarse al Laboratorio de Referencia Mundial de la OIE, en el Reino Unido, para que se realicen pruebas de confirmación. Es importante usar más de un conjunto de cebadores para la etapa de PCR cuando se comprueba la presencia de virus de ARN, ya que sus secuencias de nucleótidos pueden variar significativamente y puede producirse un desajuste del cebador en el extremo 3' o dentro de la secuencia de cebador en caso de que los cebadores no amplifiquen el ADN. El Laboratorio de Referencia Mundial de la FAO⁴, en el Reino Unido, que también es un Laboratorio de Referencia de la OIE para la peste bovina, y el Laboratorio de Referencia de la OIE en Francia (véase el cuadro que figura en la Parte 4 de este *Manual Terrestre*) pueden asesorar sobre el uso de la técnica para el análisis de muestras de campo.

1.3.2. RT-PCR para el diagnóstico del VPB en base a la amplificación de partes de los genes N y/o F

La amplificación del gen N y F se basa en el protocolo inicial descrito por Forsyth & Barrett (1995), reformulado como un método de RT-PCR de un paso. La prueba descrita requiere los siguientes materiales: un kit de RT-PCR comercial de un paso, agua destilada y cebadores, y una máquina de PCR adecuada. También se requieren instalaciones para la electroforesis con ADN de agarosa.

i) Secuencias de los cebadores utilizados:

Gen	Tamaño del producto	Cebador	Secuencia
RPV N	297 pb	B2	5'-ATC-CTT-GTC-GTT-RTA-TGC-TCT-YRG-3'
		B12	5'-CAA-GGG-RRT-GAG-ACC-CAG-MAC-AR-3'
RPV F	448 pb	F3B	5'-AGT-ATA-AGA-GGC-TGT-TGG-GGA-CAG-T-3'
		F4D	5'-TGG-GTC-TCT-GAG-GCT-GGG-TCC-AAA-T-3'
β-Actin	275 pb	BA1	5'-GAG-AAG-CTG-TGC-TAC-GTC-GC-3'
		BA2	5'-CCA-GAC-AGC-ACT-GTG-TTG-GC-3'

- ii) Se prepara cada dilución de cebador agregando 5 µl de la solución reserva de cebador (100 µM) a 45 µl de agua destilada. Se obtiene una concentración de cebador de 10 µM con un volumen final de 50 µl.
- iii) Para cada gen problema, se prepara una mezcla primaria de PCR que contenga una concentración final de cebadores de 0,6 µM.

4 <http://www.fao.org/docrep/004/X2096E/X2096E09.htm>

iv) Se agregan 5 µl de molde de ARN a 45 µl de cada mezcla primaria. Se agrega agua destilada (5 µl) en lugar de ARN para proporcionar un control negativo que debe incluirse en cada conjunto de pruebas.

v) Las condiciones del termociclador son las siguientes:

50°C for 30 minutos	1 ciclo	Paso de transcripción inversa
95°C for 15 minutos	1 ciclo	Se inactiva a T ambiente y activa la polimerasa
94°C for 30 segundos		
55°C for 30 segundos	40 ciclos	Amplificación del cADN por PCR
72°C for 1 minuto		
72°C for 5 minutos	1 ciclo	Extensión final
4°C (indefinido)	–	–

vi) Se analizan diez microlitros de cada reacción por electroforesis en un gel de agarosa al 1,5%. Para todos los resultados positivos, el resto del producto final puede usarse directamente para la secuenciación.

1.3.3. RT-PCR en tiempo real para el diagnóstico del VPB

La RT-PCR en tiempo real se lleva a cabo esencialmente como se describe en Carrillo *et al.*, 2010. Normalmente se realiza como una reacción de 20 µl. Existen varios reactivos adecuados para RT-PCR de un paso, y las condiciones de reacción exactas deben modificarse para adaptarse a los reactivos y a la máquina de PCR en tiempo real que se utiliza. Para obtener un asesoramiento detallado sobre esta prueba, contactar con los Laboratorios de Referencia de la OIE.

2. Pruebas serológicas

2.1. Enzimoimmunoanálisis de competición

Se dispone de un ELISA de competición para la detección de anticuerpos contra la peste bovina en el suero de los animales de cualquier especie que se haya expuesto previamente al virus. La prueba se basa en la capacidad que presentan los sueros problema positivos para competir en la unión al antígeno de la peste bovina con un MAb anti-proteína H de la peste bovina. La presencia de tales anticuerpos en la muestra problema bloqueará la unión del MAb, produciendo una reducción en el color esperado de la reacción después de añadir anticuerpo conjugado anti-IG de ratón marcado con enzima y una solución de sustrato/cromógeno. Como es un ensayo en fase sólida, se necesitan pasos de lavados para asegurar la eliminación de los reactivos que no se unen.

El antígeno de la peste bovina se prepara a partir de cultivos celulares Madin–Darby de riñón bovino infectados con la cepa atenuada Kabete ‘O’ del virus de la peste bovina e inactivados por exposición a 56°C durante 2 horas. El antígeno vírico se extrae de células infectadas por ciclos repetidos de sonicación y centrifugación. El MAb se obtuvo fusionando esplenocitos de ratones hiperinmunizados con la línea celular de mieloma NSO, y comprobando que era específico para peste bovina; este MAb se designa en la actualidad como C1. Se seguirá disponiendo de kits comerciales.

2.1.1. Procedimiento analítico

- i) Se reconstituye el antígeno liofilizado de peste bovina con 1 ml de agua estéril y, posteriormente, se diluye con solución salina tamponada con fosfato (PBS) 0,01 M, pH 7,4, hasta la dilución de trabajo recomendada por el fabricante
- ii) Se distribuyen de inmediato volúmenes de 50 µl del antígeno diluido en un número apropiado de pocillos de una microplaca para ELISA con alta capacidad de unión de proteínas y con fondo plano, utilizando dos pocillos por suero problema. Se golpea lateralmente la microplaca para asegurar que el antígeno se distribuya uniformemente por el fondo de cada pocillo, se tapa la microplaca y se incuba en un agitador orbital durante 1 hora a 37°C. Después se lavan los pocillos tres veces con PBS 0,002 M, pH 7,4.
- iii) Se añaden a cada pocillo problema 40 µl de tampón de bloqueo (PBS 0,01 M, Tween 20 al 0,1% [v/v] y suero bovino normal al 0,3% [v/v]) seguido de volúmenes de 10 µl a todos los sueros problema.

- iv) Se siguen las recomendaciones del fabricante para preparar una dilución de trabajo del MAb en tampón de bloqueo y añadir 50 µl del mismo a cada pocillo problema. Se tapa la placa y se re-incuba en un agitador orbital durante 1 hora a 37°C.
- v) Se siguen las recomendaciones del fabricante para preparar una dilución de trabajo de anticuerpo de conejo anti-inmunoglobulina de ratón conjugado con peroxidasa de rábano en tampón de bloqueo y se añaden 50 µl a cada pocillo problema. Se tapa la placa y se re-incuba en un agitador orbital durante 1 hora a 37°C.
- vi) Al final de este periodo se lavan las placas como antes y se les añaden de inmediato volúmenes de 50 µl de mezcla de sustrato/cromógeno (1 parte de H₂O₂ al 3% y 250 partes de OPD) y se incuba a temperatura ambiente durante 10 minutos sin agitación. A continuación, se añaden 50 µl de una solución de parada, que consiste en ácido sulfúrico 1 M.
- vii) El sistema analítico debe incluir muestras de suero positivas y negativas para la peste bovina, un control de MAb y un control de conjugado.
- viii) Los valores de absorbancia se miden en un lector de ELISA con un filtro de interferencia a 492 nm y los resultados de la prueba se expresan como valores de porcentaje de inhibición respecto al valor obtenido en el control de MAb. Valores de inhibición de 50% o más se consideran positivos, y valores inferiores al 50% se consideran negativos.

Bajando al 40% o menos el umbral positivo/negativo, aumenta la sensibilidad de la prueba, pero ello afecta inevitablemente a la especificidad, incrementando la proporción de falsos positivos. En la práctica, el GREP (*Global Rinderpest Eradication Programme*) recomienda un valor del 50%, a cuyo nivel la sensibilidad es de al menos el 70% y la especificidad sobrepasa el 99%. Es necesario tener en cuenta la sensibilidad cuando se diseñen estrategias de muestreo para la serovigilancia.

2.2. Detección de anticuerpos mediante inmunodifusión en gel de agar (AGID)

La prueba AGID se puede utilizar para examinar sueros bovinos en los que se sospecha la peste bovina y donde el virus de la PPR no está circulando. Como se ha indicado en la sección 1.2, la prueba no distingue entre el virus de la PPR y el VPB, por lo que los anticuerpos frente a cualquiera de los virus darán una reacción positiva. Debe ajustarse la AGID como se describe en 1.2, excepto por el hecho de que el pocillo central contiene una suspensión de vacuna contra el VPPR, mientras que los pocillos externos contienen antisueros anti-VPB conocidos (posiciones 1, 3 y 5), suero control negativo (p. ej. suero bovino comercial) en la posición 4 y sueros problema en las posiciones 2 y 6. Los anticuerpos contra el VPB reaccionarán de forma cruzada con los antígenos del VPPR, dando lugar a líneas de precipitación.

2.3. Neutralización del virus

La neutralización vírica (VN) se lleva a cabo en cultivos de tubos rotatorios o en frascos de cultivo con células primarias de riñón de ternero siguiendo el método de Plowright Y Ferris (1961), o bien en microplacas de 96 pocillos (Taylor & Rowe, 1984); ambas pruebas se han validado en ganado bovino infectado experimentalmente.

En el procedimiento de los tubos rotatorios, se diluye un suero que no ha sido inactivado por calor a intervalos de 1 en 10 y después, comenzando con el suero sin diluir, se mezcla con un volumen igual de virus que contenga aproximadamente 10^{3,0} DICT₅₀ (dosis que resulta infectiva en el 50% de los cultivos tisulares expuestos) de una cepa vacunal atenuada por ml. Las mezclas se mantienen durante toda la noche a 4°C y después se inoculan volúmenes de 0,2 ml en cada uno de cinco tubos rotatorios, y a continuación 1 ml de células indicadoras dispersadas y suspendidas en un medio de crecimiento a razón de 2 × 10⁵ células por ml. Los tubos se incuban a 37°C, se inclinan durante los primeros 3 días, se rellenan con un medio de mantenimiento y se colocan en el aparato de rotación; el examen final se hace a los 10 días. Para calcular los puntos finales, la dosis vírica se considera satisfactoria si la dilución final está entre los límites de 10^{1,8} y 10^{2,8} DICT₅₀/tubo. En estas circunstancias, se interpreta que la presencia de cualquier anticuerpo detectable en la dilución sérica final (1/2) indica una infección previa por el VPB.

En el método en microplaca, los sueros se inactivan por calor durante 30 minutos a 56°C antes de ser utilizados. En este procedimiento, se diluye una dilución inicial de 1/5 a intervalos dobles. Después se incuban volúmenes de 50 µl de suero con volúmenes de 50 µl de virus que contenga entre 10^{1,8} y 10^{2,8} DICT₅₀ (Taylor y Rowe, 1984). Después de una incubación de entre 45 minutos y toda la noche, se añaden como indicadores 50 µl de células susceptibles al VPB (1–2 × 10⁵ células primarias de riñón de ternero o cordero, 5 × 10³ células Vero o células Vero-SLAM, o 5 × 10⁴ células B95a). Las pruebas

terminan a los 6–7 días y pueden indicar una neutralización inespecífica a concentraciones elevadas de suero. En algunos sueros normales (respecto a una exposición previa a la peste bovina) parece haber factores que impiden la penetración y replicación del virus en las células indicadoras. En la prueba en tubo estos factores probablemente se eliminan durante los cambios del medio de mantenimiento, mientras que en el método de la microplaca permanecen presentes todo el tiempo. Si la dilución final más concentrada de suero se limita a 1/10, este efecto desaparece.

Debe tenerse en cuenta que esta prueba requiere de la manipulación de virus vacunal vivo, y que la prueba de neutralización del virus solo puede llevarse a cabo en Instalaciones Aptas para la Manipulación de Virus de la Peste Bovina con autorización específica como tales por parte de la FAO-OIE para llevar a cabo el procedimiento.

C. REQUISITOS PARA LAS VACUNAS

1. Antecedentes

1.1. Fundamentos y uso previsto del producto

La vacuna viva atenuada en cultivo de tejidos contra la peste bovina (TCRV) descrita en ediciones previas de este *Manual Terrestre* (Plowright, 1962) fue desarrollada en Kenia mediante pases seriados en RBOK (la cepa Kabete antigua de la peste bovina, o “Kabete O”), una cepa natural virulenta de la peste bovina aislada en 1911. Aunque la división actual de los virus de la peste bovina en cuatro estirpes (África 1 y 2, y la africana antigua que incluye a Kabete O, y la Asiática) no se conoció hasta 1995 (Wamwayi *et al.*, 1995) el virus vacunal Plowright sin duda protege de forma cruzada contra todas las cepas de todas las estirpes. Desde su desarrollo, el inóculo vacunal Plowright se ha distribuido mucho y se utilizaron cientos de millones de dosis del mismo en la India, Oriente Medio y Próximo, y África para el control y la erradicación de la peste bovina.

Otras cepas TCRV que se encuentran activas actualmente, LA (Nakamura y Miyamoto, 1953) y LA-AKO (Furutani *et al.*, 1957a), se establecieron en su momento a partir de una cepa vacunal lapinizada desarrollada con anterioridad y denominada Nakamura III (como alternativa, la cepa L; Nakamura *et al.*, 1938) a partir de pases repetidos en conejos y embriones de pollo. La parental Nakamura III se utilizó mucho para controlar la enfermedad en Asia oriental y el sudeste asiático. Se observó que La y LA-AKO eran de lejos mucho menos virulentas que la cepa parental, sobre todo en ganado bovino muy susceptible de Asia oriental, como las razas Wagyu o coreana amarilla. Actualmente, LA-AKO se utiliza en una Instalación Apta para la Manipulación del Virus de la Peste Bovina autorizada como tal por la FAO-OIE para la producción de vacuna contra la peste bovina y destinada a un uso para situaciones de emergencia.

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

2.1. Características del inóculo

2.1.1. Características biológicas

i) Vacuna Plowright (RBOK)

La cepa vacunal se desarrolló a partir de 90 pases en células primarias de riñón de ternero, y se comprobó que era inocua, efectiva y resistente a reversión a la virulencia durante 7 retropases en ganado bovino (Plowright y Ferris, 1962). Se ha publicado la secuencia de la vacuna (Baron & Barrett, 1995) y se ha introducido en bases de datos públicas. Los lotes de inóculo empleados en la fabricación de TCRV Plowright deben producir una vacuna en cultivo celular que tenga una inocuidad similar y que confiera una inmunidad en el ganado bovino que dure al menos 5 años. La inmunogenicidad del inóculo vírico se puso de manifiesto hasta el 122º pase por células BK, el cual no debe superarse. Por lo tanto, el inóculo vacunal debe mantenerse por un sistema de lotes de inóculo entre los pases 90 y 120. Los lotes de virus de siembra deben conservarse en estado liofilizado a –20°C o a temperatura inferior. El virus debe cultivarse en células Vero o en células de riñón primarias o cultivadas de forma seriada y derivadas de un feto bovino normal o de un ternero muy joven. Las células de cultivos seriados no pueden tener más de diez pases desde el cultivo primario.

El inóculo vírico produce una vacuna que es inocua en gran variedad de razas bovinas europeas, africanas e indias. Su inocuidad y eficacia nunca se han evaluado en razas bovinas chinas ni japonesas.

ii) Vacuna LA-AKO

El inóculo vírico primario (LA-AKO) se estableció a partir de la cepa vacunal lapinizada Nakamura III (al 897º pase por conejo) mediante repetidos pases por conejo (29 pases) y embriones de pollo (456 pases). LA-AKO no causa ningún signo inicial excepto una ligera hipertermia en animales muy susceptibles, como el Wagyu. No obstante, es necesario recordar que el virus induce una considerable esplenomegalia en los embriones de pollo inoculados (Furutani *et al.*, 1957b). Se han registrado en la base de datos pública la secuencia del genoma de LA-AKO, y su cepa de origen, Nakamura III, (Fukai *et al.*, 2011; Takamatsu *et al.*, 2015).

Los lotes de siembra deben liofilizarse o congelarse y conservarse a –20°C o a menor temperatura hasta su uso.

2.1.2. Criterios de calidad

i) Consideraciones especiales

Debido al hecho de que el VPB se ha erradicado a nivel mundial, debe tenerse especialmente en cuenta, respecto a la inoculación en animales, la evaluación de la inocuidad y la eficacia. Se recomienda secuenciar un virus candidato a la vacuna y compararlo con cepas de referencia del VPB para determinar similitudes que eliminarían la necesidad de inocular animales.

Teniendo esto en cuenta, tanto los lotes de siembra de las cepas Plowright como de las cepas LA-AKO debe demostrarse que son:

a) **Puros**

Libres de contaminación con virus, bacterias, hongos o micoplasmas.

b) **Inocuos**

Que no induzcan una reacción clínica anormal al inocularse en el ganado bovino susceptible a la peste bovina.

c) **Eficaces**

Que induzcan inmunidad contra la peste bovina en el ganado bovino susceptible.

2.2. Método de fabricación

2.2.1. Procedimiento

Los lotes individuales de vacunas se preparan infectando cultivos celulares y, después de un tiempo de incubación adecuado, se recoge o bien los medios de recubrimiento o los medios y las células infectadas conjuntamente. El virus debe recogerse de cultivos no más de 7 días (LA-AKO) o 10 días (Plowright) después de la fecha en que estos hayan sido infectados. La decisión respecto a cuándo realizar la recolección debe tomarse en base a la aparición de un ECP característico extenso en la monocapa celular.

Para constituir un lote, los cultivos infectados deben haberse inoculado con el mismo inóculo vírico e incubado y recolectado conjuntamente.

Para formar una suspensión a granel, el material recolectado debe clarificarse mediante centrifugación a baja velocidad o por filtración antes del mezclado con el crioprotector.

Se permite llevar a cabo varias recolecciones a partir del mismo conjunto de cultivos, que podrían combinarse formando una única suspensión a granel. Para la conservación a largo plazo y la distribución con cadena de frío, las suspensiones a granel se liofilizan.

Todos los estadios de la fabricación de la vacuna deben ir acompañados de registros por escrito.

2.2.2. Requisitos para los sustratos y los medios

i) Células

La vacuna Plowright podría cultivarse en células primarias de riñón de embriones bovinos o de terneros, o en células derivadas de hasta diez subcultivos seriados procedentes de dichas fuentes. Además, la vacuna podría fabricarse en líneas celulares continuas autorizadas; se han utilizado células Vero para este fin. Los inóculos primarios de reserva de LA-AKO normalmente se preparan en huevos de pollo SPF embrionados. Asimismo, se utilizan células Vero para la producción de reserva de inóculo de trabajo/producción o vacuna de LA-AKO. En todos los casos, se debe haber comprobado que las células no están infectadas por virus extraños, como el virus de la diarrea vírica bovina (VDVB), el virus de la leucemia bovina (VLB), rotavirus bovinos o el virus de la lengua azul (VLA), y deben mantenerse en un sistema de lotes de siembra.

ii) Medios

Se cultivan células de riñón de ternero y se mantienen en Solución Salina Equilibrada de Earle o en Medio Mínimo Esencial de Eagle [MEM] suplementado con hidrolizado de lactoalbúmina al 0,5% y extracto de levadura al 0,1%, junto con suero de ternero neonato al 5%, que debe proceder de animales susceptibles a la peste bovina y originarios de países con riesgo insignificante de encefalopatía espongiiforme bovina.

Las células Vero se cultivan en MEM de Eagle suplementado con un 10% de suero fetal bovino tratado térmicamente y un 0,295% de caldo de triptosa fosfato (TPB), con antibióticos según se requiera. Se han usado otras formulaciones de medio, como el Medio de Eagle modificado de Glasgow (GMEM) suplementado con un 14% (v/v) de TPB y un 6% (v/v) de suero bovino no tratado con calor (libre de anticuerpos contra la peste bovina), con antibióticos según se requiera. Todos los sueros deben provenir de animales susceptibles a la peste bovina y originarse en países con un riesgo insignificante de encefalopatía espongiiforme bovina.

iii) Crioprotector

Para la liofilización, la suspensión a granel del virus se mezcla con un volumen igual de una solución que contenga hidrolizado de lactoalbúmina al 5% y sacarosa al 10%.

2.2.3. Controles durante el proceso

Para garantizar las propiedades de una reserva de inóculo primario, debe llevarse a cabo una prueba de marcador siempre que sea posible. Debe realizarse una titulación del virus en cada lote de suspensión a granel, y en la propia suspensión a granel final, empleando diluciones decimales del virus en una microplaca o un sistema de tubos rotatorios y empleando cuatro a diez réplicas por dilución. Cada lote de la suspensión a granel final o de la propia suspensión a granel final también debe examinarse para comprobar si contiene contaminación por virus extraños aplicando las pruebas correspondientes, es decir, una o más de las siguientes:

- i) Las muestras se mezclan con un título neutralizante de antisuero de conejo contra la peste bovina, se añaden a cultivos continuos de células Vero, o células bovinas de riñón o testiculares, y se incuban a 37 °C durante 7 días. Estas células no deben desarrollar ECP dentro del período de incubación.
- ii) Las muestras se inoculan en una línea de células de riñón embrionario de mono africano, MA-104, que se sabe que es muy susceptible al rotavirus de los simios (Smith et al., 1979). Las células MA-104 inoculadas no deben desarrollar ECP.
- iii) Se mezclan 10 ml de la muestra del lote de material recolectado clarificado en suspensión o de la suspensión a granel con un título neutralizante de antisuero contra el virus de la peste bovina generado en conejo, y se inoculan a una oveja sensible al virus de la leucemia bovina (VLB) por vía intramuscular. Los sueros obtenidos de la oveja a los 2 y 3 meses después de la inoculación deben examinarse para detectar la presencia de anticuerpos ante VLB mediante una prueba de inmunodifusión en gel de agarosa.

El lote de material recolectado clarificado o de suspensión a granel también puede someterse a una prueba de marcador si está disponible. La vacuna LA-AKO induce un marcado aumento en el tamaño del bazo en embriones de pollo inoculados. Se inocularon 15 µl de diluciones de 10 y 100 veces de una muestra de una suspensión final a granel en uno de los vasos sanguíneo de más de diez huevos los días 11 a 12 después de la puesta. Los huevos inoculados se incuban a 38°C durante 5 días. Los lotes de embriones de pollo inoculados que aún están vivos

después de la incubación se recogen y pesan. Estos bazos llegarán a pesar más de 15 mg de peso.

Debe comprobarse si hay contaminación vírica extraña en al menos dos cultivos celulares control no afectados preparados a partir de la suspensión celular utilizada en la producción del lote, después de haberlos mantenido empleando los mismos medios y condiciones de incubación que con las células infectadas por la peste bovina. Deben someterse a frecuentes observaciones microscópicas durante el proceso, y dar resultados negativos. Después de recoger el virus, los cultivos control se lavan para eliminar el suero bovino y se re-incuban durante 10 días en medios que contengan sustitutos del suero bovino, periodo durante el cual se vuelven a observar microscópicamente para comprobar si hay efecto citopático. Al final de este periodo, debe examinarse al menos un cultivo para comprobar si contiene VDVB no citopático, mediante una prueba de inmunofluorescencia o de inmunoperoxidasa, o por RT-PCR.

Los cultivos control también puede examinarse para comprobar si presentan hemadsorción. Los cultivos no infectados deben lavarse para eliminar el suero bovino, y dividirse en dos grupos. Cada grupo se recubre con una suspensión al 0,1% de eritrocitos de cobaya o ganso durante 1 hora, y a continuación se somete a observación microscópica. Los cultivos control no deben adsorber eritrocitos de ninguna de estas dos especies.

Antes de la liofilización, el lote de una recolección clarificada o suspensión a granel puede mantenerse durante no más de 5 días a 4°C, pero se logra una conservación considerablemente más duradera si se congela a temperaturas de entre -20°C y -80°C.

2.2.4. Pruebas en lotes de producto final

i) Esterilidad y pureza

Las pruebas de esterilidad y ausencia de contaminación en materiales biológicos destinados a uso veterinario se describen en el capítulo 1.1.9.

El producto del lote final consiste en viales liofilizados producidos a partir de una sola suspensión a granel; un lote puede contener varios lotes de llenado. El contenido de un recipiente de cada lote de llenado debe exponerse a la neutralización con un antisuero de conejo contra la peste bovina, utilizando un método con virus variable/suero constante, e inocularse en células de riñón bovino primarias u otras células susceptibles. Se verifica la identidad del producto si no aparece ECP específico de la peste bovina.

ii) Inocuidad y eficacia

Los procedimientos pueden presentar ligeras variaciones dependiendo del país y el sistema de producción. En el caso de las reservas de inóculo vírico estabilizado, se pueden considerar innecesarias las pruebas de inocuidad y eficacia con animales.

Los animales que se utilizan en estos procedimientos deben mantenerse aislados de otros animales que sean susceptibles a la peste bovina. Al final del proceso, deben sacrificarse, y sus canales deben eliminarse de forma segura. Cuando se utiliza ganado bovino susceptible a la peste bovina, se combina el contenido de uno de cinco viales escogidos aleatoriamente y se utiliza para inocular dos o tres reses con un volumen equivalente a una dosis de campo para ganado bovino (teniendo en cuenta que una dosis de campo equivale a ≥ 1000 DICT₅₀). Además, se puede inocular una res con un volumen equivalente a 100 dosis de campo para ganado bovino. Estos animales se mantienen en una instalación para animales biológicamente segura durante las siguientes 2-3 semanas. Durante este periodo, se registra a diario la temperatura corporal de los animales y se les realizan exploraciones físicas frecuentes. Al final de este periodo, se comprueba en el ganado si presenta anticuerpos séricos neutralizantes contra la peste bovina (apartado B.2.2). La vacuna se considera inocua y efectiva si no induce reacción clínica anómala, excepto una ligera hipertermia si todos los animales vacunados presentan un título de anticuerpos neutralizantes contra el VPB de 1/10 o superior.

En términos generales, se ha comprobado ampliamente la inocuidad de la vacuna Plowright tanto en razas bovinas europeas como de la India, así como en razas enanas de África occidental. No se ha comprobado en razas japonesas ni chinas, y su inocuidad en tales animales no se puede garantizar. En cuanto a la vacuna LA-AKO se han realizado pruebas de inocuidad en razas altamente susceptibles, como la japonesa negra o la Holstein.

iii) Potencia del lote

La estrecha relación entre la potencia de inmunización y la infectividad permite que esta última se utilice como base para las estimaciones de potencia. Las titulaciones de infectividad se llevan a cabo utilizando células de una línea continua aprobada o células cultivadas a partir de cada uno de tres riñones bovinos o riñones de embrión bovino. El número de estimaciones del título del virus y el número de viales agrupados para cada estimación deben determinarse según el tamaño del lote y la reproducibilidad local del ensayo. La sensibilidad de las células utilizadas en cada sesión de trabajo debe medirse utilizando una preparación estándar de laboratorio del VPB de una instalación autorizada. El título final es la media geométrica de todas las estimaciones, cada una llevada a cabo con diluciones decimales y de cuatro a diez observaciones por dilución. Para que una vacuna sea potente debe contener ≥ 100 dosis de campo por vial.

2.3. Requisitos para la autorización

2.3.1. Requisitos de inocuidad

i) Inocuidad en especies de destino y no de destino

La vacuna Plowright no causa signos clínicos en ganado bovino ni en búfalos acuáticos susceptibles a la peste bovina. La vacuna con LA-AKO no causa signos clínicos excepto una ligera pirexia en ganado bovino susceptible al virus de la peste bovina. No se transmite por contacto a ganado bovino susceptible a la peste bovina que se encuentre muy cerca de animales vacunados.

ii) Reversión a la virulencia

El virus vacunal Plowright conserva la atenuación durante al menos cinco pases inversos en ganado bovino y carece de la capacidad de transmitirse por contacto. Toda sub-cepa de las cepas Plowright o LA-AKO utilizadas en la fabricación de la vacuna contra la peste bovina debe ser identificable por registros históricos escritos que permitan rastrearlas hasta conocer su origen en cualquiera de estas cepas vacunales.

iii) Consideraciones medioambientales

No hay consideraciones medioambientales respecto a la fabricación ni aplicación de la vacuna contra el VPB.

2.3.2. Requisitos de eficacia

i) Para la producción animal

Ambas vacunas protegen a los animales vacunados de la enfermedad clínica causada por una infección por un virus virulento de la peste bovina.

ii) Para el control y la erradicación

A efectos de erradicación, el objetivo debe ser utilizar vacuna para inmunizar cuanto antes a todos los animales susceptibles en el brote y sus proximidades (Taylor *et al.*, 2002).

2.3.3. Estabilidad

Tanto las cepas Plowright como la LA-AKO de la vacuna TCRV son muy estables si se liofilizan correctamente, y se conservarán mucho tiempo tanto a $+4^{\circ}\text{C}$ como a -20°C con tal de que el producto no pierda el vacío o se llene con nitrógeno. La velocidad de degradación de la TCRV liofilizada puede alterarse dependiendo del crioprotector escogido y de las variaciones en el ciclo de secado. Se obtienen resultados buenos con el empleo de: (a) hidrolizado de lactoalbúmina al 5% y sacarosa al 10%, un ciclo de secado de 72–74 horas bajo un vacío reducido, un secado inicial de 16 horas a -30°C , y una temperatura final de conservación de 35°C , o (b) un estabilizador a base de glutamato sódico al 1%/polivinilpirrolidona al 0,3%/sacarosa al 10%, un ciclo de secado de 48 horas a un vacío reducido (≤ 10 Pa), un secado inicial durante 24 horas a -45°C , una temperatura ambiente final de 22°C y un llenado del vial con nitrógeno.

Después de la reconstitución en solución salina normal o en sulfato magnésico 1 M, el virus es mucho más termolábil. El período para la distribución de la vacuna reconstituida en el campo no debe superar su semivida, pero como este parámetro depende de la temperatura y varía de 8 a 24 horas en un margen de 4°C a 37°C ; puede recomendarse un período universal de 4 .

3. Vacunas desarrolladas mediante ingeniería genética

Hasta ahora no se ha aprobado ninguna vacuna desarrollada mediante ingeniería genética.

BIBLIOGRAFÍA

ANDERSON J., BARRETT T. & SCOTT G.R. (1996). Manual on the Diagnosis of Rinderpest, Second Edition. FAO Animal Health Manual No.1. Food and Agriculture Organisation of the United Nations (FAO), Rome, Italy, 143 pp.

BARON M.D. & BARRETT T. (1995). Sequencing and analysis of the nucleocapsid (N) and polymerase (L) genes and the terminal extragenic domains of the vaccine strain of rinderpest virus. *J Gen. Virol.*, **76**, 593–602.

CARRILLO C., PRARAT M., VAGNOZZI A., CALAHAN J.D., SMOLIGA G., NELSON W.M. & RODRIGUEZ L.L. (2010). Specific detection of Rinderpest virus by real-time reverse transcription-PCR in preclinical and clinical samples from experimentally infected cattle. *J. Clin. Microbiol.*, **48**, 4094–4101.

FERNANDEZ P. & WHITE W. (2010). Atlas of Transboundary Animal Diseases. OIE, Paris.

FOREMAN A.J., ROWE L.W. & TAYLOR W.P. (1983). The detection of rinderpest antigen by agar gel diffusion and counterimmunoelectrophoresis. *Trop. Anim. Health Prod.*, **15**, 83–85.

FORSYTH M.A. & BARRETT T. (1995). Evaluation of polymerase chain reaction for the detection and characterisation of rinderpest and peste des petits ruminants viruses for epidemiological studies. *Virus Res.*, **39**, 151–163.

FUKAI K., MORIOKA K., SAKAMOTO K. & YOSHIDA K. (2011). Characterization of the complete genomic sequence of the rinderpest virus Fusan strain cattle type, which is the most classical isolate in Asia and comparison with its lapinized strain. *Virus Genes*, **43**, 249–253.

FURUTANI T., KATAOKA T., KURATA K. & NAKAMURA H. (1957a). Studies on the AKO strain of lapinized-avianized rinderpest virus. I. Avianization of lapinized rinderpest virus. *Bull. Natl. Inst. Anim. Health*, **32**, 117–135. (Abstract in English.)

FURUTANI T., ISHII S., KURATA K. & NAKAMURA H. (1957b). Studies on the AKO strain of lapinized-avianized rinderpest virus. II. Features of multiplication of the virus in embryonating hen eggs. *Bull. Natl. Inst. Anim. Health*, **32**, 136–149. (Abstract in English.)

KOCK R.A. (2006). Rinderpest and wildlife. In: Rinderpest and Peste des Petits Ruminants, Virus Plagues of Large and Small Ruminants, Barrett T., Pastoret P.-P. & Taylor W.P., eds. Academic Press, Oxford, UK, 143–162.

NAKAMURA J., AGATSUMA S. & FUKUSHO K. (1938). Rinderpest virus infection in rabbits I: Basic investigation. *Jpn J. Vet. Med. Sci.*, **17**, 185–204. (In Japanese only.)

NAKAMURA J. & MIYAMOTO T. (1953). Avianization of lapinized rinderpest virus. *Am. J. Vet. Res.*, **14**, 307–317.

PLOWRIGHT W. (1962). The application of monolayer tissue culture techniques in rinderpest research. II. The use of attenuated culture virus as a vaccine for cattle. *Bull. Off. int. Epiz.*, **57**, 253–276.

PLOWRIGHT W. & FERRIS R.D. (1961). Studies with rinderpest virus in cell culture. III. The stability of cultured virus and its use in neutralisation tests. *Arch. Gesamte Virusforsch.*, **11**, 516–533.

ROEDER P.L. & RICH K. (2009). Rinderpest Eradication in Millions Fed: Successes in Agriculture, Spielman D. & Pandya-Lorch R., eds. International Food Policy Research Institute, Washington, DC 20006-1002 USA; Chapter 16, 109–116.

SMITH E.M., ESTES M.K., GRAHAM D.Y. & GERBA C.P. (1979). A plaque assay for the simian rotavirus SA11. *J. Gen. Virol.*, **43**, 513–519.

TAKAMATSU H., TERUI K. & KOKUHO T. (2015). Complete genome sequence of Japanese vaccine strain LA-AKO of rinderpest virus. *Genome Announc.*, doi: 10.1128/genomeA.00976-15.

TAYLOR W.P. & BARRETT T. (2007). Peste des Petits Ruminants and Rinderpest in Diseases of Sheep, Fourth Edition, Aitken I.D., ed. Blackwell Publishing Ltd, Oxford, UK.

TAYLOR W.P., ROEDER P.L., RWEYEMAMU M.M., MELEWAS J.N., MAJUVA P., KIMARO R.T., MOLLEL J.N., MTEI B.J., WAMBURA P., ANDERSON J., ROSSITER P.B., KOCK R., MELENGEYA T. & VAN DEN ENDE R. (2002). The control of rinderpest in Tanzania between 1997 and 1998. *Trop. Anim. Health Prod.*, **34**, 471–487.

TAYLOR W.P. & ROWE L.W. (1984). A microneutralisation test for the detection of rinderpest virus antibodies. *Rev. Elev. Med. Vet. Pays Trop.*, **37**, 155–159.

WAMWAYI H.M., FLEMING M. & BARRETT T. (1995). Characterisation of African isolates of rinderpest virus. *Vet. Microbiol.*, **44**, 151–163.

*
* *

NB: Existen Laboratorios de Referencia de la OIE para la Peste bovina (puede consultarse la lista actualizada en la Tabla de la Parte 4 de este *Manual Terrestre* o en la página web de la OIE:

<http://www.oie.int/es/nuestra-experiencia-cientifica/laboratorios-de-referencia/lista-des-laboratorios/>).

Por favor, contacte los Laboratorios de Referencia de la OIE para cualquier otro dato sobre las pruebas de diagnóstico, los reactivos y las vacunas para la Peste bovina.

NB: ADOPTADO POR PRIMERA VEZ EN 1990: ÚLTIMAS ACTUALIZACIONES ADOPTADAS EN 2018.