

CAPÍTULO 3.1.24.

ESTOMATITIS VESICULAR

RESUMEN

La estomatitis vesicular (EV) es una enfermedad vesicular de los caballos y del ganado bovino y porcino causada por vesiculovirus de la familia Rhabdoviridae. En las especies susceptibles, no se puede diferenciar clínicamente de la fiebre aftosa o glosopeda (FA), del exantema vesicular porcino (EVP) ni de la enfermedad vesicular de los cerdos (EVC). Las ovejas, cabras y muchas otras especies salvajes pueden resultar infectadas. El hombre también es susceptible. La enfermedad es endémica en las Américas, pero en ocasiones se propaga a otros continentes.

Este virus se transmite directamente por vía transcutánea o transmucosa y se ha aislado de flebotomos y de mosquitos. Se ha comprobado la transmisión experimental de la mosca negra tanto a cerdos como a ganado bovino. Existe una variación estacional en los casos de EV: desaparece al final de la estación lluviosa en las áreas tropicales y, con las primeras heladas, en las zonas templadas. También hay pruebas de que podría ser un virus vegetal y que los animales son el final de la cadena epidemiológica. La patogenia de la enfermedad está poco clara, y se ha observado que los anticuerpos circulantes específicos no siempre evitan la infección por serogrupos distintos del virus de la EV.

Aunque se puede sospechar que se trata de la EV cuando hay caballos afectados, además de cerdos y vacas, es esencial un diagnóstico diferencial precoz porque los signos clínicos de la EV son imposibles de diferenciar de los de la FA cuando afecta al ganado bovino y al porcino, y de los de la EVC, la EVP y el senecavirus A cuando solo afecta a los cerdos.

El diagnóstico de la EV se lleva a cabo mediante aislamiento o poniendo de manifiesto antígeno o ácido nucleico del virus de la EVA en muestras de tejido o líquido. La detección de anticuerpos específicos del virus contra proteínas estructurales en sueros apareados también puede emplearse como indicador de la infección.

Detección del agente: El virus se puede aislar fácilmente por inoculación de varios sistemas de cultivo de tejidos, ratones lactantes o huevos embrionados de pollo. Se puede detectar ARN del virus en el tejido epitelial y en el líquido vesicular mediante la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) con transcripción inversa convencional y en tiempo real. El antígeno vírico se puede identificar mediante un ensayo inmunoquímico indirecto en sándwich (IS-ELISA) – esta es la prueba más rápida y barata. La prueba de fijación del complemento (CF) es también una buena alternativa. Puede utilizarse la prueba de neutralización del virus (NV), pero es elaborada y lleva tiempo.

Pruebas serológicas: Los animales convalecientes desarrollan anticuerpos específicos a los 4–8 días de la infección que se ponen de manifiesto mediante un ELISA de bloqueo en fase líquida (LP-ELISA), mediante un ELISA de competición (C-ELISA) y mediante la NV. Otras pruebas que se han descrito son la CF, la inmunodifusión en gel de agar y la contra-inmunolectroforesis. La demostración de anticuerpos específicos contra proteínas estructurales en animales no vacunados es indicativa de infección previa por el virus de la EV.

Requisitos para las vacunas: En EE.UU. y en Colombia se han usado vacunas con virus inactivados y con hidróxido de aluminio o aceite como adyuvantes, respectivamente. Ambas vacunas inducen unos niveles altos de anticuerpos específicos en los sueros del ganado bovino vacunado. Sin embargo, no está todavía claro que los anticuerpos séricos eviten la enfermedad. Se ha utilizado en condiciones de campo una vacuna con virus atenuados de eficacia desconocida.

A. INTRODUCCIÓN

La estomatitis vesicular (EV) fue descrita en Estado Unidos (EE.UU.) por Oltsky *et al.* (1926) y Cotton (1927) como una enfermedad vesicular de los caballos, y posteriormente del ganado bovino y de los cerdos. Las vesículas las causa el virus de la EV en la lengua, los labios, la mucosa bucal, los pezones y el epitelio de la banda coronaria del ganado bovino, los caballos, los cerdos y muchas otras especies de animales domésticos y salvajes. La enfermedad natural es muy infrecuente en las ovejas y las cabras, aunque ambas especies se pueden infectar experimentalmente. En los mismos rebaños de ganado bovino, se han presentado casos de infecciones mixtas por el virus de la fiebre aftosa (FA) y de la estomatitis vesicular (EV), y dichas infecciones se pueden inducir de modo experimental. También son susceptibles muchas especies de animales de laboratorio. La enfermedad es endémica en las Américas, pero en ocasiones se propaga a otros continentes.

En los humanos que están en contacto con animales afectados por EV o que manejan el virus infeccioso, se han observado signos semejantes a los de la gripe, normalmente sin vesículas. Las manipulaciones a nivel de laboratorio relacionadas con el virus, incluyendo la manipulación del material infeccioso de los animales, deben llevarse a cabo a un nivel de bioseguridad y biocontención adecuado, que se determinará con un análisis del riesgo (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*).

Los agentes patógenos que causan la estomatitis vesicular pertenecen a la familia *Rhabdoviridae*, género *Vesiculovirus*, y existen las siguientes cuatro especies: *Indiana vesiculovirus* - VSIV (antes IND-1), *Cocal vesiculovirus* - COCV (antes IND-2), *Alagoas vesiculovirus* - VSAV (antes IND-3) y *vesiculovirus* de Nueva Jersey. Han sido ampliamente estudiados a nivel molecular (Fowler *et al.*, 2016; ICTV, 2020; Pauszek *et al.*, 2011). Varios otros rhabdovirus estrechamente relacionados se han aislado de animales enfermos durante las últimas décadas. El VSIV, el virus Cocal y el virus Alagoas están relacionados serológicamente (Federer *et al.*, 1967). Las cepas de VSNJV y VSIV son endémicas en el ganado en áreas del sur de México, Centroamérica, Venezuela, Colombia, Ecuador y Perú, y VSVNJ causa la mayoría de los casos clínicos. Se ha reportado actividad esporádica de VSNJV y VSIV en el norte de México y el oeste de EE.UU. *Cocal vesiculovirus* se ha aislado de animales domésticos solo en Argentina y Brasil y solo de caballos (Salto-Argentina/63, Maipú-Argentina/86, Rancharia-Brasil/66, Ribeirão-Brasil/79) (Alonso *et al.*, 1991; Alonso Fernández y Sondahl, 1985). Este hallazgo confirma las primeras descripciones, en 1926 y 1927 (Cotton, 1927; Oltsky *et al.*, 1926) de VSNJV y VSIV, COCV, VSAV en caballos, y posteriormente en bovinos y porcinos; esta misma predilección se ha observado en otros brotes de EV. El virus Alagoas, (Alagoas-Brasil/64), ha sido identificado, endémicamente en el noreste de Brasil, en bovinos, equinos, porcinos, ovinos y caprinos (Alonso *et al.*, 1991; Alonso Fernandez & Sondahl, 1985; Cargnelutti *et al.*, 2014; PANAFTOSA-OPS/OMS, 2019; Rocha *et al.*, 2020).

El mecanismo de transmisión del virus no está claro. Los virus se han aislado de flebotomos, mosquitos y otros insectos (Comer *et al.*, 1992; Francy *et al.*, 1988; Mason, 1978). Se ha observado que se produce transmisión experimental del serotipo VSNJV de la mosca negra (*Simulium vittatum*) a cerdos y a ganado bovino (Mead *et al.*, 2004; 2009). Durante la epizootia de 1982 del oeste de EE.UU., hubo muchos casos de transmisión directa de animal a animal (Sellers & Maarouf, 1990). Históricamente, el VEV se ha considerado endémico entre los cerdos salvajes en Ossabaw Island, Georgia (Boring & Smith, 1962), pero posteriormente podría haber desaparecido de la isla (Killmaster *et al.*, 2011).

La incidencia de la enfermedad varía mucho entre los rebaños afectados. Normalmente, el 10-15% de los animales presenta signos clínicos. Se observan casos clínicos principalmente en animales adultos. Los bóvidos y los caballos de menos de 1 año de edad casi nunca resultan afectados. La mortalidad en ambas especies está cercana a cero. Sin embargo, se ha observado una elevada mortalidad en los cerdos afectados por el VSNJV. Los animales enfermos se recuperan aproximadamente a las 2 semanas. Las complicaciones de importancia económica más corrientes son la mastitis y la pérdida de producción en los rebaños lecheros (Lauerman *et al.*, 1962). Brotes recientes de VE de EE.UU. se han asociado principalmente a caballos y al VSNJV.

B. TÉCNICAS DE DIAGNÓSTICO

En las especies susceptibles, la EV no se puede diferenciar clínicamente con certeza de otras enfermedades vesiculares, como la fiebre aftosa o glosopeda (FA), el exantema vesicular porcino (EVP) o la enfermedad vesicular de los cerdos (EVC). En cualquier caso sospechoso de EV, es urgente un diagnóstico de laboratorio en las primeras fases de la enfermedad.

La toma de muestras y la tecnología utilizada para el diagnóstico de la EV deben estar en concordancia con la metodología utilizada para el diagnóstico de la FA (capítulo 3.1.8), el EVP y la EVC, a fin de facilitar el diagnóstico diferencial de estas enfermedades vesiculares.

Las mejores muestras para el diagnóstico son el líquido vesicular, el epitelio que cubre las vesículas no reventadas, los trozos de epitelio de las vesículas recién reventadas, o hisopos de las vesículas reventadas. Estas muestras se toman de las lesiones de la boca, así como de las patas y de otros sitios que presenten vesículas. Se recomienda sedar a los animales antes de obtener las muestras, con el fin de evitar lesiones en tanto en los propios animales como en las personas. Las muestras de tejidos o líquidos, incluidos hisopos de todas las especies, deben ponerse en recipientes con medio líquido de triptosa Tris tamponado (TBTB) y medio mínimo esencial (MEM) o tampón fosfato 0,08 M (con rojo fenol y antibióticos [1000 unidades/ml de penicilina, 100 unidades/ml de nistatina, 100 unidades/ml de neomicina y 50 unidades/ml de polimixina B], y ajustarse a pH 7,2–7,6. Las muestras tisulares también se pueden poner en tampón glicerol/fosfato con rojo fenol a pH 7,2–7,6. (Nota: el glicerol resulta tóxico para los cultivos celulares y disminuye la sensibilidad del aislamiento del virus). Las muestras deben enviarse al laboratorio sobre bloques de hielo, si pueden llegar al laboratorio en 48 horas después de ser recogidas. Si se precisan más de 48 horas de transporte, deben enviarse congeladas con hielo seco, tomando precauciones especiales para proteger la muestra del contacto directo con el CO₂. Hay requisitos especiales de embalaje para enviar muestras con hielo seco (para más información al respecto, véase el capítulo 1.1.2 *Recogida, presentación y almacenamiento de muestras para el diagnóstico*).

Teniendo en cuenta la necesidad de un diagnóstico diferencial con la fiebre aftosa, si no es posible obtener epitelio de vesículas no rotas o recién rotas o líquido vesicular, se pueden obtener muestras de líquido esofágico-faríngeo (OP) mediante vasos probang, únicamente en el caso de los rumiantes, como fuente alternativa de virus. Se debe mezclar el líquido probang con un volumen igual de líquido de transporte (véase el Capítulo 3.1.8 *Fiebre aftosa*). El recipiente debe ser capaz de resistir la congelación sobre hielo seco (dióxido de carbono sólido) o nitrógeno líquido (Kitching y Donaldson, 1987).

Cuando no es posible tomar muestras para la identificación del agente, se pueden utilizar muestras de suero para detectar y cuantificar anticuerpos específicos. En función de la prueba serológica que se utilice y de los antecedentes de estomatitis vesicular del país, puede ser necesario emplear muestras de suero apareadas del mismo animal, obtenidas con 7-14 días de diferencia.

Los reactivos específicos para el diagnóstico de la EV no están disponibles comercialmente y cada laboratorio debe producir los suyos u obtenerlos de un Laboratorio de Referencia. Los Laboratorios de Referencia de la OIE para la estomatitis vesicular¹ producen y distribuyen reactivos para diagnóstico, previa petición.

Tabla 1. Métodos analíticos disponibles para el diagnóstico de la estomatitis vesicular y su propósito

Método	Propósito					
	Demostrar ausencia de infección en la población	Demostrar ausencia de infección en animales individuales antes de los desplazamientos	Contribuir a las políticas de erradicación	Confirmar casos clínicos	Determinar la prevalencia de la infección – vigilancia	Determinar el estado inmunitario en animales o poblaciones tras la vacunación***
Detección del agente ^(a)						
Aislamiento del virus*	–	+	–	+++	–	–
IS-ELISA*	–	+	–	+++	–	–
CF*	–	+	–	++	–	–
RT-PCR*	–	+	–	++	–	–

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

Método	Propósito					
	Demostrar ausencia de infección en la población	Demostrar ausencia de infección en animales individuales antes de los desplazamientos	Contribuir a las políticas de erradicación	Confirmar casos clínicos	Determinar la prevalencia de la infección – vigilancia	Determinar el estado inmunitario en animales o poblaciones tras la vacunación***
Detección de la respuesta inmunitaria ^(b)						
LP-ELISA**	+++	++	++	++	+++	++
C-ELISA**	+++	++	++	-	+++	++
VN**	+++	+++	+++	++	++	+++
CF**	-	+	+	++	+	-

Clave: +++ = método recomendado; ++ = método recomendado pero con limitaciones; + = puede utilizarse en muy pocas situaciones.

IS-ELISA = enzimoimmunoanálisis indirecto de tipo sándwich; CF = fijación del complemento;

RT-PCR = reacción en cadena de la polimerasa con transcripción inversa; LP-ELISA = enzimoimmunoanálisis de bloqueo en fase líquida; C-ELISA = ELISA de competición; VN = neutralización del virus

*Solo deben utilizarse en animales que presenten signos clínicos compatibles con el VEV. Un resultado positivo es significativo. Un resultado negativo podría indicar que el animal ya no excreta el virus, que el nivel de virus es demasiado bajo como para ser detectado o, en el caso de las muestras destinadas al aislamiento del virus, que las muestras no se han mantenido a temperaturas adecuadas y que se ha tardado demasiado en enviarlas tras su extracción para el aislamiento del virus (el virus se ha inactivado).

**La presencia de anticuerpos contra el VEV solo indica una exposición previa al virus. No sirve para saber si los anticuerpos se deben a una infección actual o pasada. Es posible que sean necesarios sueros apareados de los mismos animales, obtenidos al menos con 7-14 días de diferencia, para evaluar la seroconversión en función de la prueba serológica que se utilice y del historial de estomatitis vesicular.

La interpretación de los resultados debe basarse en los resultados serológicos, en el cuadro clínico y en la epidemiología. En los animales, los anticuerpos que se detectan mediante CF suelen durar menos de 1 año. Los anticuerpos que se detectan mediante la prueba de la VN y el ELISA de competición pueden detectarse durante años tras la infección. La diferencia de sensibilidad entre las pruebas serológicas influye en la detección durante la fase aguda de la infección; por lo tanto, cuando un animal empieza a mostrar signos clínicos agudos de EV es necesario combinar varias pruebas, como un C-ELISA y una CF, o bien tomar muestras apareadas, que serán diagnósticas si en la segunda se observa una cuadruplicación del título respecto a la primera (mediante CF, VN, LP-ELISA).

***Indica solo la presencia de anticuerpos; no indica protección frente a la infección.

^(a)Se recomienda utilizar una combinación de métodos de identificación del agente con la misma muestra clínica.

^(b)Es suficiente con una de las pruebas serológicas de la lista.

1. Detección del agente

1.1. Visualización directa

Debido a las diferentes características morfológicas de los rhabdovirus (virus del serogrupo de la EV), picornavirus (virus de la FA, VEV y senecavirus A) calicivirus (VEP), y del gran número de partículas víricas presente en los líquidos vesiculares y en los tejidos epiteliales, la microscopía electrónica puede ser un instrumento de diagnóstico útil para averiguar cuál es la familia de virus implicada.

1.2. Aislamiento del virus en cultivo celular

Para la identificación de los virus de la EV y el diagnóstico diferencial de las enfermedades vesiculares, se deben someter a pruebas inmunológicas las suspensiones clarificadas de las muestras que sean sospechosas de contener el virus. Para el aislamiento del virus, se inoculan las mismas muestras en cultivos celulares apropiados. La inoculación de la muestra en cultivos celulares de riñón de mono verde africano (Vero), riñón de hámster neonato (BHK-21) o IB-RS-2 permite la diferenciación de las enfermedades vesiculares: los virus de la EV causan un efecto citopático (ECP) en las tres líneas celulares; el virus de la FA causa ECP en BHK-21 y en IB-RS-2, mientras que el virus de la EVC solo

causa ECP en IB-RS-2. Muchas otras líneas celulares, así como la mayoría de los cultivos primarios de células de origen animal, son susceptibles a los virus del serogrupo de la EV.

1.2.1. Procedimiento analítico

- i) Cuando se haya obtenido tejido en solución salina tamponada con fosfato (PBS)/glicerol, se debe secar en papel absorbente para reducir el contenido de glicerol, que es tóxico para los cultivos celulares, y se debe pesar. Luego se prepara una suspensión usando un triturador de tejidos o moliendo la muestra en arena estéril en un mortero estéril con un pequeño volumen de medio de cultivo tisular y antibióticos. Se debe agregar más medio hasta que se haya agregado un volumen final nueve veces mayor que el de la muestra epitelial original, dando una suspensión al 10%. En el caso de las muestras de hisopos, se prepara una solución al 10% utilizando el medio de cultivo celular. La muestra se clarifica en una centrifuga de mesa a 2 000 *g* durante al menos 10 minutos.
- ii) La suspensión clarificada de tejidos, hisopos o líquido vesicular de muestras de campo que se sospecha contienen el VEV se inoculan en recipientes de cultivo celular (células BHK-21, IB-RS-2 o Vero).
- iii) Se incuban los cultivos celulares inoculados a 37°C durante 1 hora (adsorción).
- iv) Se desecha el inóculo y se lavan los cultivos celulares tres veces con medio de cultivo celular y se reemplaza con medio de cultivo celular que contenga suero fetal bovino (FBS) al 2,5%.
- v) Se incuban las placas, tubos de plástico o matraces de cultivos celulares a 35–37°C y se observa el efecto citopático (ECP). Los cultivos celulares deben examinarse en busca de ECP durante 48 a 72 horas. Si después de 72 horas no se ha detectado ECP, se debe realizar un pase a ciegas. El cultivo celular se congela-descongela y se clarifica por centrifugación, y el sobrenadante se usa para la inoculación de monocapas frescas o suspensión celular. La muestra se considera negativa si no hay evidencia de ECP después de un promedio de tres pases ciegos en cultivos celulares; se pueden realizar pases más largos, de hasta 7 días, si la cantidad total de los mismos es menor.
- vi) La reacción en cadena de la polimerasa con transcripción inversa (RT-PCR) puede usarse para identificar la recuperación del virus, usando conjuntos apropiados de cebadores (Rainwater-Lovett *et al.*, 2007; Sepulveda *et al.*, 2007). Como alternativa, se pueden utilizar métodos inmunológicos para la identificación de los antígenos virales, como el enzimoimmunoanálisis (ELISA) (Alonso *et al.*, 1991; Ferris y Donaldson, 1988), la prueba de fijación del complemento (CFT) (Alonso *et al.*, 1991; Jenny *et al.*, 1958) o la tinción con anticuerpos fluorescentes. La prueba de neutralización del virus (VNT), con antisueros positivos conocidos contra el VSNJV y el VSIV, puede usarse en cultivos tisulares o huevos embrionados, pero requiere más tiempo.

1.3. Pruebas *in-ovo*

El virus se multiplica y puede aislarse de embriones de pollo de 8–10 días de edad mediante la inoculación en el saco alantoideo.

1.4. Enzimoimmunoanálisis

El ELISA indirecto en sándwich (IS-ELISA) (Alonso *et al.*, 1991; Ferris & Donaldson, 1988) es un método de diagnóstico habitual para identificar la EV y otras enfermedades vesiculares. Específicamente, el procedimiento ELISA con un conjunto de antisueros polivalentes de conejo/cobaya, preparados contra viriones para cepas representativas de VSIV, COCV y VSAV (Alonso *et al.*, 1991). Para la detección del VSNJV, es adecuado un conjunto monovalente de antisueros de conejo/cobaya (Alonso *et al.*, 1991; Ferris y Donaldson, 1988)..

1.4.1. Procedimiento analítico

- i) *Fase sólida:* Las placas de ELISA se recubren durante 1 hora a 37°C o durante toda la noche a 4°C con antisuero de conejo y suero normal de conejo (como han descrito Alonso *et al.*, 1991), y lo óptimo es diluirlos en tampón de carbonato/bicarbonato, a pH 9,6. Después, las

placas se lavan una vez con solución salina tamponada con fosfato (PBS) y se bloquean durante 1 hora a temperatura ambiente con un 1% de ovoalbúmina de Grado V (grado de purificación) en PBS. Las placas se lavan tres veces y pueden utilizarse de inmediato o guardarse a -20°C para uso futuro.

- ii) *Muestras problema:* Se depositan en los correspondientes pocillos las suspensiones de antígeno de las muestras problema (suspensiones al 10–20% de tejido epitelial en PBS o en medio mínimo esencial (MEM), o sobrenadantes clarificados de cultivos celulares sin diluir) y se incuban las placas 1 hora a 37°C en un agitador orbital.
- iii) *Detector:* A los pocillos correspondientes se añaden antisueros monovalentes VSNJV o polivalentes obtenidos en cobaya contra VSIV, COCV y VSAV, que sean homólogos al suero de conejo de recubrimiento y que se han diluido convenientemente en PBS con un 0,05% de Tween 20, un 1% de ovoalbúmina de Grado II, un 2% de suero normal de conejo y un 2% de suero bovino normal (PBSTB). Se deja reaccionar durante 30–60 minutos a 37°C en un agitador orbital.
- iv) *Conjugado:* Se añade un conjugado de peroxidasa/IgG obtenida en conejo o cabra anti-Ig de cobaya, diluido en PBSTB, y se deja reaccionar durante 30–60 minutos a 37°C en un agitador orbital.
- v) *Sustrato:* Se añade como sustrato H_2O_2 y se deja reaccionar a temperatura ambiente durante 15 minutos, añadiendo después ácido sulfúrico para detener la reacción. Los valores de absorbancia se miden en un lector de ELISA.

A lo largo de la prueba, se utilizan volúmenes de reactivo de 50 μl . Las placas se lavan tres-cinco veces en cada paso con suero fisiológico o PBS que contenga un 0,05% de Tween 20. Se incluyen controles de los reactivos utilizados.

- vi) *Interpretación de los resultados:* Los valores de absorbancia de los pocillos control positivos y negativos deben encontrarse dentro de los valores especificados de aceptación. Los pocillos con muestra problema que den una absorbancia $\geq 0,3$ se considerarán positivos para el correspondiente subtipo vírico. Los valores de absorbancia $< 0,3$ – $0,2$ se considerarán sospechosos, y los valores $< 0,2$ se considerarán negativos para el correspondiente subtipo vírico. Las muestras sospechosas y negativas deberán inocularse en cultivo celular y los pasajes deberán volver a analizarse mediante ELISA.

1.5. Prueba de la fijación de complemento

El método IS-ELISA es preferible a la CF, porque es más sensible y no está afectado por factores pro- ni anti-complemento. Sin embargo, cuando no se dispone de reactivos para el ELISA, se puede realizar la CF. Se describe la CF para placas de microtitulación con pocillos de fondo en forma de U, utilizando los reactivos titulados mediante la prueba de la CF50%.

1.5.1. Procedimiento analítico

- i) *Antisueros:* Se depositan en los pocillos de la placa antisueros monovalentes de cobaya contra el VSNJV y antisueros polivalentes de cobaya contra VSIV, COCV y VSAV, diluidos en tampón barbital o un tampón CF alternativo en una dilución que contenga 2,5 CFU_{50} (unidades de 50% de fijación de complemento), contra el virus homólogo. Estos antisueros son los detectores utilizados en la prueba ELISA.
- ii) *Muestras problema:* Se añaden a los pocillos con suero las suspensiones de antígeno de las muestras problema, preparadas como se describe para la prueba IS-ELISA.
- iii) *Complemento:* Se añaden al suero y al antígeno 4 CHU_{50} (unidades de complemento que causan un 50% de hemólisis). (Una alternativa es utilizar 7,5, 10 y 20 CHU_{50} con objeto de alcanzar 4 CHU_{50} en la prueba). La mezcla de antisueros, muestras problema y complemento se incubaba a 37°C durante 60 minutos.
- iv) *Sistema hemolítico:* Se añade a los pocillos una suspensión de eritrocitos de oveja en tampón CF, sensibilizados con 10 HU_{50} (unidades hemolíticas que causan un 50% de hemólisis) de suero de conejo anti-eritrocitos de oveja. El sistema hemolítico tiene un valor de absorbancia de 0,66 a 545 nm, en la proporción de dos volúmenes de sistema hemolítico más tres volúmenes de agua destilada. La mezcla se incubaba durante

30 minutos a 37°C. A continuación, las placas se centrifugan y la reacción se observa visualmente.

Se necesitan volúmenes de 25 µl para los antisueros, muestras problema y complemento, y 50 µl de sistema hemolítico. Se incluyen los controles apropiados de los antisueros, antígenos, complemento, y sistema hemolítico.

Es posible llevar a cabo la CF50% en tubos (Alonso et al., 1991) utilizando volúmenes de reactivo de 200 µl (ocho veces superiores a los indicados para la CFT en placas de microtitulación). Con la prueba CF50%, la reacción se puede expresar como lectura espectrofotométrica de la absorbancia a 545 nm.

- v) *Interpretación de los resultados:* Cuando los controles reaccionan como es esperable, las muestras con una hemólisis de un antisuero un 20% inferior a la del otro y a la de los controles, se consideran positivas para el tipo correspondiente.

Las muestras de campo negativas según las pruebas de ELISA o CFT deben inocularse en cultivos celulares. Si no hay evidencia de infección vírica después de tres pases, la muestra se considera negativa para el virus.

1.6. Métodos moleculares

Se puede utilizar la PCR para amplificar pequeñas áreas genómicas del virus de la EV (Hofner et al., 1994; Hole et al., 2010; Rodriguez et al., 1993; Wilson et al., 2009). Con esta técnica se detectará la presencia del ARN del virus en las muestras de tejidos y de los líquidos vesiculares, así como en el cultivo celular, aunque no permite determinar si el virus es infeccioso.

El diagnóstico de VS en muestras de epitelio, líquido vesicular y cultivo celular por métodos moleculares es el más adecuado para la confirmación de la enfermedad. No se ha descrito ningún protocolo de cribado que permita la detección de todas las especies de vesiculovirus de interés económico. Sin embargo, existen algunas pruebas multiplex que se describen a continuación que permiten la detección de más de una especie viral. Por lo tanto, para un diagnóstico diferencial, se necesitan diferentes protocolos para detectar todos los virus VS.

La extracción de ácido nucleico de la muestra debe realizarse de acuerdo con las instrucciones del fabricante.

Se han descrito métodos para detectar y tipificar los cuatro virus VS utilizando RT-PCR en tiempo real y convencional.

1.6.1. Detección mediante RT-PCR en tiempo y tipificación

VSNJV, VSIV, COCV y VSAV se pueden detectar y tipificar utilizando los métodos de RT-PCR en tiempo real descritos por Hole et al. (2010) con las adaptaciones de Oliveira et al. (2018) y Sales et al. (2020) y los cebadores y sondas descritos en la Tabla 2.

Hole et al. (2010) desarrollaron una RT-PCR en tiempo real que permite diferenciar entre VSIV y VSNJV con buen rendimiento. Las concentraciones de cebador deben ser 0,2 mM, excepto el VSNJV inverso, que es 0,8 mM, y las concentraciones de sonda deben ser 0,2 mM para el VSNJV y 0,1 mM para el VSIV. El protocolo de RT-PCR en tiempo real consiste en ciclos de transcripción inversa a 50°C durante 30 minutos y desnaturalización a 95°C durante 1 minuto, seguidos de 45 ciclos de 95°C durante 15 segundos, 54°C durante 30 segundos y 72°C durante 60 segundos. La reacción se realiza de acuerdo con las instrucciones del fabricante del kit, agregando MgSO₄ (4 mM).

Debido al grado de variación genética de este virus en algunas regiones, de Oliveira et al. (2018) desarrollaron un método para detectar el VSAV mediante RT-PCR múltiple en tiempo real con excelente sensibilidad y especificidad. La prueba se realiza de acuerdo con las instrucciones del fabricante del kit, y la concentración de los cebadores en un volumen final de 25 µl fue de 0,4 µM. El protocolo de la RT-PCR en tiempo real consiste en ciclos de transcripción inversa a 50°C durante 10 minutos y desnaturalización a 95°C durante 5 minutos seguidos de 45 ciclos de 95°C durante 10 segundos y 60°C durante 1 minuto.

Sales et al. (2020) describieron un protocolo de RT-PCR en tiempo real para el diagnóstico de COCV. La prueba se realiza según las instrucciones del fabricante del kit, y la concentración de cada cebador es 0,1 µM y la de la sonda 0,4 µM, en un volumen final de 25 µl. El protocolo de la RT-PCR en tiempo real consiste en ciclos de transcripción inversa de 45°C durante 10 minutos y de desnaturalización a 95°C durante 5 minutos, seguidos de 45 ciclos de 95°C durante 10 segundos y 60°C durante 1 minuto.

Tabla 2. Oligonucleótidos diana para la RT-PCR en tiempo real del VEV

RT-PCR en tiempo real para la estomatitis vesicular		
Técnica múltiple para <i>New Jersey vesiculovirus</i> e <i>Indiana vesiculovirus</i>		
Nombre	Secuencia (5'-3')	Referencia
VSNJV 7230-7254	Forward: TGA-TTC-AAT-ATA-ATT-ATT-TTG-GGA-C	Hole et al. (2010)
VSNJV 7476-7495 R	Reverse: AGG-CTC-AGA-GGC-ATG-TTC-AT	
VSNJV 7274-7296 P 1	Probe: FAM-TTT-ATG-CAT-GAC-CCW-GCA-ATA-AG-NFQ-MGB	
VSNJV 7334-7353 P 2	Probe: FAM-TTG-CAC-ACC-AGA-ACA-TTC-AA-BHQ1	
VSIV 7230-7254 IN F	Forward: TGA-TAC-AGT-ACA-ATT-ATT-TTG-GGA-C	
VSIV 7433-7456 IN R	Reverse: GAG-ACT-TTC-TGT-TAC-GGG-ATC-TGG	
VSIV 7274-7290 P	Probe: VIC- ATG-ATG-CAT-GAT-CCA-GC-NFQ-MGB	
<i>Alagoas vesiculovirus</i>		
Nombre	Secuencia (5'-3')	Referencia
VSAV-3.GP.95.F	Forward: GGG-TWA-ACA-TCC-GTG-CTA	de Oliveira et al. (2018)
VSAV-3.GP.95.R	Reverse: GTC-ACA-AGT-GGT-GAT-CCA	
VSAV-3.GP.95.S	Probe: FAM-cac+Atc+Cat+Cca+Tcagc-lowaBlack	
VSAV.LP.78.F	Forward: GTC-CAT-CAA-CCC-ATT-GTT-CC	
VSAV.LP.78.R	Reverse: ATC-AAT-CCA-TCT-GCG-ACT-CC	
VSAV.LP.78.S	Probe: FAM-CGC-GAT-TCT-TAA-GTG-AGT-TCA-AAT-CAG-GA-lowaBlack	
VSAV.GP.87.F	Forward: GAG-TGT-GGA-TCA-ACC-CAG	
VSAV.GP.87.R	Reverse: CTG-TGG-CTT-GAA-CRA-TCA	
VSAV.GP.87.S	Probe: FAM-CTGC+GGTTATG+CC+TCCA-lowaBlack	
<i>Cocal vesiculovirus</i>		
Nombre	Secuencia (5'-3')	Referencia
COCV.GP.81.F	Forward: CGT-TGC-TGT-GAT-TGT-YCA	Sales et al. (2020)
COCV.GP.81.R	Reverse: GGG-AAC-TGG-GAG-TCA-ATC	
COCV.GP.81.S	Probe: FAM-ctc+Atc+Cac+Caa+Cacat -BHQ1	

1.6.2. Detección mediante RT-PCR convencional y tipificación

VSNJV, VSIV, COCV y VSAV también se pueden detectar y tipificar utilizando los métodos de RT-PCR descritos por Rodríguez et al. (1993) y Pauszek et al. (2008; 2011), y los cebadores descritos en la Tabla 3. Después de obtener el ADNc por transcripción inversa, se realiza la PCR convencional. El protocolo para todas las RT-PCR descritas consiste en ciclos de desnaturalización a 94°C durante 3 minutos seguidos de 40 ciclos de 94°C durante 1 minuto,

50°C durante 1 minuto y 72°C durante 1 minuto, y el paso de extensión debe realizarse a 72°C durante 5 minutos.

De Oliveira *et al.* (2018) desarrollaron una RT-PCR para detectar *Cocal vesiculovirus*. La prueba se realiza de acuerdo con las instrucciones del fabricante del kit, con una concentración de cada cebador de 1 µM en un volumen final de 20 µl. El protocolo de RT-PCR consiste en ciclos de transcripción inversa a 50°C durante 30 minutos y desnaturalización a 95°C durante 15 minutos seguidos de 40 ciclos de 94°C durante 1 minuto, 54°C durante 1 minuto y 72°C durante 1 minuto.

Tabla 3. Cebadores y referencias para la RT-PCR convencional del VEV

RT-PCR convencional del virus de la estomatitis vesicular		
<i>New Jersey vesiculovirus</i> e <i>Indiana vesiculovirus</i>		
Nombre	Secuencia (5'-3')	Referencia
P 102	Forward: GAG-AGG-ATA-AAT-ATC-TCC	Rodriguez <i>et al.</i> (1993)
P 744	Reverse: GGG-CAT-ACT-GAA-GAA-TA	
P 179	Forward: GCA-GAT-GAT-TCT-GAC-AC	
P 793	Reverse: GAC-TCT-(C/T)GC-CTG-(A/G)TT-GTA	
<i>Cocal vesiculovirus</i> y <i>Alagoas vesiculovirus</i>		
Nombre	Secuencia (5'-3')	Referencia
COCV P66	Forward: AAT-TGG-ATG-ACG-CMG-TCC-A	Pauszek <i>et al.</i> (2008)
COCV P711	Reverse: CCT-CCD-ACH-GAR-ATG-AAY-TCT-CC	
VSAV PJX	Forward: TAT-GAA-AAA-AAI-TAA-CAG-IIA-TC	
VSAV P711	Reverse: CCT-CCD-ACH-GAR-ATG-AAY-TCT-CC	
PCR anidada para <i>Cocal vesiculovirus</i> y <i>Alagoas vesiculovirus</i>		
Nombre	Secuencia (5'-3')	Referencia
COCV P169	Forward: TTA-CCA-AAA-TCA-GGA-GGA-TGA	Pauszek <i>et al.</i> (2011)
COCV P686	Reverse: GCC-TCC-CAC-CGA-GAT-G	
VSAV P163	Forward: AGA-GCA-GCT-CCY-TCT-TAT-TAT	
VSAV P691	Reverse: TCA-TCA-TTC-CAT-TTC-CTC	
RT-PCR de un paso para <i>Alagoas vesiculovirus</i>		
Nombre	Secuencia (5'-3')	Referencia
VASV - P.722 F	Forward: GGG-GCC-ATT-CAA-GAG-ATA-GA	de Oliveira <i>et al.</i> (2018)
VASV -P.722 R	Reverse: TGA-TAT-CTC-ACT-CTG-GCC-TGA-TTA-T	

2. Pruebas serológicas

Para la identificación y la cuantificación de anticuerpos específicos en el suero, las pruebas de elección son el ELISA y la NV. La prueba de la CF se puede utilizar para la cuantificación de los anticuerpos tempranos. Generalmente se pueden detectar anticuerpos entre 5 y 8 días después de la infección; el tiempo de persistencia de los anticuerpos no se ha determinado con exactitud con las tres pruebas, pero se considera que es relativamente corto según la CF, y largo según la NV y el ELISA (Katz *et al.*, 1997).

El ELISA competitivo (C-ELISA) puede ser preferible a la CFT porque es más sensible y no se ve afectado por factores pro o anti-complementarios; sin embargo, durante un brote en el que puede haber animales expuestos anteriormente, para asegurar la capacidad de distinguir la exposición reciente de la pasada es importante escoger adecuadamente la prueba y las muestras de suero apareadas obtenidas con al menos 7-14 días de

diferencia. Sin embargo, cuando no se dispone de reactivos para el C-ELISA, se puede realizar la CFT. Se describe la CFT en placas de microtitulación con fondo en U, utilizando los reactivos titulados mediante la prueba CF50%.

2.1. Enzimoimmunoanálisis de bloqueo en fase líquida

El ELISA de bloqueo en fase líquida (LP-ELISA) es un método para la detección y cuantificación de anticuerpos contra virus del serogrupo de la EV. Se recomienda el uso de las glucoproteínas víricas como antígeno, porque no son infecciosas, permiten detectar los anticuerpos neutralizantes y proporcionan menos falsos positivos que la NV (Allende *et al.*, 1992).

2.1.1. Procedimiento analítico

- i) Fase sólida: Tal como se ha descrito arriba en el apartado B.1.5. para la prueba IS-ELISA.
- ii) Fase líquida: En placas de microtitulación con pocillos de fondo en U, se preparan series de diluciones a la mitad-una quinta parte de cada suero a analizar, comenzando con la dilución a 1/4. Se añade a cada pocillo un volumen igual de glucoproteína VSNJV o VSIV del virus de la EV, en una dilución predeterminada, y las placas se incuban 1 hora a 37°C. A continuación se transfieren 50 µl de estas mezclas a las placas ELISA con la fase sólida y se dejan reaccionar durante 30 minutos a 37°C en un agitador orbital.
- iii) Detector, conjugado y sustrato: Se utilizan los pasos descritos para el IS-ELISA empleando antiseros monovalentes homólogos respecto al antígeno problema, como detectores.
- iv) Interpretación de los resultados: Los títulos a punto final 50% se expresan en log₁₀, en referencia a la DO 50% del antígeno control, de acuerdo con el método de Spearman-Kärber. Los títulos >1,0 (1/10) se consideran positivos.

2.2. Enzimoimmunoanálisis de competición

También se ha desarrollado un método ELISA de competición para la detección de anticuerpos. El procedimiento que se describe aquí se basa en el descrito por Afshar *et al.* (1993). En él se utilizan los antígenos recombinantes VSNJV y VSIV de la estomatitis vesicular según lo descrito por Katz *et al.* (1995).

2.2.1. Procedimiento analítico

- i) Fase sólida: Los antígenos se diluyen en tampón carbonato/bicarbonato, a pH 9,6, y se añaden 75 µl a cada pocillo de una placa ELISA de 96 pocillos. Se incuban las placas durante toda la noche a 4°C; las placas recubiertas se pueden guardar, con antígeno *in situ*, hasta 30 días a -70°C. Se descongelan las placas, se decanta el antígeno y se añaden 100 µl de solución bloqueante (solución al 5% de leche en polvo desnatada en PBS [por ejemplo, se disuelven 5 g de leche en polvo en 95 ml de PBS]). A continuación, se incuban las placas durante 15-30 minutos a 25°C y se decanta la solución bloqueante. Las placas se lavan tres veces con una solución de PBS/0,05% de Tween 20.
- ii) Fase líquida: Se añaden 50 µl de suero diluido a 1/8 en leche en polvo desnatada al 1% en PBS a cada uno de los pocillos duplicados para cada muestra. En cada placa de ELISA debe incluirse un suero control positivo y uno negativo para cada especie vírica. Se incuban las placas a 37°C durante 30 minutos. Sin lavar, se añaden 50 µl de líquido biorreactor a cada pocillo y las placas se incuban a 37°C durante 30 minutos.
- iii) Detector: Se lavan las placas tres veces y se añaden a cada pocillo 50 µl de suero anti-ratón obtenido en cabra y conjugado con peroxidasa de rábano y diluido en leche en polvo desnatada al 1% con suero normal de cabra al 10%. Se incuban las placas a 37°C durante 30 minutos, se lavan tres veces, y se añade a cada pocillo 50 µl de solución de tetrametilbenzidina (TMB) como sustrato. Se incuban las placas a 25°C durante 5-10 minutos y después se añaden a cada pocillo 50 µl de ácido sulfúrico 0,05 M. Se leen las placas a 450 nm, y la densidad óptica de los pocillos del diluyente control debe ser > 1,0.
- iv) Interpretación de los resultados: Una muestra es positiva si la absorbancia es ≤50% de la absorbancia del diluyente control. Es importante tener en cuenta que se han observado

caballos infectados de forma natural por el virus VSNJV que han dado positivo en esta prueba al menos durante 8 años tras la infección.

2.3. Neutralización del virus

Virus y células: VSIV, COCV, VSAV y VSNJV se propagan en monocapas de células BHK, IB-RS-2 o Vero y se conservan en nitrógeno líquido o congelados a -70°C (Allende et al., 1992).

2.3.1. Procedimiento analítico

- i) Los sueros problema se inactivan por calor, incluidos los sueros estándar de control, durante 30 minutos a 56°C .
- ii) A partir de una dilución 1/8, los sueros se diluyen dos o cuatro veces en medio de cultivo celular, y la serie de diluciones se continúa en una placa de microtitulación de 96 pocillos de fondo plano de grado de cultivo celular utilizando al menos dos filas de pocillos, aunque preferiblemente cuatro (según el grado de precisión requerido) y un volumen de 50 μl por pocillo. Se utiliza un pocillo adicional con suero problema de dilución 1/8 para el control de la toxicidad de los sueros. También se incluyen en la prueba diluciones de los sueros control con títulos conocidos (positivo, positivo débil y negativo).
- iii) Se agregan 50 μl por pocillo de la cepa del VEV (reserva de VSIV, COCV, VSAV y VSNJV a una dilución en medio de cultivo calculada para proporcionar 100 DICT₅₀ (dosis infectiva en cultivo tisular en el 50% de los casos) por pocillo. En los pocillos destinados a control de toxicidad, se agregan 50 μl de medio de cultivo en lugar de virus. Se añaden 100 μl de medio de cultivo a una fila de pocillos vacíos como controles celulares. También se lleva a cabo una titulación por retroceso del virus reserva, al menos cuatro pocillos por dilución, para comprobar la potencia del virus (límites de aceptación de dosis: 32–320 DICT₅₀ por pocillo). Un protocolo alternativo puede ser una dosis de virus de 1000 DICT₅₀ por pocillo (rango de tolerancia entre 750 y 1270 y DICT₅₀) para aumentar la especificidad de la prueba.
- iv) Se incuban las placas durante 60 minutos a 37°C en una atmósfera de CO_2 al 3-5% para permitir la neutralización del virus.
- v) Se añaden 100 μl por pocillo de la suspensión de células BHK, IB-RS-2 o Vero a 3×10^5 ml, que contiene FBS al 10% para el crecimiento celular.
- vi) Se incuban las placas durante 48–72 horas a 37°C , ya sea en una atmósfera de CO_2 al 3–5% o sembrando la placa con cinta sensible a la presión, e incubándola.
- vii) Se comprueba si los cultivos celulares presentan ECP y se leen los resultados: pocillos de monocapa positivos: donde el virus ha sido neutralizado, no tienen ECP y las células permanecen intactas (láminas de células teñidas de azul); pocillos negativos: donde el virus no ha sido neutralizado, presentan ECP (cavidad vacía - sin tinción). Si se usa tinción, las células se fijan con formol/solución salina al 10% durante 30 minutos. Para la tinción, las placas se sumergen en violeta cristal al 0,1% en etanol al 1% y formalina tamponada al 5% durante 30 minutos.
- viii) Se valida la prueba comprobando la titulación por retroceso del virus (que debe dar un valor de 100 DICT₅₀ por pocillo con un rango admisible de 32–320 DICT₅₀), de los sueros control y de los pocillos de control celular. El suero control positivo debe dar un título de dilución doble ($\pm 0,3 \log_{10}$ unidades) de su valor objetivo. El suero positivo débil debe ser positivo. El suero negativo no debe dar ninguna neutralización. En los pocillos de control celular, las monocapas deben estar intactas.
- ix) *Interpretación de los resultados:* Títulos de neutralización vírica de las respuestas de anticuerpos séricos (los títulos se expresan como la dilución final del suero presente en la mezcla suero/virus donde el 50% de los pocillos están protegidos). Esto se puede calcular mediante los métodos de Spearman – Kärber o de Reed Muench. El título de neutralización del 50% de cada suero se expresa como log 10. Cuando solo se realizan dos repeticiones por dilución, se puede tomar la mayor inversa de la dilución que neutralizó el 100% de las cavidades. En general, un título de ≥ 32 (1,5) o más de la dilución de suero final en la mezcla de suero/virus se considera positivo para anticuerpos del VEV. Se anima a los laboratorios

a verificar este límite internamente, con reactivos proporcionados por un Laboratorio de Referencia de la OIE, cuando los haya. Si se observa citotoxicidad en los pocillos control, se considera que la muestra es tóxica (sin resultado) a menos que se observe neutralización del virus sin citotoxicidad a diluciones más altas y se pueda leer un título sin ambigüedad. (Allende *et al.*, 1992).

Nota: Se considera que hay seroconversión cuando hay un aumento de cuatro veces en el título de anticuerpos entre muestras de suero apareadas obtenidas con un intervalo mínimo de 7 a 14 días entre la primera (fase aguda de la enfermedad) y la segunda obtención de sangre (fase de convalecencia).

2.4. Fijación de complemento

En el apartado B.1.5. se ofrece una descripción detallada de esta prueba. Se modifica del siguiente modo. La CF se puede utilizar para la cuantificación de anticuerpos tempranos, principalmente IgM. Con este fin, se mezclan diluciones del suero a la mitad con 2 CFU₅₀ de antígeno conocido y con un 5% de suero bovino normal o de ternero incluido en 4 CHU₅₀ de complemento. La mezcla se incuba durante 3 horas a 37°C o durante toda la noche a 4°C. A continuación, se añade el sistema hemolítico y se incuba durante 30 minutos a 37°C. El título del suero es la dilución más alta a la que no se observa hemólisis. Los títulos de 1/5 o superiores son positivos. Esta prueba de la CF tiene una sensibilidad baja y frecuentemente se ve afectada por factores anticomplementarios o inespecíficos.

C. REQUISITOS PARA LAS VACUNAS

1. Antecedentes

1.1. Fundamentos y uso previsto del producto

Las infecciones por el virus de la estomatitis vesicular pueden influir de manera importante en la salud y en la producción de los animales, dando lugar a considerables pérdidas económicas para los productores. La reducción de la ingesta de alimento derivada de las lesiones orales puede dar lugar a una pérdida de peso y a retrasos en el peso de venta. Las lesiones de las patas pueden causar problemas locomotores temporales que afecten a la capacidad de un animal de conseguir alimento y agua, y los problemas de patas crónicas pueden provocar el desvieje del animal. Las lesiones en la glándula mamaria pueden influir en la capacidad de la madre de alimentar a las crías y a la producción de leche destinada al consumo humano. Las lesiones graves en la glándula mamaria o los pezones pueden provocar el desvieje del animal. Aunque no se aplique vacunación de forma generalizada, las vacunas se utilizan para reducir la gravedad de los signos clínicos y del impacto económico que ejerce la enfermedad.

En EE.UU., Panamá, Guatemala, Perú y Venezuela se han probado vacunas con virus atenuados en el campo (Lauerman *et al.*, 1962; Mason, 1978), pero no se conoce su eficacia. En Colombia y Venezuela se producen vacunas muertas contra VSIV y VSNJV (revisión vacunal de la OIE de 2002). Aunque en estudios de exposición al virus vacunal se ha probado y publicado una vacuna comercial para países andinos que combina antígenos de la EV y de la fiebre aftosa en una sola emulsión (House *et al.*, 2003), la vacuna no se produce ni aplica de manera ordinaria.

En el capítulo 1.1.8 *Principios para la producción de vacunas veterinarias*, se presentan las directrices para la producción de vacunas veterinarias. Las normas dadas aquí y en el capítulo 1.1.8 tienen carácter general y pueden complementarse con requisitos nacionales o regionales.

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

2.1. Características del inóculo

2.1.1. Características biológicas

Deben estar bien documentados la identidad del inóculo y el origen del suero utilizado en el cultivo y en los pasajes de los virus, incluidos la fuente y el historial de pasajes del microorganismo.

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

Se debe demostrar la pureza del inóculo y de las células que se utilizan para la producción de la vacuna. El inóculo original (MSV) debe estar libre de agentes indeseables, bacterias o *Mycoplasma*, lo cual se debe garantizar realizando pruebas que sean sensibles para detectar estos microorganismos. La muestra a analizar debe contener un título suficiente para la producción de la vacuna, pero no un título tan alto como para que el suero hiperinmune sea incapaz de neutralizar el virus de siembra durante el análisis de la pureza. El virus del inóculo se neutraliza con un antisuero monoespecífico o con un anticuerpo monoclonal contra el virus del inóculo, y la mezcla virus/anticuerpo se cultiva sobre monocapas de varios tipos de líneas celulares. Se recomienda una línea celular muy permisiva para el virus de la diarrea vírica bovina, de los tipos 1 y 2, como una de las líneas celulares elegidas para la evaluación del MSV. El virus de la diarrea vírica bovina es un contaminante potencial introducido por el uso de suero fetal bovino en los sistemas de cultivos celulares. Los cultivos se someten a pases cada 7 días durante al menos 14 días y después se analizan para comprobar si contienen virus indeseables que puedan haber infectado las células o el inóculo durante los pases previos.

2.2. Método de producción

2.2.1. Procedimiento

Una vez se ha visto que la vacuna es eficaz, y que las condiciones de producción propuestas son aceptadas por las autoridades competentes, se puede obtener la aprobación para producir la vacuna. El virus del inóculo puede multiplicarse en cultivos celulares. La selección del tipo celular para el cultivo depende del grado de adaptación del virus, del crecimiento en el medio, y del rendimiento vírico en el sistema de cultivo específico. Los productos de la vacuna deben limitarse al número de pases del MSV que se demuestre que es eficaz. En general, se trabaja con monocapas o con sistemas celulares en suspensión a gran escala en condiciones estrictas de temperatura controlada, condiciones asépticas y métodos definidos de producción, para asegurar la igualdad entre lotes. La dosis de virus utilizada 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, determinado por su ECP, por inmunofluorescencia o por otra prueba aprobada, dicho virus se clarifica, se filtra y se inactiva (en el caso de las vacunas muertas).

2.2.2. Requisitos para los sustratos y los medios

Debe demostrarse que los cultivos celulares están libres de virus extraños. Todos los productos de origen animal utilizados en la producción y mantenimiento de las células (es decir, tripsina, suero fetal bovino) y en el cultivo de los virus deben estar libres de agentes extraños, y debe prestarse especial atención a la presencia de virus de la diarrea vírica bovina.

2.2.3. Controles durante el proceso

Los cultivos celulares deben analizarse macroscópicamente en busca de posibles anomalías o signos de contaminación, y desecharse si no resultan satisfactorios. La concentración de virus se puede determinar por la masa antigénica o mediante pruebas de infectividad.

Se debe realizar un estudio de la cinética de inactivación utilizando el agente inactivador aprobado (β -propiolactona o 1 ml por 100 ml de suspensión vírica de etilenimina binaria 0,1 M [BEI] durante 24 horas), en cada lote de virus con un título mayor que el título de máxima producción y cultivado según el método de producción aprobado. Este estudio debería demostrar que el método de inactivación es suficiente como para asegurar la completa inactivación del virus. Las muestras tomadas a intervalos regulares y después inoculadas en una línea celular susceptible deberían indicar una pérdida lineal y completa de título al final del proceso de inactivación.

Durante la producción, se mide el contenido antigénico para establecer que se alcanzan en masa los títulos mínimos. El contenido antigénico se suele medir antes de la inactivación (si se trata de vacunas muertas) y antes del procesado posterior.

2.2.4. Pruebas en los lotes de producto final

Se debe demostrar que las posibles vacunas son puras, seguras, potentes y eficaces.

i) Esterilidad y pureza

Durante la producción se deben realizar pruebas de contaminación para bacterias, *Mycoplasma* y hongos, tanto en los lotes de vacuna inactivada como en los de vacuna viva, y deben confirmarse en el producto final (véase el capítulo 1.1.9 *Pruebas de esterilidad y ausencia de contaminación en los materiales biológicos de uso veterinario*).

ii) Inocuidad

Debe evitarse en la medida de lo posible el uso animales de las especies de destino o de laboratorio en pruebas de inocuidad para la liberación del lote.

iii) Potencia del lote

La potencia se comprueba en el producto formulado final. A semejanza de lo que se hace en las pruebas de potencia de las vacunas para la fiebre aftosa, se ha propuesto una prueba de exposición al virus vacunal para evaluar las vacunas contra el VEV (House *et al.*, 2003). Las lagunas en los conocimientos sobre la patogenia de la infección por el VEV y los mecanismos inmunitarios que protegen contra esta infección vírica suponen una limitación para el desarrollo y la implementación de un protocolo validado para una prueba de exposición al virus. No obstante, para la liberación de lotes también pueden emplearse pruebas indirectas, por motivos de viabilidad y de bienestar animal, siempre que en las pruebas de eficacia se haya validado una correlación con la protección en las especies de destino. Teóricamente, se llevan a cabo pruebas indirectas para cada cepa de cada especie y para cada formulación vacunal con el fin de establecer una correlación entre los resultados de las mismas y los resultados de la eficacia vacunal.

La potencia relativa podría utilizarse para determinar el contenido antigénico del producto final. Se requiere confirmar la sensibilidad, especificidad, reproducibilidad y robustez de tales pruebas.

2.3. Requisitos para la aprobación del registro

2.3.1. Requisitos de inocuidad

i) Inocuidad en especies de destino y no de destino

El producto final puede evaluarse en el hospedador utilizando dos animales de la edad mínima recomendada para el uso de la vacuna, según las instrucciones del prospecto; los animales se observan durante 21 días. También se recomiendan estudios de seguridad en el campo en, al menos, tres áreas geográficas divergentes, con un mínimo de 300 animales por área.

En el caso de las vacunas con virus muertos y modificados (MLV), el criterio de inocuidad será la ausencia de reacciones como shock, abscesos en el punto de inoculación, etc. En el caso concreto de las vacunas con MLV, no sería esperable observar signos clínicos. Si se observan signos clínicos de estomatitis vesicular, debe plantearse la utilización de la vacuna. Antes de mezclar el antígeno con el adyuvante debe evaluarse si hay virus residual. La inocuidad se evalúa inicialmente en unos pocos animales durante 21 días mediante una observación minuciosa para detectar posibles problemas macroscópicos de inocuidad. Si la vacuna supera esta primera prueba de inocuidad, se utiliza en el campo en un gran número de animales para determinar si aparecen problemas sutiles de inocuidad: reacciones adversas/hinchazón, abscesos, shock, etc.

ii) Reversión a la patogenicidad en vacunas atenuadas/vivas

La reversión a la patogenicidad en vacunas víricas vivas se suele poner de manifiesto mediante un paso inverso por especies susceptibles. Se aísla virus del animal vacunado y este virus se utiliza para inocular otros animales. El pase secuencial por animales debe

poner de manifiesto que los animales siguen estando clínicamente sanos sin manifestar lesiones características de estomatitis vesicular.

iii) Consideraciones medioambientales

Probablemente las vacunas inactivadas no presentan ningún peligro especial para el usuario, aunque la inoculación accidental puede ocasionar una reacción adversa causada por el adyuvante y por componentes secundarios de la vacuna. Las vacunas de virus vivo modificado pueden suponer un riesgo para el usuario según cuál sea el nivel de inactivación del virus.

En la medida de lo posible, deben evitarse los conservantes y, de no ser así, su presencia debe limitarse a la concentración más baja posible. Los frascos de vacuna, las jeringuillas y las agujas pueden suponer un riesgo medioambiental en el caso de las vacunas en las que se utilizan adyuvantes o conservantes, así como en el caso de las vacunas de virus vivos modificados. En la información del embalaje de la vacuna deben incluirse las instrucciones de desecho, que se basarán en la legislación vigente en materia medioambiental del país en el que se utilice.

2.3.2. Requisitos de eficacia

Las lagunas en los conocimientos sobre la patogenia de la infección por el VEV y los mecanismos inmunitarios que protegen contra esta infección vírica suponen una limitación para el desarrollo y la implementación de un protocolo validado para una prueba de exposición al virus. Teóricamente, la eficacia vacunal debe estimarse en animales vacunados de manera directa evaluando su resistencia en caso de exposición al virus vivo. La eficacia vacunal debe establecerse para cada cepa que vaya a autorizarse para ser utilizada en la vacuna.

Los VEV de referencia vivos correspondientes a cepas víricas circulantes en la región se guardan a temperaturas ultrabajas. Cada virus de desafío se prepara como sigue. Debe obtenerse tejido lingual infectado por el VEV de casos de campo originales de EV y enviarse al Laboratorio de Referencia en tampón glicerol como se describe en el Apartado B. *Técnicas de diagnóstico*.

La preparación del virus al que vaya a exponerse el ganado bovino se lleva a cabo según el proceso descrito en el Capítulo 2.1.8 *Fiebre aftosa*, Apartado B.1.4 *Aislamiento del virus*, con vistas a obtener una suspensión estéril al 10% en medio mínimo esencial de Eagle con suero fetal bovino estéril al 10%.

La preparación de la reserva de virus de desafío a partir de la cual se tomarán alícuotas se lleva a cabo a partir de lesiones de dos reses de más de 6 meses de edad, en las que previamente se habrá comprobado que no tienen anticuerpos contra el VEV. Estos animales se tranquilizarán, por ejemplo con xilacina a razón de 100 mg/ml (siguiendo las instrucciones de uso), y a continuación se les inoculará por vía intradérmica (id) en la lengua la suspensión en unos 20 puntos, administrando 0,1 ml en cada uno. En el momento en que las lesiones alcancen su pico, unos 2 días después, se tomarán muestras del tejido lingual con vesículas.

Se prepara una suspensión al 2% como se ha descrito arriba y se filtra a través de un filtro de 0,2 µm de poro; se toman alícuotas y se congelan en la fase gaseosa del nitrógeno líquido, lo cual constituye la reserva del virus de desafío. Los títulos infectivos de esta reserva se determinan tanto en cultivo celular (DICT₅₀) como en dos reses (BID₅₀). A estas dos reses, que se han tranquilizado con xilacina, se les inyectan, por vía intradérmica en la lengua, diluciones decimales (1/0 a 1/10 000), empleando cuatro puntos de inyección por dilución (Henderson, 1949). Las titulaciones en ganado bovino se leen 2 días después. Lo más habitual es que los títulos sean superiores a las 10⁶ DICT₅₀ para 0,1 ml y superiores a las 10⁵ BID₅₀ para 0,1 ml, todo ello calculado según el método de Spearman-Kärber. La dilución a utilizar en la prueba de desafío para ganado bovino es de 10 000 DIB₅₀ en un volumen total de 4× 0,1 ml mediante inyección intralingual tanto en la prueba de la PD₅₀ como en la de la PGP (House *et al.*, 2003).

i) Método de exposición al virus vacunal

En este método experimental, un grupo de 12 reses seronegativas para el VEV y de al menos 6 meses de edad se vacuna, los días 0 y 40 del estudio, con una dosis bovina por la vía de administración y al volumen recomendados por el fabricante. Estos animales y un grupo control de dos animales no vacunados se exponen al virus 2 semanas o más después de la segunda vacunación. La cepa de desafío es una suspensión de virus bovino que es totalmente patógena y adecuada para los tipos víricos de la vacuna que se está estudiando, y la exposición tiene lugar por inoculación de un total de 10 000 BID₅₀ por vía intradérmica en cuatro puntos (0,1 ml por punto) de la cara superior de la lengua. Estos animales se observan a los 7-8 días del desafío.

Se propuso que los animales vacunados que no presentaran lesiones en la lengua deberían considerarse totalmente protegidos. Los animales vacunados que presenten lesiones en uno, dos o tres puntos de inoculación deberán considerarse parcialmente protegidos, y los que presenten lesiones en cuatro puntos deberán considerarse no protegidos (House *et al.*, 2003). Los animales control deben desarrollar lesiones en cuatro puntos. La vacuna debe proteger totalmente al menos a nueve animales de los 12 vacunados (protección del 75%), y los restantes deben quedar parcialmente protegidos o desprotegidos. Esta prueba permite conocer de modo fehaciente la protección tras la inyección de dos dosis bovinas comerciales de vacuna en una población bovina pequeña.

Aunque se ha descrito y publicado el método de la exposición al virus vacunal (House *et al.*, 2003), no se dispone de datos sobre la validación en condiciones de campo en cuanto a la eficacia de la vacuna liberada.

ii) Eficacia en otras especies

Todavía no se han descrito o estandarizado pruebas de eficacia en otras especies de destino, como los caballos. En general, una prueba exitosa en el ganado bovino debería considerarse una evidencia suficiente de la calidad de una vacuna contra la EV como para apoyar su uso en otras especies.

2.3.3. Duración de la inmunidad

La duración de la inmunidad (DI) de una vacuna contra la EV dependerá de la eficacia (formulación y carga antigénica). Como parte del procedimiento de aprobación, se deberá exigir al fabricante que demuestre la DI de una vacuna determinada mediante la exposición o el uso de una prueba alternativa validada, por ejemplo serológica, al final del periodo de protección indicado.

2.3.4. Estabilidad

Como parte de los estudios de determinación del periodo de validez necesarios para la aprobación, debe demostrarse la estabilidad de todas las vacunas, incluidas las vacunas en forma de emulsión oleosa. Las vacunas nunca deben congelarse ni guardarse a temperaturas superiores a la indicada.

Las vacunas deben guardarse a 4-8°C, con la mínima exposición posible a la luz. El periodo de validez debe determinarse a lo largo del periodo de viabilidad propuesto utilizando la prueba de potencia aprobada (apartado C.2.2.4.iii).

i) Para la producción animal

El/los virus utilizados en la producción de vacunas deben estar antigénicamente relacionados con los virus que se encuentran en el campo. Se debe utilizar un estudio de vacunación/desafío en la especie para la que va a ser utilizada, a fin de indicar el grado de protección que proporciona la vacuna. Las especies utilizadas en los estudios de vacunación/desafío deben carecer de anticuerpos contra la estomatitis vesicular. Los estudios de vacunación/desafío deben llevarse a cabo utilizando virus producidos mediante el método de producción previsto, al máximo número de pases de virus permitido y utilizando un modelo animal experimental. Es necesario confirmar la

sensibilidad, la especificidad, la reproducibilidad y la significación estadística y el nivel de confianza de este modelo experimental.

Los niveles de anticuerpos tras la vacunación medidos *in vitro* podrían utilizarse para evaluar la eficacia de la vacuna, siempre que se haya llevado a cabo un estudio de la correlación en el que se haya obtenido significación estadística. En el caso de las vacunas que contengan más de un virus (por ejemplo, VSNJV y VSIV), la eficacia de los diferentes componentes de estas vacunas debe establecerse en cada caso por separado y luego conjuntamente para comprobar si existe interferencia entre los diferentes virus.

Antes de que un producto sea aprobado, debe determinarse la duración de la inmunidad de la vacuna y la frecuencia de vacunación recomendada. En principio, dicha información se adquiere directamente mediante los estudios de vacunación/desafío en el animal hospedador. El período de protección demostrada, medida según la capacidad de los vacunados de resistir una exposición mediante una prueba válida, se puede incorporar en las indicaciones incluidas en el prospecto de la vacuna.

Si la vacuna se utiliza en caballos, cerdos, ganado bovino u otros rumiantes destinados al comercio y al consumo humano, debe establecerse un período de retirada que dependerá del adyuvante utilizado (generalmente será de 21 días), mediante un examen histopatológico cuyos resultados se enviarán a las autoridades sanitarias responsables de la inocuidad alimentaria.

ii) Para el control

Se aplican los mismos principios que para la utilización en producción animal. Además, es importante observar que las respuestas de anticuerpos en animales vacunados pueden no ser diferenciables de las de los animales expuestos al virus natural. Por tanto, para determinar la exposición al virus natural, los animales vacunados tendrán que identificarse claramente si, además de los signos clínicos compatibles con la enfermedad, van a utilizarse métodos serológicos.

BIBLIOGRAFÍA

AFSHAR A., SHAKARCHI N.H. & DULAC G.C. (1993). Development of a competitive enzyme linked immunosorbent assay for detection of bovine, equine, ovine and porcine antibodies to vesicular stomatitis virus. *J. Clin. Microbiol.*, **31**, 1860–1865.

ALONSO A., MARTINS M., GOMES M.P.D., ALLENDE R. & SONDAHL M.S. (1991). Development and evaluation of an enzyme-linked immunosorbent assay for detection, typing and subtyping of vesicular stomatitis virus. *J. Vet. Diagn. Invest.*, **3**, 287–292.

ALONSO FERNANDEZ A. & SONDAHL M.S. (1985). Antigenic and immunogenic characterisation of various strains of the Indiana serotype of vesicular stomatitis isolated in Brazil. *Bol. Cen. Panam. Fiebre Aftosa*, **51**, 25–30.

ALLENDE R., SEPULVEDA L., MENDES DA SILVA A., MARTINS M., SONDAHL M.S. & ALONSO FERNANDEZ A. (1992). An enzyme-linked immunosorbent assay for the detection of vesicular stomatitis virus antibodies. *Prev. Vet. Med.*, **14**, 293–301.

BORING W. & SMITH D. (1962). Vesicular Stomatitis Virus: A Survey and Analysis of the Literature. Technical Study No. 43, US Army Biological Laboratories, Fort Detrick, USA.

CARGNELUTTI J.F., OLINDA R. G., MAIA L.A., AGUIAR G.M.N., NETO E.G.M., SIMÕES S.V.D., LIMA T.G., DANTAS A.F.M., WEIBLEN R., FLORES E.F. & RIET-CORREA F. (2014). Outbreaks of vesicular stomatitis Alagoas virus in horses and cattle in northeastern Brazil. *J. Vet. Diagn. Invest.*, **26**, 788–794.

COMER S.A., CORN J.L., STALLKNECHT D.E., LANDGRAF J.G. & NETTLES V.F. (1992). Titers of vesicular stomatitis virus New Jersey serotype in naturally infected male and female *Lutzomyia shannoni* (Diptera: Psychodidae) in Georgia. *J. Med. Entomol.*, **29**, 368–370.

- COTTON W.E. (1927). Vesicular stomatitis. *Vet. Med.*, **22**, 169–175.
- DE OLIVEIRA A.M., FONSECA A.A. JR, CAMARGOS M.F., ORZIL L.M., LAGUARDIA-NASCIMENTO M., OLIVEIRA A.G.G., RODRIGUES J.G., SALES M.L., DE OLIVEIRA T.F.P. & DE MELO C.B. (2018). Development and validation of RT-qPCR for vesicular stomatitis virus detection (*Alagoas vesiculovirus*). *J. Virol. Methods*, **257**, 7–11.
- FEDERER K.E., BURROWS R. & BROOKSBY J.B. (1967). Vesicular stomatitis virus – the relation between some strains of the Indiana serotype. *Res. Vet. Sci.*, **8**, 103–117.
- FERRIS N.P. & DONALDSON A.I. (1988). An enzyme-linked immunosorbent assay for the detection of VSV antigen. *Vet. Microbiol.*, **18**, 243–258.
- FOWLER V.L., KING D.J., HOWSON E.L.A., MADI M., PAUSZEK S.J., RODRIGUEZ L.L, KNOWLES N.J., MIOULET V. & KING D.P. (2016). Genome sequences of nine vesicular stomatitis virus isolates from South America. *Genome Announc.*, **4**, e00249-16. doi: 10.1128/genomeA.00249-16.
- FRANCY D.B., MOORE C.G., SMITH G.C., TAYLOR S.A. & CALISER C.H. (1988). Epizootic vesicular stomatitis in Colorado, 1982: isolation of virus from insects collected along the northern Colorado Rocky Mountain Front Range. *J. Med. Entomol.*, **25**, 343–347.
- HENDERSON W.M. (1949). The quantitative study of foot and mouth disease virus. Agricultural Research Council Report Series No. 8, HMSO, London, UK, page 5.
- HOFNER M.C., CARPENTER W.C., FERRIS N.P., KITCHING R.P. & BOTERO F.A. (1994). A hemi-nested PCR assay for the detection and identification of vesicular stomatitis virus nucleic acid. *J. Virol. Methods*, **50**, 11–20.
- HOLE K., VELAZQUES-SALINAS L. & CLAVIJO A. (2010). Improvement and optimization of a multiplex real time RT-PCR assay for the detection and typing of vesicular stomatitis virus. *J. Vet. Diagn. Invest.*, **22**, 428–433.
- HOUSE J.A, HOUSE C., DUBOURGET P. & LOMBARD M. (2003). Protective immunity in cattle vaccinated with a commercial scale inactivated, bivalent vesicular stomatitis vaccine. *Vaccine*, **21**, 1932–1937.
- ICTV (International Committee on Taxonomy of Viruses) (2019). Virus Taxonomy: 2019 EC 51 Release. Available at: <https://talk.ictvonline.org/taxonomy/>
- JENNY E.W., MOTT L.O. & TRAUB E. (1958). Serological studies with the virus of vesicular stomatitis. I. Typing of vesicular stomatitis by complement fixation. *Am. J. Vet. Res.*, **19**, 993–998.
- KATZ J.B., EERNISSE K.A., LANDGRAF J.G. & SCHMITT B.J. (1997). Comparative performance of four serodiagnostic procedures for detecting bovine and equine vesicular stomatitis virus antibodies. *J. Vet. Diagn. Invest.*, **9**, 329–331.
- KATZ J.B., SHAFER A.L. & EERNISSE K.A. (1995). Construction and insect larval expression of recombinant vesicular stomatitis nucleocapsid protein and its use in competitive ELISA. *J. Virol. Methods*, **54**, 145–157.
- KILLMASTER L.F., STALKNECHT D.E., HOWERTH E.W., MOULTON J.K., SMITH P.F. & MEAD D.G. (2011). Apparent disappearance of vesicular stomatitis New Jersey virus from Ossabaw Island, Georgia. *Vector Borne Zoonotic Dis.*, **11**, 559–565.
- KITCHING R.P. & DONALDSON A.I. (1987). Collection and transportation of specimens for vesicular virus investigation. *Rev. Sci. Tech.*, **6**, 251–283. doi: 10.20506/rst.6.1.291.
- LAUERMAN L.H., KUNS M.L. & HANSON R.S. (1962). Field trial of live virus vaccination procedure for prevention of vesicular stomatitis in dairy cattle. I: Preliminary immune response. Proceedings of the 66th Annual Meeting of the United States Animal Health Association, 365–369.
- MASON J. (1978). The epidemiology of vesicular stomatitis. *Bol. Cen. Panam. Fiebre Aftosa*, **29–30**, 35–53.
- MEAD D.G., LOVETT K.R., MURPHY M.D., PAUSZEK S.J., SMOLIGA G., GRAY E.W., NOBLET R., OVERMYER J. & RODRIGUEZ L.L. (2009). Experimental transmisión of vesicular stomatitis New Jersey virus from *Simulium vittatum* to cattle: clinical outcome is influenced by site of insect feeding. *J. Med. Entomol.*, **46**, 866–872.

MEAD D.G., GRAY E.W., MURPHY M.D., HOWERTH E.W. & STALLKNECHT D.E. (2004). Biological transmission of vesicular stomatitis virus (New Jersey serotype) by *Simulium vittatum* (Diptera: Simuliidae) to domestic swine (*Sus scrofa*). *J. Med. Entomol.*, **41**, 78–82.

OLTSKY P.K., TRAUM J. & SCHOENING H.W. (1926). Comparative studies on vesicular stomatitis and foot and mouth disease. *J. Am. Vet. Med. Assoc.*, **70**, 147–167.

PANAFTOSA-OPS/OMS (2019). Informe de Situación de los Programas de Erradicación de la Fiebre Aftosa. Sudamerica y Panamá en 2019. <https://iris.paho.org/handle/10665.2/51789>.

PAUSZEK S.J., ALLENDE R. & RODRIGUEZ L.L. (2008). Characterization of the full-length genomic sequences of vesicular stomatitis Cocal and Alagoas viruses. *Arch. Virol.*, **153**, 1353–1357.

PAUSZEK S.J., BARRERA J. DEL C., GOLDBERT T., ALLENDE R. & RODRIGUEZ L.L. (2011). Genetic and antigenic relationships of vesicular stomatitis viruses from South America. *Arch. Virol.*, **156**, 1961–1968.

RAINWATER-LOVETT K., PAUSZEK S.J., KELLEY W.N. & RODRIGUEZ L.L. (2007). Molecular epidemiology of vesicular stomatitis New Jersey virus from the 2004–2005 US outbreak indicates a common origin with Mexican strains. *J. Gen. Virol.*, **88**, 2042–2051. DOI 10.1099/vir.0.82644-0.

ROCHA C.S., OLIVEIRA I.V.P.M., MOURA G.H.F., BEZERRA J.A.B., RONDON F.C.M., VASCONCELOS D.C., ALMEIDA M.M., CORTEZ A.A., CLABUIG C. & ANTUNES J.M.A.P. (2020). Vesicular stomatitis due to Indiana III (Alagoas/VSIV-3) is endemic in Brazilian state of Ceará. *Ciênc. Rural*, **50**, 6, Santa Maria, e20190846. <http://doi.org/10.1590/0103-8478cr20190846>.

RODRIGUEZ L.L., LETCHWORTH G.J., SPIROPOULOU C.F. & NICHOL S.T. (1993). Rapid detection of vesicular stomatitis virus New Jersey serotype in clinical samples by using polymerase chain reaction. *J. Clin. Microbiol.*, **31**, 2016–2020.

SALES M.L., DALL'AGNOL M., DE OLIVEIRA A.M., CAMARGOS M.F., FONSECA A.A. JR & PIMENTA DOS REIS J.K.P. (2020). RT-qPCR for the diagnosis of the vesiculovirus Cocal virus. *Arch. Virol.*, **165**, 1843–1847.

SELLERS R.F. & MAAROUF A.R. (1990). Trajectory analysis of winds in vesicular stomatitis in North America. *Epidemiol. Infect.*, **104**, 313–328.

SEPULVEDA L. M., MALIRAT V., BERGMANN I.E., MANTILLA A. & NASCIMENTO E.R. (2007). Rapid diagnosis of vesicular stomatitis virus in Ecuador by the use of polymerase chain reaction. *Braz. J. Microbiol.*, **38**, 500–506.

WILSON W.C., LETCHWORTH G.J., JIMENEZ C., HERRERO M.V., NAVARRO R., PAZ P., CORNISH T.E., SMOLIGA G., PAUSZEK S.J., DORNAK C., GEORGE M. & RODRIGUEZ L.L. (2009). Field evaluation of a multiplex real-time reverse transcription polymerase chain reaction assay for detection of Vesicular stomatitis virus. *J. Vet. Diagn. Invest.*, **21**, 179–186.

*
* *

NB: Existen Laboratorios de Referencia de la OIE para la estomatitis vesicular (puede consultarse la página web de la OIE: <https://www.woah.org/es/que-ofrecemos/red-de-expertos/laboratorios-de-referencia/#ui-id-3>). Por favor, contacte con los Laboratorios de Referencia de la OIE para cualquier otro dato sobre las pruebas de diagnóstico, los reactivos y las vacunas para la Estomatitis vesicular.

NB: ADOPTADO POR PRIMERA VEZ EN 1990; ÚLTIMAS ACTUALIZACIONES ADOPTADAS EN 2021.