

GRUPE EQUINA (INFECCIÓN POR EL VIRUS DE LA GRUPE EQUINA)

RESUMEN

Descripción de la enfermedad: La gripe o influenza equina es una infección respiratoria aguda de los caballos, los asnos, las mulas y las cebras causada por dos subtipos bien diferenciados del virus de la influenza A (el H7N7, antes llamado equi-1, y el H3N8, antes llamado equi-2) dentro del género Influenzavirus A, de la familia Ortomixoviridae. No se han aislado virus del subtipo H7N7 desde finales de los años 70. Los virus de la influenza equina de ambos subtipos se consideran de origen aviar, y el H5N1 altamente patógeno se ha asociado recientemente a un brote de enfermedad respiratoria en mulas, en Egipto. En équidos muy susceptibles, los signos clínicos incluyen fiebre y una tos seca y áspera seguida de secreción nasal mucopurulenta. En animales vacunados con inmunidad parcial, puede estar ausente uno o más de estos signos. Los caballos infectados vacunados pueden seguir excretando el virus y servir de fuente de virus a otros animales. La influenza se suele transmitir rápidamente dentro de poblaciones susceptibles. Es una enfermedad endémica en muchos países en los que hay considerables poblaciones equinas.

Aunque por lo general solo afecta a los équidos, la influenza equina causada por el subtipo H3N8 ha cruzado la barrera interespecífica afectando a los perros. Se ha comunicado una infección extensa en perros en Norteamérica, donde normalmente produce fiebre moderada y tos, pero puede desembocar en una neumonía fatal. Aunque no se ha demostrado que la influenza equina afecte a los humanos, sí se han descrito pruebas serológicas de infección, principalmente en personas con exposición laboral al virus. Durante el programa de vigilancia de influenza llevado a cabo en 2004-2006 en el centro de China (Rep. Pop. de), también se aislaron dos virus de influenza H3N8 en cerdos.

Identificación del agente: Para el aislamiento de los virus a partir de hisopos nasofaríngeos o de lavados nasales y traqueales se pueden utilizar huevos embrionados de gallina y/o cultivos celulares. La infección también se puede demostrar por detección del antígeno o el ácido nucleico vírico en las secreciones respiratorias utilizando una reacción en cadena de la polimerasa con transcripción inversa (RT-PCR) o un ensayo inmunoenzimático (ELISA) de captura de antígeno, respectivamente.

Pruebas serológicas: El diagnóstico de las infecciones por el virus de la influenza se suele establecer solo mediante pruebas en sueros pareados; la primera muestra debe tomarse cuanto antes después de la aparición de los signos clínicos y la segunda unas dos semanas más tarde. Los títulos de anticuerpo se determinan por inhibición de la hemaglutinación (HI), por hemólisis radial simple (SRH) o por ELISA.

Requisitos para las vacunas: Se puede disminuir la propagación de la infección y la gravedad de la enfermedad mediante el uso de vacunas inactivadas potentes contra la influenza equina que contengan las cepas víricas adecuadas desde el punto de vista epidemiológico. Las vacunas inactivadas contra la gripe equina contienen virus completos o sus subunidades. Los virus vacunales se propagan en huevos embrionados de gallina o en cultivo de tejidos, se concentran, y se purifican antes de la inactivación con agentes como formalina o beta-propiolactona. Las vacunas inactivadas confieren protección induciendo anticuerpos humorales contra la proteína hemaglutinina. Por lo general, las respuestas son de corta duración y se requieren múltiples dosis para mantener un nivel protector de anticuerpos. Por lo general, se necesita un adyuvante para estimular niveles protectores de anticuerpo de mayor duración. Se han autorizado en algunos países las vacunas con virus vivos atenuados y las vacunas víricas vectorizadas.

El fracaso de las vacunas se ha atribuido a una potencia insuficiente de las mismas, a programas de vacunación poco apropiados, y a vacunas que han quedado obsoletas por contener virus que ya no sirven, como consecuencia de la deriva antigénica. Puede utilizarse una prueba de potencia *in vitro* (difusión radial simple) como análisis interno del contenido antigénico de los productos inactivados antes de añadir el adyuvante. Las pruebas durante el proceso que se realizan en las vacunas vivas y vectorizadas se basan en la titulación del virus infeccioso. En programas internacionales de vigilancia se realiza un seguimiento de la deriva antigénica de los virus de la influenza equina y cada año el Grupo de Expertos en Vigilancia (ESP) sobre las Vacunas contra la Influenza Equina establece recomendaciones para escoger las cepas vacunales más adecuadas. Si se produce un cambio en las recomendaciones, las vacunas deben actualizarse cuanto antes para garantizar una protección óptima. Es algo especialmente importante en el caso de las poblaciones equinas sometidas a frecuentes desplazamientos y de cualquier caballo que sea objeto de desplazamientos internacionales.

A. INTRODUCCIÓN

La gripe o influenza equina puede estar causada por dos subtipos: H7N7 (antes subtipo 1) y H3N8 (antes subtipo 2) del virus de la influenza A (género *Influenzavirus A* de la familia *Orthomyxoviridae*); sin embargo, en los últimos 30 años, ha habido muy pocos informes sobre infecciones por el virus del subtipo H7N7 (Webster, 1993).

En équidos muy susceptibles, los signos clínicos incluyen fiebre, secreción nasal y una tos seca y áspera; se han descrito como muy infrecuentes la neumonía en potros y asnos jóvenes y la encefalitis en caballos (Daly *et al.*, 2006; Gerber, 1970). Los signos clínicos asociados a la infección en los perros también consisten en fiebre y tos; de forma ocasional la infección desemboca en bronconeumonía purulenta y muerte repentina (Crawford *et al.*, 2005). Es habitual que la gripe se extienda rápidamente entre la población susceptible. El virus se transmite por la vía respiratoria, e indirectamente por personal, vehículos y fómites contaminados. El periodo de incubación en caballos susceptibles puede ser inferior a las 24 horas. En animales vacunados y parcialmente inmunes, el periodo de incubación puede alargarse, uno o más signos clínicos pueden no presentarse y la transmisión de la enfermedad puede reducirse. Esto hace que resulte más difícil el diagnóstico de la gripe equina ya que otras enfermedades víricas, como la enfermedad respiratoria causada por el herpesvirus equino, pueden parecerse clínicamente a una forma moderada de la gripe. Los caballos infectados por el virus de la gripe equina se vuelven susceptibles a una infección bacteriana secundaria y pueden desarrollar una rinorrea mucopurulenta, lo que puede inducir al diagnóstico de una enfermedad bacteriana al pasar por alto la verdadera causa subyacente.

Se considera que los virus causantes de la gripe equina son de origen aviar, y más recientemente se ha observado transmisión de virus aviáres a caballos y asnos. El análisis de la secuencia de un virus H3N8 aislado en 1989 de caballos durante una corta epidemia de gripe que tuvo lugar en el noreste de China (Rep. Pop. de) estableció que el virus estaba más estrechamente emparentado con virus de la influenza aviar que con virus de la influenza equina (Guo *et al.*, 1992). Recientemente, en Egipto se han asociado virus H5N1 aviáres a enfermedad respiratoria de asnos (Abdel-Moneim *et al.*, 2010).

Ciertos virus de la gripe equina pueden cruzar barreras interespecie y se han asociado a enfermedad respiratoria en perros, principalmente en Norteamérica (Crawford *et al.*, 2005). También se han observado brotes aislados de gripe equina en perros del Reino Unido pero el virus no se ha establecido en la población canina. En todos los brotes del Reino Unido se consideró que la causa había sido un contacto directo con caballos infectados. También se han aislado virus de la gripe equina en cerdos del centro de China (Rep. Pop. de) (Tu *et al.*, 2009). A pesar de la ocasional identificación de personas seropositivas con exposición laboral, actualmente hay pocas pruebas de infecciones zoonóticas por gripe equina en personas (Alexander y Brown, 2000).

En países endémicos, las pérdidas económicas debidas a la gripe equina pueden minimizarse mediante la vacunación, y muchas autoridades y organismos ecuestres aplican políticas de obligatoriedad de la vacunación. La vacunación no produce inmunidad estéril; los caballos vacunados pueden excretar virus y contribuir de forma silente a diseminar la enfermedad. Así, deben elaborarse estrategias adecuadas de gestión del riesgo para hacer frente a esta posibilidad.

Para obtener información reciente sobre la distribución a nivel de país, consulte la interfaz WAHIS (<https://wahis.oie.int/#/home>).

B. TÉCNICAS DE DIAGNÓSTICO

Los métodos disponibles para el diagnóstico de la gripe equina y sus propósitos se resumen en la Tabla 1. El diagnóstico laboratorial de las infecciones agudas por el virus de la gripe equina se basa en la detección del virus en hisopos nasales tomados de caballos con la enfermedad respiratoria en fase aguda. Como alternativa, puede intentarse demostrar la respuesta serológica a la infección con muestras pareadas de suero. Lo ideal es utilizar los dos métodos. El virus de la gripe equina puede aislarse de huevos embrionados de gallina o en cultivo celular. La infección también puede demostrarse mediante la detección del antígeno vírico en las secreciones respiratorias utilizando el enzimoimmunoanálisis (ELISA) de captura de antígeno o pruebas de reacción en cadena de la polimerasa con transcripción inversa (RT-PCR). Todos los virus de la gripe son muy infecciosos para los hospedadores susceptibles, y por tanto se debe procurar evitar la contaminación accidental cruzada durante la manipulación de huevos o cultivos infectados. En el laboratorio de diagnóstico no se deben propagar las cepas estándar, al menos nunca de modo simultáneo o en el mismo lugar donde se procesan las muestras para el diagnóstico. Todas las zonas de trabajo deben desinfectarse de forma eficaz antes y después de la manipulación del virus, lo que debe realizarse preferiblemente en cabinas de seguridad biológica de nivel 2 y de clase II.

Es importante obtener muestras lo más pronto posible después de la aparición de los signos clínicos, preferiblemente en un plazo máximo de 3–5 días. Estas muestras incluyen hisopos nasofaríngeos y lavados nasales o traqueales, los últimos, tomados por endoscopia. Los hisopos se pueden elaborar con una esponja absorbente de algodón o gasa pinchados en un alambre y deben ser lo bastante largo como para ser introducidos por el meato ventral hasta la nasofaringe. Inmediatamente después, los hisopos deben introducirse en un tubo con medio de transporte. Este medio estará formado por solución salina tamponada con fosfato (PBS) que contenga o bien glicerol al 40% o caldo de triptosa con fosfato al 2% con una solución de antibióticos al 2% (penicilina [10 000 unidades], estreptomycin [10 000 unidades] en agua destilada estéril [100 ml], y fungizona (250 mg/ml de reserva) al 2%. Si las muestras se van a inocular en un plazo máximo de 1–2 días, se pueden conservar a 4°C, pero si ha de transcurrir más tiempo deben conservarse a –70°C o menos. Las muestras deben mantenerse refrigeradas durante la conservación y el transportarse al laboratorio.

El procesado de la muestra debe seguir los procedimientos de calidad descritos en el capítulo 1.1.5 *Gestión de la calidad en los laboratorios veterinarios de análisis*, adoptando medidas para prevenir una contaminación cruzada. El líquido se extrae del hisopo exprimiéndolo con unas pinzas, y después se elimina el hisopo de modo adecuado. Si la muestra parece estar muy contaminada por bacterias, se pueden añadir más antibióticos. El líquido extraído se conserva a –70°C. Las muestras con antibióticos se dejan en hielo 30–60 minutos y luego se centrifugan a 1 500 **g** durante 15 minutos para eliminar las bacterias y los restos; para la inoculación se utilizan los sobrenadantes. El líquido restante se conserva a –70°C. No es aconsejable filtrar las muestras, ya que el virus de la gripe se puede adsorber al filtro y desaparecer de la muestra.

Tabla 1. Métodos analíticos disponibles para el diagnóstico de la gripe equina y su propósito

Método	Propósito					
	Demostrar ausencia de infección en la población	Demostrar ausencia de infección en animales concretos	Contribuir a las políticas de erradicación	Confirmar casos clínicos sospechosos	Determinar la prevalencia de la infección – vigilancia en el rebaño/manada	Determinar el estado inmunitario en animales concretos o en poblaciones tras la vacunación
Identificación del agente¹						
Aislamiento del virus	–	+	–	++	–	–
RT-PCR en tiempo real	–	+++	+++	+++	+++	–
RAD	–	+	–	++	+	–
ELISA de captura de antígeno	–	++	++	+++	++	–

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

Detección de respuesta inmunitaria						
HI	++	++ ^a	–	+++ ^a	+++	++
SRH	++	++ ^a	–	+++ ^a	+++	+++
ELISA	++	+	++ ^b	+ ^a	+++	+

Clave: +++ = método recomendado; ++ = método adecuado; + = puede utilizarse en ciertas situaciones, pero el coste, la fiabilidad u otros factores limitan su aplicación; – = no adecuado para esta finalidad.

Aunque no todas las pruebas clasificadas como +++ o ++ han sido validadas formalmente, su uso sistemático y hecho de que se hayan utilizado ampliamente sin resultados dudosos las hace aceptables.

RT-PCR = reacción en cadena de la polimerasa con transcripción inversa; RAD = detección rápida del antígeno; HI = inhibición de la hemaglutinación; SRH = hemólisis radial simple; ELISA = enzimoimmunoanálisis.

^aSe precisa un análisis de muestras pareadas.

^bPuede resultar útil para la estrategia DIVA (detección de infección en animales vacunados) cuando se utiliza con las vacunas apropiadas.

1. Identificación del agente

El aislamiento de virus infeccioso se puede lograr en huevos embrionados de gallina o en cultivos celulares. Tradicionalmente, para el aislamiento del virus de la gripe equina, se han preferido los huevos, ya que muchas cepas clínicas no crecen bien en células sin un pase seriado. Una comparación entre virus H3N8 aislados en huevos y virus H3N8 aislados en células Madin–Darby de riñón canino (MDCK) indicó que las células MDCK son capaces de seleccionar variantes del virus que no son representativas del virus predominante en las muestras clínicas (Ilobi *et al.*, 1994). Sin embargo, se han aislado con éxito algunos virus en células MDCK, pero no en huevos, y ha tenido lugar una selección de variantes debida al cultivo en huevos (Oxburgh y Klingborn, 1999). Lo ideal es intentar el aislamiento en los dos sustratos.

Se están empleando mucho la RT-PCR y la RT-PCR en tiempo real en laboratorios de diagnóstico como alternativa más sensible que el aislamiento del virus (Quinlivan *et al.*, 2005). El antígeno del virus de la gripe presente en las secreciones nasales también se puede detectar directamente mediante un ELISA de captura de antígeno sensible para el virus H3N8 utilizando un anticuerpo monoclonal (MAB) contra la nucleoproteína del virus de la influenza equina (Livesay *et al.*, 1993). Esta prueba no se comercializa más que en forma de servicio de diagnóstico, pero existen kits comerciales completos para la detección de la gripe humana que, según se ha demostrado, también sirven para detectar el antígeno de la gripe equina (Chambers *et al.*, 1994; Yamanaka *et al.*, 2008). Este método es menos sensible que la RT-PCR pero proporciona un resultado rápido en el que pueden basarse las decisiones de tratamiento. Dicho enfoque no debe suplantar al del aislamiento vírico, ya que es fundamental aislar los nuevos virus y enviarlos a los Laboratorios de Referencia para su caracterización como parte del programa de vigilancia para realizar un seguimiento de la deriva antigénica y de la aparición de nuevos virus, y para proporcionar cepas que se puedan incluir en vacunas actualizadas. Los resultados positivos de la RT-PCR y del ELISA son útiles para la selección de muestras para los intentos de aislamiento del virus cuando los recursos son escasos o para la selección de las muestras que han de enviarse a los Laboratorios de Referencia para intentar aislar y caracterizar el virus.

1.1. Aislamiento del virus en huevos de gallina embrionados

Se introducen huevos fértiles en una incubadora húmeda a 37–38°C cambiándolos de posición dos veces al día; después de 10–11 días, se examinan en un ovoscopio y se seleccionan los huevos embrionados vivos para su utilización. Se limpia con alcohol la zona situada sobre el saco vitelino y se hace un pequeño orificio en la cáscara. Puede introducirse inóculo en la cavidad amniótica o en la alantoidea. Se inoculan varios huevos/muestra (0,1 ml) en la cavidad amniótica sin más dilución de la muestra (la muestra también se puede diluir a 1/10 y 1/100 en PBS que contenga antibióticos). Se retira la jeringa aproximadamente 1 cm y se inoculan 0,1 ml más en la cavidad alantoidea. Como alternativa, muchos laboratorios optan por realizar una inoculación solo en la cavidad alantoidea, a través de un segundo orificio abierto inmediatamente debajo de la línea de la cámara de aire. Se sella el orificio u orificios con cera o cinta adhesiva y se incuban los huevos a 34–35°C durante 3 días. Se deben desechar los embriones que mueran a partir de las 24 horas siguientes a la inoculación. Los huevos que contengan embriones que hayan muerto en un plazo de 24 horas tras la inoculación o que contengan embriones vivos pasados 3 días, se examinan para ver si contienen el virus de la gripe equina (VGE).

Los huevos se conservan a 4°C durante 4 horas o toda la noche para matar los embriones y reducir la hemorragia en el momento de la recogida. Las cáscaras se desinfectan y se recoge el líquido amniótico y/o el alantoideo con una pipeta, manteniendo separada cada recogida. Se comprueba si

estas presentan actividad hemaglutinante (HA) mezclando diluciones a la mitad del líquido recogido en volúmenes iguales (0,025 ml) con eritrocitos de pollo (células concentradas en PBS al 0,5% [v/v]) en placas para microtitulación de fondo en V o en U, o con eritrocitos de cobaya (células concentradas en PBS al 0,4% [v/v]) también en placas de fondo en V o en U. Las placas se incuban unos 30 minutos preferiblemente a 4°C para prevenir la actividad neuraminidasa. Si se utilizan eritrocitos de pollo, las placas pueden leerse inclinándolas 70° de modo que las células no aglutinadas “corran” al fondo del pocillo. Las células no aglutinadas de cobaya forman un botón en el fondo del pocillo y la sedimentación puede llevar más tiempo. Si no hay actividad HA, se juntan alícuotas de cada recogida y se pasan por más huecos. Todas las muestras positivas a HA se dividen en alícuotas y se conservan a -70°C; una de ellas se titula inmediatamente mediante HA. El título HA es la inversa de la dilución más alta a la que se observa aglutinación. Si el título es de 1/16 o más, la cepa se caracteriza de inmediato. Si los títulos son bajos, las muestras positivas deben someterse a otro pase. Debe tenerse cuidado de evitar la generación de partículas defectuosas que generen interferencia mediante una predilución del inóculo a 1/10, 1/100, 1/1 000. Las muestras positivas que deriven de la dilución más alta deben seleccionarse como reserva para conservación. Puede ser necesario realizar hasta cinco pases para aislar en virus, en concreto en el caso de caballos vacunados. Si no se obtiene virus al quinto pase, es improbable que los pases posteriores resulten eficaces.

1.2. Aislamiento del virus en cultivos celulares

Para aislar los virus de la gripe equina se pueden utilizar cultivos de la línea celular MDCK (MDCK, ATCC CCL34). Las células se cultivan en tubo hasta confluencia y luego se infectan por triplicado con 0,25–0,50 ml de cada muestra, procesada como se ha descrito anteriormente. Antes de la inoculación, se lava la monocapa celular al menos una vez con medio de cultivo tisular que contenga tripsina (2 µg/ml) sin suero. Los cultivos se mantienen en medio sin suero que contenga 0,5–2 µg/ml de tripsina (tratada con TPCK [L-1-tosilamina-2-feniletíl clorometil cetona] para eliminar la quimotripsina, aunque puede comprarse pre-tratada (por ejemplo, la de Sigma), y se examinan diariamente para comprobar si presentan efecto citopático (ECP). Si son positivas, o en cualquier caso después de 7 días, se comprueba si los sobrenadantes presentan HA. Los líquidos con títulos $\geq 1/16$ se caracterizan inmediatamente. Los negativos, y aquellos con títulos $< 1/16$ se someten a otros pases, hasta un total de cinco.

Como alternativa, se comprueba si las células presentan hemadsorción (HAD). Este procedimiento detecta la expresión de antígenos víricos en la superficie celular. El medio se extrae de los cultivos y los tubos se lavan con PBS. Se añaden una o dos gotas de una suspensión de eritrocitos de pollo o cobaya al 50%, se rotan los tubos con cuidado, y se conservan a temperatura ambiente (23°C \pm 2°C) 30 minutos. Los eritrocitos no unidos se eliminan mediante lavados con PBS, y se comprueba microscópicamente si los cultivos presentan HAD.

1.3. Subtipificación de la hemaglutinina

El subtipo HA de nuevas cepas de virus de la gripe equina puede determinarse mediante la inhibición de la hemaglutinación (HI; apartado B.2.1) utilizando antisueros específicos contra H7N7 y H3N8. Las cepas se pueden tratar primero con Tween 80/éter, que destruye la infectividad vírica y reduce el riesgo de contaminación cruzada. En el caso particular de los virus H3N8, este tratamiento aumenta la actividad HA (John y Fulginiti, 1966). Sin embargo, el tratamiento con Tween 80/éter también disminuye la especificidad y puede aumentar la variabilidad de los resultados obtenidos. Se deben titular en paralelo antígenos estándar con pruebas para identificar virus y se deben incluir cepas H7N7 (por ejemplo, A/eq/Praga/56, A/eq/Newmarket/77) y cepas H3N8 (por ejemplo, A/eq/Newmarket/2/93, A/eq/South Africa/4/03 y A/eq/Richmond/1/07). Las cepas de virus se pueden obtener de Laboratorios de Referencia de la OIE (véase la Tabla de la Parte 4 de este *Manual Terrestre*). Además, se deben incluir cepas aisladas recientemente en la misma zona geográfica, si se dispone de ellas. Los antígenos estándar deben tratarse con Tween 80/éter para evitar contaminaciones cruzadas. Tanto los antígenos problema como los estándar se someten siempre a una titulación por retroceso para confirmar su contenido antigénico.

Desde los años 1980, de caballos solo se han aislado virus del subtipo H3N8. La secuencia NA de las cepas H3 puede determinarse rápidamente mediante RT-PCR y secuenciación, como describen Rash *et al.* (2014), lo cual se aconseja para fines de vigilancia.

Las nuevas cepas de virus de gripe equina se pueden caracterizar mejor mediante HI utilizando antisueros específicos de cepa. Las especies en las que se obtienen los anticuerpos influirán en la reactividad cruzada del antisuero, siendo los hurones los que suministran la mayor parte de anticuerpos específicos de cepa (Mumford, 1992). La especificidad y la reactividad cruzada de los sueros también resultan influidas por el programa de inmunización. Se considera que los sueros

obtenidos 3 semanas después de una sola aplicación de antígeno tienen más capacidad de discriminación.

Todas las cepas deben enviarse inmediatamente a un Laboratorio Internacional de Referencia designado por la OIE o por la Organización Mundial de la Salud (OMS) para su inclusión en el programa de vigilancia de cepas, con el fin de realizar un seguimiento de la deriva antigénica y la aparición de nuevos virus.

1.4. Subtipificación de la neuraminidasa

La subtipificación de la neuraminidasa requiere anticuerpos específicos y no existe una técnica rutinaria. La subtipificación también se puede llevar a cabo utilizando cebadores de PCR específicos. Desde los años 1980, de caballos solo se han aislado virus del subtipo H3N8. La secuencia NA de las cepas H3 puede determinarse rápidamente mediante RT-PCR y secuenciación, como describen Rash *et al.* (2014), lo cual se aconseja para fines de vigilancia.

1.5. Reacción en cadena de la polimerasa

Las RT-PCR, tanto convencionales como en tiempo real, de forma habitual se utilizan para la detección del genoma de la gripe equina en secreciones nasales porque son más sensibles que el cultivo del virus en huevos y que la detección de nucleoproteína con kits de detección rápida del antígeno (RAD) para la detección de influenza humana. Durante el programa de erradicación llevado a cabo en Australia en 2007 se combinó una RT-PCR en tiempo real con sonda basada en el gen de la matriz y desarrollada para la detección de una gran variedad de cepas de influenza tipo A, incluido el virus H5N1 aviar (Heine *et al.*, 2007), con un sistema automático de extracción de ADN para establecer una prueba de alto rendimiento empleada para la detección masiva de caballos infectados (Foord *et al.*, 2009). Este tipo de prueba paninfluenza se ha utilizado con eficacia para el diagnóstico y la vigilancia de la influenza equina en Laboratorios de Referencia de la OIE (Gildea *et al.*, 2013a). Recientemente se han descrito RT-PCR en tiempo real específicas de virus de la gripe equina tipo 2 (H3N8) y tipo 1 (H7N7), y existe un kit comercial de RT-PCR para la detección de la gripe equina (Lu *et al.*, 2009).

Los Laboratorios de Referencia de la OIE seleccionaron una PCR en tiempo real panreactiva frente al virus influenza tipo A que tiene por diana el gen matricial, que se basa en la prueba descrita por Heine *et al.* (2007) y que se ha validado de acuerdo con lo establecido en la Plantilla de Validación de la OIE. Esta prueba se ha validado para el fin previsto de certificar la ausencia de infección en animales concretos antes de su compra-venta o desplazamientos.

Las secuencias de los cebadores de la PCR utilizados son las siguientes:

Directo: 5'-AGA-TGA-GYC-TTC-TAA-CCG-AGG-TCG-3'

Inverso: 5'-TGC-AAA-NAC-ATC-YTC-AAG-TCT-CTG-3'

Sonda: 6-FAM-5'-TCA-GGC-CCC-CTC-AAA-GCC-GA-3'-TAMRA

N=A, G, C o T y Y=C o T

El siguiente protocolo puede requerir alguna modificación para ajustarse a cada laboratorio o a los requisitos de los distintos kits de RT-PCR. En el Laboratorio de Referencia de la OIE, situado en el *Irish Equine Centre*, pueden conseguirse muestras de referencia fuertemente positivas, débilmente positivas y negativas que facilitarán los ajustes, la validación y el seguimiento de la prueba.

- i) Se extrae el ARN de 100 µl de secreciones nasofaríngeas. El ácido nucleico se eluye en 80 µl de tampón de elución y 5 µl se utilizan como molde en cada reacción RT-PCR de un solo paso, que se lleva a cabo con 25 µl.

Es muy fácil conseguir kits comerciales de extracción; el paso de la extracción del ácido nucleico vírico se puede llevar a cabo siguiendo los pasos especificados en cada kit. En esta etapa, se introduce un control positivo interno sintético y se incluye a lo largo de todo el proceso para comprobar la posible presencia de inhibidores de la PCR, es decir, para reducir la probabilidad de falsos negativos.

- ii) Existen a la venta kits para la RT-PCR en tiempo real de un solo paso. A continuación, se indican algunos pasos básicos que quizás tengan que modificarse en función de los requisitos del lugar, de los kits que se empleen y del equipo con el que se trabaje.
- iii) Los cebadores y las sondas se conservan a una dilución de trabajo de 10 µM.

- iv) Se prepara un volumen adecuado de mezcla primaria de RT-PCR de un solo paso en tiempo real para la cantidad de muestras que deban analizarse, siguiendo las instrucciones del fabricante. Normalmente, 20 µl de muestra contienen 12,5 µl de tampón 2 × RT, 2,0 µl de tRNA, 0,8 µl de cada cebador (a una concentración final de 0,32 µM), 0,2 µl de sonda (a una concentración final de 0,08 µM), 1,0 µl de mezcla enzimática 25 × RT-PCR, 1,25 µl de IPC (control positivo interno) de la mezcla de cebador/sonda y 1,45 µl de agua sin nucleasa.
- v) Se añaden 5 µl de muestra de ARN, incluyendo la muestra problema y los controles positivo y negativo, a 20 µl de la mezcla primaria en los pocillos correspondientes de la placa de PCR.
- vi) La placa se sitúa en un ciclador térmico en tiempo real programado para la transcripción inversa y la detección de amplificación o fluorescencia del cDNA, según indique el fabricante. El siguiente perfil térmico es un ejemplo: transcripción inversa a 45°C durante 10 minutos seguida de desnaturalización a 95°C durante 10 minutos. El cDNA se amplifica mediante 40 ciclos de 95°C durante 15 segundos y 60°C durante 45 segundos

Nota: Los tiempos y temperaturas pueden variar y deben optimizarse en función de los reactivos o el kit que se utilicen.

1.5.1. Interpretación de los resultados

Los resultados se expresan para los valores de ciclo umbral (Ct), que representan el número de ciclos necesario para un aumento estadísticamente significativo en la emisión de colorante indicador. Una barra de valor umbral destinada a fijar estos valores se desplaza manualmente hasta un valor ΔRn constante situado más o menos a mitad de la porción lineal de un gráfico de amplificación. Los valores Ct de hasta 40 se consideran positivos. Las muestras se clasificarán como negativas si el IPC Ct cae dentro del intervalo aceptable según el fabricante, y el Ct para diagnosticar influenza debe ser de 40 o superior.

La RT-PCR en tiempo real descrita arriba no es específica del virus de la influenza equina, sino que también permite detectar virus de la influenza aviar o la influenza porcina. Es posible que también detecte el virus de la influenza humana, que accidentalmente podría contaminar tanto la nasofaringe como la muestra equina, aunque se considera que este es un riesgo muy bajo. Para investigar en mayor profundidad cualquier muestra que dé positivo en la RT-PCR, se debe intentar secuenciar el gen de la HA. La prueba descrita abajo se basa en la descrita por Rash *et al.* (2014) y se ha utilizado para cepas del sublinaje Florida tanto del clado 1 como del clado 2. No obstante, con la continua divergencia de ambos clados, es posible que deban modificarse las secuencias del cebador para que se mantengan óptimas, y que tengan que compararse con las secuencias recientes del virus de la influenza equina disponibles en bases de datos públicas. El gen de la HA se amplifica dando lugar a un conjunto de cuatro productos de la PCR con solapamiento, mientras que a partir del gen de la NA se producen tres amplicones con solapamiento. Cada amplicón tiene entre 400 y 600 bp. Los cebadores para la PCR específicos del virus H3N8 de la influenza equina se marcan en el extremo 5' con secuencias de cebador M13 directo o inverso, simplificando así las reacciones de secuenciación posteriores. El siguiente protocolo describe un método general, de tal forma que podría tener que adaptarse en función de los enzimas y kits comerciales que se utilicen.

1.5.2. Síntesis de cDNA

El cDNA se transcribe a partir de ARN vírico (extraído como se describe arriba) mediante transcripción inversa (RT). Las enzimas transcriptasas inversas deben utilizarse siguiendo las instrucciones del fabricante. En primer lugar, se desnaturalizan 4 µl en presencia de un cebador UNI-12 modificado (5'-AGT-AGC-RAA-AGC-AGG-3', concentración final de 1 µM) y 7 µl de agua a 70°C durante 10 minutos antes de enfriar sobre hielo. A continuación, se añade la mezcla dNTP (concentración final de 0,5 µM cada dNTP), DTT (concentración final de 10 mM), tampón para reacción 1 × y 200 U de enzima transcriptasa inversa a un volumen de reacción final de 20 µl. Este volumen de reacción se incuba a 42°C durante 1 hora y después se procede al paso de inactivación a 65°C durante 20 minutos. También debe incluirse un control RT negativo, en el cual el ARN se sustituye por agua.

1.5.3. Amplificación por PCR de segmentos de los genes de la HA y la NA

Para amplificar los segmentos de los genes de la HA y la NA mediante PCR, se utiliza una ADN polimerasa de alta fidelidad. Para cada amplicón, se preparan 50 µl de mezcla para PCR que contienen 2 µl de cDNA, mezcla de dNTP (cada dNTP a una concentración de 0,2 µM), tampón para reacción 1×, 1U de ADN polimerasa, agua y pares de cebadores (cada uno a una concentración final de 0,2 µM), como se indica en la Tabla 2. Las siguientes condiciones de ciclado podrían tener que ajustarse según la ADN polimerasa que se utilice: desnaturalización inicial a 98°C durante 30 segundos, seguida de 30 ciclos de 98°C durante 10 segundos, 50°C

durante 30 segundos y 72°C durante 30 segundos y una extensión final a 72°C durante 2 minutos. Debe incluirse un control negativo para cada par de cebadores, en los cuales, el cDNA se sustituye por el producto del control RT negativo.

Tabla 2. Secuencias de los cebadores para amplificar los segmentos de los genes de la HA y la NA del virus H3N8 de la influenza equina mediante PCR.

Nombre del cebador	Secuencia del cebador (5'–3')	Cobertura de nucleótidos aproximada
HA/AF	GC-GTAAAACGACGGCCAGT AGCAAAGCAGGGGACGATATT	1–515
HA/AR	GC AACAGCTATGACCATG GATTTGTTAGCCAATTCAG	
HA/BF	GC GTAAAACGACGGCCAGT CAGGTGTCACTCAAACG	428–1032
HA/BR	GC AACAGCTATGACCATG GGATTTGCTTTTCTGGTAC	
HA/CF	GC GTAAAACGACGGCCAGT GGTTACATATGGAAAATGCC	939–1336
HA/CR	GC AACAGCTATGACCATG GAGCCACCAGCAATTCT	
HA/DF	GC GTAAAACGACGGCCAGT GAAGGAAGAATTCAGGA	1251–1733
HA/DR	GC AACAGCTATGACCATG GAGTAGAAACAAGGGTGTTTTAAAC	
NA/AF	GC GTAAAACGACGGCCAGT AGCAAAGCAGGAGTTT	1–508
NA/AR	GC AACAGCTATGACCATG GCCCTATTTTGACACTC	
NA/BF	GC GTAAAACGACGGCCAGT CACACAGGGCTCATTAC	417–1049
NA/BR	GC AACAGCTATGACCATG CCGAAACCTTTTACACCG	
NA/CF	GC GTAAAACGACGGCCAGT CACAGTTGGATATTTGTG	951–1461
NA/CR	GC AACAGCTATGACCATG AGTAGAAACAAGGAGTT	

Los productos de la PCR se pueden visualizar a partir de una electroforesis en gel de agarosa al 0,8% teñido con una tinción para ácido nucleico. Los productos de la PCR se pueden purificar empleando un kit comercial o mediante precipitación con etanol. Las reacciones de la secuenciación se llevan a cabo empleando dideoxinucleótidos de final de cadena y los cebadores M13 directo (5'-GTA-AAA-CGA-CGG-CCA-GT-3') e inverso (5'-AAC-AGC-TAT-GAC-CATG-3') para cada producto de la PCR para determinar la secuencia en ambas hebras de ADN. Las secuencias finales se pueden ensamblar a partir de los amplicones con solapamiento, y a continuación puede eliminarse toda secuencia derivada de cebador.

Aunque la secuencia genética de las cepas también puede obtenerse mediante PCR, sigue siendo fundamental aislar virus infecciosos para determinar las propiedades antigénicas de las nuevas cepas y evaluar la deriva antigénica en condiciones de campo.

2. Pruebas serológicas

Las infecciones por influenza se pueden detectar mediante pruebas serológicas con sueros pareados para demostrar un aumento en el título de anticuerpos específicos. Estas pruebas se deben realizar tanto si se ha intentado el aislamiento del virus como si no. Son robustas y pueden poner de manifiesto el virus aun cuando este no se haya aislado. Existen dos métodos sencillos, la IH y la hemólisis radial simple (SRH), cada uno igualmente eficaz y de amplio uso. Existen ELISA para la detección de anticuerpos contra nucleoproteína de influenza pero aunque se usan con menor frecuencia, han demostrado ser robustos y son útiles cuando se tienen que analizar grandes cantidades de muestras (Galvin *et al.*, 2013; Kittleberger *et al.*, 2011, Sergeant *et al.*, 2011). También se puede aplicar la prueba de fijación de complemento (CF), pero no es de uso general. Las muestras de sueros pareados, es decir, las muestras de fase aguda y de fase convaleciente, deben analizarse juntas para minimizar la influencia de la variabilidad inter-analítica. Los antígenos estándares se han descrito anteriormente (apartado B.1.3.). Si se dispone de ellos, deben incluirse cepas de casos recientes. En el *European Directorate for the Quality of Medicines* (EDQM)² se dispone de antisueros equinos liofilizados post-infección contra A/eq/Newmarkrt/77 (H7N7), A/eq/Newmarket/1/93 (linaje H3N8 americano), A/eq/Newmarket/2/93 (linaje H3N8 europeo), A/eq/South Africa/4/03 (Florida Clado 1, sublinaje del linaje americano), A/eq/Richmond/07 (Clado

2 Sede Central: EDQM - Council of Europe, 7 allée Kastner, CS 30026, F-67081 Strasbourg, Francia.

Florida Clado 2, sublinaje del linaje americano) y un suero equino negativo para la gripe. A estos sueros se les ha asignado valor SRH en estudios de colaboración internacional y se pueden utilizar como sueros de referencia para esta prueba (Daly *et al.*, 2007; Mumford, 2000).

2.1. Prueba de la inhibición de la hemaglutinación

Para incrementar la sensibilidad de la prueba, el antígeno se trata primero con Tween 80/éter, en concreto en el caso de virus H3N8. La prueba de HI también puede realizarse sin tratamiento con éter aunque a un menor nivel de sensibilidad. Esta prueba se realiza mejor en placas de microtitulación con un equipo adecuado de dilución. Se puede utilizar una macroprueba, donde el antígeno se diluye a un título final de HA de 1/8 por pocillo y los volúmenes de PBS, sueros y antígeno son de 0,5 ml. Los sueros se pre-tratan para eliminar hemaglutininas no específicas y a continuación se inactivan a 56°C durante 30 minutos. Los pre-tratamientos incluyen la utilización de alguno de los siguientes procedimientos: (a) adsorción por caolín y eritrocitos, no recomendada en la HI para el subtipo H7N7, (b) periodato potásico, o (c) enzima de *Vibrio cholerae* destructor de receptores. El tratamiento de elección es el periodato de potasio o el enzima de *V. cholerae* destructor de receptores. Los sueros tratados se diluyen con PBS, se añade una dosis estándar de antígeno (título HA de 1/4 por pocillo en la prueba de microtitulación) y estos se mantienen a temperatura ambiente (23°C ± 2°C) durante 30 minutos. Después de mezclar cuidadosamente, se añaden eritrocitos y la prueba se lee a los 30 minutos. Los títulos HI son la dilución de suero más alta que produce una inhibición completa de la hemaglutinación. Se pueden utilizar eritrocitos de pollo (células concentradas al 1% [v/v]) en placas de microtitulación con pocillos de fondo en V, o eritrocitos de cobaya (células concentradas al 0,5% [v/v]) en placas con pocillos de fondo en V o en U. Si se utilizan eritrocitos de pollo, las placas pueden leerse inclinándolas 70° de modo que las células no aglutinadas “corran” al fondo del pocillo. Las células no aglutinadas de cobaya forman un botón en el fondo del pocillo y la sedimentación puede llevar más tiempo. El título de HI es la inversa de la dilución más alta que muestra inhibición completa de la aglutinación. Actualmente, no está determinado el punto de corte para las muestras positivas en la prueba de la HI, de tal modo que los títulos bajos deben seguir estudiándose. Los aumentos de título de cuatro veces o más entre sueros pareados indican una infección reciente.

2.1.1. Tratamiento del virus con Tween 80/éter

- i) Se añaden 0,5 ml de una suspensión de Tween 80 al 10% (v/v) en PBS a 39,5 ml de líquido alantoideo infectivo, para lograr una concentración de Tween 80 del 0,125% (v/v).
- ii) Se mezcla ligeramente a temperatura ambiente durante 5 minutos y luego se añaden 20 ml de dietil éter para lograr una concentración final del 33,3% por volumen, y se mezcla bien la suspensión a 4°C durante 15 minutos.
- iii) Después de dejar que se separen las capas mediante reposo, se extrae la capa acuosa que contiene las partículas víricas rotas y se lleva a una botella de vidrio con el tapón aflojado para permitir que el exceso de éter se evapore durante una noche (John y Fulginiti, 1966). Al manipular éter deben aplicarse estrictamente las medidas de seguridad, y el trabajo debe llevarse a cabo en una campana de extracción.
- iv) El virus tratado se conserva en alícuotas a –70°C.

2.1.2. Titulación de la hemaglutinación

- i) Se añaden 25 µl de PBS a todos los pocillos de una fila de una placa de microtitulación.
- ii) Se añaden 25 µl de virus al primer pocillo y a continuación se genera una serie de diluciones a la mitad por toda la placa dejando el último pocillo como control negativo.
- iii) Se añaden otros 25 µl de PBS a todos los pocillos.
- iv) Se añaden 50 µl de eritrocitos a todos los pocillos. Se deja a temperatura ambiente o a 4°C (en concreto si la temperatura ambiente es alta), durante 30 minutos. El título HA es la última dilución de virus que produce HA parcial.

2.1.3. Pretratamiento de sueros con periodato de potasio

- i) Se mezcla un volumen de suero (150 µl) con dos volúmenes (300 µl) de periodato potásico 0,016 M recién preparado (0,38 g en 100 ml de PBS), y se deja a 22°C (± 2°C) durante 15 minutos.
- ii) Se añade un volumen de glicerol al 3% en PBS para neutralizar el exceso de solución de periodato, se mezcla y se deja a temperatura ambiente (23°C ± 2°C) durante 15 minutos.
- iii) Se inactiva en un baño a 56°C durante 30 minutos

2.1.4. Procedimiento analítico

- i) Se depositan 25 µl de PBS en todos los pocillos de una placa de microtitulación.
- ii) Se añade suero (25 µl) al primer pocillo de una fila de 12, a continuación se generan diluciones seriadas a la mitad (de 1/8 hasta como mínimo 1/512, a partir de la dilución 1/4 del tratamiento del suero), dejando el último pocillo como control.
- iii) Se diluye el antígeno para dar una dosis de 4 unidades HA (4 x dosis aglutinante mínima, es decir, título/4).
- iv) Se añaden 25 µl a cada pocillo y se incuba a 22°C (± 2°C) durante 30 minutos.
- v) Se añaden 50 µl de eritrocitos a cada pocillo. Se deja a temperatura ambiente o a 4°C (sobre todo si la temperatura ambiente es alta) durante 30 minutos.
- vi) Las placas pueden leerse inclinándolas 70° de modo que las células no aglutinadas "corran" al fondo del pocillo. La falta de aglutinación se considera como un resultado positivo.

2.2. Hemólisis radial simple

En esta prueba, los antígenos víricos se unen a eritrocitos fijados que se suspenden en agarosa que contiene complemento de cobaya (C'). Se excavan pocillos en la agarosa y se llenan con los sueros problema. Los anticuerpos contra la gripe y el C' lisan los eritrocitos recubiertos de antígeno, originando una zona hemolítica transparente alrededor del pocillo; el tamaño de esta zona es directamente proporcional al nivel de anticuerpo específico contra la cepa de la muestra problema (Morley *et al.*, 1995).

Para la prueba se pueden utilizar placas especiales de inmunodifusión (MP Biomedical), pero también son adecuadas las placas de Petri. Los eritrocitos de oveja recogidos se lavan tres veces en solución de Alsever. Se puede comprar el C' o se puede utilizar suero normal de cobaya. Los antígenos víricos son reservas cultivadas en huevo o preparaciones purificadas; las cepas usadas son las mismas que para las pruebas HI. Los virus se unen a los eritrocitos con periodato potásico o con cloruro crómico. Las preparaciones de antígeno/eritrocito unidos se mezclan con C', junto con una solución de agarosa al 1% (de grado de fusión bajo) en PBS. Debe tenerse cuidado de que la temperatura no supere los 42°C en ningún caso. Se vierte la mezcla en placas y se deja que solidifique. Se excavan en la agarosa solidificada pocillos de 3 mm de diámetro separados entre sí 12mm, por lo menos a 6 mm del borde de la placa. Estas placas se pueden conservar a 4°C durante 12 semanas. Se preparan placas para cada antígeno.

Los sueros se inactivan a 56°C durante 30 minutos, pero no es necesario más tratamiento. Los sueros pareados deben analizarse en la misma placa. Como mínimo, debe incluirse un antisuero específico de subtipo como un control de suero en un pocillo de cada placa. Todos los sueros se analizan en una placa control que contenga todos los componentes excepto virus para comprobar si aparece lisis inespecífica. Como alternativa, en la placa control se puede utilizar un virus no relacionado, tal como el A/PR/8/34 (H1N1). Los sueros que muestran actividad hemolítica de eritrocitos de oveja deben someterse a pre-absorción con eritrocitos de oveja. Las zonas de lisis deben ser transparentes y no neblinosas ni traslúcidas. Se deben medir todas las zonas transparentes y calcular las áreas de hemólisis.

2.2.1. Preparación de reactivos

- i) *Solución salina/HEPES*: NaCl al 0,85% (4,25 g/500 ml); HEPES (N-2-hidroxiethylpiperazina, N-2-ácido etanosulfónico) 0,05 M (5,95 g/500 ml); y azida sódica al 0,02%. Ajustar a pH 6,5 con NaOH.
- ii) *Solución salina/HEPES/BSA*: como la solución salina/HEPES con seroalbúmina bovina (BSA) al 0,2% (p/v).
- iii) *Solución base de CrCl₃ (2,25 M) 6 g/10 ml*: Para cada prueba hay que preparar una dilución fresca 1/400 en NaCl al 0,85%.
- iv) *PBS (London)/PBS "A"*: NaCl (10,00 g); KCl (0,25 g); Na₂PO₄ (1,45 g); KH₂PO₄ (0,25 g); y azida sódica (0,20 g). Se lleva hasta 1 litro con agua destilada.
- v) *Agarosa en PBS*: Se coloca en un agitador un recipiente con PBS "A". Se añaden lentamente 10 g de agarosa a la solución en agitación. Se licua en una olla a presión. Se deposita en botellas de vidrio para guardar a 22°C (±2°C).

- vi) *Antígeno vírico*: Se recoge el líquido alantoideo que contiene el virus infeccioso y se mantiene a -70°C . Para preparar eritrocitos de oveja sensibilizados, la relación óptima entre antígeno vírico y eritrocitos a utilizar se determina mediante una pequeña curva de titulación. Las cepas H7N7 siempre producen zonas transparentes; las cepas H3N8 a veces producen zonas neblinosas, en cuyo caso es necesario concentrar el virus por centrifugación.
- vii) *Sangre de oveja*: Se recoge sangre en un volumen igual de solución de Alsever y se conserva a 4°C . Puede ser necesario sangrar varias ovejas, debido a que las características de los eritrocitos varían entre animales. Se guarda la sangre durante 2 días antes de su utilización, y luego puede utilizarse durante un máximo de 3 semanas, con tal de que se mantenga la esterilidad.
- viii) *Complemento*: Se utiliza un complemento comercializado de cobaya o se recoge suero de cobayas jóvenes de 300–350 g de peso y se conserva en pequeños volúmenes a -70°C . Para su uso, se descongela en agua fría y se conserva a 4°C antes de ser mezclado.
- ix) *Tratamiento de los sueros*: Se utilizan sueros sin diluir inactivados por calor a 56°C durante 30 minutos. Se han de evitar ciclos reiterados de congelación y descongelación.

2.2.2. Procedimiento analítico

- i) Se lavan los eritrocitos de oveja al menos tres veces en solución salina /HEPES.
- ii) Se prepara un volumen adecuado de eritrocitos al 8% (células concentradas, v/v) en solución salina /HEPES, habiendo calculado antes el número de placas que se necesitan y considerando 1 ml por cada placa de 6×11 cm, y 1–2 ml extra.
- iii) Se añade un volumen predeterminado³ de antígeno vírico a la solución de eritrocitos al 8%. Se mantiene la mezcla a 4°C durante 10 minutos. Se puede observar hemaglutinación.
- iv) Se añade LENTAMENTE CrCl_3 (1/400 en NaCl al 0,85%) a la mitad del volumen total de suspensión de virus/eritrocitos. Se mantiene a 22°C ($\pm 2^{\circ}\text{C}$) durante 5 minutos mezclando ocasionalmente.
- v) Se sedimentan por centrifugación los eritrocitos sensibilizados a 1 500 **g** durante 5 minutos.
- vi) Se resuspenden suavemente en solución salina/HEPES/BSA y se centrifugan a 1 500 **g** durante 5 minutos.
- vii) Se resuspende la suspensión de eritrocitos al 8% en PBS "A".

Durante el proceso de sensibilización se funde la agarosa. Poco antes de su uso, se pipetea volúmenes de 7,8 ml a botellas Universal y se conservan a 42°C . Se comprueba que el agar se haya enfriado hasta 42°C antes de utilizarlo.

2.2.3. Preparación de placas

- i) Se añaden 0,9 ml de eritrocitos de oveja sensibilizados con virus a 7,8 ml de agarosa (42°C). Se mezcla con rapidez, pero suavemente.
- ii) Se añaden 0,3 ml de suero de cobaya sin diluir. Se mezcla de nuevo y se vierte en inmunoplasmas sobre una mesa nivelada. Se deja reposar y secar al aire sin tapar unos 5 minutos.
- iii) Se tapan las placas y se conservan a 4°C en una caja húmeda hasta su uso.
- iv) Se preparan placas control con células no sensibilizadas o con células sensibilizadas con un virus no relacionado. Los lotes de placas preparadas se pueden guardar varias semanas.
- v) Se excavan agujeros de 3 mm en el juego de geles siguiendo una plantilla para 16 sueros problema y un suero control positivo. En las placas de control de antígeno, se hacen cinco filas de ocho pocillos.
- vi) Se pipetea en los pocillos adecuados 10 μl de los sueros problema inactivados por calor (a 56°C durante 30 minutos) y de un suero control positivo. Se incuban a 34°C durante 20 horas en una caja húmeda.

3 Se preparan tres placas añadiendo 0,6, 1,2 o 1,8 ml de antígeno vírico a 2 ml de eritrocitos. Se añaden 1,3, 1,6 y 1,9 ml de CrCl_3 , respectivamente, y se vuelven a suspender hasta 2 ml en PBS "A". El volumen óptimo de antígeno vírico es el que produce las zonas mayores y más transparentes con un suero de referencia apropiado.

- vii) Se miden los diámetros de las zonas y se calculan las áreas de hemólisis después de restar el área del pocillo.

2.2.4. Interpretación de los resultados

Para que los resultados sean válidos, los sueros control positivo y negativo deben dar los resultados determinados por el estudio de colaboración internacional (Daly *et al.*, 2007; Mumford, 2000) o, en el caso de no utilizar esos estándares internacionales, resultados acordes a los esperados en función de la experiencia previa. Las áreas de hemólisis de los sueros control deben ser transparentes y no deben variar entre laboratorios en más de un 5% del valor asignado al suero control. Los resultados se pueden expresar como mm² o como proporción respecto al valor del suero control. Los sueros que den resultados positivos en la placa control deben adsorberse con eritrocitos de oveja. A efectos diagnósticos, deben analizarse por duplicado y en misma placa sueros correspondientes a la fase aguda y sueros correspondientes a la fase de convalecencia. El aumento de las áreas de las zonas generadas por el suero de la fase de convalecencia respecto al suero de la fase aguda constituye una evidencia de infección. Un incremento del área de 25 mm² o del 50%, lo que sea menor, por lo general se considera significativo, aunque ello dependerá de la reproducibilidad de la prueba en el laboratorio, y debe ser el equivalente a un incremento de dos veces o más en la concentración de anticuerpo. Esta área se puede calcular a partir de una curva estándar generada a partir de diluciones seriadas de un antisuero estándar.

2.3. ELISA de competición/bloqueo

Se han descrito varios ELISA de competición/bloqueo basados en la nucleoproteína del virus de la influenza A y en un anticuerpo monoclonal anti-nucleoproteína conjugado a peroxidasa de rábano. Se han evaluado cuatro ELISA que ya se comercializan y que se desarrollaron para la influenza aviar, y se ha comprobado que son efectivos para la detección de anticuerpos contra la influenza A en caballos (Kittleberger *et al.*, 2011). Deben seguirse las instrucciones que se proporcionan con cada prueba.

C. REQUISITOS PARA LAS VACUNAS

1. Antecedentes

1.1. Fundamentos y uso previsto del producto

La gripe equina es una enfermedad autolimitante y su importancia económica se debe principalmente a la naturaleza contagiosa del virus y a la perturbación que ocasiona en actividades ecuestres. Las medidas de control clave para la gripe equina son un diagnóstico rápido, las restricciones de movimientos y la vacunación. La vacunación disminuye los signos clínicos y la excreción de virus. Es fácil conseguir vacunas contra la gripe, y se empujan sistemáticamente en caballos de carreras de Europa, América y Asia. En algunos países, la vacunación es obligatoria en caballos de deporte y de carreras que compitan bajo las normas de ciertas organizaciones ecuestres. Tras un ciclo inicial de tres dosis a intervalos de aproximadamente 0, 1 y 6 meses, normalmente el requisito mínimo es una revacunación anual. En el caso de caballos jóvenes se recomienda una vacunación más frecuente, y algunas organizaciones ecuestres requieren recordatorios bianuales.

Las vacunas contra el virus de la gripe equina suelen contener virus inactivados completos o sus subunidades de glucoproteína, con o sin adyuvante. En algunos países se han empezado a comercializar vacunas de virus vivos atenuados y vectorizadas por la viruela del canario. La inmunidad producida por las vacunas inactivadas que se administran por vía intramuscular depende de la estimulación de los anticuerpos circulantes contra la HA, que neutralizan el virus; se ha demostrado que algunos productos estimulan a los anticuerpos en las secreciones respiratorias. Es fundamental mantener la integridad y estructura de la HA durante el proceso de inactivación para garantizar que la vacuna estimula a los anticuerpos neutralizantes adecuados. Esto se puede comprobar utilizando una prueba inmunológica como la SRD (difusión radial simple), que mide la HA inmunológicamente activa y capaz de reaccionar con anticuerpos específicos contra HA. Se puede confirmar la inmunogenicidad de la vacuna mediante la medición del anticuerpo contra la HA estimulado en modelos de pequeños animales o en la especie de destino. También se ha comprobado que varias vacunas contra la gripe equina fabricadas, como las vacunas fabricadas con virus entero inactivado, subunidad o vectorizadas con virus de la viruela del canario pueden sensibilizar la inmunidad celular (CMI) (Gildea *et al.*, 2013b).

En las vacunas vectorizadas con virus vivo, que contienen el gen del virus de la influenza que codifica la HA y no el antígeno, no puede realizarse una prueba de potencia mediante SRD. En su lugar, el título infeccioso del virus recombinante se utiliza como parámetro para la medición *in vitro* de la potencia, y la inmunogenicidad se evalúa midiendo los anticuerpos generados en las especies de destino.

Los anticuerpos contra la HA medidos por SRH y estimulados por el virus entero inactivado, por una subunidad o por la vacuna vectorizada con el virus de la viruela del canario tienen una correlación alta con la protección frente a la infección en un sistema en el que se emplea un modelo de desafío experimental (Edlund Toulemonde *et al.*, 2005; Mumford, 1983; 1994). Por el contrario, un mutante adaptado al frío y sensible a la temperatura que se utiliza como vacuna viva atenuada se replica en las vías respiratorias altas y no produce niveles altos de anticuerpos circulantes frente a la HA, pero sin embargo, proporciona protección contra la infección desafío. Se sospecha que la inmunidad está mediada por la respuesta mucosa o celular y no por los anticuerpos circulantes. Como en el caso de la vacuna vectorizada, las pruebas de control durante el proceso se basan en la medición del título del virus infeccioso.

Las directrices para la producción de vacunas veterinarias se presentan en el capítulo 1.1.8. *Principios de producción de vacunas veterinarias*. Las normas que se dan aquí y en el capítulo 1.1.8 son de carácter general porque los fabricantes están obligados a cumplir los requisitos de la Farmacopea Europea, el USDA u otros requisitos nacionales o regionales.

Todas las vacunas contra la gripe equina deben contener cepas epidemiológicamente relevantes

Desde 1995 se está aplicando un programa mundial de vigilancia formal de la gripe equina. Los Laboratorios de Referencia de la OIE y otros laboratorios colaboradores recogen datos sobre los brotes de gripe equina y de variación de cepas que un Grupo de Expertos en Vigilancia (ESP) en el que se encuentran representantes de la OIE y de la OMS revisa anualmente. Este grupo plantea consideraciones relativas a la necesidad de actualizar vacunas, que se publican anualmente en el Boletín de la OIE y en la página web de la OIE. Los criterios de actualización de vacunas contra la gripe equina son similares a los que se aplican a las vacunas de gripe humana y se basan en análisis de alteraciones antigénicas, alteraciones genéticas y, cuando es posible, datos relevantes sobre desafíos experimentales.

H7N7: Muchas vacunas siguen conteniendo una cepa H7N7. No obstante, el Grupo de Expertos en Vigilancia ha recomendado que se omita el componente H7N7 porque a lo largo de los últimos 30 años no se ha documentado ninguna infección por este subtipo.

H3N8: Co-circulan variantes antigénicas y genéticas de virus H3N8 (Bryant *et al.*, 2009; Favaro *et al.*, 2018) y es importante incluir una cepa o cepas que sean epidemiológicamente relevantes, como recomienda el Grupo de Expertos en Vigilancia de la OIE. Los Laboratorios de Referencia de la OIE pueden contribuir a escoger las cepas vacunales más adecuadas.

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

2.1. Características del inóculo

2.1.1. Características biológicas

Para cada cepa vacuna debe prepararse un lote prototipo para establecer su idoneidad como cepa vacunal, es decir, debe confirmarse su pureza e inocuidad mediante técnicas estándar. Debe confirmarse la capacidad de los virus de lotes de siembra de crecer hasta altos títulos y de generar suficiente masa antigénica como para estimular suficientes respuestas de anticuerpos en las especies de destino. Además, los virus vacunales derivados de células MDCK deben caracterizarse por completo para garantizar que no hayan surgido variantes antigénicas durante el cultivo, de tal modo que el virus de la vacuna ya no sea representativo de la cepa original.

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

Las cepas de virus se pueden obtener de Laboratorios de Referencia de la OIE (véase la Tabla de la parte 3 de este *Manual Terrestre*). Los virus que se seleccionan como cepas vacunales deben describirse en lo que respecta a su origen y a su historia de pases. Las cepas se propagan en la cavidad alantoidea de huevos embrionados de 10 días de gallina o en cultivos celulares, como los de células MDCK. Se deben hacer todas las manipulaciones de cada cepa por separado. El crecimiento vírico se sigue mediante las pruebas de HA. El virus que se pasa se identifica por pruebas serológicas, como HI o SRH, o por PCR mediante el uso de cebadores específicos. Si el virus vacunal crece en cultivo celular se deben hacer estudios con suero de hurón y MAb para asegurarse de que no se seleccionan variantes de virus durante los pases para la preparación de los inóculos víricos primarios y de trabajo. Los inóculos primarios de virus y los de trabajo se dividen en alícuotas y se guardan en forma liofilizada a -20°C o a -70°C después de hacer pruebas para agentes extraños. Se debe mantener un registro escrito de las condiciones de almacenamiento.

El lote de inóculo primario de cada cepa vacunal seleccionada debe procesarse de una sola vez para asegurar una composición uniforme, y debe comprobarse si presenta agentes extraños y caracterizarse por completo. Para caracterizar las cepas vacunales se pueden obtener antisueros o MAb de los Laboratorios de Referencia de la OIE y la OMS para su utilización en las pruebas HI.

Los lotes de trabajo derivan de un lote de inóculo primario y deben ser de composición uniforme, estar libres de agentes extraños y caracterizarse por completo. Para la producción de vacunas se utilizan alícuotas del inóculo de trabajo.

Tanto los lotes de inóculo primario como los de trabajo deben prepararse en huevos libres de patógenos específicos o, cuando menos, en huevos procedentes de una parvada sana.

Si se utilizan células MDCK para propagar al virus vacunal, se deben establecer y guardar en nitrógeno líquido las líneas celulares primarias, en las que se debe verificar la ausencia de agentes extraños de acuerdo con las Directrices de la Autoridad Nacional de Control.

La comprobación de la presencia de agentes extraños, incluidos micoplasmas y otros virus equinos, en los inóculos víricos debe realizarse mediante las técnicas apropiadas, como la inoculación de cultivos de tejidos susceptibles y la comprobación de efecto citopático, o la aplicación de anticuerpos fluorescentes para la detección de antígeno.

Se debe excluir específicamente la presencia de otros agentes patógenos respiratorios comunes en équidos, como los herpesvirus equinos 1, 2 y 4, los picornavirus equinos, el virus de la arteritis equina y adenovirus equinos.

Se debe confirmar la ausencia de bacterias mediante pruebas estándar de esterilidad y pruebas de toxicidad en pequeños animales.

2.2. Método de fabricación

2.2.1. Procedimiento

La producción se basa en un sistema de lotes de inóculo que se ha validado respecto a las características de las cepas vacunales. Cuando se utilicen huevos, cada cepa de virus se inocula por separado en la cavidad alantoidea de huevos embrionados de 9–11 días de gallinas procedentes de una parvada sana. Los huevos se incuban a una temperatura adecuada durante 2–3 días y se recoge el líquido alantoideo. Como alternativa, se inocula cada cepa por separado en cultivos celulares MDCK. Las suspensiones víricas de cada cepa se recogen por separado y se inactivan. Si es necesario, se pueden purificar. Se pueden añadir adyuvantes apropiados y conservantes antimicrobianos.

Las combinaciones de virus monovalente deben inactivarse cuanto antes mediante un método aprobado por la Autoridad Nacional de Control después de su preparación. Cuando se usa formalina (formaldehído al 37%) o beta-propiolactona (2-oxetanona), la concentración por volumen no debe exceder el 0,2%. Lo ideal es mantener las combinaciones de virus a 4°C e inactivarlas en un plazo de 5 días tras de la recogida. Se debe demostrar la inactivación de la vacuna. Un método adecuado consiste en inocular 0,2 ml de la combinación monovalente no diluida, y de diluciones 1/10 y 1/100 de la misma, a las cavidades alantoideas de grupos de huevos fértiles (10 huevos por grupo), e incubar los huevos a $33-37^{\circ}\text{C}$ durante 3 días. A cada

nivel de dosis, al menos 8 de cada 10 huevos deben sobrevivir. De cada huevo superviviente, se toman 0,5 ml de líquido alantoideo. Los líquidos recogidos de cada uno de los grupos se juntan, y se inoculan sin diluir 0,2 ml de cada uno de los tres conjuntos en otro grupo de 10 huevos fértiles. En estos nuevos grupos de huevos no se debe detectar actividad de hemaglutinina. En algunos países, el requisito de que sobrevivan el 80% de los huevos durante la incubación puede resultar imposible, en cuyo caso la Autoridad Nacional de Control debe especificar un requisito modificado. Antes de la inactivación, se deben tomar muestras para pruebas de esterilidad bacteriana y fúngica.

El material monovalente se puede concentrar y purificar mediante centrifugación a velocidad elevada u otros métodos adecuados aprobados por la Autoridad Nacional de Control, antes o después del proceso de inactivación. Es importante concentrar y purificar el virus bajo condiciones óptimas, por ejemplo, a temperaturas que mantengan sus propiedades antigénicas.

Se debe demostrar que el conjunto de virus monovalente no contiene virus de la gripe viable cuando se analice mediante inoculación de huevos embrionados de gallina, por un método aprobado por la Autoridad Nacional de Control. Como alternativa, también se puede comprobar si la inactivación es satisfactoria inoculando monocapas de células MDCK.

2.2.2. Requisitos para los sustratos y los medios

Las vacunas deben producirse en huevos o en una línea celular que cumpla los requisitos de la Autoridad Nacional de Control. Siempre que sea posible, debe mantenerse al mínimo el uso de sustancias de origen animal, como suero o tripsina. Las sustancias de origen animal utilizadas durante la producción deben someterse a procedimientos de esterilización o inactivación adecuados y validados, o bien debe comprobarse que están libres de microorganismos extraños.

2.2.3. Controles durante el proceso

Se deben llevar a cabo importantes controles durante el proceso antes y después de la inactivación, y antes y después de la concentración y la purificación.

Los controles durante el proceso comprenden: (a) identidad de las cepas de virus (analizadas por HI); (b) esterilidad; (c) título de virus; (d) contenido de hemaglutinina (analizado mediante unidades de hemaglutinación de eritrocitos de pollo, CCA [aglutinación de células de pollo]); y (e) HA inmunológicamente activa (analizada mediante SRD u otro método inmunoquímico adecuado).

2.2.4. Prueba de la difusión radial simple

La SRD es un método fiable para medir HA inmunológicamente activa en términos de μg de HA, y se utiliza de modo rutinario para determinar la potencia de las vacunas contra la gripe humana (Wood *et al.*, 19836).

La potencia de la vacuna inactivada de la gripe equina depende de la concentración de hemaglutinina inmunológicamente activa (Wood *et al.*, 1983a).

La determinación del contenido antigénico de la vacuna solamente por CCA puede ser errónea, ya que la sensibilidad de esta prueba refleja la capacidad de las cepas del virus para aglutinar eritrocitos. Una rotura del virus puede ocasionar un aumento aparente de HA si se mide por CCA. La prueba de la CCA no proporciona una medida de las propiedades antigénicas de la HA (la HA puede mantener su propiedad de unirse a eritrocitos perdiendo al mismo tiempo su capacidad para estimular la formación de anticuerpos).

La composición de la mayoría de las vacunas contra la gripe equina consiste en más de una variante del subtipo H3N8. En tal situación, no es posible juzgar la potencia de componentes individuales de H3N8 en pruebas serológicas realizadas con sueros de caballos o de pequeños animales vacunados con el producto final, debido a la reacción cruzada entre las dos cepas del mismo subtipo. Por lo tanto, es importante utilizar un método fiable, como el de la SRD, para medir la potencia de cada componente antes y después de la inactivación y antes de la mezcla y de la formulación con adyuvante.

En la prueba SRD, se comparan preparaciones de virus con una preparación de referencia calibrada cuyo contenido en HA se conoce. Los antígenos se dejan difundir a través de un gel

que contiene un antisuero específico contra un antígeno HA particular. La distancia que el antígeno ha difundido antes de precipitar con el anticuerpo incorporado en el gel es directamente proporcional a la concentración de hemaglutinina presente en las preparaciones de antígeno.

Los reactivos estándar para la prueba SRD se pueden adquirir del Laboratorio Internacional de la OMS para Estándares Biológicos⁴. En la actualidad están disponibles los reactivos para las cepas de H3N8 A/eq/Miami/63, A/eq/Kentucky/81, A/eq/Newmarket/1/93 (linaje americano) y A/eq(Newmarket/2/93 (linaje europeo).

2.2.5. Pruebas en lotes de producto final

i) Esterilidad y pureza

Las pruebas de esterilidad y ausencia de contaminación en los materiales biológicos de uso veterinario se encuentran en el capítulo 1.1.9.

ii) Inocuidad

- a) En el caso de las vacunas inactivadas o de subunidades, debe demostrarse la ausencia de infectividad vírica mediante dos pases en 10 huevos de gallina embrionados. El líquido alantoideo no debe presentar actividad hemaglutinante.
- b) Se utilizan al menos tres caballos y se inocula cada uno de ellos por vía intramuscular (en dos sitios diferentes) con la dosis de vacuna especificada por el fabricante; estas inoculaciones se repiten 2–4 semanas más tarde. Los animales se mantienen en observación durante 10 días después de la segunda serie de inyecciones. No deben aparecer reacciones anómalas localizadas ni sistémicas.
- c) Si la vacuna va a usarse en yeguas, debe demostrarse la inocuidad administrando dos dosis de vacuna al menos a dos yeguas gestantes, con el intervalo prescrito y en el trimestre en que se recomienda la vacunación. Una vez se ha comprobado la inocuidad en un lote prototipo, no es necesario realizar analizar todos los demás lotes de producto final en yeguas gestantes.

iii) Potencia del lote

Después de mezclar los antígenos víricos y los adyuvantes, se debe comprobar *in vivo* la potencia utilizando caballos y cobayas u otra prueba inmunoquímica adecuada. Los adyuvantes causan interferencias en pruebas cuantitativas *in vitro*, como en CCA y SRD, aunque SRD se puede utilizar con el producto final como prueba cualitativa para demostrar la presencia de antígeno de cada cepa vacunal. Para pruebas repetitivas con lotes, solo se utilizan cobayas u otra prueba inmunoquímica adecuada, sujeta a acuerdo por parte de la Autoridad Nacional de Control.

a) Respuestas serológicas en caballos

Para que una prueba de potencia *in vivo* sea válida, se deben seleccionar para vacunación caballos seronegativos no sometidos previamente a experimentación. En caballos jóvenes o ponis (no menores de 6 meses) debe comprobarse si presentan anticuerpo utilizando los virus H7N7 y H3N8 incluyendo virus aislados recientemente representativos de la zona en que se criaron los caballos. Si se utilizan pruebas HI en el análisis, los virus H3N8 deben tratarse con Tween 80/éter para aumentar la sensibilidad de la prueba. De modo alternativo, se puede utilizar SRH para establecer el estado seronegativo de los animales.

Para comprobar la eficacia de una vacuna en caballos, se inyecta el volumen correspondiente a una dosis por animal a cinco caballos susceptibles seronegativos, por la vía recomendada. Tras el período recomendado entre la primera y la segunda dosis, como se indica en la etiqueta, se inyecta a cada caballo un volumen de vacuna correspondiente a la segunda dosis.

Se toman tres muestras de sangre de cada animal; la primera, en el momento de la primera vacunación; la segunda, una semana después de la primera vacunación para comprobar si hay respuesta anamnésica; y la tercera, dos semanas después de la segunda vacunación.

4 National Institute for Biological Standards and Control, Blanche Lane, South Mimms, Potters Bar, Hertfordshire EN6 3QG, Reino Unido.

La prueba serológica utilizada para medir la respuesta de anticuerpos frente a los virus contenidos en la vacuna debe estar estandarizada por una prueba válida de potencia *in vivo*. Con fines de control de calidad, la prueba SRH (véase el apartado B.2.2.) es la de elección si se dispone de sueros estándar de referencia de la Farmacopea Europea⁵. Estos sueros deben analizarse en paralelo con los sueros problema para asegurar la validez de la prueba en cuanto a sensibilidad; los valores obtenidos no deben variar más del 20% respecto a los valores asignados por SRH en un estudio internacional de colaboración (Daly *et al.*, 2007; Mumford, 2000). Debido a la baja repetitividad y reproducibilidad de la prueba HI entre distintos laboratorios, a estos sueros no se les pudo asignar títulos de HI.

Tras la vacunación, el valor de anticuerpos medido por SRH no debe ser menor de 150 mm². Esto es superior al valor que se requiere en la Monografía de la *Farmacopea Europea* para las vacunas inactivadas contra la gripe equina (85 mm²) ya que se considera que este valor no proporciona protección. Si el valor encontrado en algún caballo después de la primera vacunación indicara que ha habido una respuesta anamnésica, el resultado no se tiene en cuenta. Se realiza una prueba suplementaria, como se ha descrito anteriormente, reemplazando los caballos que presentaron respuesta anamnésica por un número igual de animales nuevos.

Si se utiliza la prueba HI, el título de anticuerpos de cada suero tomado después de la segunda vacunación no debe ser menor de 1/64 en cada prueba (calculado para el suero original, teniendo en cuenta la predilución de 1/8). Como alternativa, los niveles de anticuerpo estimulados por la vacuna en estudio deben ser al menos iguales a los niveles estimulados por una vacuna estándar estudiada en paralelo, que se haya demostrado antes que es capaz de proteger a los caballos contra una infección de desafío.

b) Estudios de desafío en caballos

Estos estudios se pueden llevar a cabo exponiendo caballos o ponis vacunados a un aerosol de virus de la gripe virulento, al menos 2 semanas, aunque preferiblemente más de 3 meses después de la segunda dosis de vacuna. La comparación de signos clínicos, excreción de virus y respuestas serológicas se lleva a cabo con un grupo de animales control no vacunados que se estimulan con la dosis de desafío al mismo tiempo. La programación del proceso de desafío debe basarse en los datos que obren en el registro respecto a la duración de la inmunidad. La protección a las 2 semanas post-vacunación cuando los niveles de anticuerpos están en su máxima concentración no necesariamente indica una buena duración de la inmunidad sobre el terreno.

Si se han obtenido resultados satisfactorios en las pruebas de potencia realizadas en caballos con un lote representativo de la vacuna, no es necesario seguir realizando estas pruebas como controles rutinarios en otros lotes de vacuna que se hayan preparado utilizando el mismo sistema de lotes de inóculo, con tal de que la Autoridad Nacional de Control esté de acuerdo.

c) Respuestas serológicas de cobayas

Se inyecta una dosis de vacuna al menos a cinco cobayas que carezcan de anticuerpos específicos. Se toman muestras de sangre 21 días después, y el suero se analiza mediante SRH o HI (véanse los apartados B.2.1. y B.2.2.). Se realizan las pruebas en cada suero utilizando, respectivamente, los antígenos preparados a partir de las cepas utilizadas en la producción de la vacuna. El título de anticuerpos de cada suero obtenido en cada prueba no debe ser inferior al título estimulado por una vacuna estándar que se haya demostrado que logra en caballos niveles de protección por anticuerpos.

2.3. Requisitos para la autorización de vacunas

2.3.1. Requisitos de inocuidad

Los requisitos de inocuidad pueden variar en función de la Autoridad Nacional, pero normalmente consisten en la evaluación de la administración de una sobredosis y de la

5 Suero contra A/eq/Newmarket/1/77 (Número de catálogo E0850010), A/eq/Newmarket/1/93 (E0850021) y A/eq/Newmarket/2/93 (E0850022).

administración repetida de una dosis a caballos jóvenes y yeguas gestantes, en el caso de que la vacuna vaya destinada a yeguas gestantes. En el caso de las vacunas vivas, debe estudiarse la diseminación por parte del caballo vacunado y la transmisión de la cepa vacunal de caballos vacunados a no vacunados, así como las posibles consecuencias. Deben llevarse a cabo estudios de reversión a la virulencia mediante pases seriados de la vacuna viva.

2.3.2. Requisitos de eficacia

Los requisitos de eficacia pueden variar en función de la Autoridad Nacional, pero normalmente consisten en la evaluación de la respuesta serológica en caballos y en estudios de desafío con virus en caballos susceptibles (véase el apartado C.2.2.5.iii.b).

Cuando en el prospecto de la vacuna se indique la duración de la inmunidad, dichas indicaciones deben estar respaldadas por datos sobre la duración de los niveles de anticuerpos protectores que se mantienen en caballos vacunados según la pauta recomendada. Los niveles de anticuerpos considerados como protectores deben ser validados mediante estudios de desafío o por comparación con datos publicados.

2.3.3. Estabilidad

Las vacunas deben conservarse a $5 \pm 3^{\circ}\text{C}$ protegidas de la luz. El periodo de validez indicado en el prospecto debe demostrarse comprobando la potencia de alícuotas a lo largo del tiempo utilizando la prueba de potencia en cobayas (véase el apartado C.2.2.5.iii.c.).

2.4. Requisitos para la autorización de nuevas cepas vacunales

Para que los fabricantes de vacuna puedan responder rápidamente a las recomendaciones del Grupo de Expertos en Vigilancia, deberán autorizarse las vacunas existentes que se hayan actualizado con arreglo a las recomendaciones de la OIE, siempre que cumplan los requisitos de las pruebas que se realicen en los lotes de producto final (véase el Apartado C.2.2.5).

El Comité de Medicamentos Veterinarios (CVMP) de la Agencia Europea para la Evaluación de Medicamentos (EMA) ha desarrollado unas Directrices sobre el cumplimiento de las vacunas autorizadas para la gripe equina con las recomendaciones de la OIE. En EE.UU., los cambios de cepa vacunal en las vacunas contra la gripe equina se tratan en la Memoranda sobre Servicios Veterinarios de la USDA/CVB/ nº 800.111, que sigue las recomendaciones de la OIE.

3. Vacunas desarrolladas mediante biotecnología

3.1. Vacunas existentes y sus ventajas

En algunos países se dispone de una vacuna recombinante con virus de la viruela del canario, que se empleó en el programa de control y erradicación de la gripe equina en el año 2007 en Australia. Se utilizó un ELISA de nucleocápsida para diferenciar caballos vacunados con la vacuna recombinante de los caballos que habían estado expuestos a virus por infección natural (DIVA). Esta estrategia DIVA fue posible porque el virus recombinante de la viruela del canario expresa solo el gen de la gripe equina correspondiente a la hemaglutinina. Existen algunas pruebas de que esta vacuna podría utilizarse para estimular al sistema inmunitario a pesar de la presencia de anticuerpos maternos (Minke *et al.*, 2007).

3.2. Requisitos especiales

Las Autoridades Nacionales a menudo exigen una evaluación del riesgo ambiental, que puede consistir en una evaluación de los posibles efectos adversos directos e indirectos, inmediatos o retardados de las vacunas modificadas genéticamente en la salud humana y animal y en el medio ambiente. Tal vez tengan que evaluarse la estabilidad fenotípica y genética de la vacuna y sus posibles interacciones con otros organismos.

BIBLIOGRAFÍA

ABDEL-MONEIM A.S., ABDEL-GHANY A.E. & SHANY A.S.S. (2010). Isolation and characterisation of highly pathogenic avian influenza subtype H5N1 from donkeys. *J. Biomed. Sci.*, doi. 10.1186/1423-0127-17-25.

ALEXANDER D.J. & BROWN I.H. (2000). Recent zoonoses caused by influenza A viruses. *Rev. sci. tech. Off. Int. Epiz.*, **19**, 197–225.

BRYANT N.A., RASH A.S., RUSSELL C.A., ROSS J., COOKE A., BOWMAN S., MACRAE S., LEWIS N.S., PAILLOT R., ZANONI R., MEIER H., GRIFFITHS L.A., DALY J.M., TIWARI A., CHAMBERS T.M., NEWTON J.R. & ELTON D.M. (2009). Antigenic and genetic variations in European and North American equine influenza virus strains (H3N8) isolated from 2006 to 2007. *Vet. Microbiol.*, **138**, 41–52.

CHAMBERS T.M., SHORTRIDGE K.F., LI P.H., POWELL D.G. & WATKINS K.L. (1994). Rapid diagnosis of equine influenza by the Directigen FLU-A enzyme immunoassay. *Vet. Rec.*, **135**, 275–279.

CRAWFORD P.C., DUBOVI E.J., CASTLEMAN W.L., STEPHENSON I., GIBBS E.P., CHEN L., SMITH C., HILL R.C., FERRO P., POMPEY J., BRIGHT R.A., MEDINA M.J., JOHNSON C.M., OLSEN C.W., COX N.J., KLIMOV A.I., KATZ J.M. & DONIS R.O. (2005). Transmission of equine influenza virus to dogs. *Science*, **310**, 482–485.

DALY J., DAAS A. & BEHR-GROSS M.E. (2007). Collaborative study for the establishment of a candidate equine influenza subtype 2 American-like strain A/EQ/South Africa/4/03 – horse antiserum biological reference preparation. *Pharmeuropa Bio*, **1**, 7–14.

DALY J.M., WHITWELL K.E., MILLER J., DOWD G., CARDWELL J.M. & SMITH K.C. (2006). Investigation of equine influenza cases exhibiting neurological disease: coincidence or association? *J. Comp. Pathol.*, **134**, 231–135. [PMID: 16527298]

EDLUND TOULEMONDE C., DALY J., SINDLE T., GUIGAL P.M., AUDONNET J.C. & MINKE J.M. (2005). Efficacy of a recombinant equine influenza vaccine against challenge with an American lineage H3N8 influenza virus responsible for the 20003 outbreak in the United Kingdom. (2005). *Vet. Rec.*, **156**, 367–3771.

EUROPEAN AGENCY FOR THE EVALUATION OF MEDICINAL PRODUCTS (EMA), COMMITTEE FOR VETERINARY MEDICINAL PRODUCTS (CVMP) (1998). Note for Guidance: Harmonisation of Requirements for Equine Influenza Vaccines Specific Requirements for Substitution or Addition of a Strain or Strains. Document EMA/CVMP/112/98-FINAL, EMA, London, UK.

FAVARO P.F., FERNANDES W.R., RISCHARK D., BRANDAO P.E., DE SOUZA SILVA S.O. & RICHTZENHAIN L.J. (2018). Evolution of equine influenza viruses (H3N8) during a Brazilian outbreak, 2015. *Brazilian J. Microbiol.*, **49**, 336–346.

FOORD A.J., SELLECK P., COLLING A., KLIPPEL J., MIDDLETON D. & HEINE H.G. (2009). Real-time RT-PCR for detection of equine influenza and evaluation using samples from horses infected with A/equine/Sydney/2007 (H3N8). *Vet. Microbiol.*, **137**, 1–9.

GALVIN P., ARKINS S., GILDEA S. & CULLINANE A. (2013). The evaluation of a nucleoprotein ELISA for the detection of equine influenza antibodies and the differentiation of infected from vaccinated horses (DIVA). *Influenza and Other Respiratory Viruses*, **7** (Suppl. 4), 73–80.

GERBER H. (1970). Clinical features, sequelae and epidemiology of equine influenza. *In: Equine Infectious Diseases II*, Bryans J.T. & Gerber H., eds. S. Karger, Basel, Switzerland, 63–80.

GILDEA S., FITZPATRICK D.A. & CULLINANE A. (2013a) Epidemiological and virological investigations of equine influenza outbreaks in Ireland (2010 – 2012). *Influenza and Other Respiratory Viruses*, **7** (Suppl 4), 61–72.

GILDEA S., QUINLIVAN M., MURPHY B. & CULLINANE A. (2013b) Humoral response and antiviral cytokine expression following vaccination of thoroughbred weanlings – a blinded comparison of commercially available vaccines. *Vaccine*, **31**, 5216–5222.

GUO Y., WANG M., KAWAOKA Y., GORMAN O., ITO T., SAITO T. & WEBSTER R.G. (1992). Characterisation of a new avian-like influenza A virus from horses in China. *Virology*, **188**, 245–255.

HEINE H.G., TRINIDAD L., SELLECK P. & LOWTHER S. (2007). Rapid detection of highly pathogenic avian influenza H5N1 virus by TaqMan reverse transcriptase–polymerase chain reaction. *Avian Dis.*, **51** (Suppl. 1), 370–372.

- ILOBI C.P., HENFREY R., ROBERTSON J.S., MUMFORD J.A., ERASMUS B.J. & WOOD J.M. (1994). Antigenic and molecular characterisation of host-cell mediated variants of equine H3N8 influenza viruses. *J. Gen. Virol.*, **75**, 669–673.
- JOHN T.J. & FULGINITI V.A. (1966). Parainfluenza 2 virus: increase in haemagglutinin titre on treatment with Tween-80 and ether. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.*, **121**, 109–111.
- KITTELBERGER R, MCFADDEN A.M, HANNAH M.J, JENNER J, BUENO R, WAIT J, KIRKLAND P.D, DELBRIDGE G, HEINE H.G, SELLECK P.W, PEARCE T.W, PIGOTT C.J, O'KEEFE J.S. (2011) Comparative evaluation of four competitive/blocking ELISAs for the detection of influenza A antibodies in horses. *Vet Microbiol.*, **148**, 377–383.
- LIVESAY G.J., O'NEILL T., HANNANT D, YADAV M.P. & MUMFORD J.A. (1993). The outbreak of equine influenza (H3N8) in the United Kingdom in 1989; diagnostic use of an antigen capture ELISA. *Vet. Rec.*, **133**, 515–519.
- LU Z., CHAMBERS T.M., BOLIAR S., BRANSCUM A.J., STURGILL T.L., TIMONEY P.J., REEDY S.E., TUDOR L.R., DUBOVI E.J., VICKERS M.L., SELLS S. & BALASURIYA U.B. (2009). Development and evaluation of one-step Taqman real-time reverse transcription-PCR assays targeting nucleoprotein, matrix and hemagglutinin genes of equine influenza virus. *J. Clin. Microbiol.*, **47**, 3907–3913.
- MINKE J.M., TOULEMONDE C.E., DINIC S., COZETTE V, CULLINANE A., AUDONNET J.C. (2007). Effective priming of foals born to immune dams against influenza by a canarypox-vectored recombinant influenza H3N8 vaccine. *J. Comp. Pathol.*, **137**, S76–S80.
- MORLEY P.S., BOGDAN J.R., TOWNSEND H.G.G. & HAINES D.M. (1995). The effect of changing single radial haemolysis assay method when quantifying influenza A antibodies in serum. *Vet. Microbiol.*, **44**, 101–110.
- MUMFORD J.A. (1992). Progress in the control of equine influenza. *In: Equine Infectious Disease VI: Proceedings of the Sixth International Conference*, Plowright W., Rosedale P.D. & Wade J.F., eds. Newmarket, R & W Publications, UK, 207–217.
- MUMFORD J. (2000). Collaborative study for the establishment of three European Pharmacopoeia biological reference preparations for equine influenza horse antiserum. *PHARMEUROPA Special Issue, Bio 2000-1*, 5–21.
- MUMFORD J.A., JESSETT D., DUNLEAVY U., WOOD J., HANNANT D., SUNDQUIST B. & COOK R.F. (1994). Antigenicity and immunogenicity of experimental equine influenza ISCOM vaccines. *Vaccine*, **12**, 857–863.
- MUMFORD J., WOOD J.M., SCOTT A.M., FOLKERS C. & SCHILD G.C. (1983). Studies with inactivated equine influenza vaccine 2. Protection against experimental infection with influenza virus A/equine/Newmarket/79 (H3N8). *J. Hyg. (Camb.)*, **90**, 385–395.
- OXBURGH L. & KLINGBORN B. (1999). Cocirculation of two distinct lineages of equine influenza virus subtype H3N8. *J. Clin. Microbiol.*, **37**, 3005–3009.
- QUINLIVAN M., DEMPSEY E., RYAN F., ARKINS S. & CULLINANE A. (2005). Real-time reverse transcription PCR for detection and quantitative analysis of equine influenza virus. *J. Clin. Microbiol.*, **43**, 5055–5057.
- RASH A., WOODWARD A., BRYANT N., MCCAULEY J. & ELTON D. (2014). An efficient genome sequencing method for equine influenza (H3N8) virus reveals a new polymorphism in the PA-X protein. *Viol. J.*, **11**, 159.
- SERGEANT E.S, COWLED B.D, BINGHAM P. (2011) Diagnostic specificity of an equine influenza blocking ELISA estimated from New South Wales field data from the Australian epidemic in 2007. *Aust. Vet. J. Suppl. 1*, **89**, 43–45.
- TU J., ZHOU H., JIANG T., LI C., ZHANG A., GUO X., ZOU W., CHEN H. & JIN M. (2009). Isolation and molecular characterization of equine H3N8 influenza virus from pigs in China. *Arch. Virol.*, **154**, 887–890.
- WEBSTER R.G. (1993). Are equine 1 influenza viruses still present in horses? *Equine Vet. J.*, **25**, 537–538.
- WOOD J.M., MUMFORD J., FOLKERS C., SCOTT A.M. & SCHILD G.C. (1983b). Studies with inactivated equine influenza vaccine 1. Serological responses of ponies to graded doses of vaccine. *J. Hyg. (Camb.)*, **90**, 371–384.

WOOD J.M., SCHILD G.C., FOLKERS C., MUMFORD J. & NEWMAN R.W. (1983a). The standardisation of inactivated equine influenza vaccines by single-radial immunodiffusion. *J. Biol. Stand.*, **11**, 133–136.

YAMANAKA T., TSUJIMURA K., KONDO T. & MATSUMURA T. (2008). Evaluation of antigen detection kits for diagnosis of equine influenza. *J. Vet. Med. Sci.*, **70**, 189–192.

*
* *

NB: Existen Laboratorios de Referencia de la OIE para la gripe equina (puede consultarse la página web de la OIE: <https://www.oie.int/es/que-ofrecemos/red-de-expertos/laboratorios-de-referencia/#ui-id-3>) Por favor, contacte con los Laboratorios de Referencia de la OIE para información adicional sobre las pruebas de diagnóstico, los reactivos y las vacunas para la gripe equina

NB: ADOPTADO POR PRIMERA VEZ EN 1990. ÚLTIMAS ACTUALIZACIONES ADOPTADAS EN 2019.