

CAPÍTULO 3.1.3.

LENGUA AZUL (INFECCIÓN POR EL VIRUS DE LA LENGUA AZUL)

RESUMEN

La lengua azul (LA) es una enfermedad infecciosa y no contagiosa transmitida por vectores que afecta a rumiantes domésticos y salvajes, como ovejas, cabras, bovinos, búfalos, ciervos, la mayor parte de los antílopes africanos y muchos otros miembros de los artiodáctilos, a modo de hospedadores vertebrados. La infección por el virus de la lengua azul (VLA) es latente en la gran mayoría de los animales, pero puede causar enfermedad mortal en algunas ovejas, ciervos y rumiantes salvajes infectados. En el ganado bovino, la infección por el VLA no suele dar lugar a signos clínicos, con la excepción de una infección por VLA8 en Europa. El ganado bovino es especialmente importante en la epidemiología de la enfermedad debido a la larga viremia si no hay enfermedad clínica. Los síntomas clínicos se deben principalmente a la permeabilidad vascular y consisten en fiebre, hiperemia y congestión, edema y hemorragias faciales, y erosión de las mucosas.

Identificación del agente: El VLA forma parte del género Orbivirus, de la familia Reoviridae, y es una de las 22 especies o serogrupos reconocidos dentro del género. La especie, o serogrupo, del VLA contiene 26 serotipos reconocidos. El serotipo de los virus individuales dentro de cada serogrupo se identifica mediante pruebas de neutralización, y cada cepa dentro de un determinado serotipo se identifica mediante secuenciación. Las partículas completas del VLA consisten en una cápsida icosaédrica doble que contiene un ARN bicatenario. La cápsida externa incluye dos proteínas, una de las cuales, la VP2, es el determinante principal de la especificidad serotípica. La cápsida interna contiene dos proteínas principales y tres minoritarias, y diez módulos genéticos de ARN bicatenario. La proteína VP7 de la cápsida interna es la que posee los antígenos de especie o de serogrupo. La identificación tradicional del virus implica su aislamiento y replicación en huevos embrionados de pollo, células de Culicoides, cultivos de tejido o inoculación en rumiantes susceptibles, y la posterior aplicación de pruebas específicas para establecer el serogrupo y el serotipo. La tecnología de la reacción en cadena de la polimerasa con transcripción inversa (RT-PCR) ha permitido una amplificación rápida del ADNc del VLA en muestras clínicas, y ahora se dispone de un procedimiento basado en la RT-PCR. La PCR en tiempo real está permitiendo el desarrollo de pruebas incluso más rápidas y sensibles, y se han validado y publicado los procedimientos. Estos procedimientos pueden potenciar las técnicas de la virología clásica proporcionando información sobre el serogrupo, el serotipo y el topotipo víricos.

Pruebas serológicas: Las respuestas serológicas aparecen a los 7–14 días de la infección por VLA y, por lo general, son duraderas. Se recomienda un enzoinmunoanálisis basado en anticuerpos monoclonales para detectar específicamente anticuerpos anti VLA (serogrupo). Los procedimientos para identificar y cuantificar anticuerpos contra serotipos del VLA son más complejos, y suelen basarse en pruebas de neutralización.

Requisitos para las vacunas: En varios países se utiliza la vacunación para reducir las pérdidas directas, evitar la circulación del VLA y permitir los desplazamientos seguros de los animales. La producción de vacunas vivas atenuadas en grandes cantidades resulta barata, son capaces de generar una inmunidad adecuada tras una única inyección y tienen una eficacia demostrada para la prevención de la enfermedad clínica. Las consecuencias adversas son un descenso en la producción de leche en las ovejas lactantes y el aborto o la muerte embrionaria y teratogénesis en la descendencia de las hembras grávidas vacunadas durante la primera mitad de la gestación. Otro riesgo asociado al uso de las vacunas vivas atenuadas es su potencial de diseminación por vectores, con la eventual reversión a la forma patógena y la recombinación de los genes del virus

de la vacuna con los de las cepas del virus natural. La frecuencia e importancia de estos hechos sigue conociéndose poco, pero en Europa ya se ha documentado la transmisión de cepas vacunales mediante el vector *Culicoides* en el campo.

A. INTRODUCCIÓN

La lengua azul (LA) es una enfermedad vírica infecciosa, no contagiosa y transmitida por mosquitos, que afecta a rumiantes salvajes y domésticos. Los mosquitos de solo algunas especies del género *Culicoides* (el insecto hospedador) (Standfast *et al.*, 1985) transmiten el virus de la lengua azul (VLA) entre los rumiantes susceptibles, y resultan infectados al alimentarse de animales con viremia (el hospedador vertebrado). En muchas partes del mundo, la infección tiene una frecuencia estacional (Verwoerd & Erasmus, 2004). El VLA no provoca infecciones persistentes en los rumiantes y que su supervivencia en el medio está asociada a factores del insecto (Lunt *et al.*, 2006; MacLachlan, 2004). Se considera que los sistemas epidemiológicos (episistemas) delimitados por especies del vector y sus antecedentes naturales (Gibbs & Greiner, 1994) determinan la distribución mundial del VLA. Observaciones recientes de Europa y de EE.UU. indican que las cepas del VLA pueden pasar de unos episistemas a otros y adaptarse a distintas especies de quiromónidos vectores.

Los hospedadores vertebrados del VLA son rumiantes tanto domésticos como salvajes, como ovejas, cabras, ganado bovino, búfalos, ciervos, la mayoría de especies del antílope africano y otros artiodáctilos, como los camellos. Aunque en algunos carnívoros, félidos, rinocerontes negros y blancos y elefantes se ha comprobado la existencia de anticuerpos contra el VLA, y contra antígeno vírico, el ácido nucleico o el virus vivo, el papel que desempeñan las especies no rumiantes en la epidemiología del VLA se considera muy escaso. El efecto de la infección varía desde una manifestación que pasa desapercibida en la gran mayoría de los animales infectados, especialmente en el ganado bovino, rumiantes y cabras salvajes africanos, hasta un resultado grave o mortal en algunas ovejas, cabras, ciervos y rumiantes salvajes infectados (Verwoerd & Erasmus, 2004). Sin embargo, se ha observado una mayor incidencia de la enfermedad clínica en el ganado bovino infectado por el VLA8 de Europa. Algunas razas de ovejas son más susceptibles a la enfermedad que otras, lo que origina que en algunos países las infecciones del ganado por el VLA puedan pasar desapercibidas o se detecten solamente con una vigilancia activa (Daniels *et al.*, 2004).

Los signos clínicos de la enfermedad en ovejas son de gravedad muy variable, y están influidos por el tipo o cepa del virus infectante, factores relacionados con el manejo de los animales, y su raza (Verwoerd & Erasmus, 2004). En los casos graves, hay una respuesta febril aguda caracterizada por la inflamación y congestión, que conduce a un edema de la cara, párpados y orejas, y a la aparición de hemorragias y ulceración de las mucosas. La lengua puede presentar una hiperemia intensa y un aspecto edematoso, sobresalir de la boca y, en los casos graves, volverse cianótica. La hiperemia se puede extender a otras partes del cuerpo, en particular a la banda coronaria de las pezuñas, las ingles, las axilas y el periné. A menudo se produce una degeneración muscular grave. La dermatitis puede originar roturas de la lana asociadas a lesiones anatomopatológicas de los folículos. Es frecuente observar una intolerancia al movimiento, y en los casos graves puede aparecer tortícolis. En los casos fatales, los pulmones pueden presentar hiperemia interalveolar con un edema alveolar grave y el árbol bronquial puede contener espuma. La cavidad torácica y el saco pericárdico pueden contener cantidades variables de un líquido parecido al plasma. En la mayor parte de los casos se presenta una hemorragia característica cerca de la base de la arteria pulmonar (Verwoerd & Erasmus, 2004).

El control del VLA en los animales se aborda en el Capítulo 8.3 del *Código Sanitario para los Animales Terrestres* de la OIE. El virus puede introducirse en una zona libre mediante insectos infectados, rumiantes vivos o en productos contaminados que a continuación se transmiten a rumiantes susceptibles. Si hay *Culicoides* sp. competentes como vectores, a continuación el virus se puede transmitir a otros hospedadores. No se ha observado que el VLA cause enfermedad en el ser humano en ningún caso.

Desde el punto de vista taxonómico, el VLA se clasifica como una especie o serogrupo del género *Orbivirus*, dentro de la familia Reoviridae, y es una de las 22 especies reconocidas en ese género, que también incluye los virus de la enfermedad hemorrágica epizootica (VEHE), la encefalosis equina y la peste equina africana (PEA) (Attoui *et al.*, 2012). Existe una importante reactividad cruzada entre los miembros del serogrupo del VLA (Monaco *et al.*, 2006). Dentro de cada especie, cada miembro se diferencia por el genotipo y mediante pruebas de neutralización, y actualmente se reconocen 26 serotipos del VLA, como el virus Toggenburg (VLA 25) y un serotipo 26 de Kuwait.

Las partículas del VLA están formadas por tres capas proteicas. La cápsida externa contiene dos proteínas, la VP2 y la VP5. La VP2 es el antígeno de neutralización más importante y el que determina la especificidad de serotipo. La eliminación de la capa externa de la VP2/VP5 deja una partícula central icosaédrica formada por dos capas que incluye una capa externa formada totalmente por capsómeros de VP7 y una cápsida interna completa (la capa subcentral), que envuelve los 10 segmentos del genoma del ARNs y proteínas estructurales menores. La VP7 es un determinante importante de la especificidad del serogrupo y el componente que contiene los

epítomos que se utilizan en los ensayos de inmunoenzimología de competición (C-ELISA) para detectar los anticuerpos contra el VLA (Mertens *et al.*, 2005). La VP7 también puede ser la responsable de la unión del VLA a las células de los insectos (Attoui *et al.*, 2012).

La secuenciación de los genomas del VLA permite una diferenciación adicional y el análisis de las cepas independientemente del serotipo (Gould, 1987; McColl & Gould, 1991; Pritchard *et al.*, 1995; Wilson *et al.*, 2000). Incluso en el caso de las cepas pertenecientes a un mismo serotipo, es posible identificar su probable origen geográfico (topotipo) (Gould, 1987; Potgieter *et al.*, 2005). La identificación de aparentes asociaciones entre ciertos genotipos de virus y ciertas especies de vectores ha conducido a un mayor desarrollo del concepto de ecosistemas virus-vector (Daniels *et al.*, 2004; Gibbs & Greiner, 1994; MacLachlan, 2004). Movimientos recientes de varios serotipos del VLA entre especies de vectores y a nuevas regiones geográficas indican que se precisa una mejor comprensión de la epidemiología del VLA.

No existe riesgo conocido de infección humana por el VLA. Las medidas de biocontención deben determinarse en función del análisis del riesgo, como se describe en el Capítulo 1.1.4 *Bioseguridad y bioprotección: norma para la gestión del riesgo biológico en el laboratorio veterinario y en las instalaciones de los animales.*

B. TÉCNICAS DE DIAGNÓSTICO

Tabla 1. Pruebas analíticas disponibles para el diagnóstico de la lengua azul y su propósito

Método	Propósito					
	Demostrar ausencia de infección en la población	Demostrar ausencia de infección en animales individuales antes de los desplazamientos	Contribuir a las políticas de erradicación	Confirmar casos clínicos	Determinar la prevalencia de la infección – vigilancia	Determinar el estado inmunitario en animales o poblaciones tras la vacunación
Identificación del agente¹						
RT-PCR en tiempo real	–	+++	–	+++	++	–
RT-PCR	–	+++	–	+++	++	–
Aislamiento clásico del virus	–	+++	–	+++	–	–
Detección de la respuesta inmunitaria						
C-ELISA (específico de serogrupo)	++	+++	++	–	++	++
VN (específico de serotipo)	++	+++	++	–	++	++
AGID	+	–	+	–	+	+
CF	+	–	+	–	+	+

Clave: +++ = método recomendado; ++ = método idóneo; + = puede utilizarse en algunas situaciones, pero el coste, la fiabilidad y otros factores limitan mucho su aplicación; – = no adecuado para este propósito.

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; C-ELISA = ensayo de inmunoenzimología de competición; VN = neutralización vírica; AGID = inmunodifusión en gel de agar; CF = prueba de fijación del complemento.

¹ Se recomienda combinar varios métodos de identificación del agente en la misma muestra clínica

1. Identificación del VLA

1.1. Cultivos *in vitro* e *in vivo*

Se utilizan los mismos procedimientos para los rumiantes domésticos que para los salvajes. Varios sistemas de aislamiento de virus son de uso frecuente para el VLA, pero el método más sensible es la inoculación de huevos de pollo embrionados (HPE). Se ha observado que la inoculación primaria de cultivos celulares como la línea celular KC (una línea celular que deriva del mosquito quiromónido *C. variipennis*) es muy sensible (McHolland & Mecham, 2003). La inoculación en oveja también puede ser una estrategia útil si el título de virus en la muestra de sangre es muy bajo, como suele ser el caso después de varias semanas de infección vírica, o cuando no se dispone de instalaciones de laboratorio. Los intentos de aislar el virus en cultivos celulares *in vitro* pueden ser más adecuados, pero, con frecuencia, la probabilidad de éxito es mucho menor que la lograda mediante los sistemas *in vivo* (Gard *et al.*, 1988). Las muestras para aislar el virus son sangre no coagulada de animales sospechosos de ser virémicos, coágulos de sangre tras la separación del suero, bazo o ganglios linfáticos obtenidos en la necropsia de casos clínicos, o mosquitos quiromónidos.

1.1.1. Aislamiento en huevos embrionados de pollo

- i) Se recoge sangre de animales que se sospeche que son virémicos con un anticoagulante como la heparina, el EDTA (ácido etilendiaminotetraacético), o el citrato sódico, y las células sanguíneas se lavan tres veces con solución salina estéril tamponada con fosfato (PBS). Las células lavadas se vuelven a suspender en PBS o en cloruro sódico isotónico y se guardan a 4°C o se usan inmediatamente para intentar el aislamiento del virus. También puede prepararse una suspensión de tejido y mosquitos quiromónidos y guardarse como se describe arriba o bien utilizarse de inmediato.
- ii) Para el almacenaje a largo plazo cuando no es posible la refrigeración, las muestras de sangre se recogen en oxalato-fenol-glicerina. Si las muestras se pueden congelar, entonces se recogen en solución de peptona tamponada con lactosa o dimetil sulfoxido al 10% y se mantienen a –70°C o a temperatura inferior. El virus no es estable a –20°C. El VLA ha permanecido viable durante varios meses en sangre completa con anticoagulante almacenada a 4°C.
- iii) El bazo y los ganglios linfáticos son los órganos preferidos para los intentos de aislamiento del virus en los casos mortales. Los órganos y tejidos deben mantenerse a 4°C y transportarse a un laboratorio donde se homogeneizan en PBS o en solución salina isotónica, (1/10), se centrifugan a 1500 rpm durante 10 minutos y se filtran (0.2–0.4 µm). Las suspensiones tisulares se pueden utilizar como se describe más adelante para las células de la sangre.
- iv) Se vuelven a suspender en agua destilada células de la sangre lavadas o se sónica en PBS y se inoculan 0,1 ml por vía intravascular en 5–12 HPE de 9–12 días de edad. Este proceso requiere práctica. El trabajo de Clavijo *et al.* contiene los detalles (2000).
- v) Los huevos se incuban en una cámara húmeda a 32–33,5°C y se observan diariamente al trasluz. Cualquier muerte embrionaria ocurrida en las primeras 24 horas post-inoculación se considera inespecífica.
- vi) Los embriones que mueren entre los días 2 y 7 se mantienen a 4°C, y los que permanecen vivos el día 7, se sacrifican. Con frecuencia, los embriones infectados pueden presentar un aspecto hemorrágico. Los embriones muertos y los que vivían el día 7 se homogeneizan por separado. Se homogeneizan los embriones completos, después de eliminar sus cabezas, u órganos combinados, como el hígado, el corazón, el bazo, los pulmones y los riñones, y los restos se eliminan por centrifugación.
- vii) El virus se puede identificar directamente en el sobrenadante como se describe en el apartado 1.2 siguiente o después de su amplificación en cultivo celular, como se describe en el apartado 1.1.2.

1.1.2. Aislamiento en cultivo celular

El aislamiento de los virus se puede intentar en el VLA en cultivos celulares susceptibles al virus de la lengua azul, como las células L de ratón, las de riñón de hámster neonato (BHK-21), las de riñón de mono verde africano (Vero) o el clon C6/36 de *Aedes albopictus* (AA). Mediante la inoculación de cultivos celulares con muestras de diagnóstico, la eficacia del aislamiento suele ser inferior a la que se obtiene con HPE. La mejor eficacia de aislamiento en cultivo celular se logra mediante el aislamiento primario del virus en ECE y por pases posteriores por células AA o células mamarias para una mayor replicación del virus. También se ha llevado a cabo un aislamiento del virus exitoso en células derivadas de *Culicoides sonorensis* libres del

VLA y virus *Culicoides* y denominadas células KC o CuVa (McHolland & Mecham, 2003; Wechsler *et al.*, 1989). En caso de pases por células AA, KC o CuVa normalmente se realizan pases adicionales por líneas celulares de mamíferos, como células BHK-21 o Vero. En las células AA o Kcor CuVa no se observa necesariamente un efecto citopático (ECP), pero este es visible en células de mamíferos. Se analizan las monocapas celulares para comprobar si hay ECP durante 5 días a 37°C con un 5% de CO₂ y humedad. Si no aparece el ECP, se realiza un segundo pase por cultivo celular de mamíferos. Puede detectarse VLA aislado tras cada pase por ECE o cultivo celular mediante detección de antígeno o técnicas de reacción en cadena de la polimerasa (PCR).

1.1.3. Aislamiento en ovejas

Este procedimiento para el aislamiento del VLA no se utiliza de forma sistemática, pero es útil cuando no se dispone de instalaciones de laboratorio o cuando existe el requisito de propagar el virus sin emplear sistemas de aislamiento *in-vitro*.

- i) Las ovejas se inoculan con células lavadas procedentes de 10 a 500 ml de sangre, o con 10–50 ml de suspensión de tejido. Los inóculos se administran subcutáneamente en alícuotas de 10–20 ml. Volúmenes superiores pueden facilitar el aislamiento del virus y deben administrarse por vía intravenosa.
- ii) Las ovejas se mantienen 28 días para la comprobación diaria de la fiebre y la comprobación semanal de la respuesta de anticuerpos utilizando pruebas serológicas como el C-ELISA, según se describe más adelante. Normalmente, la sangre de oveja recogida a los 7 y 14 días de la inoculación contiene el virus, que puede almacenarse en estado viable a 4°C o a –70°C y detectarse y caracterizarse empleando los métodos descritos en los apartados B.1.2 y B.1.3.

1.2. Detección y caracterización de los virus

El éxito de las técnicas de aislamiento vírico se evalúa comprobando si hay VLA en los sobrenadantes de cultivo celular, tejidos embrionarios o la sangre de animales inoculados, empleando cualquiera de los muchos sistemas de detección. Antes de que aparecieran las técnicas de PCR, se empleaban técnicas de inmunodetección. Actualmente, el método de detección de referencia es el análisis de los medios de aislamiento mediante la PCR en tiempo real. Después, el virus del sobrenadante puede identificarse o bien por C-ELISA, o bien por PCR con transcripción inversa (RT-PCR) o RT-PCR en tiempo real, como se describe en el apartado B.1.3, a continuación.

La detección y caracterización suele ser un proceso escalonado, en el cual, para detectar la presencia de un VLA se utilizan inicialmente pruebas específicas de serogrupo. La posterior identificación del genotipo y el serotipo de las cepas del VLA aporta una información epidemiológica de gran valor y es esencial para implementar vacunas o para desarrollarlas. Las pruebas de RT-PCR en las cuales se emplean cebadores específicos de serotipo aportarán la información más rápida y específica relativa al serotipo de la cepa (Johnson *et al.*, 2000; Maan *et al.*, 2012; Mertens *et al.*, 2007).

La genotipificación para la epidemiología molecular puede basarse en la RT-PCR y posterior secuenciación del amplicón. Varios laboratorios han estandarizado distintas secuencias génicas para este fin. Siempre que sea posible, también puede llevarse a cabo una secuenciación del genoma completo para determinar el serotipo, así como otros datos propios de la secuencia de las cepas.

Para la serotipificación también pueden emplearse procedimientos de neutralización utilizando antiseros contra serotipos concretos, aunque algunos serotipos presentan reacción cruzada y pueden dificultar la interpretación. En el caso de laboratorios sin instalaciones para la serotipificación, las cepas del VLA pueden enviarse a cualquiera de los varios Laboratorios de Referencia de la OIE para la LA para que sean tipificadas allí.

1.2.1. Seroagrupación inmunológica de los virus

Las cepas de Orbivirus aisladas se suelen seroagrupar según su reacción frente a antiseros estándar específicos que detectan proteínas, como la VP7, que se conservan dentro de cada serogrupo. La reacción cruzada entre los miembros de los serogrupos LA y EHE plantea la posibilidad de que una cepa del VEHE pueda confundirse con VLA debido a una reacción de inmunofluorescencia débil con un antisuero policlonal anti-VLA. Los anticuerpos policlonales o monoclonales que se emplean para seroagrupar cepas del VLA deben caracterizarse adecuadamente para el propósito en cuestión. Existe una importante variación de la VP7 dentro del VLA, así como relación antigénica entre otros orbivirus estrechamente relacionados, como el VEHE, que influirá en la unión de anticuerpos en varios formatos analíticos (IFA,

ELISA, AGID). Por esta razón, se puede usar un MAb específico del serogrupo de la LA. Varios laboratorios han generado tales reactivos específicos de serogrupo. Los métodos más utilizados para la identificación de los virus a nivel de serogrupo son los siguientes.

i) Inmunofluorescencia

Se infectan monocapas de células BHK o Vero en cultivos laminares (portas de vidrio) con un virus adaptado al cultivo de tejido o con virus de lisados de HPE. Después de 24–48 horas a 37°C, o después de la aparición de un ECP incipiente, las células infectadas se fijan con agentes como el paraformaldehído, la acetona o el metanol, se dejan secar y el antígeno vírico se detecta utilizando un antisuero anti-VLA o anticuerpos monoclonales específicos contra el VLA y los procedimientos estándar para la inmunofluorescencia.

ii) Enzimoimmunoanálisis de captura de antígeno

Se puede detectar directamente el antígeno vírico en lisados de HPE, en medios de cultivo, en insectos infectados y en sangre de oveja. En esta técnica, las proteínas derivadas del virus se capturan por el anticuerpo adsorbido a una placa de ELISA y los materiales unidos se detectan usando un segundo anticuerpo. El anticuerpo de captura puede ser policlonal o un MAb específico de serogrupo. Para detectar los virus capturados, se han usado con éxito MAb específicos de serogrupo y anticuerpos policlonales contra las partículas de la cápsida expresadas en baculovirus.

1.2.2. Serotipificación por neutralización del virus

Las pruebas de neutralización son específicas de tipo para los serotipos de VLA que se han aislado en cultivo actualmente reconocidos y pueden utilizarse para serotipificar una cepa de virus aislada o modificarse para determinar la especificidad de los anticuerpos en los sueros. En el caso de una cepa no tipificada, la localización regional característica de los serotipos de VLA puede eliminar, por lo general, la necesidad de realizar la neutralización con antisuecos contra todos los serotipos aislados, en particular cuando los serotipos endémicos se conocen bien.

Existe una serie de métodos disponibles, que se basan en el cultivo celular, para detectar la presencia de anticuerpos neutralizantes anti-VLA. Las líneas celulares más utilizadas son BHK, Vero y L929. Más adelante se resumen tres métodos para serotipificar el VLA. También existe una prueba de inhibición de la fluorescencia, no descrita. Se ha descrito que los antisuecos específicos de serotipo contra VLA generados por cobayas y conejos presentan menos reacción cruzada que los obtenidos en ganado bovino u ovino. Es importante incluir controles del antisuero.

i) Reducción de placas (o calvas)

El virus que se va a serotipificar se diluye hasta que contenga aproximadamente 100 unidades formadoras de placas (UFP) y se incuba sin suero (control) o con diluciones seriadas de antisuecos individuales estándar de una serie de serotipos de VLA. Se añaden las mezclas de virus/antisuero a las monocapas celulares. Después de la adsorción y la eliminación del inóculo, las monocapas se cubren con agarosa. Los títulos de anticuerpos neutralizantes se determinan como la inversa de la dilución del suero que da lugar a una reducción determinada (por ejemplo, del 90%) en el número de UFP. Se considera que el virus no identificado es serológicamente idéntico a un serotipo estándar cuando este último resulta neutralizado de forma similar si se realiza la prueba en paralelo con el virus problema.

ii) Inhibición de placas (o calvas)

Las pruebas se realizan en placas Petri de 90 mm de diámetro que contienen monocapas celulares confluentes que se infectan con aproximadamente 5×10^4 UFP de virus estándar y de virus no tipificado. Después de la adsorción y la eliminación del inóculo, las monocapas se cubren con agarosa. En discos individuales de papel de filtro se depositan antisuecos estándar anti-VLA, que se colocan sobre la superficie de agarosa. Las placas se incuban durante por lo menos 4 días. Alrededor del disco que contenga el antisuero homólogo aparecerá una zona de neutralización del virus con la consiguiente supervivencia de la monocapa celular.

iii) Neutralización en microtitulación

En una placa de microtitulación con pocillos de fondo plano se depositan aproximadamente 100 DICT₅₀ (dosis infectivas en un 50% de los cultivos de tejidos) del virus estándar y del virus no tipificado en un volumen de 50 µl por pocillo, y se mezclan con el mismo volumen de antisuero estándar diluido de forma seriada con medio de cultivo de tejidos. Se depositan aproximadamente 10⁴ células por pocillo en un volumen de 100 µl y, después de incubar durante 4–6 días, se leen los resultados de la prueba utilizando un microscopio invertido. Los pocillos se analizan respecto al grado de ECP observado. Los pocillos que contengan solo células o células y antisuero no deberían mostrar ECP. Por el contrario, los pocillos con células y virus deberían mostrar un ECP del 75–100%. Se considera que el virus no identificado es serológicamente idéntico al serotipo estándar de VLA si ambos resultan neutralizados en la prueba con un grado similar.

1.3. Métodos moleculares – detección del ácido nucleico

Las técnicas de RT-PCR aportan una identificación rápida del ácido nucleico vírico del VLA en la sangre y otros tejidos de los animales infectados. Es importante destacar que el diagnóstico basado en la RT-PCR debe interpretarse con cuidado porque la RT-PCR detecta ácido nucleico específico de virus una vez el virus ya no es viable y capaz de crear una nueva infección ni en insectos ni en hospedadores mamíferos. Por lo tanto, un resultado positivo en la RT-PCR no necesariamente indica la presencia del virus infeccioso (MacLachlan *et al.*, 1994).

Existen varios formatos de RT-PCR que pueden emplearse para detectar el VLA específicamente para determinar el serogrupo de los orbivirus y para determinar el serotipo del VLA. Estos enfoques moleculares son mucho más rápidos que los métodos virológicos e inmunológicos tradicionales, que pueden tardar hasta 4 semanas en suministrar información sobre serogrupos y serotipos.

En el VLA, la secuencia nucleotídica de genes homólogos puede variar en función del área geográfica del aislamiento del virus (Gould, 1987). Esto supone una oportunidad única para complementar estudios epidemiológicos sobre el VLA, al suministrar información sobre el potencial origen geográfico de las cepas víricas aisladas, un proceso que se denomina genotipificación. Aunque parece probable que la secuenciación de cepas del VLA de otras partes del mundo permite una discriminación más fina del origen geográfico. No obstante, la relación entre la secuencia y el origen geográfico puede no ser directa. Esta información es importante y todos los datos relativos a las secuencias de segmentos del VLA se deben hacer accesibles enviando los datos a las webs oficialmente reconocidas como <http://oiebtnet.izs.it>.

Estas páginas web presentan los análisis de los árboles filogenéticos de las cepas de VLA basados en la secuencia de segmentos del ARN. Estos datos representarán un recurso para los estudios epidemiológicos, la identificación de nuevas cepas y el diseño de nuevos cebadores para una PCR posterior por transcripción inversa (RT) y, posiblemente, para las pruebas específicas de serotipo de VLA.

La capacidad de la RT-PCR para detectar cantidades muy pequeñas de moléculas de ácido nucleico indica que estas pruebas son exquisitamente sensibles a la contaminación por ácidos nucleicos externos. Estos últimos pueden ser cualquier cebador que se utilice en el laboratorio o polinucleótidos previamente amplificados. Por tanto, es importante disponer de un área "limpia" que contenga todo el equipo necesario para la preparación de los reactivos y de las pruebas, y de un área separada para el propio equipo de amplificación. Se deben utilizar guantes de látex y cambiarlos con frecuencia en todas las fases del procedimiento, en particular después de trabajar con muestras de ARN o de ADN amplificado. Esto ayuda a proteger a los reactivos y a las muestras de la contaminación por ARNasas ubicuas y por otros agentes, y de la contaminación cruzada con ADN. La posibilidad de falsos positivos por contaminación de la muestra realza la importancia de la secuenciación de los productos de la RT-PCR para determinar, por ejemplo, si la secuencia amplificada es idéntica o diferente de la de un control positivo. Pueden detectarse falsos positivos, debidos por ejemplo a una mala calidad de la muestra o a unos cebadores inadecuados, cuando en extractos de células infectadas no se puede amplificar ni el VLA ni un gen del hospedador, como una globina. Esto se explica en mayor detalle en el Capítulo 1.1.6 *Principios y métodos de validación de las pruebas de diagnóstico de las enfermedades infecciosas*.

En la actualidad se usan muchas pruebas RT-PCR en las que se utilizan diferentes métodos de extracción, transcriptasas inversas, enzimas de amplificación, cebadores y condiciones de ensayo. La tecnología está en continuo cambio. Además, la diversidad de los genes del VLA determina que la elección y la validación de las pruebas de RT-PCR estén condicionadas por su aplicación a un

escenario regional determinado. Lo mismo ocurre en el caso de la PCR en tiempo real, que en el futuro se desarrollará para el diagnóstico molecular sistemático del VLA. Por tanto, los procedimientos indicados a continuación son tan solo ejemplos. Cada vez resulta más importante mantener las pruebas de diagnóstico acreditadas con arreglo a una norma internacional como la ISO/ISEC 17025 y colaborar en la mejora de las pruebas. En varios países se han desarrollado sistemas para la mejora de las pruebas basadas en la RT-PCR.

Se presentan aquí dos pruebas de RT-PCR para el VLA: una prueba en tiempo real (Hofmann *et al.*, 2008), que tiene por objetivo el genoma NS3; y una prueba anidada convencional que tiene por diana el genoma NS1, en las que se usan cebadores diseñados por Katz *et al.* (1993). La prueba anidada se utilizó con éxito durante más de 20 años y permite detectar los serotipos 1 a 24 y el 26 (el serotipo 25 no se ha analizado) de varias especies. La prueba anidada puede resultar ventajosa para laboratorios en los que no se disponga de instalaciones para PCR en tiempo real. La RT-PCR en tiempo real indicada a continuación se ha ejecutado en varios países de todo el mundo y se ha observado que permite detectar todos los serotipos del VLA, y que iguala o supera la sensibilidad de la prueba anidada, aportando al mismo tiempo una detección rápida y cuantitativa del VLA sin los riesgos de contaminación propios de la PCR anidada.

1.3.1. Reacción en cadena de la polimerasa con transcripción inversa en tiempo real

Los métodos de la RT-PCR en tiempo real aportan una detección sensible y rápida del VLA en un procedimiento de un solo paso. Las ventajas de la PCR en tiempo real respecto de la clásica son la rapidez de análisis, la cuantificación del virus presente y la reducción de la probabilidad de contaminación, porque no es necesaria una manipulación posterior a la amplificación, como una electroforesis en gel. La RT-PCR en tiempo real es una prueba de elección para el diagnóstico.

El método aquí descrito es una adaptación de Hofmann *et al.* (2008) y permite detectar todos los serotipos y cepas conocidos del VLA actualmente en circulación. La prueba tiene por diana el segmento 10 del VLA (NS3). El procedimiento propuesto puede requerir alguna modificación para adaptarlo a los requisitos de cada laboratorio o del kit de RT-PCR.

- i) Extracción del ARN a partir de sangre, muestras de tejido y mosquitos quiromónidos
Existe gran variedad de kits comerciales; el paso de extracción del ARN puede realizarse según los procedimientos especificados en cada kit.
- ii) Reacción en cadena de la polimerasa con transcripción inversa en tiempo real
Existen kits comerciales de PCR en tiempo real de un solo paso. A continuación se presentan algunos pasos básicos según la descripción de Hofmann *et al.* (2008), que pueden modificarse en función de los requisitos locales/específicos de cada caso, de los kits utilizados y del equipo del que se dispone.

Secuencias de los cebadores y la sonda para la detección de especies del VLA:

VLA_IVI_F 5'-TGG-AYA-AAG-CRA-TGT-CAA-A-3'

VLA_IVI_R 5'-ACR-TCA-TCA-CGA-AAC-GCT-TC-3'

VLA_IVI_P 5'FAM-ARG-CTG-CAT-TCG-CAT-CGT-ACG- C-3' BHQ1

- a) Las soluciones primarias de cebador se diluyen hasta una concentración de trabajo de 20 pmol/μl, mientras que la sonda se diluye hasta una concentración de trabajo de 5 pmol/μl.
- b) Debe diseñarse una distribución de placas de análisis e introducirse en el programa de la máquina de PCR en tiempo real. Empleando una distribución como guía, se añaden 0,5 μl de cada cebador primario de trabajo (20 pmol/μl) a cada pocillo, que después contendrá muestras de ARN, controles positivos o controles negativos. La placa se mantiene sobre hielo.

Nota: las placas de PCR se puede reemplazar por tubos o tiras según necesidad.

- c) Se añaden 2 μl de muestras de ARN, tanto de la muestra problema como de los controles positivo y negativo, a los pocillos adecuados de la placa siguiendo la distribución (nota: estos pocillos ya contienen cebadores desde el paso b).

- d) Desnaturalización por calor: 95°C durante 5 minutos, y se mantienen sobre hielo otros 3 minutos.
- e) Se prepara un volumen adecuado de la mezcla primaria de la RT-PCR de un solo paso en tiempo real, según el número de muestras a analizar y siguiendo las instrucciones del fabricante. La sonda debe incluirse en la mezcla primaria de tal modo que se obtenga una concentración final de 0.2 pmol/μl por muestra.
- f) Se distribuyen 22 μl de mezcla primaria en cada pocillo de la placa de PCR que contenga los cebadores desnaturalizados y ARN.
- h) La placa se sitúa en un termociclador de tiempo real programado para una transcripción inversa y amplificación /detección mediante fluorescencia del ADNc. El siguiente perfil térmico es un ejemplo:

	48°C	x30 minutos
	95°C	x2 minutos
50 ciclos:	95°C	x15 segundos
	56°C	x30 segundos
	72°C	x30 segundos

1.3.2. Reacción en cadena de la polimerasa con transcripción inversa – PCR en tiempo real

Se escogen los kits de elección de RT-PCR (transcripción inversa y amplificación de primera fase) y de PCR (amplificación anidada) para llevar a cabo la prueba anidada. En la prueba que se presenta a continuación a modo de ejemplo se utilizan los parámetros relacionados con un kit concreto. Se ajustan los parámetros de la PCR según las recomendaciones del fabricante teniendo en cuenta los kits concretos que vayan a emplearse.

La prueba anidada incluye el uso de los siguientes cebadores:

Amplificación de primera fase (externa) (se diluye a 25 pmol/μl; la concentración final en la PCR es 0,6 μM para cada uno):

Directo: GTT-CTC-TAG-TTG-GCA-ACC-ACC

Inverso: AGG-CCA-GAC-TGT TTC-CCG-AT

Amplificación anidada (se diluye a 25 pmol/μl; la concentración final en la PCR es 0,5 μM para cada uno):

Directo: GCA-GCA-TTT-TGA-GAG-AGC-GA

Inverso: CCC-GAT-CAT-ACA-TTG-CTT-CCT

- i) Se prepara la primera amplificación de la prueba (kit de RT-PCR de un solo paso) de los siguientes reactivos (por muestra):

Agua libre de nucleasa	11,8 μl	
Tampón 5x para RT-PCR de un solo paso	5,0 μl	
Mezcla de dNTP	1,0 μl	
Enzima	1,0 μl	
Cebador directo (25 pmol/μl)	0,6 μl	
Cebador inverso (25 pmol/μl)		0,6 μl

- ii) Se dispensan 20 μl de la mezcla en cada tubo de PCR incubado para la prueba. Se añaden 5 μl de muestra o ARN desnaturalizado control (se describe arriba) al tubo adecuado. Se colocan los tubos en un termociclador y se ejecuta el siguiente programa.

Transcripción inversa	50°C	30 minutos
Activación Taq	95°C	15 minutos
Seguido de 35 ciclos de:		
Desnaturalización:	94°C	45 segundos
Hibridación:	58°C	45 segundos
Extensión	72°C	60 segundos (extensión final 10 minutos)

- iii) Se prepara una mezcla de PCR anidada (kit de AND polimerasa HotStarTaq) de los siguientes reactivos (por muestra):

Agua libre de nucleasa	40,75 µl
Tampón HotStar 10x	5,0 µl
Mezcla de dNTP	1,0 µl
HotStarTaq	0,25 µl
Cebador directo n (25 pmol/µl)	1,0 µl
Cebador inverso n (25 pmol/µl)	1,0 µl

- iv) Se dispensan 49 µl de la mezcla en cada tubo de PCR. Se transfieren 1,0 µl del ADN amplificado de la reacción de la primera fase (paso 2) al tubo anidado correspondiente. Se realiza cambio de guantes entre muestras, y se procede con cuidado al transferir el ADN para evitar la contaminación cruzada de las muestras. Se colocan los tubos en un termociclador y se ejecuta el siguiente programa:

Activación Taq	95°C	15 minutos
Seguido de 28 programas de:		
Desnaturalización:	94°C	45 segundos
Hibridación:	62°C	45 segundos
Extensión:	72°C	1 minuto (extensión final 10 minutos)

Se realiza una electroforesis en gel seguida de visualización con luz ultravioleta del producto de la PCR anidada. El/los control/es positivo/s y todas las muestras positivas tendrán una banda de 101 pares de bases. Los controles negativos y las muestras negativas no deben tener ninguna banda visible. Las muestras positivas se pueden secuenciar, para verificarlas.

2. Pruebas serológicas

Los anticuerpos contra el VLA generados en animales infectados pueden detectarse mediante varios procedimientos, de diversas sensibilidades y especificidades. Se inducen anticuerpos específicos tanto de serogrupo como de serotipo y, si el animal no ha estado previamente expuesto al VLA, los anticuerpos neutralizantes que se generan son específicos del serotipo del virus infectante. Las infecciones múltiples con diferentes serotipos de VLA dan lugar a la producción de anticuerpos capaces de neutralizar los serotipos a los que el animal no ha estado expuesto.

2.1. Fijación del complemento

Hasta 1982 se utilizó mucho una prueba de fijación del complemento (CF) para detectar anticuerpos contra el VLA, que fue en gran medida reemplazada por la prueba de IGDA, aunque en algunos países todavía se utiliza la prueba de CF.

2.2. Inmunodifusión en gel de agar

Es importante reconocer que un inconveniente importante de la AGID que se emplea para la LA es su falta de especificidad, ya que no detecta exclusivamente anticuerpos contra serogrupos de la LA y la EHE, y por lo tanto no puede utilizarse de forma definitiva para detectar anticuerpos contra el VLA, ya que una reacción positiva puede ser consecuencia de una infección por otra especie de *Orbivirus*. No obstante la IGDA es fácil de llevar a cabo y el antígeno utilizado en la prueba es relativamente fácil de producir. Desde 1982, la prueba ha sido uno de los procedimientos analíticos estándar para controlar los movimientos internacionales de rumiantes, pero ya no se considera lo bastante exacta para utilizarla como apoyo al comercio internacional. Los sueros positivos según la AGID deben volver a analizarse con una prueba específica de serogrupo de la LA si se requiere especificidad del VLA. El C-ELISA es una prueba de elección, y se describe en el apartado B.2.3.

2.3. Enzimoimmunoanálisis de competición

El ELISA de competición, o ELISA de bloqueo, para la LA se desarrolló para medir los anticuerpos específicos contra el VLA sin detectar anticuerpos de reacción cruzada contra otros *Orbivirus* (Afshar et al., 1989; Lunt et al., 1988). La especificidad es el resultado de utilizar uno de varios MAb con reactividad de serogrupo para la LA. Estos anticuerpos proceden de varios laboratorios y, aunque son diferentes, todos parecen unirse a la región amino-terminal de la principal proteína de la cápsida, VP7. En el C-ELISA, los anticuerpos de los sueros a analizar compiten con los MAb para unirse al antígeno. El siguiente procedimiento de C-ELISA se ha estandarizado después de llevar a cabo estudios comparativos en varios laboratorios internacionales.

2.3.1. Procedimiento analítico

Hay descritos varios procedimientos; este es un ejemplo de un ELISA para la LA.

- i) Durante una noche a 4°C o durante 1 hora a 37°C, se dejan recubiertos los 96 pocillos de las placas de microtitulación con 50-100 µl de antígeno derivado de cultivos celulares obtenido por sonicación o del antígeno principal de la cápsida VP7 expresado en Baculovirus (Oldfield *et al.*, 1990) o levaduras (Martyn *et al.*, 1990), y diluidos en tampón carbonato 0,05 M, pH 9,6.
- ii) Las placas se lavan cinco veces con PBST (PBS 0,01 M que contenga Tween 20 al 0,05% o 0,1%, pH 7,2).
- iii) A continuación, se añaden por duplicado 50 µl de sueros problema a una única dilución, 1/5 (Afshar *et al.*, 1989) o 1/10 (Lunt *et al.*, 1988), en PBST que contenga un 3% de seroalbúmina bovina (BSA).
- iv) Inmediatamente, se añaden a cada pocillo 50 µl de una dilución predeterminada de MAb diluido en PBST que contenga un 3% de BSA. Los pocillos de control de MAb contienen tampón de diluyente en vez de suero problema.
- v) Las placas se incuban 1 hora a 37°C o 3 horas a 25°C, con agitación continua.
- vi) Después de lavar como se indicó anteriormente, los pocillos se llenan con 100 µl de una dilución apropiada de anticuerpos anti IgG de ratón (H+L) generados en conejo y marcados con peroxidasa de rábano, realizada en PBST con un 2% de suero bovino normal.
- vii) Después de incubar 1 hora a 37°C, se elimina la solución del conjugado y las placas se lavan cinco veces con PBS o PBST. Los pocillos se llenan con 100 µl de solución de sustrato que contenga ABTS (2,2'-azino-bis-[3-etilbenzotiazolina-6 ácido sulfónico]) 1,0 mM, H₂O₂ 4 mM en citrato sódico 50 mM, pH 4,0, y las placas se agitan a 25°C durante 30 minutos. (Se pueden utilizar otros sustratos y dejar que la reacción continúe agitándose durante un tiempo adecuado para permitir la aparición del color).
- viii) La reacción se detiene añadiendo un agente de parada, como azida sódica.
- ix) Después de poner a cero el lector de ELISA con los pocillos que solo contienen sustrato y agente bloqueante, se miden los valores de absorbancia a 414 nm. Los resultados se expresan como porcentajes de inhibición y derivan de los valores medios de absorbancia de cada muestra según la fórmula siguiente:

$$\% \text{ inhibición} = 100 - \left[\frac{\text{Media de la absorbancia de la muestra problema}}{\text{Media de la absorbancia del MAb control}} \right] \times 100.$$

NB: Algunos laboratorios prefieren usar un suero control negativo que previamente se haya visto que tenga un porcentaje de inhibición igual a cero como alternativa al MAb control.

- x) Los porcentajes de inhibición >50% se consideran positivos. Una inhibición de entre el 40% y el 50% se considera sospechosa. Los resultados de los duplicados de los sueros a analizar pueden variar con tal de que los valores caigan dentro del intervalo considerado positivo.
- xii) En cada placa se deben incluir sueros positivos fuertes y débiles y un control de suero negativo. Un positivo débil debe dar un 60-80% de inhibición, y uno negativo menos del 40% de inhibición.

Ahora existen varios C-ELISA producidos comercialmente que se basan en la proteína VP-7 recombinante y en MAb anti-VP-7. Estos ensayos comerciales se utilizan sistemáticamente en muchos laboratorios de todo el mundo y se ha comprobado que se ajustan a los criterios exigidos en las pruebas del anillo (Batten *et al.*, 2008). La aceptación formal para fines comerciales dependerá de si el kit en cuestión es aceptado en el Registro de la OIE.

La divergencia genética de ciertas cepas del VLA (por ejemplo, distintos grupos regionales o topotipos) puede afectar al tipo de anticuerpos reactivos de serogrupo. Por lo tanto, es posible que las características diagnósticas para la detección de anticuerpos no sean las mismas para todos los virus que engloba el serogrupo. Esto debe valorarse en cuanto a la idoneidad para el propósito en cuestión.

2.4. ELISA indirecto

Se ha observado que un ELISA indirecto de muestras de leche de tanque es fiable y útil para fines de vigilancia (Kramps *et al.*, 2008). Antes de utilizarlo debe validarse para los serotipos relevantes.

2.5. Serología de neutralización vírica

La serología de NV es útil para identificar anticuerpos neutralizantes específicos de serotipo, así como para determinar su título. Es otra prueba importante en zonas endémicas en las que es posible que haya múltiples serotipos. Su capacidad de identificar el serotipo involucrado en un brote es fundamental para aplicar medidas de control adecuadas, como la vacunación. También es útil para la vigilancia epidemiológica, para las pruebas de transmisión y para determinar la respuesta de anticuerpos ante la vacunación. Pueden aparecer anticuerpos de reacción cruzada en animales que hayan sufrido infección por el VLA. En concreto, la infección por un segundo serotipo puede ampliar la respuesta de anticuerpos neutralizantes incluyendo anticuerpos contra serotipos a los cuales el animal no ha estado expuesto. La aplicación de la serología de NV a menudo es más útil junto con otras pruebas virológicas que, combinadas, pueden aportar una base más definitiva para determinar el perfil de serotipos.

2.5.1. Procedimiento analítico

Se han descrito varios métodos para determinar el título y serotipo del VLA, y aquí se describe brevemente el procedimiento que se ha estandarizado tras estudios comparativos en varios laboratorios internacionales. Las líneas celulares que se usan con frecuencia son BHK y Vero. Se ha observado que antisueros específicos de serotipos del VLA generados en cobayas o conejos tienen menos reactividad cruzada ante serotipos que los generados en ganado bovino o en ovejas. Es importante incluir controles antisuero.

- i) Se añaden 50 µl de diluciones séricas seriadas, desde 1/10 a 1/1280, a cada pocillo problema de placas de microtitulación de fondo plano y cada pocillo se mezcla con un volumen igual de serotipos de VLA estándar de referencia de la OIE (100–300 DICT₅₀). Las placas se incuban a 37°C en CO₂ al 5%.
- ii) Tras 1 hora de incubación, se añaden unas 10⁴ células Vero o BHK-21 por pocillo a un volumen de 100 µl, MEM (medio mínimo esencial) que contenga anticuerpos y, tras una incubación de 3–5 días, la prueba se lee empleando un microscopio invertido.
- iii) Los pocillos se puntúan según el grado de ECP observado. Una muestra se considera positiva cuando presenta más de un 75% de neutralización del ECP a la mínima dilución (1/10). El título sérico es la máxima dilución sérica capaz de neutralizar más de un 75% del ECP en el cultivo tisular.

C. REQUISITOS PARA LAS VACUNAS

1. Antecedentes

Actualmente se utilizan vacunas con el VLA atenuado y vacunas con el VLA inactivado en ovejas y cabras, respectivamente. Hay vacunas contra la LA recombinantes en proceso de desarrollo basadas en distintas estrategias, pero ninguna ha sido autorizada y tales vacunas no se consideran aquí. En Sudáfrica, se han usado durante más de 50 años las vacunas vivas atenuadas y se sabe que inducen una inmunidad eficaz y duradera (Erasmus, 1975). Las vacunas vivas atenuadas se producen adaptando cepas naturales del VLA a crecer *in vitro* en cultivo de tejidos o en huevos embrionados de gallina mediante pases seriados. La estimulación de una fuerte respuesta de anticuerpos mediante estas vacunas se correlaciona directamente con su capacidad para crecer en el hospedador vacunado. La obtención de vacunas vivas atenuadas en grandes cantidades es un proceso barato; producen una inmunidad protectora tras una única inoculación y son eficaces para evitar la enfermedad clínica de la LA en las zonas donde se usan (Dungu *et al.*, 2004). Sin embargo, las vacunas con el VLA vivo atenuado presentan algunos inconvenientes documentados o potenciales, como la sub-atenuación, cuyo impacto puede variar entre razas ovinas. La frecuencia e importancia de estos hechos sigue sin aclararse del todo, pero la transmisión de cepas vacunales por vectores quimiónidos ya se ha documentado en EE.UU., Sudáfrica y Europa (Ferrari *et al.*, 2005; MacLachlan *et al.*, 1985; Monaco *et al.*, 2006; Venter *et al.*, 2004).

Las directrices para la producción de vacunas veterinarias se exponen en el Capítulo 1.1.8 *Principios de producción de vacunas veterinarias*. Las directrices que se indican a continuación y las del capítulo 1.18 son de carácter general y pueden complementarse con los requisitos nacionales y regionales.

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

2.1. Características del inóculo

Véase el Capítulo 1.1.8 para consultar los requisitos generales para los inóculos primarios y los pases permitidos para la producción de vacunas.

2.1.1. Características biológicas del inóculo primario

Para las vacunas vivas atenuadas, el inóculo base o primario se prepara a partir de una placa o calva única de VLA atenuado que se ha cultivado por pases seriados. Los virus se atenúan por pases en HPE, cultivo celular de tejidos, o una combinación de ambos. Antes de fabricar la vacuna también debe comprobarse si los lotes de inóculo primario presentan transmisión y reversión a la patogenicidad. Se deben comprobar en las ovejas la apatogenicidad, la seguridad y la inmunogenicidad de muestras de la vacuna preparada a partir de inóculos víricos secundarios del máximo nivel de pases permitidos.

A las vacunas inactivadas no se aplica atenuación alguna, y la estrategia utilizada suele ser la de utilizar cepas naturales con pocos pases de cultivo para intentar lograr una elevada antigenicidad.

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

Los virus del inóculo primario deben estar libres de bacterias, virus, priones, hongos y micoplasmas contaminantes, evitando en particular la contaminación por pestivirus. A este respecto, se debe prestar atención al suero fetal bovino utilizado en los cultivos celulares, ya que puede estar contaminado. Los virus de siembra deben tener la especificidad serotípica deseada. El VLA que se utiliza en el lote del inóculo primario debe secuenciarse y los datos deben introducirse en las bases de datos reconocidas (Osburn, 2004). Los lotes de inóculo secundario que se usan como inóculo en la producción de vacunas, no suelen tener más de tres pases de cultivo más que el lote de inóculo primario.

2.1.3. Validación como cepa para vacuna

Las vacunas atenuadas vivas contra la LA deben ser seguras y eficaces; a continuación, se presenta una breve descripción de las pruebas relacionadas con estos parámetros. Además, los virus atenuados no deben revertir a la condición de patógenos durante su replicación en animales vacunados ni ser capaces de transmitirse desde tales animales por insectos vectores. Este último criterio es muy importante, porque la transmisión de los virus atenuados mediada por los insectos desde los animales vacunados a los no inmunes, con los subsiguientes pasos replicativos en cada especie hospedadora, aumenta la probabilidad de reversión a la condición de patógenos. Aunque casi nunca se llevan a cabo pruebas de reversión a la condición de patógenos y de transmisión, se resumen los requisitos en una breve descripción.

Existe variabilidad en la susceptibilidad a la lengua azul entre las distintas razas de ovejas; es importante, a efectos de la validación de la vacuna, que se utilicen ovejas en las que se haya demostrado que son susceptibles a la infección por el VLA.

2.1.4. Procedimiento de urgencia para la aceptación provisional de un nuevo inóculo vírico primario (MSV) en caso de epizootia

En varias circunstancias (véase el Capítulo 1.1.10 *Bancos de vacunas*) y en caso de que un serotipo o variante del VLA nuevo o diferente dé lugar a una situación epizootica de emergencia que no pueda controlarse mediante las vacunas disponibles en ese momento, y cuando no se disponga de tiempo suficiente para analizar por completo si un nuevo MSV presenta o no cada uno de los agentes extraños, una aceptación provisional de la nueva cepa podría basarse en un análisis del riesgo de la posibilidad de contaminación con agentes extraños en el antígeno producido a partir del nuevo MSV. En esta evaluación del riesgo deben tenerse en cuenta las características del proceso, incluida la naturaleza y concentración del inactivante en el caso de las vacunas inactivadas, antes de permitir o no la liberación temprana del nuevo producto.

2.2. Método de producción

2.2.1. Procedimiento

La atenuación de cepas naturales de VLA inicialmente se llevó a cabo mediante pases seriados en HPE. Debido a la posibilidad de transmisión de los virus atenuados propagados en huevos, se ha recomendado que los animales inoculados con vacunas producidas en HPE no sean objeto de desplazamientos internacionales (Osburn, 2004). Más recientemente, parece haber quedado claro que el pase por células en cultivo también induce la atenuación del poder patógeno. No se han realizado estudios para relacionar con precisión el número de pases con el grado de atenuación de cepas o serotipos víricos determinados. Para preparar virus atenuados, se adaptan cepas naturales a cultivo celular y se pasan *in vitro* hasta 40 veces o más. En teoría, en esta etapa se seleccionan varios virus purificados de placas o calvas y cada uno se examina para determinar el nivel de viremia que generan y su capacidad para inducir una respuesta inmunitaria de protección en las ovejas vacunadas. El virus ideal es el que se replica a bajo título pero que induce una respuesta inmunitaria protectora, y este puede constituir la fuente de virus para el inóculo primario de la vacuna.

Para las vacunas inactivadas, el VLA se produce a gran escala en cultivos celulares en suspensión en condiciones asépticas y controladas. Se utilizan líneas celulares adaptadas para su cultivo industrial a gran escala y que están libres de microorganismos contaminantes. Cuando la suspensión alcanza su título vírico máximo, se realiza la homogeneización celular y se clarifica y se filtra el cultivo. Después se lleva a cabo la inactivación según los procesos adoptados por el fabricante, como la adición de etilenoimina binaria (BEI) u otros agentes inactivantes. El proceso debe cumplir con la legislación pertinente respecto al comercio, y debe superar la validación que asegure una inactivación completa y disponer de la documentación apropiada. El proceso de inactivación no debe alterar de modo significativo las propiedades inmunogénicas de los antígenos víricos. La purificación se realiza por cromatografía. A continuación, el virus inactivado se concentra mediante ultrafiltración y se almacena. Los antígenos inactivados del VLA, purificados por cromatografía y concentrados se convierten en vacuna mediante la dilución en una solución tampón y la adición de adyuvantes.

2.2.2. Requisitos para los ingredientes

En todos los componentes de origen animal, como el suero y las células, debe comprobarse si hay bacterias, virus, hongos o micoplasmas viables. Para más detalles, véase el capítulo 1.1.8 sobre datos generales relativos a los ingredientes de origen animal. Los ingredientes de origen animal deben proceder de un país con riesgo insignificante de encefalopatías espongiformes transmisibles (EET).

2.2.3. Controles durante el proceso

La concentración de virus en las vacunas atenuadas se determina mediante la infectividad y por pruebas ELISA.

En cuanto a las vacunas inactivadas, durante la inactivación del virus se toman muestras a intervalos periódicos con el fin de comprobar la velocidad y linealidad del proceso de inactivación. Los títulos víricos de las muestras se determinan mediante inoculación de células BHK-21 u otros cultivos celulares adecuados. Al final del proceso de inactivación, se comprueba que la vacuna no contenga ningún virus vivo.

2.2.4. Pruebas en el lote de producto final

i) Esterilidad

En cada lote de vacuna debe comprobarse si hay virus contaminantes o contaminación por bacterias, hongos o micoplasmas viables. En Sudáfrica, por ejemplo, se inocula un conjunto de diez ampollas seleccionadas al azar en caldo de soja y caldo de tioglicolato y se incuban a temperatura ambiente y a 37°C, respectivamente, durante 14 días. Si el cultivo aparece contaminado, el lote se desecha.

ii) Inocuidad

Se comprueba la inocuidad de cada lote de vacuna en ratones adultos y neonatos, en cobayas y en ovejas. Si se advierten reacciones adversas o signos notables, se repite la prueba. Cualquier incremento en la temperatura corporal del animal por encima de la esperada para esa cepa particular de virus atenuado que se está analizando debe

considerarse como sintomático. Si los resultados no son satisfactorios tras un segundo intento, el lote se desecha.

Las pruebas de inocuidad de las vacunas inactivadas se realizan en ovejas para asegurar la ausencia de efectos secundarios.

iii) Potencia

Cada lote se comprueba inoculando ovejas susceptibles. Los sueros de pre-vacunación y los de 21 y 28 días post-vacunación se analizan mediante ensayos de NV para determinar los niveles de anticuerpos neutralizantes. Para superar este aspecto, el título de anticuerpos debe ser igual o superior a unos valores establecidos por los estándares internacionales de vacunas.

iv) Duración de la inmunidad

Los estudios sobre vacunas con el VLA vivo atenuado han mostrado que, en las ovejas, los anticuerpos pueden aparecer antes del día 10 post-vacunación, alcanzan un máximo aproximadamente 4 semanas después y persisten durante bastante más de un año. Existe una relación temporal entre el aumento en el título de anticuerpos neutralizantes y la desaparición del virus de la circulación periférica. Las vacunas con VLA vivo atenuado se han usado durante más de 50 años y se sabe que inducen una inmunidad eficaz y duradera en ovejas (Verwoerd & Erasmus, 2004). En las áreas endémicas de Sudáfrica pueden presentarse muchos serotipos del VLA, y se usan vacunas polivalentes. La inclusión de 15 serotipos en tres vacunas polivalentes que se administran secuencialmente conlleva que en ocasiones no se genere una respuesta inmune eficaz frente a todos los serotipos, probablemente porque la masa antigénica de algunos antígenos individuales específicos de serotipo es pequeña. Para intentar ampliar la respuesta, se repite la vacunación anualmente (Erasmus, 1975).

Los estudios iniciales llevados a cabo con vacunas inactivadas indican que se pueden detectar anticuerpos contra el VLA a los 7 días de la vacunación, y que el título aumenta hasta los 14–21 días. Una segunda dosis de la vacuna aumenta el título. Se están consiguiendo datos para demostrar la duración esperable de la inmunidad.

v) Estabilidad

Se han elaborado procedimientos para las vacunas atenuadas. La estabilidad debe comprobarse a lo largo de un período de 2 años. Se considera que las vacunas en forma líquida o liofilizada tienen una caducidad de 1 y 2 años, respectivamente. Cada lote de vacuna se somete a una prueba acelerada de caducidad, guardándolos a 37°C durante 7 días. Luego se titulan y evalúan con arreglo a un procedimiento estándar, como se determina en las pruebas iniciales de la vacuna. Debe comprobarse periódicamente el periodo de validez de alícuotas de inóculo primario almacenadas a 4°C.

2.3. Requisitos de autorización/registro/licencia

2.3.1. Proceso de fabricación

Para el registro de vacunas, deben presentarse a las autoridades todos los datos relevantes en cuanto a la fabricación de la vacuna y las pruebas de control de calidad (véase el apartado C.2.1 y el C.2.2). Esta información debe facilitarse a partir de tres lotes consecutivos de vacuna con un volumen no inferior a 1/3 del volumen habitual de un lote industrial.

2.3.2. Requisitos de inocuidad

En todas las vacunas deben realizarse pruebas de inocuidad. Las pruebas de inocuidad para las vacunas atenuadas no abordan el problema de la teratogenicidad. Las vacunas con virus atenuado son teratógenas y no deben administrarse a ovejas gestantes durante la primera mitad de la gestación, ya que pueden causar anomalías fetales y muerte embrionaria (Flanagan & Johnson, 1995; Lunt et al., 2006)

i) Inocuidad en especies de destino y no de destino

En cuanto a las vacunas con virus vivo atenuado es necesario demostrar que no son patógenas. Se inoculan con el inóculo primario varias ovejas, seronegativas según una prueba serológica sensible adecuada (que será fiable para detectar anticuerpos incluso en animales vacunados). Las temperaturas se registran dos veces al día. Se realiza un

seguimiento de los animales a intervalos periódicos a lo largo de un periodo de 28 días para saber si presentan signos clínicos y posibles reacciones locales o sistémicas, con el fin de asegurar que no son patógenas y que son inocuas. Se pueden utilizar muestras de sangre extraídas a intervalos periódicos para medir el nivel de viremia y las respuestas de anticuerpos. La prueba será válida si todas las ovejas vacunadas presentan signos de replicación vírica y ninguna presenta signos de enfermedad más allá de un trastorno transitorio leve. En Sudáfrica, para cada animal se calcula un índice de reacción clínica entre los días 4 y 14, y debe ser inferior a un valor estándar concreto.

ii) Reversión a la virulencia en vacunas atenuadas/vivas y consideraciones medioambientales

La transmisibilidad es un problema con las vacunas vivas atenuadas pero no con las vacunas muertas. Es difícil aplicar y analizar estadísticamente procedimientos para determinar si el virus atenuado puede ser transmitido por insectos que se alimenten en ovejas vacunadas virémicas, y por lo tanto este criterio de validación de las vacunas casi nunca se aplica. Los datos de laboratorio indican que los virus adaptados al laboratorio pueden ser transmitidos por insectos vectores (Ferrari *et al.*, 2005; Monaco *et al.*, 2006; Standfast *et al.*, 1985). Para que el procedimiento para determinar la transmisibilidad de un virus atenuado sea adecuado, deben vacunarse las ovejas y, durante la viremia, exponerlas a *Culicoides* competentes no infectados, a los cuales, a continuación, se les permite alimentarse en animales no infectados en los que se realiza un seguimiento para comprobar si presentan el VLA y anticuerpos contra el VLA. Dado que el título del virus atenuado en la sangre de ovejas vacunadas suele ser bajo, es posible que sean necesarias cantidades muy grandes de *Culicoides* y que solo una pequeña parte de estos resulten infectados y vivan lo suficiente como para alimentarse y llegar a transmitir el virus a otra oveja no infectada. Es difícil diseñar una prueba de laboratorio en la que se tenga en cuenta la gran cantidad de ovejas vacunadas y de insectos que habría en condiciones de campo. Aunque normalmente un título de virus en sangre inferior a 10^3 DICT₅₀/ml se ha considerado el umbral de "inocuidad", se han observado casos auténticos de insectos que contraen el VLA por alimentarse en animales con títulos virémicos muy inferiores (Bonneau *et al.*, 2002). Dada la compleja interacción entre el VLA, los vectores *Culicoides* y los animales hospedadores en el ciclo vital de la infección, los títulos víricos inducidos por la vacuna viva atenuada deben mantenerse en un mínimo absoluto, sobre todo si causa preocupación una transmisión de cepas vacunales en condiciones de campo.

Los datos actuales indican que durante la viremia y contrariamente a lo que ocurre con el virus natural, pueden hallarse cepas del VLA adaptadas al laboratorio en el semen de toros y carneros (Kirkland *et al.*, 2004). Las implicaciones de estas observaciones relativas a la transmisibilidad del virus no están del todo claras. En un estudio reciente del semen de carneros vacunados con vacuna preparada con VLA2 vivo atenuado se ha observado que aunque no se haya detectado el VLA en el semen, la vacuna ha causado una disminución de la calidad del mismo (Bréard *et al.*, 2007).

Los estudios de validación confirman que los virus atenuados no revierten a la virulencia en ovejas vacunadas. Sin embargo, si se pueden transmitir virus atenuados a partir de animales vacunados, la reversión a la virulencia durante varios ciclos de replicación en oveja-insecto resulta claramente posible. La única forma adecuada de comprobar si ha habido reversión a la virulencia en estas circunstancias es comparar la virulencia del virus vacunal con la del que se ha sometido a varios ciclos de replicación en oveja-insecto, como se ha descrito anteriormente. Como se ha indicado, es difícil de lograr. En consecuencia, no se ha determinado cuál es el efecto de varios pases en oveja-insecto sobre la virulencia de los virus atenuados. En Sudáfrica, se acepta que si la sangre de animales vacunados durante las fases virémicas se pasa de forma seriada tres veces por oveja y no revierte a la virulencia, la probabilidad de reversión en condiciones de campo será infinitamente baja. En Europa, se exigen cinco pases.

iii) Precauciones (peligros)

En los meses más fríos deben utilizarse vacunas atenuadas cuando las poblaciones de vectores *Culicoides* adultos están al mínimo. No deben utilizarse en ovejas durante la primera mitad de la gestación ni en carneros 2 meses antes de la estación reproductiva.

2.3.3. Requisitos de eficacia

Ovejas vacunadas y no vacunadas que se sepa que son susceptibles a la LA deben exponerse a un serotipo homólogo virulento. Se recomienda que el modelo de exposición utilice preferiblemente virus pasados solo por animales rumiantes y sin ECE o escaso, o por cultivo celular. El pase en este tipo de sistema de aislamiento da lugar a cultivos víricos que podrían inducir una LA clínica más leve que la enfermedad natural (Flanagan & Johnson, 1995). Se comprueba si los animales presentan signos clínicos de LA, se toman las temperaturas rectales dos veces al día y se extraen muestras de sangre a intervalos periódicos para medir la viremia y las respuestas de anticuerpos. Las ovejas control no vacunadas deben presentar signos clínicos de LA y viremia. No obstante, es difícil estar seguro de la aparición de enfermedad clínica tras la inoculación de ciertos serotipos y cepas del VLA a la oveja, y en consecuencia, la evidencia de infección en ovejas control no vacunadas podría tener que basarse en un aumento de la temperatura por encima de los 40°C y una viremia. Para comprobar dicha infección, se analizan sueros tomados antes y después de la vacunación para determinar si presentan anticuerpos neutralizantes.

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

Las vacunas vivas atenuadas y las inactivadas actualmente disponibles no permiten una estrategia DIVA.

2.3.5. Duración de la inmunidad

Para aprobar definitivamente una vacuna, deben llevarse a cabo estudios para determinar cuál es la duración mínima de la inmunidad. La duración de la inmunidad debe ponerse de manifiesto de manera similar a como se hace en el estudio original de eficacia, exponiendo animales al final del periodo de protección propuesto. En zonas infectadas estacionalmente, la inmunidad deberá durar, como mínimo, lo mismo que la estación del mosquito. Tal vez sea deseable demostrar una inmunidad más prolongada en animales con mayor riesgo y en zonas con presencia de mosquitos a lo largo de todo el año.

2.3.6. Estabilidad

A las vacunas vivas se les suele asignar un periodo de validez de 18 meses, y a las inactivadas, de 24. Para confirmar la idoneidad de dichos periodos, es necesario llevar a cabo pruebas de estabilidad en tiempo real. En el etiquetado del producto deben especificarse las condiciones de almacenaje necesarias.

BIBLIOGRAFÍA

AFSHAR A., THOMAS F.C., WRIGHT P.F., SHAPIRO J.L. & ANDERSON J. (1989). Comparison of competitive ELISA, indirect ELISA and standard AGID tests for detecting bluetongue virus antibodies in cattle and sheep. *Vet. Rec.*, **124**, 136–141.

ATTOUI H., MERTENS P.P.C., BECNEL J., BELAGANAHALLI S., BERGOIN M., BRUSSAARD C.P., CHAPPELL J.D., CIARLET M., DEL VAS M., DERMODY T.S., DORMITZER P.R., DUNCAN R., FANG Q., GRAHAM R., GUGLIELMI K.M., HARDING R.M., HILLMAN B., MAKKAY A., MARZACHÌ C., MATTHIJNSSENS J., MILNE R.G., MOHDJAAFAR F., MORI H., NOORDELOOS A.A., OMURA T., PATTON J.T., RAO S., MAAN M., STOLTZ D., SUZUKI N., UPADHYAYA N.M., WEI C. & ZHOU H. (2012). Family reoviridae. In: *Virus Taxonomy: Classification and Nomenclature of Viruses: Ninth Report of the International Committee on Taxonomy of Viruses*, King A.M.Q., Adams M.J., Carstens E.B. & Lefkowitz, E.J., eds. Elsevier Academic Press, San Diego, USA.

BATTEN C.A., BACHANEK-BANKOWSKA K., BIN-TARIF A., KGOSANA L., SWAIN A.J., CORTEYN M., DARPEL K., MELLOR P.S., ELLIOTT H.G. & OURA C.A.L. (2008). Bluetongue virus: European Community inter-laboratory comparison tests to evaluate ELISA and RT-PCR detection methods. *Vet. Microbiol.*, **129**, 80–88.

BRÉARD E., POZZI N., SAILLEAU C., CATINOT V., DURAND B., DUMONT P., GUÉRIN B. & ZIENTARA S. (2007). Transient effect of the attenuated bluetongue virus vaccine on the quality of the ram semen. *Vet. Rec.*, **160**, 431–435.

BONNEAU K.R., DEMAULA C.D., MULLENS B.A. & MACLACHLAN N.J. (2002) Duration of viraemia infectious to *Culicoides sonorensis* in bluetongue virus-infected cattle and sheep. *Vet. Microbiol.*, **88**, 115–125.

- CLAVIJO A., HECKERT R.A., DULAC G.C. & AFSHAR A. (2000). Isolation and identification of bluetongue virus. *J. Virol. Methods*, **87**, 13–23.
- DANIELS P.W., SENDOW I., PRITCHARD L.I., SUKARSIH & EATON B.T. (2004). Regional overview of bluetongue viruses in South-East Asia: viruses, vectors and surveillance. *Veterinaria Italiana*, **40**, 94–100.
- DUNGU B., GERDES T. & SMIT T. (2004). The use of vaccination in the control of bluetongue in southern Africa. *Vet. Ital.*, **40**, 616–622.
- ERASMUS B.J. (1975). The control of bluetongue in an enzootic situation. *Aust. Vet. J.*, **51**, 209–210.
- FLANAGAN M. & JOHNSON S.J. (1995). The effects of vaccination of Merino ewes with an attenuated Australian bluetongue virus serotype 23 at different stages of gestation. *Aust. Vet. J.*, **72**, 455–457.
- FERRARI G., DE LIBERATO C., SCAVIA G., LORENZETTI R., ZINI M., FARINA F., MAGLIANO A., CARDATI G., SHOLL F., GUIDONI M., SCICLUNA M.T., AMADDEO D., SCARAMOZZINO P. & AUTORINO G.L. (2005). Active circulation of bluetongue vaccine virus serotype-2 among unvaccinated cattle in central Italy. *Prev. Vet. Med.*, **68**, 10–13.
- GARD G.P., WEIR R.P. & WALSH S.J. (1988). Arboviruses recovered from sentinel cattle using several isolation methods. *Vet. Microbiol.*, **18**, 119–125.
- GIBBS E.P. & GREINER E.C. (1994). The epidemiology of bluetongue. *Comp. Immunol. Microbiol. Infect. Dis.*, **17**, 207–220. Review.
- GOULD A.R. (1987). The complete nucleotide sequence of bluetongue virus serotype 1 RNA3 and a comparison with other geographic serotypes from Australia, South Africa and the United States of America, and with other orbivirus isolates. *Virus Res.*, **7**, 169–183.
- HOFMANN M., GRIOT C., CHAIGNAT V., PERLER L. & THÜR B. (2008). Bluetongue disease reaches Switzerland. *Schweiz. Arch. Tierheilk.*, **150**, 49–56.
- JOHNSON D.J., WILSON W.C. & PAUL P.S. (2000). Validation of a reverse transcriptase multiplex PCR test for the serotype determination of U.S. isolates of bluetongue virus. *Vet. Microbiol.*, **76**, 105–115.
- KATZ J., GUSTAFSON G., ALSTAD D., ADLER K. & MOSER K. (1993). Colorimetric diagnosis of prolonged bluetongue viremia in sheep using an enzyme-linked oligonucleotide sorbent assay of amplified viral nucleic acids. *Am. J. Vet. Res.*, **54**, 2021–2026.
- KIRKLAND P.D., MELVILLE L.F., HUNT N.T., WILLIAMS C.F. & DAVIS R.J. (2004) Excretion of bluetongue virus in cattle semen: a feature of laboratory adapted virus. *Vet. Ital.*, **40**, 497–501.
- KRAMPS J.A., VAN MAANEN K., MARS M.H., POPMA J.K. & VAN RIJN P.A. (2008). Validation of a commercial ELISA for the detection of bluetongue virus (BTV)-specific antibodies in individual milk samples of Dutch dairy cows *Vet. Microbiol.*, **130**, 80–87.
- LUNT R.A., MELVILLE L., HUNT N., DAVIS S., ROOTES C.L., NEWBERRY K.M., PRITCHARD L.I., MIDDLETON D., BINGHAM J., DANIELS P.W. & EATON B.T. (2006). Cultured skin fibroblast cells derived from bluetongue virus-inoculated sheep and field-infected cattle are not a source of late and protracted recoverable virus. *J. Gen. Virol.*, **87**, 3661–3666.
- LUNT R.A., WHITE J.R. & BLACKSELL S.D. (1988). Evaluation of a monoclonal antibody blocking ELISA for the detection of group-specific antibodies to bluetongue virus in experimental and field sera. *J. Gen. Virol.*, **69**, 2729–2740.
- MAAN N., MAAN S., BELAGANAHALLI M., OSTLUND E., JOHNSON D., NOMIKOU K. & MERTENS P. (2012). Identification and differentiation of the twenty-six bluetongue virus serotypes by RT-PCR amplification of the serotype-specific genome segment 2. *PLoS One*, **7** (2): e32601. Doi: 10.1371/journal.pone.0032601.
- MACLACHLAN N.J. (2004). Bluetongue: pathogenesis and duration of viraemia. *Veterinaria Italiana*, **40**, 462–467.
- MACLACHLAN N.J., NUNAMAKER R.A., KATZ J.B., SAWYER M.M., AKITA G.Y., OSBURN B.I. & TABERCHNICK W.J. (1994). Detection of bluetongue virus in the blood of inoculated calves: comparison of virus isolation, PCR assay, and *in vitro* feeding of *Culicoides variipennis*. *Arch. Virol.*, **136**, 1–8.
- MACLACHLAN N.J., OSBURN B.I., STOTT J.L. & GHALIB H.W. (1985). Orbivirus infection of the bovine fetus. *Prog. Clin. Biol. Res.*, **178**, 79–84.

- MARTYN C.J., GOULD A.R. & EATON B.T. (1990). High level expression of the major core protein VP7 and the non-structural protein NS3 of bluetongue virus in yeast: use of expressed VP7 as a diagnostic, group-reactive antigen in a blocking ELISA. *Virus Res.*, **18**, 165–178.
- McCOLL K.A. & GOULD A.R. (1991). Detection and characterisation of bluetongue virus using the polymerase chain reaction. *Virus Res.*, **21**, 19–34.
- McHOLLAND L.E. & MECHAM J.O. (2003). Characterization of cell lines developed from field populations of *Culicoides sonorensis* (Diptera: Ceratopogonidae). *J. Med. Entomol.*, **40**, 348–351.
- MERTENS P.P., MAAN N.S., PRASAD G., SAMUEL A.R., SHAW A.E., POTGIETER A.C., ANTHONY S.J. & MAAN S. (2007). Design of primers and use of RT-PCR assays for typing European bluetongue virus isolates: differentiation of field and vaccine strains *J. Gen. Virol.*, **88**, 2811–2823.
- MERTENS P.P.C., MAAN S., SAMUEL A. & ATTOUI H. (2005). Orbiviruses. *In: Virus Taxonomy. Classification and Nomenclature of Viruses*; Fauquet C.M., Mayo M.A., Maniloff J., Desselberger U. & Ball L.A., eds., Elsevier Academic Press, Amsterdam, Netherlands, 466–483.
- MONACO F., CAMMÀ C., SERINI S. & SAVINI G. (2006). Differentiation between field and vaccine strain of bluetongue virus serotype 16. *Vet. Microbiol.*, **116**, 45–52.
- OLDFIELD S., ADACHI A., URAKAWA T., HIRASAWA T. & ROY P. (1990). Purification and characterization of the major group-specific core antigen VP7 of bluetongue virus synthesized by a recombinant baculovirus. *J. Gen. Virol.*, **71**, 2649–2656.
- OSBURN B.I. (2004). Conclusions. *In: Proceedings of the Third OIE International Symposium on Bluetongue*. Taormina, 26–29 October 2003, MacLachlan N.J. & Pearson J.E., eds. *Vet. Ital.*, **40**, 713–726.
- POTGIETER A.C., MONACO F., MANGANA O., NOMIKOU K., YADIN H. & SAVINI G. (2005). VP2-segment sequence analysis of some isolates of bluetongue virus recovered in the Mediterranean basin during the 1998–2003 outbreak. *J. Vet. Med. [B.]*, **52**, 372–379.
- PRITCHARD L.I., GOULD A.R., WILSON W.C., THOMPSON L., MERTENS P.P. & WADE-EVANS A.M. (1995). Complete nucleotide sequence of RNA segment 3 of bluetongue virus serotype 2 (Ona-A). Phylogenetic analyses reveal the probable origin and relationship with other orbiviruses. *Virus Res.*, **35**, 247–261.
- STANDFAST H.A., DYCE A.L. & MULLER M.J. (1985). Vectors of BT in Australia. *In: Bluetongue and Related Orbiviruses*, Barber T.L. & Jochim M.M., eds. Alan R. Liss, New York, USA, 177–186.
- VENTER G.J., GERDES G.H., MELLOR P.S. & PAWESKA J.T. (2004). Transmission potential of South African *Culicoides* species for live-attenuated bluetongue virus. *Vet. Ital.*, **40**, 198–202.
- VERWOERD D.W. & ERASMUS B.J. (2004). Bluetongue. *In: Infectious Diseases of Livestock*, Second Edition, Coetzer J.A.W. & Tustin R.C., eds. Oxford University Press Southern Africa, Cape Town, South Africa, 1201–1220.
- WECHSLER S.J., McHOLLAND L.E. & TABACHNICK W.J. (1989). Cell lines from *Culicoides variipennis* (Diptera: Ceratopogonidae) support replication of bluetongue virus. *J. Invert. Pathol.*, **54**, 385–393.
- WILSON W.C., MA, H.C., VENTER E.H., VAN DJIK A.A., SEAL B.S. & MECHAM J.O. (2000). Phylogenetic relationships of bluetongue viruses based on gene S7. *Virus Res.*, **67**, 141–151.

*

* *

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

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

Por favor, contacte con los Laboratorios de Referencia de la OIE para información adicional sobre pruebas de diagnóstico, reactivos y vacunas para la lengua azul

NB: ADOPTADO POR PRIMERA VEZ EN 1991; ÚLTIMAS ACTUALIZACIONES ADOPTADAS EN 2014.