



Organisation
Mondiale
de la Santé
Animale

World
Organisation
for Animal
Health

Organización
Mundial
de Sanidad
Animal

70 SG/12/CS2 B

Original: Inglés
Enero/febrero de 2002

INFORME DE LA REUNIÓN DE LA COMISIÓN DE NORMAS DE LA OIE

París, 29 de enero – 1 de febrero de 2002

La Comisión de Normas de la OIE se reunió en la Sede de la OIE del 29 de enero al 1 de febrero de 2002.

El Dr Bernard Vallat, Director General, se excusó por su ausencia (se encontraba en Addis Abeba, Etiopía, asistiendo a una reunión de la Representación Regional de la OIE para África). El Prof. Marian Trusczyński leyó una carta del Dr Vallat en la que éste agradecía a la Comisión por su excelente apoyo. El Dr Vallat también declaró que la OIE encargará a sus diferentes comisiones que tomen decisiones respecto al bienestar de los animales y a las enfermedades de origen alimentario, a un nuevo sistema de categorización, y a un método para examinar el estatus de los Países Miembros respecto a la EEB¹. El Dr Vallat desea que las Comisiones de la OIE se hagan más eficientes y eficaces mediante su estrecha cooperación. El Dr James Pearson puso a la Comisión al día acerca de los cambios de personal en la Oficina Central de la OIE.

El orden del día y la lista de los participantes figuran en los Anexos I y II, respectivamente.

1. Laboratorios de Referencia de la OIE

1.1. Nuevas aplicaciones para el estatus de Centro Colaborador y de Laboratorio de Referencia

La Comisión convino en que se necesitaba un Laboratorio de Referencia de la OIE para el carbunco bacteriano y que solicitará nominaciones por parte de los Delegados de la OIE adjuntando una carta explicativa al informe de la Comisión de Normas.

1.2. Actualización de la lista de los Laboratorios de Referencia

La Comisión aprobó una solicitud de los Laboratorios de los Servicios Veterinarios Nacionales, Estados Unidos de América (E.E.U.U.), de ser suprimidos de la lista de los Laboratorios de Referencia para la enfermedad hemorrágica del conejo.

La Comisión recomienda que se posponga la aprobación del Centro Panafricano de Vacunas Veterinarias (PANVAC²) como Laboratorio de Referencia para la perineumonía contagiosa bovina hasta que sea totalmente operacional.

Se han notificado a la OIE los siguientes cambios de expertos nombrados en los Laboratorios de Referencia de la OIE. La Comisión recomienda su aprobación:

¹ EEB: Encefalopatía espongiforme bovina

² PANVAC: Pan African Veterinary Vaccine Centre

Fiebre aftosa

El Dr M.G. Mosienyane para remplazar al Sr. M. Proteau en el Botswana Vaccine Institute, en Gaborone, Botsuana.

Perineumonía contagiosa bovina

El Dr A. Pini para remplazar al Dr F.G. Santini en el Istituto Zooprofilattico Sperimentale dell'Abruzzo e del Molise 'G. Caporale', en Teramo, Italia.

Lengua azul

El Dr P.S. Mellor para remplazar al Dr J. Anderson en el Institute for Animal Health, en Pirbright, Reino Unido.

Rabia

El Dr C.A. de Mattos para remplazar al Dr J. Bingham en el Onderstepoort Veterinary Institute, Sudáfrica.

1.3. Carta de los E.E.U.U. respecto al deber de informar de los Laboratorios de Referencia

La Comisión de Normas recibió las directrices recomendadas del delegado de los E.E.U.U. respecto al deber de informar de los Laboratorios de Referencia de la OIE. La Comisión acoge estas sugerencias y opina que éstas pueden, si se desea, servir de directrices internas para un país y ser implementadas por el Delegado. También se toma nota de que los Laboratorios de Referencia de la OIE son nombrados y sus funciones son apoyadas por el Delegado. La Comisión opina que se respondió a algunas de las preocupaciones expresadas mediante los cambios que se hicieron el año pasado para exigir que los Laboratorios de Referencia dieran a conocer los resultados positivos de las pruebas.

1.4. Informe anual de los Laboratorios de Referencia para el 2001

Se recibieron los informes de 106/116 Laboratorios de Referencia y de 7/8 Centros Colaboradores. La Comisión volvió a comentar la impresionante gama de actividades llevadas a cabo por los Laboratorios de Referencia orientadas hacia los objetivos de la OIE, y el apoyo continuo proporcionado por expertos individuales al trabajo de la Comisión de Normas. Se entregará el conjunto completo de informes a los Países Miembros y a todos los Laboratorios de Referencia y Centros Colaboradores. Las actividades internacionales pertinentes al trabajo de la OIE están resumidas más abajo:

Actividades generales	Porcentaje de Laboratorios que llevan a cabo estas actividades	Porcentaje de Centros Colaboradores que llevan a cabo estas actividades
1a) Pruebas de diagnóstico realizadas	88%	14%
1b) Identificaciones del agente realizadas	83%	29%
2 Producción, pruebas y distribución de los reactivos de diagnóstico	82%	29%
3 Investigación	84%	29%
Actividades específicas de la OIE		
1 Armonización/normalización internacional de los métodos	58%	57%
2 Preparación y suministro de estándares internacionales de referencia	51%	29%
3 Recolección, análisis y divulgación de datos epizootiológicos	49%	43%
4 Suministro de pericia por consultores	49%	71%
5 Suministro de formación científica y técnica	56%	86%
6 Organización de reuniones científicas internacionales	21%	100%
7 Participación en estudios científicos internacionales efectuados en colaboración	55%	71%
8 Publicaciones	81%	100%

2. Normalización internacional de las pruebas de diagnóstico y las vacunas

2.1. Programas de normalización de la OIE para las pruebas de diagnóstico

ENFERMEDADES DE LA LISTA A

Perineumonía contagiosa bovina – Coordinador Dr A. Pini

El Dr Pini informó que los sueros candidatos se estaban sometiendo a prueba.

Peste porcina clásica – Coordinador Dr S. Edwards

El Dr Steve Edwards proporcionó datos sobre la validación de un antisuero de referencia fuertemente positivo, de uno débilmente positivo y de uno negativo para ser utilizados en la prueba de neutralización del virus para detectar la peste porcina clásica. La Comisión examinó los datos y recomendó que estos sueros fueran designados sueros de Referencia Internacional aprobados por la OIE para la peste porcina clásica. Dichos sueros se pueden obtener del Laboratorio de Referencia de la OIE en VLA, Weybridge, Reino Unido.

ENFERMEDADES DE LA LISTA B

Leucosis bovina enzoótica (PCR³) – Coordinador Dr L. Renström

El Dr Renström informó que no se había efectuado ningún progreso en la normalización de la PCR o en la preparación de sueros de referencia para la leucosis bovina enzoótica; se le alentó a que continuara a hacer progresar el proyecto.

Gripe equina – Coordinador Dr J. Mumford

La Comisión convino en que la reunión de septiembre del Panel de Expertos para la Vigilancia sobre la Gripe Equina debería celebrarse en la Sede de la OIE. La Comisión recomendó que el Panel se reuniese inmediatamente antes de la reunión de la Comisión de Normas para que pudiese entregar su informe y su recomendación a la Comisión respecto a las cepas virales apropiadas para la vacuna.

2.2. Validación/normalización de las pruebas para la fiebre aftosa

El Dr Kris De Clercq, Presidente de la Comisión Europea para la Lucha contra la Fiebre Aftosa, se reunió con la Comisión para examinar el tema de la elaboración de normas de referencia para la fiebre aftosa adicionales. Se tomó nota de que se necesitan sueros de referencia para subtipos adicionales de fiebre aftosa. Además, la utilización de ELISAs⁴ diferenciales para la fiebre aftosa requiere sueros de referencia provenientes de animales vacunados. También parecen necesarios reactivos de referencia para la PCR.

La Comisión apoya fuertemente el concepto de que se necesitan sueros de referencia adicionales para las pruebas serológicas de la fiebre aftosa dado el alto riesgo global de infección por la fiebre aftosa. Se dió la prioridad máxima a la producción de sueros de referencia para la prueba ELISA NSP⁵. Para producir dichos sueros deberían utilizarse antígeno y protocolos de referencia estándar. La Comisión también convino en que se necesita un panel de sueros de referencia para una gama más amplia de subtipos de fiebre aftosa. Además, es preciso evaluar en la prueba NSP ELISA los sueros de referencia débilmente positivos existentes para determinar si es necesario normalizar el valor umbral de la prueba. Para la prueba ELISA indirecta hacen falta sueros específicos de una especie, así como sueros de animales vacunados. La Comisión convino en que los nuevos sueros de referencia deberían someterse a prueba en los laboratorios de referencia para la fiebre aftosa y en laboratorios adicionales que practiquen serología de la fiebre aftosa. La OIE contactará a la AIEA⁶ para estudiar la posibilidad de que sus laboratorios produzcan sueros para la prueba ELISA NSP y de animales vacunados. La Comisión le pedirá al autor del capítulo sobre la fiebre aftosa en el *Manual de Normas para las Pruebas de Diagnóstico y las Vacunas* (el *Manual*) que añada una sección respecto a la

3 PCR: Amplificación en cadena por polimerasa

4 ELISA: Ensayos inmunoenzimáticos

5 NSP: Proteína no estructural

6 AIEA: Agencia Internacional de Energía Atómica

pureza de la vacunas para las NSP. La Comisión remitirá al laboratorio de Pirbright la cuestión del rendimiento de los sueros de referencia actuales débilmente positivos en la prueba ELISA en fase sólida para la fiebre aftosa.

3. Lista de las pruebas prescritas y de sustitución

3.1. Repaso de la definición de ‘prueba prescrita’

La Comisión recomienda que se describan las pruebas apropiadas para determinar el estatus libre de enfermedad para las cuatro enfermedades para las que la OIE tiene procedimientos oficiales de reconocimiento del estatus ‘libre de enfermedad’ (Fiebre aftosa, peste bovina, PCB y EEB) como tales en el *Manual*, ya que pueden, o no, también ser designadas como pruebas prescritas para el comercio internacional.

3.2. ELISA en fase sólida para la fiebre aftosa

La Comisión propone que se designe el método ELISA en fase sólida de las proteínas estructurales como una prueba prescrita. El protocolo para esta prueba que figura en el proyecto de capítulo sobre la fiebre aftosa en la edición de 2004 del *Manual* ha sido revisado y juzgado aceptable, con algunos cambios menores, para ser admitido como norma para la prueba. (Anexo III).

3.3. ELISA para la serología de la rabia

La Comisión propone que se designe la prueba ELISA como prueba prescrita (Anexo IV). La Comisión pidió la clarificación de algunos puntos en el dossier sobre la validación. La aceptación de esta prueba requerirá un pequeño cambio en el capítulo sobre la rabia del *Código Zoosanitario Internacional* (el *Código*). El cambio sugerido es el siguiente: Artículo 2.2.5.5 punto 4) fueron sometidos, no menos de 3 meses y no más de 24 meses antes del embarque, a una prueba de anticuerpo según figura en el *Manual*, con un resultado positivo equivalente por lo menos a 0.5 IU/ml de suero [prueba de titulación de anticuerpos neutralizantes, y su suero contenía por lo menos 0.5 IU/ml].

3.4. Pruebas de las proteínas no estructurales para la fiebre aftosa

La Comisión examinó las pruebas NSP para la fiebre aftosa. La Comisión recomendó que se elaborasen sueros de referencia de la OIE, incluidos aquellos positivos para la vacuna, a partir de animales infectados y no infectados. La Comisión reiteró la discusión de su última reunión acerca de que la prueba 3ABC es apropiada para ser utilizada en la determinación del estatus respecto a la fiebre aftosa en animales vacunados, a nivel de rebaño. La Comisión aprobó los procedimientos NSP, incluido el método ELISA, que se han sometido para su publicación en la edición del *Manual* de 2004 (Anexo V). A la vista de las decisiones tomadas por la Comisión para la fiebre aftosa y otras epizootias, la Comisión de Normas ha modificado las declaraciones de su reunión de septiembre de 2001 acerca de la utilización de los ensayos NSP:

La prueba ELISA NSP puede ser utilizada para restituir el estatus libre de enfermedad, en países originalmente "libres sin vacunación" en el marco de un programa de serovigilancia para determinar la ausencia de infección en la población vacunada restante.

La prueba ELISA NSP puede ser utilizada para la vigilancia serológica en "un país o zona libre de fiebre aftosa donde se practica la vacunación" para restituir el estatus libre de enfermedad.

3.5. Anaplasmosis bovina (de septiembre de 2001)

La Comisión se reunió con expertos acerca de la prueba de fijación del complemento para la anaplasmosis bovina y se recomendó conservar la prueba FdC como prueba de sustitución en el *Manual*.

3.6. Otros cambios propuestos para la lista de pruebas prescritas y de sustitución

La Comisión recomienda que se apruebe el método ELISA como prueba prescrita para la brucelosis porcina y que la prueba con antígeno de *Brucella* tamponado (BBAT⁷) pase a tener un estatus de prueba de sustitución. También recomienda que se incluya en la lista la prueba PCR para la leucosis bovina enzoótica como prueba de sustitución (el anexo VI contiene todos los cambios propuestos para la lista de las pruebas prescritas).

7 BBAT: Buffered *Brucella* antigen test

4. Cuestionario sobre la tuberculosis bovina

La Comisión examinó la aportación del cuestionario que se envió a los Delegados respecto a la utilización y fabricación de la tuberculina en sus países. La Comisión enviará un cuestionario a los fabricantes de tuberculina sobre los protocolos utilizados para su producción y su evaluación. El Laboratorio de Referencia de la OIE en la Agencia de Laboratorios Veterinarios (Veterinary Laboratories Agency), en Weybridge, Reino Unido, está evaluando varios aspectos de la fabricación y estandarización de las tuberculinas, y mantendrá informada a la Comisión.

5. Manual de Normas para las Pruebas de Diagnóstico y las Vacunas de la OIE

5.1. Reacción de los Países Miembros a la cuarta edición del *Manual*

La Comisión dio la bienvenida al Dr Anthony Cullen invitándole a que participara en su discusión respecto a las propuestas de los Países Miembros sobre la cuarta edición del *Manual*. La Comisión añadirá informaciones nuevas y pertinentes, incluidos protocolos para las nuevas pruebas prescritas, en su espacio web previsto, a fin de mantener el *Manual* actualizado. Existen proyectos de publicar la edición del *Manual* del 2000 en francés.

5.2. Quinta edición del *Manual*

La Comisión comentó la necesidad de autores para varios capítulos nuevos sobre las enfermedades bacterianas. Se elaboró una lista de autores potenciales, y se les contactará. La Comisión revisó la lista de capítulos, autores y revisores.

6. Preparación de un folleto sobre las directrices

La Comisión ha finalizado el contenido del folleto sobre las directrices. Éste incluirá: las Normas de Gestión y los Requisitos Técnicos de la OIE para los Laboratorios que realizan Pruebas para detectar las Enfermedades Animales Infecciosas, las Directrices de la OIE para la Validación de las Pruebas de Diagnóstico para las Enfermedades Infecciosas, las Directrices de la OIE para los Reactivos Internacionales de Referencia para las Pruebas de Anticuerpos, y las Directrices de la OIE para la Evaluación de la Capacidad de los Laboratorios.

6.1. Revisión del artículo de la *Revista* sobre la validación de los ensayos para el folleto propuesto

La Comisión aceptó la versión revisada del artículo Validación de las Pruebas de Diagnóstico para las Enfermedades Infecciosas de la OIE (Anexo VII).

6.2. Normas de la OIE – derechos de autor

La OIE ha convenido en pagar a ISO⁸ los derechos de autor asociados a la publicación de las Normas de la OIE. Estos derechos se incluirán en el precio de venta. Se deberá incluir una declaración en el prefacio alentando fuertemente a los laboratorios que efectúan pruebas para el comercio internacional a que cumplan con las normas ISO 17025.

7. Relación con las otras Comisiones

COMISIÓN DEL CÓDIGO

7.1. Propuesta para la eliminación de la rinitis atrófica del cerdo de la Lista B

La Comisión se reunirá con expertos en el campo acerca de la cuestión del comercio en relación con la rinitis atrófica.

7.2. Adenomatosis pulmonar ovina

La Comisión del Código aceptó la recomendación de la Comisión de Normas de no incluir por el momento la adenomatosis pulmonar ovina en el *Código*, dada la falta de pruebas de diagnóstico adecuadas.

8 ISO: Organización Internacional de Normalización

COMISIÓN PARA LAS ENFERMEDADES DE LOS PECES

7.3. Reglamentación para el embalaje y envío postal de material infeccioso

La Comisión convino en que, de acuerdo con lo estipulado en el *Código*, en el *Código Sanitario para los Animales Acuáticos* y en el *Manual*, se debe cumplir con la reglamentación IATA⁹ UN602.

7.4. Recuperación de gastos para los reactivos, estándares, pruebas, etc., para los Laboratorios de Referencia

La Comisión propuso cambiar el mandato de los Laboratorios de Referencia para incluir una declaración respecto a la posibilidad de que éstos cobren por sus servicios, y a su deber de informar sobre las enfermedades de los animales acuáticos de declaración obligatoria (véase Anexo VIII).

8. Continuación de la Sesión General de mayo de 2001

8.1. Resolución No. XXV de la Sesión General, párrafo 2a, sobre la resistencia antimicrobiana

La Comisión revisó el informe del Grupo Ad hoc de la OIE sobre la Resistencia Antimicrobiana que se publicó en la Revista Científica y Técnica. Se felicitó al Grupo Ad hoc por la calidad del informe. La Comisión se encargará de que se modifique el formato de dicho informe para que pueda ser sometido a los Países Miembros y al Comité Internacional para su aprobación como directriz de la OIE, reconocida por el Acuerdo sobre Medidas Sanitarias y Fitosanitarias de la Organización Mundial del Comercio.

8.2. Resolución No. XX de la Sesión General sobre las enfermedades emergentes

La Comisión examinó las diferentes maneras de proporcionar a los Países Miembros información acerca de los procedimientos de diagnóstico para las enfermedades emergentes. Se decidió que se utilizaría para este fin la página web de la Comisión de Normas, y que los Miembros ayudarían a la Oficina Central a identificar las enfermedades emergentes de las que se deberá tratar.

La Comisión también recomienda que si se sospecha la presencia de una enfermedad emergente, se sometan muestras al laboratorio nacional de referencia. Si dicho laboratorio no pudiera lidiar con esa enfermedad emergente, el Jefe de Servicios Veterinarios debería pedir asistencia a uno de los Laboratorios de Referencia de la OIE o a uno de los Centros Colaboradores especializados en el diagnóstico de las enfermedades emergentes para esa especie particular.

9. Otros asuntos

9.1. Simposio Internacional sobre el Control de Calidad de las vacunas contra la gripe equina

Esta reunión fue patrocinada por el *European Directorate for the Quality of Medicines* y por la OIE; se celebró en Budapest, Hungría, los 10-11 de diciembre de 2001. Se examinaron los cambios necesarios para establecer mejores Normas Europeas y de la OIE para la evaluación de la eficacia de las vacunas, y se modificará el capítulo del *Manual* de acuerdo con dichos cambios. Además, se recomendó que los Laboratorios de Referencia de la OIE mejoren sus procedimientos de vigilancia y de declaración para permitir la adaptación rápida de nuevas cepas adecuadas en las vacunas.

9.2. Síndrome Multisistémico Post Destete

La Comisión tomó nota de la importancia económica del Síndrome Multisistémico Post Destete (PMWS¹⁰). Sin embargo, la Comisión no recomendaría establecer normas para el comercio relativas a la PMWS, dada su naturaleza multifactorial.

9 IATA: Asociación Internacional de Transporte Aéreo

10 PMWS: Post-weaning multisystemic wasting syndrome

9.3. Normalización de los ensayos moleculares

La Comisión reconoce la necesidad de estandarizar los ensayos moleculares y le pedirá a un experto que asista a su próxima reunión de septiembre para examinar esta importante cuestión. También se ha pedido a un experto que redacte un capítulo sobre la validación de los ensayos moleculares para la quinta edición del *Manual*.

9.4. Adelantos en la investigación sobre las pruebas para detectar los priones

La Comisión tomó nota de los progresos realizados en este importante campo.

9.5. Página Web de la Comisión de Normas

La Comisión examinó los posibles problemas relativos al diseño de su nueva página Web. Se convino en que el espacio se utilizaría para proporcionar informaciones nuevas que, a la larga y una vez aprobadas por el Comité Internacional, se incluirán en el *Manual*, como, por ejemplo, técnicas para las enfermedades emergentes. Este espacio también incluirá conexiones al *Manual*, la lista de los Laboratorios de Referencia, los Reactivos de Referencia Internacionales aprobados por la OIE que estén disponibles, e informes sobre sus reuniones.

9.6. Pre-propuesta para un "Challenge Programme" CGIAR¹¹

La Comisión examinó con el Dr Vallat los campos potenciales de investigación en el marco del "Challenge Programme". Se concluyó que la enfermedad animal con mayor impacto sobre el comercio para los países en vías de desarrollo a través del mundo es la fiebre aftosa. Prácticamente todos los países en vías de desarrollo están infectados y han visto su comercio severamente restringido a causa de esta enfermedad. Puesto que el objetivo general del programa es la lucha contra la pobreza, se convino en que se debería centrar la atención en África. La enfermedad con segundo grado de importancia es, por lo tanto, la peste porcina africana. Esta enfermedad se ha propagado recientemente a un mayor número de países en África, y está teniendo un impacto importante sobre el comercio. La lucha contra esta enfermedad es difícil y costosa, ya que no existe vacuna. Otras dos enfermedades animales tienen una alta prioridad. Se trata de la fiebre del Valle del Rift, que ha tenido un impacto muy importante sobre el comercio en África, y la enfermedad de Newcastle, que ha causado ciertas restricciones en el comercio y ha tenido un gran impacto sobre la producción de proteínas animales baratas para el mundo en vías de desarrollo.

Las prioridades en la investigación sobre estas enfermedades son las siguientes:

- Elaboración e implementación de pruebas de diagnóstico rápidas, robustas y poco costosas para que se puedan implementar programas de control efectivos,
- Elaboración de vacunas mejoradas y poco costosas, incluidas vacunas que no necesiten una cadena del frío,
- Desarrollo de una infraestructura de vigilancia que le permita a un país probar la presencia de zonas libres de enfermedad.

La Comisión imagina una situación en la que un centro de investigación en el mundo desarrollado formara un partenariado con un centro en un país en vías de desarrollo para llevar a cabo este tipo de investigación e implementarla en el país en vías de desarrollo. La creación de capacidades en el centro situado en un país en vías de desarrollo debería ser una meta principal de esta investigación con miras a que los resultados sean sostenibles y que se pueda mantener un mercado una vez esté abierto. Los Laboratorios de Referencia de la OIE y la FAO¹² y los Centros Colaboradores de la OIE tienen la capacidad de estudiar estas enfermedades, especialmente en asociación con laboratorios de países en vías de desarrollo, y deberían ser uno de los principales contribuidores para esta investigación.

Se elaborará una recomendación que será sometida al Comité Internacional, como resultado de la consulta que se realizará con los donantes y centros del CGIAR en marzo de 2002 en la sede de la OIE.

11 CGIAR: Grupo Consultivo sobre Investigación Agrícola Internacional

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

9.7. Simposio conjunto OIE/WAVLD¹³ de 2003 en Tailandia

La Comisión apoyó el punto central propuesto sobre los kits de diagnóstico anexos para ser utilizados con vacunas dotadas de un marcador. Se propuso contactar a ponentes en los siguientes campos: fiebre aftosa, peste porcina clásica, herpesvirus, brucelosis, una visión general de las estrategias para la utilización de vacunas con marcador y el potencial de las vacunas con marcador para otras enfermedades.

9.8. Reunión de la OIE sobre la lengua azul

Se está organizando la Tercera Conferencia Internacional sobre la lengua azul, la peste equina y otros orbivirus de la familia para el otoño de 2002 ó la primavera de 2003, y dicha conferencia se celebrará en Italia.

9.9. Fechas de las próximas reuniones de la Comisión de Normas

Se han establecido las siguientes fechas para las próximas reuniones: 25-27 de septiembre de 2002 y primeros de enero de 2003.

.../Anexos

13 WAVLD: Asociación Mundial de Especialistas de Laboratorios de Diagnóstico Veterinario



Organisation
Mondiale
de la Santé
Animale

World
Organisation
for Animal
Health

Organización
Mundial
de Sanidad
Animal Anexo I

REUNIÓN DE LA COMISIÓN DE NORMAS

París, 29 de enero – 1 de febrero de 2002

Orden del día

1. Laboratorios de Referencia de la OIE
2. Normalización internacional de las pruebas de diagnóstico y las vacunas
3. Lista de las pruebas prescritas y de sustitución
4. Cuestionario sobre la tuberculosis bovina
5. *Manual de Normas para las Pruebas de Diagnóstico y las Vacunas* de la OIE
6. Preparación de un folleto sobre las directrices
7. Relación con las otras Comisiones
8. Continuación de la Sesión General de mayo de 2001
9. Otros asuntos



Organisation
Mondiale
de la Santé
Animale

World
Organisation
for Animal
Health

Organización
Mundial
de Sanidad
Animal Anexo II

**REUNIÓN DE LA COMISIÓN DE NORMAS
París, 29 de enero – 1 de febrero de 2002**

Lista de los participantes

MIEMBROS

Prof. Marian Trusczyński
(*Presidente*)

National Veterinary Research Institute
57 Partyzantow St., 24-100 Pulawy
POLONIA
Tel.: (48-81) 886.32.70
Telex: 642401
Fax: (48-81) 887.71.00.
Email: mtrusczy@esterka.piwet.pulawy.pl

Dr Steve Edwards (*Vicepresidente*)

VLA Weybridge
New Haw, Addlestone
Surrey KT15 3NB
REINO UNIDO
Tel.: (44-1932) 34.11.11
Fax: (44-1932) 34.70.46
Email: s.edwards@vla.defra.gsi.gov.uk

Dr Beverly Schmitt
(*Secretario General*)

National Veterinary Services
Laboratories, Diagnostic Virology
Laboratory, P.O. Box 844, Ames
IA 50010
ESTADOS UNIDOS DE AMÉRICA
Tel.: (1-515) 663.75.51
Fax: (1-515) 663.73.48
Email: beverly.j.schmitt@aphis.usda.gov

OTROS PARTICIPANTES

Dr Peter Wright

Canadian Food Inspection Agency, National Centre for
Foreign Animal Disease, 1015 Arlington Street
Winnipeg, Manitoba R3E 3M4
CANADA
Tel.: (1-204) 789.20.09
Fax: (1-204) 789.20.38
Email: pwright@inspection.gc.ca

OFICINA CENTRAL DE LA OIE

Dr Bernard Vallat

Director General,
OIE 12 rue de Prony,
75017 Paris
FRANCIA
Tel.: (33-1) 44.15.18.88
Fax: (33-1) 42.67.09.87
Email: oie@oie.int

Dr James E. Pearson

Jefe del Departamento Científico y Técnico
Email: je.pearson@oie.int

Dr Dewan Sibartie

Jefe Adjunto del Departamento Científico y Técnico
d.sibartie@oie.int

Ms Sara Linnane

Secretaria de redacción, Departamento Científico y Técnico
Email: s.linnane@oie.int

PARTICIPANTES INVITADOS

Dr Kris De Clercq

Department of Virology
Section Epizootic Diseases
CODA-CERVA-VAR
Groeselenberg 99
B-1180 Ukkel
BÉLGICA
Tel.: (32-2) 37.90.512
Fax: (32-2) 37.90.666
Email: kris.de.clercq@var.fgov.be

Dr G. Anthony Cullen

2, Muirfield Road
Woking, Surrey GU21 3PW
REINO UNIDO
Tel.: (44-1483) 76.03.15
Fax: (44-1483) 72.38.30
Email: anthony.cullen@btinternet.com



PROTOCOLO PARA EL NUEVO MÉTODO PRESCRITO PROPUESTO PARA LA SEROLOGÍA DE LA ENFERMEDAD DE LA FIEBRE AFTOSA

Ensayo inmunoenzimático de competición en fase sólida

Se utiliza el antisuero de conejo contra el antígeno 146S de uno de los siete tipos del virus de la fiebre aftosa como el anticuerpo de captura a una concentración óptima predeterminada¹⁴ en una solución tampón de carbonato/bicarbonato, a pH 9.6.

Se preparan los antígenos mediante la inactivación de virus propagados en cultivo celular en presencia de etilenimina utilizando los protocolos descritos para la fabricación de vacunas. Se elige la dilución final de manera a que, tras añadir un volumen igual de diluyente, arroje una lectura de absorbancia situada en la parte superior de la región lineal de la curva de titulación (densidad óptica aproximadamente igual a 1.5). Se utiliza como diluyente una solución salina tamponada con fosfato (PBS) más Tween 20 al 0.05% e indicador rojo de fenol (PBST).

Como anticuerpos para la detección se utilizan antisueros de cobaya, preparados mediante la inoculación de los cobayas con el antígeno 146S de uno de los siete serotipos, y previamente bloqueados con suero bovino normal (SBN). Se preparan soluciones con una concentración óptima predeterminada en PBS, más Tween 20 al 0.05%, y leche descremada en polvo al 5% (PBSTM).

La inmunoglobulina (Ig) anticobaya de conejo (u oveja) marcada con la peroxidasa de rábano y previamente bloqueada con SBN se utiliza a una concentración óptima predeterminada, en PBSTM.

Los sueros problema se diluyen en PBST.

Estudios efectuados en colaboración han demostrado que esta prueba es más específica e igual de sensible que la ELISA de bloqueo en fase líquida (1).

• Protocolo

- i) Se revisten las placas ELISA con el suero de conejo anti antígeno del virus de la fiebre aftosa diluido en una solución tampón de carbonato/bicarbonato a pH 9.6, a razón de 50 µl por pocillo, y se dejan toda la noche en una cámara húmeda a 4°C.
- ii) Se lavan cinco veces las placas ELISA con PBS.
- iii) Se añaden 50 µl del antígeno del virus de la fiebre aftosa diluido en una solución tampón de bloqueo a cada pocillo de las placas ELISA, se cubren dichas placas y se ponen en un agitador rotatorio a 37°C durante 1 hora, con agitación continua.
- iv) Tras lavar cinco veces con PBS, se añaden 40 µl de solución tampón de bloqueo a cada pocillo, y luego 10 µl de los sueros problema (o de los sueros control), con una dilución inicial del suero de 1/5.
- v) Se añaden inmediatamente 50 µl de antisuero de cobaya anti-virus de la fiebre aftosa diluido en una solución tampón de bloqueo, con una dilución final del suero de 1/10.
- vi) Se cubren las placas y se incuban a 37°C durante 1 hora en un agitador rotatorio.
- vii) Tras lavar cinco veces con PBS, se añaden 50 µl de Ig anticobaya marcada diluida en una solución tampón de bloqueo; se cubre y se incuba a 37°C durante 1 hora en un agitador rotatorio.
- viii) Tras lavar cinco veces con PBS, se añade a cada pocillo 50 µl de ortofelilendiamina más H₂O₂ al 0.05% (de una solución al 30%).
- ix) Se detiene la reacción después de 10 minutos mediante la adición de 50 µl de ácido sulfúrico 2 M. Se leen las placas a 492 nm en un espectrofotómetro conectado a un ordenador.

¹⁴ Se realiza una titulación cruzada del antisuero de captura de conejo, del antisuero de cobaya y del antisuero anti-cobaya. Antes de utilizar el ELISA de captura del antígeno o el ELISA de bloqueo en fase líquida, se calcula la titulación de cada uno de estos reactivos unos con otros, manteniendo el tercer reactivo a una concentración fija. De esta manera, se pueden determinar las diluciones óptimas (para el color positivo y un color débil de fondo). Se utilizan después estas diluciones "predeterminadas" para todas las futuras pruebas que se efectúen utilizando estos lotes de reactivos.

Anexo III (cont.)

- x) Controles: en cada placa, se utilizan dos pocillos para el control del marcador (sin suero de cobaya), cuatro pocillos para cada uno de los sueros fuertemente positivos y débilmente positivos, dos pocillos para los sueros negativos, y cuatro pocillos para el 0% de competición (ningún suero problema).
- xi) Interpretación de los resultados: se calcula un porcentaje de inhibición para cada uno de los pocillos, visualmente o utilizando un programa de computación adecuado ($100 - [\text{densidad óptica de cada valor para el suero problema o control} / \text{densidad óptica media para el 0\% de competición}] \times 100\%$), que represente la competición entre el suero problema y el antisuero de cobaya anti-virus de la fiebre aftosa para el antígeno del virus de la fiebre aftosa en la placa ELISA. Las inhibiciones que excedan 60% serán consideradas positivas. (N.B. solución tampón de bloqueo: Tween 20 al 0.05% [w/v], suero bovino normal al 10% [v/v], suero de conejo normal al 5% [v/v].)

Bibliografía

1. MACKAY D.K.J., BULUT A.N., RENDLE T., DAVIDSON F. & FERRIS N.P. (2001). A solid-phase competition ELISA for measuring antibody to foot-and-mouth disease virus. *J. Virol. Methods*, 97 (1–2), 33–48.
-



PROTOCOLO PARA EL NUEVO ENSAYO INMUNOENZIMÁTICO PRESCRITO PROPUESTO PARA LA SEROLOGÍA DE LA RABIA

Ensayo inmunoenzimático

Este ensayo inmunoenzimático indirecto (ELISA) permite la detección cuantitativa de anticuerpos contra la rabia en muestras séricas individuales de perros y gatos. Se necesita un mínimo de 0.5 Unidades Internacionales (UI) por ml de anticuerpos contra la rabia para proteger contra la infección por dicha enfermedad, según las recomendaciones de la Organización Mundial de la Salud (OMS 1992. Comité de Expertos sobre la Rabia, Octavo Informe. Organización Mundial de la Salud, Ginebra, Serie de Informes Técnicos No. 824).

La reacción se compone de tres etapas:

1. Se coloca cada muestra sérica en un pocillo sensibilizado con antígenos virales de la rabia inactivados. Los anticuerpos presentes en la muestra se ligan a los antígenos virales que revisten el fondo del pocillo.
2. Tras una etapa de lavado, se añade el conjugado Proteína A/peroxidasa. Éste se fija a las inmunoglobulinas previamente capturadas (anticuerpos) y se forma un complejo: (Ag de la rabia)–anticuerpos anti-rabia)–(Proteína A / peroxidasa).
3. Se elimina el exceso de conjugado mediante una etapa de lavado. Se revela la enzima ligado al complejo al añadir un sustrato que se transforma en un producto coloreado. Una vez detenida la reacción, se miden las densidades ópticas.

• Preparación del antígeno

Se cultiva la cepa de virus de la rabia G52 (derivada de la cepa de Pasteur) en células NIL2 de bajo pasaje o en una línea celular obtenida a partir de embriones de hámster. Se clarifican los virus recolectados para eliminar los desechos celulares por filtración sobre gel, y se inactiva la suspensión viral con betapropiolactona.

• Reactivos¹⁵

Una microplaca que contenga 6 hileras de 16 pocillos sensibilizados con antígenos de la rabia. Utilícese antes de 4 semanas después de abrir la bolsita, que se debe cerrar después de cada utilización;

Conjugado (CJ): Proteína A / peroxidasa (10 × concentrado). Se diluye el conjugado diez veces en el diluyente para conjugado (DC), y se utiliza antes de 24 horas después de la dilución;

Sustrato peroxidasa tamponado (SP); 3,3', 5,5'- tetrametilbenzidina

Suero control negativo (N), Sueros específicos libres de patógeno diluídos en Stabilzyme, un estabilizador comercializado suministrado por Surmodics Inc, MN 55344-3523 E.E.E.U.

Suero control positivo (P), sueros hiperinmunes provenientes de perros vacunados diluídos en Stabilzyme, un estabilizador comercializado suministrado por Surmodics Inc, MN 55344-3523 E.E.E.U.

Diluyente para la muestra (DM), solución tampón PBS, a pH = 7,8, con caseína al 0,28% (w/v), Tritón X100 al 0,055 % (v/v), PEG al 0,55% (w/v), SDS al 0,056% (w/v), PVP al 1% (w/v), Tetricon al 0,42% (w/v), y suero bovino inactivado por calor al 1% (v/v).

Solución de lavado (W), solución tampón Tris / NaCl, a pH = 7,5, con Tween 20 al 1%.

Solución de dilución del conjugado (DC), solución tampón Tris, a pH = 8.

Solución de parada de la reacción (S), solución de ácido sulfúrico 4N.

Los reactivos diluídos deberán conservarse a 5°C ± 3°C.

Se deben poner todos los reactivos a la temperatura del laboratorio por lo menos 1 hora antes de utilizarlos.

¹⁵ Pueden ser obtenidos de Synbiotics Europe S.A.S., 2 rue Alexander Fleming, 69367 LYON CEDEX 07

- **Muestras**

La reacción se lleva a cabo en sueros individuales inactivados por calor (30 minutos a 56°C), diluidos a 1/100. Es necesario someter a prueba una serie apropiada de diluciones del Suero de Referencia Internacional para la Rabia de la OIE que contiene 6,7 UI/ml (se puede obtener del Laboratorio de Referencia para la Rabia de la OIE, Nancy, Francia).

Las muestras séricas deberán conservarse a 5°C ± 3°C. Para una conservación prolongada, se deberán congelar las muestras a -20°C.

- **Etapas preliminares de predilución**

Es preciso atenderse de manera estricta al protocolo indicado más abajo. Se utilizarán controles negativos y positivos por duplicado para cada prueba y/o cada placa.

- i) Se planifica con cuidado la distribución e identificación de los controles y las muestras utilizando los planos que figuran más abajo.
- ii) Se preparan los sueros que deben analizarse. Se efectúan las diluciones en la solución de dilución para las muestras (DM) de la siguiente manera: se prediluyen primero las muestras a 1/10 en una microplaca en blanco (10 µl de muestra en 90 µl de DM).
- iii) Para la titulación del suero, se deberán efectuar una serie de seis diluciones del suero de referencia de la OIE, en tubos o en una microplaca en blanco, empezando por una dilución inicial de 1/10, seguida por 1/30, 1/100, 1/300, 1/1000 hasta la dilución final de 1/3000. Se deberá incluir esta serie de diluciones del suero de referencia de la OIE en cada prueba y/o microplaca con una dilución inicial de 1/10, 1/30, 1/100, 1/300, 1/1000 y 1/3000.

Se recomienda utilizar el siguiente esquema para preparar la serie apropiada de diluciones:

Dilución de la OIE	Preparación
1/10	10 µl de suero de referencia internacional para la rabia de la OIE + 90 µl de diluyente para la muestra
1/30	10 µl de suero de referencia internacional para la rabia de la OIE + 290 µl de diluyente para la muestra
1/100	10 µl de la dilución 1/10 + 90 µl de diluyente para la muestra
1/300	10 µl de la dilución 1/30 + 90 µl de diluyente para la muestra
1/1000	10 µl de la dilución 1/100 + 90 µl de diluyente para la muestra
1/3000	10 µl de la dilución 1/300 + 90 µl de diluyente para la muestra

Esta gama de diluciones del suero de referencia de la OIE deberá estar presente en todas las placas.

- **Protocolo para la prueba**

- i) *Distribución de los controles:* se distribuyen 90 µl del diluyente para la muestra, y se añaden 10 µl del control negativo en los pocillos A1 y A2, y 10 µl del control positivo en los pocillos B1 y B2.
- ii) *Distribución de las muestras y diluciones del suero de referencia de la OIE:* se distribuyen 90 µl del diluyente para las muestras, se añaden 10 µl de una predilución de 1/10 de la muestra o de cada dilución del suero de la OIE de 1/10 a 1/3000 en los demás pocillos, y se mezcla bien.

Las diluciones de las muestras y del suero de referencia de la OIE deberán analizarse por duplicado. Se recomiendan los siguientes planos de distribución (refiriéndose a las diluciones finales para el análisis):

Cuantificación del anticuerpo (dilución final)

	1	2	3	4
A	N 1/10	N 1/10	S1 1/100	S1 1/100
B	P 1/10	P 1/10	S2 1/100	S2 1/100
C	OIE 1/100	OIE 1/100	S3 1/100	S3 1/100
D	OIE 1/300	OIE 1/300	S4 1/100	S4 1/100
E	OIE1/1000	OIE1/1000	S5 1/100	S5 1/100
F	OIE 1/3000	OIE 1/3000	S6 1/100	S6 1/100
G	OIE 1/10000	OIE 1/10000	S7 1/100	S7 1/100
H	OIE 1/30000	OIE 1/30000	S8 1/100	S8 1/100

Siempre se deberán colocar las hileras en el marco para que se puedan utilizar el lavador y el lector. Se cubren los pocillos con cinta adhesiva, cortada al largo necesario en función del número de hileras utilizadas. Se mezcla agitando la placa despacio manualmente o utilizando un agitador de placas.

iii) Se incuban las muestras durante 1 hora \pm 5 minutos a $37^{\circ}\text{C} \pm 3^{\circ}\text{C}$.

iv) Dilución de los reactivos:

Tampón de lavado: se diluye la solución de lavado concentrada (W) a 1/10 en agua destilada o desmineralizada.

Conjugado: se diluye el conjugado concentrado (CJ) al 1/10 en la solución de dilución del conjugado (DC); se necesitan 2 ml para una hilera, es decir 20 μl de CJ en 1,88 ml de DC.

v) Se retira con cuidado la cinta adhesiva y se lava cuatro veces.

vi) Se añaden 100 μl del conjugado diluido en los pocillos y se cubren con un trozo nuevo de cinta adhesiva.

vii) Se incuba el conjugado durante 1 hora \pm 5 minutos a $37^{\circ}\text{C} \pm 3^{\circ}\text{C}$.

viii) Se retira con cuidado la cinta adhesiva y se lava cuatro veces.

ix) Se añaden 100 μl del sustrato peroxidasa tamponado (PS) por pocillo. No se cubre con cinta adhesiva en esta etapa. Se mezcla agitando la placa despacio manualmente o se utiliza un agitador de placas para asegurar una buena homogenización.

x) Se incuba durante 30 ± 5 minutos a la temperatura del laboratorio ($20^{\circ}\text{C} \pm 5^{\circ}\text{C}$), protegiendo la placa de la luz.

xi) Se añaden 50 μl de solución de parada de la reacción (S) por pocillo. Se mezcla agitando la placa despacio manualmente o utilizando un agitador de placas. Es preciso asegurarse de que no aparecen burbujas en los pocillos. Se limpia con cuidado la superficie inferior de los pocillos.

xii) Se mide la densidad óptica (DO) de manera bicromática a 450 y 630 nm, o monocromática a 450 nm (en la banda amarilla).

- **Cuantificación del anticuerpo: expresión e interpretación de los resultados**

Cálculo del título utilizando la curva de regresión

i) Se calcula el valor medio de DO para cada muestra analizada y cada dilución del suero de la OIE.

ii) Se calcula el valor del logaritmo natural (\ln) para cada valor medio de DO y el valor del \ln de la concentración del anticuerpo anti-rabia para cada dilución de la OIE (de 6,7 a 0,0223 UI/ml, sin tener en cuenta el factor de dilución del ensayo de 1/100).

- iii) Se traza el \ln (DO) (eje Y) en función del \ln (concentración del anticuerpo anti-rabia) (eje X) de manera a dibujar la curva de referencia para el suero de referencia de la OIE.
- iv) Utilizando todos los resultados individuales obtenidos para las diluciones del suero de referencia de la OIE, se efectúa una regresión lineal entre el \ln de las concentraciones del anticuerpo anti-rabia (expresado en unidades ELISA (UE))/ml) y el \ln (DO), para establecer el modelo matemático correspondiente:

$$\ln \text{ de la concentración del anticuerpo anti-rabia (UE/ml)} = a + b \times \ln \text{ DO}$$

- v) Para cada muestra analizada, se calcula el valor medio de DO, y después la concentración del anticuerpo anti-rabia en la muestra expresada en 'unidades equivalentes por ml' (UE/ml), a partir del modelo establecido:

$$\text{Concentración del anticuerpo anti-rabia en la muestra (UE/ml)} = e^{(a + b \times \ln \text{ DO})}$$

- **Validación de la prueba**

Los resultados de cada prueba (o de cada placa) son válidos:

- si la densidad óptica obtenida con el control positivo (DO P) es superior o igual a 0,300, y
- si la densidad óptica obtenida con el control negativo (DO N) es inferior a $0,50 \times \text{DO P}$.
- el coeficiente de correlación entre los \ln de las DOs y los \ln de las concentraciones del anticuerpo anti-rabia para el suero de referencia de la OIE es superior a 0,95.

- **Ejemplos**

Control positivo:

$$\text{DO pocillo B}_1 = 0.610 \quad \text{DO pocillo B}_2 = 0.690 \quad \Rightarrow \quad \text{DO P} = 0.650$$

Control negativo:

$$\text{DO pocillo A}_1 = 0.190 \quad \text{DO pocillo A}_2 = 0.210 \quad \Rightarrow \quad \text{DO N} = 0.200$$

$$\text{Muestra 1: DO pocillo 1} = 1.790 \quad \text{DO pocillo 2} = 1.750 \quad \Rightarrow \quad \text{DO} = 1.770$$

$$\text{Muestra 2: DO pocillo 1} = 0.350 \quad \text{DO pocillo 2} = 0.390 \quad \Rightarrow \quad \text{DO} = 0.370$$

Prueba de validación

$\text{DO P} = 0,650 > 0,300$ y $\text{DO N} = 0,200 < 0,50 \times 0,650 = 0,325$, la prueba es, por lo tanto, válida.

- **Resultados e interpretación (titulación cuantitativa del anticuerpo)**

Si el título calculado es $\geq 0,6$, se considera que el animal está protegido.

Si el título calculado es $< 0,6$, se considera que, potencialmente, el animal no está protegido. Dado que se utiliza el método ELISA como prueba de selección inicial, se podrá llevar a cabo, como confirmación, una prueba de neutralización viral por anticuerpos fluorescentes [FAVN].

PROTOCOLO PARA LA METODOLOGÍA DE LAS PROTEÍNAS NO ESTRUCTURALES PARA DETERMINAR EL ESTATUS RESPECTO A LA FIEBRE AFTOSA EN ANIMALES VACUNADOS A NIVEL DE REBAÑO

Pruebas de anticuerpos para las proteínas no estructurales

Los anticuerpos contra proteínas NS expresadas y recombinantes, del virus de la fiebre aftosa se pueden, medir por ELISA o inmunotransferencia. Se ha demostrado en varios laboratorios que una prueba ELISA de captura de anticuerpo monoclonal (MAT¹⁶) para la detección de anticuerpos contra 3ABC (2) y los ELISAs de bloqueo para detectar anticuerpos contra 3AB o 3ABC (5) son sensibles, específicos y fiables. La detección simultánea de anticuerpos contra varias proteínas NS en una sola prueba utilizando el método ELISA (3, 5) o un tipo particular de Western blot (1), la prueba de inmunoelectrotransferencia (EITB¹⁷), es útil para la confirmación de animales positivos para un anticuerpo contra 3AB o 3ABC. No existen hoy en día normas reconocidas internacionalmente para los anticuerpos contra las proteínas NS del virus de la fiebre aftosa, pero más abajo figura de manera detallada una aplicación para estas pruebas.

- **Ensayo inmunoenzimático indirecto**

Preparación de los antígenos recombinantes

- Las cinco proteínas NS del virus de la fiebre aftosa obtenidas por ingeniería genética 3A, 3B, 2C, 3D y 3ABC se expresan en *E. coli* C600 por inducción térmica. El polipéptido 3D se expresa en su forma completa (4), mientras que se obtienen las demás proteínas en forma de fusiones con la parte N-terminal del gen de la polimerasa MS-2 (6).
- Se purifica la polimerasa expresada sobre fosfo-celulosa, seguido por una columna de sefarosa poly(U). Las proteínas fusionadas 3A, 3B, 2C y 3ABC se purifican por extracción secuencial de los extractos de bacteria con concentraciones crecientes de urea. La fracción 7M que contiene las proteínas de fusión se purifica además en un gel preparativo PAGE con SDS al 10% (10%SDS/PAGE¹⁸: electroforesis en gel de poli(acrilamida con dodecil sulfato de sodio). Se recoge del gel la banda correspondiente a la proteína de fusión y se electroeluye (4).
- Se separa la mezcla que contiene 20 ng/ml de cada uno de los polipéptidos recombinantes purificados en un gel 12.5% SDS/PAGE y se transfiere electroforéticamente a nitrocelulosa (4).

- **Protocolo para la prueba**

- Se revisten las microplacas durante toda la noche a 4°C con el antígeno de fusión 3ABC a una concentración de 1 µg/ml en una solución tampón de carbonato/bicarbonato, a pH 9.6 (100 µl por pocillo). El antígeno 3ABC fue expresado y purificado como se indica para las pruebas EITB (4).
- Se lavan seis veces las placas con PBS, a pH 7.2, más Tween 20 al 0.05%.
- Se añaden los sueros problema (100 µl por pocillo) diluidos al 1/20 en un tampón de bloqueo compuesto por PBS, Tween 20 al 0.05%, leche descremada en polvo al 5%, suero equino al 10% y lisado de *Escherichia coli* al 0.1%. Cada placa incluye una serie de normas de referencia según lo definido para el ensayo EITB.
- Se incuban las placas durante 30 minutos a 37°C y se lavan seis veces con PBS-Tween.
- Se diluye la IgG de conejo anti-especie marcada con la peroxidasa de rábano de manera óptima en la solución tampón de bloqueo, se añade a razón de 100 µl por pocillo, y se incuba la placa durante 30 minutos a 37°C.
- Tras seis lavados, se llena cada pocillo con 100 µl de 3,3', 5,5'-tetrametilbenzidina más H₂O₂ (w/v) al 0.004% en una solución tampón de fosfato/citrato, a pH 5.5.
- Se detiene la reacción tras 15 minutos de incubación a la temperatura ambiente añadiendo 100 µl de H₂SO₄ 0.5 M. Se lee la absorbancia a 450 nm y a 620 nm para retirar el ruido de fondo.

¹⁶ MAT: MAb trapping

¹⁷ EITB: Enzyme-linked immuno-electrotransfer blot

¹⁸ SDS/PAGE: Sodium dodecyl sulphate/polyacrylamide gel electrophoresis

- **Interpretación de los resultados**

Para que sea válido el sistema de prueba se aplican los siguientes criterios de rendimiento: la absorbancia de los controles negativos debe ser <0.10 después de ser corregida teniendo en cuenta la absorbancia de los pocillos de control en blanco. El suero control de valor límite (cut-off serum), obtenido según lo descrito para la prueba EITB, debería dar unos valores de absorbancia de 0.15–0.40. Se expresan los resultados como un índice obtenido dividiendo el valor de absorbancia del suero problema por el del control de valor límite. La proporción de los positivos débiles/control umbral debería ser de 2.5 con un coeficiente de variación $<20\%$. Los sueros problema con proporciones >0.8 se consideran sospechosos o positivos y vuelven a someterse a prueba por EITB. Las placas revestidas y los estándares secundarios se pueden obtener de PANAF-TOSA¹⁹.

Bibliografía

1. BERGMANN I.E., DE MELLO P.A., NEITZERT E., BECK & GOMEZ, I. (1993). Diagnosis of persistent aphthovirus infection and its differentiation from vaccination response in cattle by use of enzyme-linked immunoelectrotransfer blot analysis with bioengineered non-structural viral antigens. *Am. J. Vet. Res.*, **54**, 825–831.
2. DE DIEGO M., BROCCHI E., MACKAY D. & DE SIMONE F. (1997). The use of the non-structural polyprotein 3ABC of FMD virus as a diagnostic antigen in ELISA to differentiate infected from vaccinated cattle. *Arch. Virol.*, **142**, 2021–2033.
3. MACKAY D.K.J, FORSYTH M.A., DAVIES P.R., BERLINZANI, A., BELSHAM G.J., FLINT M. & RYAN M.D. (1997). Differentiating infection from vaccination in foot-and-mouth disease using a panel of recombinant, non-structural proteins in ELISA. *Vaccine*, **16**, 446–459.
4. NEITZERT E., BECK E., AUGE DE MELLO P., GOMES I. & BERGMANN I.E. (1991). Expression of the aphthovirus RNA polymerase gene in *Escherichia coli* and its use together with other bioengineered non-structural antigens in detection of late persistent infections. *Virology*, **184**, 799–804.
5. SORENSEN K.J., MADSEN K.G., MADSEN E.S., SALT J.S., NQUINDI J. & MACKAY D.K.J. (1998). Differentiation of infection from vaccination in foot-and-mouth disease by the detection of antibodies to the non-structural proteins 3D, 3AB and 3ABC in ELISA using antigens expressed in baculovirus. *Arch. Virol.*, **143**, 1461–1476.
6. STREBEL K., BECK E., STROHMAIER D. & SCHALLER H. (1986). Characterisation of foot-and-mouth disease virus gene products with antisera against bacterially synthesised fusion proteins. *J. Virol.*, **57**, 983–991.

¹⁹ PANAF-TOSA/ Centre Panamericano de Fiebre Aftosa, Caixa Postal 589, 20001-970 Rio de Janeiro, Brasil. (dir@aftosa.ops-oms.org)

MANUAL DE NORMAS PARA LAS PRUEBAS DE DIAGNÓSTICO Y LAS VACUNAS DE LA OIE

Cambios propuestos para la Lista de pruebas prescritas y de sustitución

Ref. No.	Enfermedad	Pruebas prescritas	Pruebas de sustitución
A010	Fiebre aftosa	ELISA*, NV	FdC
B058	Rabia	<u>ELISA</u> , NV	–
B108	Leucosis bovina enzoótica	AGID, ELISA	<u>PCR</u>
B253	Brucelosis porcina	[BBAT] <u>ELISA</u>	<u>BBAT [ELISA], FPA</u>

*Sírvese referirse a los capítulos del *Manual* para verificar qué método se prescribe.

- AGID = Inmunodifusión en gel de agar (agar gel immunodiffusion)
 BBAT = Antígeno de *Brucella* tamponado (Buffered *Brucella* antigen test)
 FdC = Fijación del Complemento
 ELISA = Método inmunoenzimático (enzyme-linked immunosorbent assay)
 FPA = Prueba de polarización en fluorescencia (Fluorescence polarisation assay)
 PCR = Amplificación en cadena por polimerasa (Polymerase chain reaction)
 NV = Neutralización viral

Texto subrayado con doble línea = nueva propuesta.

Texto con caracteres pequeños y entre corchetes = eliminación propuesta.



DIRECTRICES DE LA OIE PARA LA VALIDACIÓN DE LAS PRUEBAS DE DIAGNÓSTICO PARA LAS ENFERMEDADES INFECCIOSAS

1. Introducción

1.1. Propósito

Este documento ofrece directrices para la validación de los métodos de las pruebas (ensayos) para la detección de las enfermedades infecciosas y es un aditamento al Capítulo I.1.3, Principios de Validación de las Pruebas de Diagnóstico para las Enfermedades Infecciosas, *Manual de Normas para las Pruebas de Diagnóstico y las Vacunas* de la OIE, 2000, y al artículo de Jacobson R.H. (1998) Validación de los ensayos serológicos para el diagnóstico de las enfermedades infecciosas. *Rev. sci. tech. Off. int. Epiz.*, **17** (2), 469–486.

1.2. Esfera de acción

Estas directrices se destinan a ser utilizadas por los Países Miembros de la OIE para determinar y verificar las características de rendimiento de los ensayos, en general, y para la "validación" de los ensayos desarrollados en un país, según se describe en las Normas para la Gestión y Requisitos Técnicos para los Laboratorios que realizan Pruebas para la Detección de Enfermedades Animales Infecciosas (Standard for Management and Technical Requirements for Laboratories Conducting Tests for Infectious Animal Diseases) de la OIE.

1.3. Ensayo validado

Un ensayo validado produce, de manera consistente, resultados de pruebas que identifican a los animales como positivos o negativos para una sustancia analizable (analyte) particular (p.ej. anticuerpo o antígeno) o una reacción (p.ej. induración en el sitio de prueba en la piel) que, por deducción, predicen con exactitud el estado de infección del animal con un grado predeterminado de certeza estadística.

1.4. Etapas de la elaboración y validación de un ensayo

La elaboración y la validación de un ensayo son un proceso acumulativo que consiste en, por lo menos, cinco etapas. Es importante entender todas las etapas del desarrollo, ya que las etapas iniciales pueden influenciar fuertemente la capacidad del ensayo en dar resultados exactos y fiables.

Estas etapas incluyen:

- a) Estudios de factibilidad,
- b) Desarrollo y estandarización,
- c) Caracterización del rendimiento del ensayo,
- d) Validez de los resultados del ensayo: valor predictivo,
- e) Mantenimiento y extensión de los criterios de validación.

2. Estudios de factibilidad

2.1. Adecuación

Se deberían desarrollar los ensayos de diagnóstico solamente una vez realizados los estudios de factibilidad. Primero y principalmente, los nuevos ensayos deberían tener aplicaciones de diagnóstico específicas (es decir, importación/exportación, vigilancia, lucha contra las enfermedades, etc).

La sensibilidad analítica (definida más abajo) respecto al tipo y a la concentración de la sustancia analizable o al nivel de reacción que se desea detectar, y la especificidad analítica respecto al organismo en cuestión deben ser adecuadas para la aplicación a la que se destina.

La aplicación en sí deberá delimitar los requisitos mínimos aceptables para la sensibilidad y especificidad del diagnóstico.

Se deberán tener en cuenta los factores relacionados con el huésped con respecto a la especie a la que se destina, e incluir los efectos de la edad, del sexo, de la raza, del estado nutricional, de un posible embarazo y de la respuesta inmunológica.

Se deberá elaborar el protocolo de manera apropiada en relación con su integración en las rutinas de diagnóstico, así como con los reactivos y los requisitos de muestreo, con el control de calidad, con la repetibilidad y con la expresión de los datos.

2.2. Coste y disponibilidad

El coste y la disponibilidad de equipos y servicios de laboratorio especializados, de productos químicos y de material de laboratorio, incluidos el material de plástico, y de reactivos biológicos, incluidos los anticuerpos monoclonales y los antígenos recombinantes, no deberían ser factores limitantes.

3. Desarrollo y estandarización

3.1. Estandarización de los parámetros de los protocolos y de las concentraciones óptimas de los reactivos

Se deberán estandarizar y definir en un protocolo por escrito todos los parámetros físicos/químicos del ensayo. Deberán identificarse los puntos de control críticos.

Se deberán describir o referenciar en el protocolo todos los reactivos biológicos (p.ej. antígenos, anticuerpos, controles, sistemas enzima/sustrato, etc), así como las condiciones de almacenamiento y de preparación para su utilización. Esto deberá incluir los protocolos para la titulación de los reactivos y para la calibración en acuerdo con los estándares de referencia internacionales, cuando sea posible.

También deberán incluirse las descripciones detalladas de los criterios de aceptación/rechazo para las diferentes series de ensayos (es decir basados en controles internos) y para las muestras problema individuales. Además, deberán detallarse las descripciones de la normalización y expresión de los datos, así como la interpretación de los datos.

3.2. Estimaciones de la repetibilidad

Deberán establecerse estimaciones preliminares de la repetibilidad. La concordancia entre las réplicas en una prueba y entre las diferentes series de pruebas deberá ser compatible con la variabilidad inherente al tipo particular de ensayo. Deberá investigarse y corregir cualquier variabilidad excesiva antes de proseguir.

3.3. Sensibilidad analítica y especificidad

La sensibilidad analítica representa la cantidad más pequeña de sustancia analizable o la reacción más pequeña detectable. Para determinar la sensibilidad analítica en términos absolutos se necesita utilizar sustancias analizables purificadas. Esto es a menudo imposible cuando se trata de sistemas biológicos complejos, como, por ejemplo, las interacciones antígeno-anticuerpo. Pueden deducirse medidas indirectas de la sensibilidad analítica, por ejemplo, mediante la titulación del punto final de estándares de referencia.

Se puede evaluar la sensibilidad analítica sometiendo a prueba paneles de muestras provenientes de animales que han sido infectados con organismos de la misma familia. Cuanto más bajo el nivel de reactividad cruzada, más alto es el nivel de sensibilidad analítica. Según la aplicación a la que se destine el ensayo, el nivel apropiado de sensibilidad analítica podrá depender específicamente de la especie, del grupo o del subgrupo.

4. Determinación de las características de rendimiento del ensayo

4.1. Estimaciones de la sensibilidad y especificidad de diagnóstico

Las estimaciones de la sensibilidad y especificidad de diagnóstico son la base de los cálculos de otros parámetros de los que se hacen deducciones acerca de los resultados de las pruebas. Es, por lo tanto, imperativo que estas estimaciones sean todo lo precisas posible.

De manera ideal, deberían deducirse estas estimaciones de pruebas realizadas sobre series de muestras provenientes de animales de referencia para los que se conoce el historial y el estado de infección. Sin embargo, es frecuentemente difícil juntar paneles de muestras de animales para los que se sabe que están infectados. Para demostrar la presencia de infección se necesita aislar el organismo o utilizar los signos patognomónicos histopatológicos. En algunos casos, puede que sea necesario inmunizar o infectar experimentalmente a un grupo de animales, y recolectar muestras en serie en el curso del desarrollo de la respuesta inmunitaria o de la infección. También puede resultar difícil juntar paneles de muestras de animales para los que se sabe que no están infectados. Esto es particularmente cierto en zonas donde la enfermedad es endémica. En algunos casos, puede ser necesario someter a prueba grupos de animales no infectados alejados de la población problema a la que se destina la prueba.

La sensibilidad de diagnóstico (Sn) es la proporción de animales que se sabe están infectados y que dan un resultado positivo en el ensayo. Los animales infectados que dan un resultado negativo se considera que dan resultados falsos negativos.

La especificidad de diagnóstico (Sp) es la proporción de animales que se sabe no están infectados y que dan un resultado negativo en el ensayo. Los animales no infectados que dan un resultado positivo se considera que dan resultados falsos positivos.

Se pueden calcular el número de muestras de referencia necesarias para determinar las estimaciones de Sn y Sp. Para ello, se debe utilizar una predicción razonable para ambas Sn y Sp. Debe elegirse un error admisible para las estimaciones de ambas Sn y Sp. Por último, se debe incluir en la ecuación la confianza deseada en la estimación (normalmente 95%).

Sin embargo, ninguna formula puede tener en cuenta los numerosos factores huésped/organismo que pueden afectar el resultado de la prueba. Un método práctico general es no realizar pruebas en menos de 300 animales infectados y no menos de 1000 animales no infectados para determinar las estimaciones de Sn y Sp, respectivamente.

4.2. Selección de valores umbrales positivos/negativos

Para calcular las estimaciones de la sensibilidad y especificidad de diagnóstico, deben clasificarse los resultados de la prueba como positivos o negativos. Independientemente del tipo de ensayo (p.ej. cualitativo, semi-cuantitativo o cuantitativo) se deben definir claramente los criterios del valor umbral positivo/negativo.

Se han utilizado numerosos métodos para establecer los valores umbrales. Ningún método es infalible y, en muchos casos, podrá ser apropiado elegir más de un valor umbral para las investigaciones futuras y la confirmación.

4.3. Cálculo de la sensibilidad y especificidad de diagnóstico

Una vez reunidos los paneles apropiados de muestras provenientes de animales de referencia infectados o no, y elegido el valor umbral, pueden calcularse las estimaciones de la sensibilidad y la especificidad de diagnóstico.

Resultado de la prueba:	Estado infeccioso:	
	Infectado	No infectado
Positivo	TP	FP
Negativo	FN	TN

$$\text{Sensibilidad de diagnóstico} = TP / (TP + FN)$$

$$\text{Especificidad de diagnóstico} = TN / (TN + FP)$$

‘TP’ representa un verdadero positivo, ‘TN’ representa un verdadero negativo, ‘FP’ representa un falso positivo y ‘FN’ representa un falso negativo, de acuerdo con los resultados de la prueba en comparación con el estado de infección.

La comparación de las estimaciones de la sensibilidad y la especificidad de diagnóstico de cualquier prueba con otra debe realizarse únicamente después de haber realizado la prueba en las mismas muestras de referencia infectadas y no infectadas. De no ser así, la comparación no es válida.

4.4. Otras normas de comparación

Se comparan frecuentemente los nuevos ensayos con un ensayo estándar existente. Este estándar es a menudo el ensayo que se considera tiene la mayor sensibilidad y/o especificidad de diagnóstico de todos los ensayos corrientemente utilizados. Puede compararse un ensayo nuevo con un estándar existente en términos de sensibilidad y especificidad ‘relativas’. Se hace, sin embargo, la suposición crítica de que los resultados del ensayo estándar reflejan de manera exacta el estado de infección verdadero del animal.

Resultado de la prueba:	Resultado del ensayo estándar:	
	Positivo	Negativo
Positivo	TP	FP
Negativo	FN	TN

$$\text{Sensibilidad relativa} = TP / (TP + FN)$$

$$\text{Especificidad relativa} = TN / (TN + FP)$$

‘TP’ representa un verdadero positivo, ‘TN’ representa un verdadero negativo, ‘FP’ representa un falso positivo y ‘FN’ representa un falso negativo, según los resultados de la prueba estándar de comparación.

El problema con este tipo de comparaciones es que es difícil explicar una discrepancia sin efectuar un seguimiento extensivo de estos animales para determinar su verdadero estado de infección. Otra manera de interpretar estos resultados es calcular la concordancia total según la fórmula $(TP + TN) / (TP + FN + TN + FP)$, pero, una vez más, es difícil explicar cualquier discrepancia.

Para reducir los resultados sesgados debidos a las tasas inherentes de FP y FN del ensayo estándar en la comparación precitada, sería preferible utilizar una batería de pruebas para definir la reactividad de las muestras de referencia.

4.5. Repetibilidad y reproductibilidad

La precisión es una medida de la dispersión de los resultados para una muestra que se ha sometido a prueba de manera repetida. Por otro lado, la exactitud es una medida de la concordancia entre un valor problema y el valor esperado para un estándar de referencia de concentración o título conocido.

Deberá determinarse la repetibilidad en el seno de un laboratorio particular. El grado de variabilidad se deberá determinar para las réplicas de los controles para cada prueba, así como entre las diferentes series de pruebas. Los límites de control superior e inferior deberán establecerse para cada uno de los controles positivos y negativos como una medida de la precisión del ensayo. Estos límites determinarán si una prueba particular está dentro de los controles o debe ser rechazada.

Si uno de los controles positivos también representa un estándar de trabajo, cada serie de pruebas también se convierte en una medida de la exactitud.

Las muestras problema también deberán examinarse para la concordancia entre las réplicas. Una variabilidad excesiva entre las réplicas, especialmente alrededor del valor umbral afectaría desfavorablemente la capacidad de tomar una decisión de diagnóstico respecto al estado de infección.

Para determinar la reproducibilidad, varios laboratorios han de realizar pruebas sobre un panel de muestras con una reactividad definida, utilizando protocolos de ensayo y reactivos idénticos. El grado en que los resultados colectivos para cada muestra se desvían del valor esperado es un indicador de la reproducibilidad del ensayo y proporciona medidas de la precisión y de la exactitud entre los laboratorios.

En algunos casos, puede no ser apropiado predeterminar el resultado esperado, sino mejor establecer estadísticamente un límite superior e inferior de actividad aceptable basado en un consenso de los resultados obtenidos por los laboratorios participantes. Esto es especialmente importante para la elaboración de estándares internacionales.

5. Validez de los resultados del ensayo: valor predictivo

El valor predictivo de una prueba positiva (PV+) es la proporción de resultados positivos en el ensayo que identifican correctamente a animales infectados.

El valor predictivo de una prueba negativa (PV-) es la proporción de resultados negativos en el ensayo que identifican correctamente a animales no infectados.

Los valores predictivos de un ensayo dependen de las estimaciones de la sensibilidad y especificidad de diagnóstico, así como de la prevalencia de la enfermedad en la población diana.

La prevalencia de la enfermedad en la población diana tiene un efecto notable en los PVs, si las estimaciones de la sensibilidad y especificidad de diagnóstico se mantienen constantes. Los resultados del diagnóstico no pueden ser interpretados al pie de la letra sin conocimiento de la prevalencia de la enfermedad. Por lo tanto, la validez de los resultados de un ensayo no es simplemente una función de sus características de rendimiento.

6. Mantenimiento y mejora de los criterios de validación

Un ensayo validado necesita un seguimiento y un mantenimiento constantes para asegurar su fiabilidad. Los datos relativos al control de calidad interno deberán ser vigilados continuamente en tanto que medida de la precisión y exactitud en el seno del laboratorio.

Un panel de muestras que representen toda la gama de reactividades previstas en la población diana deberán utilizarse para evaluar todos los lotes nuevos de reactivos para asegurar una calidad de producción uniforme.

Se necesitará evaluar las modificaciones aportadas a los protocolos de producción o a los parámetros del ensayo para determinar si ha ocurrido algún cambio en las características de rendimiento del ensayo. Puede no ser necesaria una re-evaluación total de la sensibilidad y especificidad de diagnóstico para las modificaciones menores que mejoran la repetibilidad y reproductibilidad sin afectar el rendimiento analítico del ensayo.

Cualquier modificación mayor que se aporte al ensayo, como, por ejemplo, la introducción de un protocolo de producción o de un reactivo totalmente nuevo necesitará una evaluación completa de las características de rendimiento del ensayo y una comparación con el protocolo original. Puede no ser obligatoriamente necesario efectuar comparaciones con otros ensayos, salvo si se han alterado de manera radical la sensibilidad o especificidad analíticas.

Dado que los datos se obtienen a partir de muestras tomadas en el terreno, las estimaciones de la sensibilidad y especificidad de diagnóstico deberán ser actualizadas. Cuanto más grande el número de muestras utilizadas para generar estos valores, mayor es el grado de confianza en las estimaciones.

Las disminuciones en la prevalencia de la enfermedad, las variaciones estacionales, la emergencia de organismos de la misma familia o cambios en las prácticas de vacunación pueden necesitar una re-evaluación de las características de rendimiento del diagnóstico respecto a la adecuación del ensayo para la aplicación a la que se destina.

LABORATORIOS DE REFERENCIA

MANDATO

El mandato principal de los Laboratorios de Referencia de la Oficina Internacional de Epizootias es:

- desempeñar el papel de centro pericial y de estandarización para una enfermedad (o varias enfermedades) o temas específicos [de las metodologías aplicables en los campos de su especialidad];
- conservar y distribuir productos biológicos de referencia y cualquier otro reactivo empleado para el diagnóstico y el control de la (o las) enfermedad(es) o temas [enfermedades animales de las Listas A y B];
- desarrollar nuevos métodos de diagnóstico y control de la(s) enfermedad(es) o temas designados [dichas enfermedades];
- recolectar, procesar, analizar y difundir los datos epizootiológicos correspondientes a su especialidad;
- poner a disposición de la Oficina Internacional de Epizootias consultores expertos.

También pueden contribuir a:

- proveer la formación científica y técnica de personal perteneciente a los Países Miembros de la Oficina;
- proporcionar a los Países Miembros instalaciones para las pruebas de diagnóstico:

En caso de obtenerse resultados positivos para enfermedades de declaración obligatoria a la OIE, el Laboratorio de Referencia deberá inmediatamente informar al Delegado ante la OIE del País Miembro del que procedan las muestras;

- organizar reuniones científicas por cuenta de la Oficina;
- coordinar estudios científicos y técnicos en colaboración con otros laboratorios u organizaciones;
- publicar y difundir todas las informaciones en su campo de competencia que puedan ser útiles para los Países Miembros de la Oficina.

Los Laboratorios de Referencia de la OIE podrían cobrar por los servicios que proporcionan.

LABORATORIOS DE REFERENCIA

REGLAMENTO INTERNO

Artículo 1

Las candidaturas al título de Laboratorio de Referencia de la Oficina Internacional de Epizootias podrán ser dirigidas al Director General por el Delegado del País Miembro al que pertenece el Laboratorio o por la Comisión regional correspondiente.

Artículo 2

Las candidaturas recibidas serán presentadas por el Director General a la Comisión Administrativa en sus reuniones anuales, después de una consulta con la Comisión de Normas o con la Comisión sobre las Enfermedades de los Peces, según sea apropiado. Las candidaturas serán seleccionadas únicamente en función de la competencia científica y técnica de los establecimientos candidatos.

Artículo 3

Las candidaturas seleccionadas por la Comisión serán presentadas al Comité para su aprobación.

Artículo 4

El Director General notificará a los Laboratorios seleccionados su designación como "Laboratorio de Referencia de la OIE".

Artículo 5

Esta notificación otorgará al Laboratorio el derecho de utilizar el título de "Laboratorio de Referencia de la OIE" y el emblema de la OIE en todos los documentos que elabore en su calidad oficial, así como, al especialista designado en el Laboratorio, el derecho al título de experto de la OIE.

Artículo 6

Los expertos de la OIE ejercerán sus actividades en el marco del "reglamento aplicable a los expertos de la OIE".

Artículo 7

Como contrapartida de los derechos citados en el artículo 5, el Laboratorio y el experto se comprometerán a ejecutar con conciencia el mandato de Laboratorio de Referencia de la OIE en la medida de los medios de que dispongan, y a suministrar un informe de actividad sucinto al término de cada año civil de su mandato. Dicho informe será entregado a todos los Países Miembros.

Artículo 8

La designación será válida durante cuatro años, al cabo de los cuales el Director General podrá proponer al Comité la renovación de la misma. Ambas partes tendrán el derecho de revocar dicha designación en cualquier momento.

Artículo 9

Cualquier modificación importante que se produzca en el Laboratorio y que pueda reducir sus competencias (especialmente la cesación de actividad del experto designado) deberá ser señalada inmediatamente al Director General de la Oficina.



Organisation
Mondiale
de la Santé
Animale

World
Organisation
for Animal
Health

Organización
Mundial
de Sanidad
Animal

© **Office International des Epizooties (OIE), 2002**

El presente documento fue preparado por especialistas a solicitud de la OIE. Excepto en el caso de su adopción por el Comité Internacional de la OIE, lo expresado refleja únicamente las opiniones de dichos especialistas. Este documento no podrá ser reproducido, bajo ninguna forma, sin la autorización previa y por escrito de la OIE. Solamente se autoriza su reproducción para su utilización por parte de las personas autorizadas de los organismos destinatarios.