

## SECCIÓN 3.6.

# EQUIDAE

---

### CAPÍTULO 3.6.1.

## PESTE EQUINA (INFECCIÓN POR EL VIRUS DE LA PESTE EQUINA)

### RESUMEN

**Descripción de la enfermedad:** La peste equina (PE) es una enfermedad vírica infecciosa, pero no contagiosa, que afecta a todas las especies de équidos, causada por un orbivirus de la familia Reoviridae y caracterizada por alteraciones de las funciones respiratoria y circulatoria. La PE se transmite por al menos dos especies de Culicoides. Se han descrito nueve serotipos diferentes.

En el este y el sur de África se presentan todos los serotipos de la PE. En el norte y el oeste africano, se han detectado los serotipos 9, 4 y 2, desde donde ocasionalmente pasan a países limítrofes del Mediterráneo. Algunos ejemplos de brotes que han tenido lugar fuera de África son: en Oriente Medio (1959–1963), en España (serotipo 9, 1966, serotipo 4, 1987–1990), y en Portugal (serotipo 4, 1989).

El diagnóstico de laboratorio de la PE es esencial. Aunque los signos clínicos y las lesiones son características, se pueden confundir con las de otras enfermedades equinas.

Como enfermedad vírica, el diagnóstico de laboratorio de la PE se puede basar en la identificación del virus infeccioso, del ácido nucleico del virus, de los antígenos víricos o de anticuerpos específicos. Se ha adaptado una amplia variedad de pruebas de laboratorio para detectar tanto el virus de la PE (VPE) como los anticuerpos específicos.

**Identificación del agente:** Siempre que se surjan brotes fuera de las regiones enzoóticas es especialmente importante llevar a cabo el aislamiento y la serotipificación del virus, con el fin de escoger un serotipo homólogo para la vacuna.

El VPE se puede aislar de sangre tomada durante la fase febril inicial. Otros tejidos adecuados para el diagnóstico y aislamiento del virus son el bazo, los pulmones y los ganglios linfáticos, que se obtienen durante la necropsia. Las muestras se pueden inocular en cultivos celulares, como los de riñón de hámster neonato-21 (BHK-21), células estables de mono (MS) o riñón de mono verde africano (Vero), o bien células de insecto (KC), así como por vía intravenosa en huevos embrionados. Se han desarrollado varios ensayos inmunológicos (ELISA) para la detección rápida del antígeno VPE en sangre, en tejidos de bazo y en sobrenadantes de células infectadas. También se ha logrado la identificación del ARN del VPE usando un método de reacción en cadena de la polimerasa con transcripción inversa. Las cepas aisladas se pueden serotipificar por una prueba serológica con especificidad de tipo como la de neutralización vírica (VN) y por una reacción en cadena de la polimerasa con transcripción inversa (PCR) también con especificidad de tipo, y posterior secuenciación.

**Pruebas serológicas:** Los caballos que sobreviven a una infección natural desarrollan anticuerpos contra el serotipo infeccioso del VPE a los 8–12 días de la infección. Esto se puede demostrar por varios métodos serológicos, como la prueba de la fijación de complemento, por el ELISA, por inmunotransferencia y por VN. La última técnica es la usada en la serotipificación.

**Requisitos para las vacunas:** Actualmente se dispone de vacunas vivas atenuadas (mono y polivalentes) en el mercado para uso en caballos, mulas y asnos. Se han evaluado experimentalmente vacunas de subunidades.

## A. INTRODUCCIÓN

La peste equina (PE) (*African horse sickness, Peste equine*) es una enfermedad infecciosa de los équidos, no contagiosa y transmitida por artrópodos, que está causada por un *Orbivirus* de ARN bicatenario perteneciente a la familia Reoviridae. El género *Orbivirus* también incluye al virus causante de la lengua azul y al virus de la enfermedad hemorrágica epizootica, que tienen propiedades morfológicas y bioquímicas similares pero distintas propiedades patológicas y antigénicas, así como un diferente rango de hospedadores. Mediante neutralización vírica se han identificado nueve serotipos del VPE antigenicamente diferenciados; se ha observado cierta reacción cruzada entre 1 y 2, 3 y 7, 5 y 8, y 6 y 9, pero no se producen reacciones cruzadas con otros orbivirus conocidos. El virus se puede inactivar sometándolo a 72°C durante 120 minutos (deberá confirmarse mediante tres pases a ciegas por la línea celular Vero).

El virión es una partícula sin envoltura de un tamaño de unos 70 nm. El genoma del virus de la PE (VPE) comprende diez segmentos de ARN bicatenario que codifican siete proteínas estructurales (VP1-7), la mayor parte de las cuales han sido secuenciadas por completo en los serotipos del VPE 4, 6 y 9 (Roy *et al.*, 1991; Venter *et al.*, 2000; Williams *et al.*, 1998), y cuatro proteínas no estructurales (NS1, NS2, NS3, NS3A) (Grubman & Lewis, 1992; Laviada *et al.*, 1993). Las proteínas VP2 y VP5 forman la cápsida externa del virión, y las proteínas VP3 y VP7 son las proteínas principales de la cápsida interna. Las proteínas VP1, VP4 y VP6 constituyen las proteínas minoritarias de la cápsida interna. Las proteínas NS3 son las segundas más variables de entre las proteínas del VPE (Van Niekert *et al.*, 2001), siendo la más variable la proteína principal de la cápsida externa, VP2. Esta proteína, VP2, es la principal determinante de los diferentes serotipos del VPE y, junto con VP5, la diana de la neutralización vírica (Martínez-Torrecedradora *et al.*, 2001). Al menos dos vectores de campo intervienen en la transmisión del virus: *Culicoides imicola* y *C. bolitinos*.

La PE es una enfermedad enzoótica en el África sub-sahariana, aunque se han dado brotes ocasionales en el norte de África (1965, 1989–1990, 2007-2010), en el Oriente Medio (1959–1961) y en Europa (España, 1966, 1987–1990, y Portugal, 1989) (Sánchez-Vizcaíno, 2004).

Las cuatro formas clínicas clásicas de la PE son: la pulmonar, la cardíaca, la mixta y la febril. La forma pulmonar hiperaguda tiene lugar en animales totalmente susceptibles y es de curso corto, ya que a menudo dura solo unas horas; ocasiona una alta mortalidad. El animal presenta dificultad respiratoria, extiende la cabeza y el cuello y suda profusamente. Por último, excreta espuma por la nariz. La forma cardíaca, edematosa, tiene un curso más subagudo y la mortalidad llega al 50%. La cabeza y el cuello pueden presentar una intensa hinchazón, que puede avanzar hasta el tórax. También es característica una hinchazón de las fosas supraorbitales y puede haber hinchazón conjuntival con petequias. La parálisis del esófago puede dar lugar a neumonía por aspiración, y la presencia de hemorragias sublinguales siempre indican mal pronóstico. La forma mixta, aguda, es más frecuente y tiene rasgos tanto de la cardíaca como de la pulmonar. La mortalidad puede alcanzar el 70%. La febril suele pasar desapercibida, ya que es una forma leve de la enfermedad, y se observa en équidos resistentes, como cebras y asnos (Coetzer & Guthrie, 2005).

También se han descrito casos clínicos en perros, con síndrome de disnea aguda o muerte súbita. En los perros, la mortalidad es alta, y pueden intervenir en la diseminación de la enfermedad (Oura, 2018). Históricamente, la infección se ha atribuido al consumo de carne de caballo infectada, aunque datos más recientes incluyen la sospecha de una transmisión por vectores (O'Dell *et al.*, 2018; van Sittert *et al.* 2013).

La enfermedad tiene una incidencia estacional (final de verano/otoño) y cíclica, con las mayores epizootias durante las estaciones calurosas en Sudáfrica, como por ejemplo, durante el fenómeno de El Niño (Baylis *et al.*, 1999). La mortalidad por el VPE depende de la especie de équido afectada y de la cepa y el serotipo del virus. Dentro de la familia de los équidos, los caballos son los más susceptibles a la PE, con una mortalidad del 50–95%, seguidos por las mulas, cuya mortalidad es de alrededor del 50%. En las regiones enzoóticas de África, los asnos son muy resistentes al VPE y experimentan solo infecciones subclínicas. Sin embargo, en países europeos y asiáticos, los asnos son moderadamente susceptibles y presentan una mortalidad del 10%. Las cebras son también notablemente resistentes, sin signos clínicos, excepto la fiebre, aunque pueden presentar una larga viremia (de hasta 40 días).

Las pruebas de laboratorio son indispensables para establecer y confirmar un diagnóstico correcto. Aunque algunos signos clínicos y lesiones son característicos, la PE se puede confundir con otras enfermedades. Así, por ejemplo, la hinchazón supraorbital, que a menudo está presente en caballos con PE subaguda, es, junto con unos antecedentes determinados, suficiente para establecer un diagnóstico provisional. Otros signos y lesiones

son menos específicos de la PE, y deben excluirse otras enfermedades, como la encefalitis equina, la anemia infecciosa equina, el virus Hendra, la arteritis viral equina, la piroplasmosis y la púrpura hemorrágica (OIE, 2010).

Actualmente se comercializan vacunas vivas atenuadas (monovalentes y polivalentes) para su uso en caballos, mulos y asnos.

No hay indicios de que los humanos se puedan infectar por ninguna cepa natural del VPE, ni por contacto con animales infectados natural o experimentalmente ni por manipulación del virus en los laboratorios. Las manipulaciones de laboratorio deben llevarse a cabo a un nivel de contención adecuado, que vendrá determinado por un análisis del riesgo biológico (véase el Capítulo 1.1.4. *Bioseguridad y bioprotección: Normas para la gestión del riesgo biológico en el laboratorio veterinario y en las instalaciones de los animales*).

## B. TÉCNICAS DE DIAGNÓSTICO

**Tabla 1.** Métodos analíticos disponibles para el diagnóstico de la Peste equina 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
<b>Identificación del agente<sup>1</sup></b>						
RT-PCR en tiempo real	+	+++	+	+++	++	–
RT-PCR en gel de agarosa	–	+	+	++	+	–
Aislamiento del virus	–	++	–	+++	–	–
<b>Detección de respuesta inmunitaria</b>						
ELISA (específico de serogrupo con VP7)	+++	++	++	++	+++	++
CFT	+	+	+	+	+	+
VN	+	+	–	+	+	+++

Clave: +++ = método recomendado, validado para este propósito; ++ = método idóneo pero que puede precisar una posterior validación; + = puede utilizarse en algunas situaciones, pero el coste, la fiabilidad y otros factores limitan mucho su aplicación; – = no adecuado para este propósito; n/a = no aplicable.

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; ELISA = enzimoimmunoanálisis; CF= fijación del complemento; VN = prueba de neutralización vírica

Se dispone de varias técnicas para la identificación vírica de la PE que varían desde el enzimoimmunoanálisis (ELISA) de captura (tipo sándwich indirecto) (Rubio *et al.*, 1998), con anticuerpos poli (PAb) o monoclonales (MAb), hasta la prueba de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR), incluyendo PCR con transcripción inversa (RT-PCR) para diferenciar entre los nueve serotipos del VPE, o aislamiento vírico en cultivo celular. Si es posible se debe realizar más de una prueba para diagnosticar un brote de PE, especialmente en el caso cero. La primera prueba puede ser una prueba rápida, como el ELISA o la PCR, seguida del aislamiento del virus en

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

cultivo celular. La neutralización del virus (VN) para identificación del serotipo o la RT-PCR específica de tipo con posterior secuenciación deben realizarse cuanto antes en el curso del brote para que pueda identificarse el serotipo y pueda escogerse la vacuna adecuada.

Actualmente no hay estándares internacionales para virus ni para reactivos de diagnóstico, ni tampoco una metodología normalizada para la identificación del VPE. Sin embargo, se ha evaluado una serie de virus y de anticuerpos y en varios laboratorios se han realizado estudios comparativos entre diferentes ELISA de detección de antígeno del VPE y de determinación de anticuerpos contra el VPE, como el Laboratorio de Referencia de la UE para la PE. Los resultados han demostrado un alto nivel de correlación tanto en la detección de antígenos como de anticuerpos al emplear una prueba interna y kits comerciales. Se han llevado a cabo estudios similares con distintas RT-PCR en los que también se ha observado un alto nivel de correlación. En los Laboratorios de Referencia de la OIE para la PE se dispone de más información sobre estudios comparativos de los distintos métodos y kits para el análisis.

Un aspecto muy importante del diagnóstico es la selección de muestras y que el transporte al laboratorio se realice de forma segura.

## 1. Identificación del agente

### 1.1. Aislamiento del virus

Las muestras de elección para diagnóstico son: sangre completa no coagulada extraída de animales enfermos durante la fase febril de la enfermedad, así como pequeños trozos (2–4 g) de bazo, pulmón y ganglios linfáticos de los que hayan muerto. Las muestras se deben mantener a 4°C durante el transporte y procesarse en un corto plazo de tiempo.

#### 1.1.1. Cultivo celular

Se ha utilizado con éxito el aislamiento directo del VPE en líneas celulares de mamíferos: riñón de hámster neonato (BHK-21), células estables de mono (MS), células de riñón de mono verde africano (Vero), y en líneas celulares de insectos: *Culicoides* y mosquitos. Las muestras de sangre recogidas con un anticoagulante adecuado se pueden usar sin diluir como inóculo. Tras 15–60 minutos de adsorción, y a una temperatura ambiente de 37°C, los cultivos celulares se lavan y se añade medio de mantenimiento. Alternativamente, y de modo más frecuente, la sangre se lava, se lisa y se diluye a 1/10. Este procedimiento elimina anticuerpos indeseables que podrían neutralizar el virus y favorece la liberación de los virus asociados a la membrana celular de los eritrocitos. Cuando se utilizan muestras de tejidos, como el bazo, el pulmón, etc., se prepara una suspensión de tejido al 10% en solución salina tamponada con fosfato (PBS) o en medio de cultivo celular, que contenga antibióticos.

Entre los 2 y 10 días después de la infección puede aparecer un efecto citopático (ECP) en las células de mamíferos. Se deben realizar tres pases ciegos antes de considerar una muestra como negativa. No se observa el efecto citopático en las células de insectos, pero sí puede detectarse la presencia del virus en el sobrenadante entre 7 y 10 días después mediante RT-PCR. El sobrenadante de células de insecto infectadas puede pasarse a continuación sobre células de mamífero, lo cual pondrá de manifiesto ECP tras uno o dos pasos.

### 1.2. Métodos basados en ácidos nucleicos

#### 1.2.1. Reacción en cadena de la polimerasa con transcripción inversa

La RT-PCR es una técnica muy sensible que proporciona una identificación rápida del ácido nucleico del virus de la PE en sangre y otros tejidos de los animales infectados. Esta técnica ha mejorado mucho el diagnóstico laboratorial de la PE gracias a un aumento de la sensibilidad de la detección y a un acortamiento del tiempo necesario para el diagnóstico. La RT-PCR detecta ácido nucleico específico del virus incluso después de que el virus ya no sea viable ni capaz de establecer una nueva infección ni en células de insecto ni en células de mamífero. Por lo tanto, un resultado positivo no necesariamente indica la presencia de virus infeccioso.

Se han descrito varias RT-PCR basadas en gel de agarosa para la detección específica de ARN del VPE dirigida a los segmentos víricos 3, 7 u 8 (Aradaib, 2009; Bremer *et al.*, 1998; Laviada *et al.*, 1997; Sakamoto *et al.*, 1994; Stone-Marschat *et al.*, 1994; Zientara *et al.*, 1994). El método más utilizado emplea cebadores correspondientes al extremo 5' (nucleótidos 1–21) y 3' (nucleótidos 1160–1179) del segmento 7 del ARN (que codifica la VP7), que amplifican todo el segmento vírico (Zientara *et al.*, 1994).

Se han desarrollado métodos basados en la RT-PCR en tiempo real (rRT-PCR) para una detección muy sensible y específica de ARN del VPE basados en un par de cebadores y una sonda marcada a partir de secuencias conservadas de los segmentos víricos 3, 5 o 7 (Agüero *et al.*, 2008; Bachanek-Bankowska *et al.*, 2014; Fernández-Pinero *et al.*, 2009; Rodríguez-Sánchez *et al.*, 2008). También se ha descrito una rRT-PCR doble que accede a los segmentos 7 y 8 del genoma (que codifican la NS1 y la NS2, respectivamente) (Quan *et al.*, 2010).

Aunque tanto los procedimientos basados en gel como la rRT-PCR pueden detectar cepas de referencia de los nueve serotipos víricos, la rRT-PCR aporta ventajas respecto a los métodos de RT-PCR basados en gel de agarosa, por ofrecer un análisis más rápido, una mayor sensibilidad, e idoneidad para una automatización de alto rendimiento. No obstante, los métodos de RT-PCR basados en gel, en concreto los que amplifican largos fragmentos de ARN (Laviada *et al.*, 1997; Zientara *et al.*, 1994), pueden ser muy útiles en la posterior caracterización genética del virus secuenciando los amplicones. Asimismo, en los laboratorios sin capacidad de llevar a cabo una RT-PCR en tiempo real, pueden resultar ventajosos.

En 2015, los Laboratorios de Referencia de la OIE para la PE llevaron a cabo un estudio internacional comparativo para recoger información sobre el rendimiento de los distintos métodos empleados en los principales laboratorios de diagnóstico del VPE. Se evaluaron diez protocolos distintos de RT-PCR. Aunque en este estudio comparativo ciertos métodos no pudieron evaluarse en uno o dos laboratorios, produjeron resultados muy buenos y por lo tanto son adecuados para la posterior evaluación y validación. En el estudio se observó que los métodos de RT-PCR en tiempo real de Agüero *et al.* (2008) y Guthrie *et al.* (2013) detectaban correctamente todas las cepas representativas incluidas en el estudio internacional con una sensibilidad alta en el análisis de las muestras de campo. Estos métodos están validados para la certificación de animales antes de los desplazamientos, y se describen a continuación.

A continuación se dan los detalles de los métodos de la RT-PCR basada en gel y de la RT-PCR en tiempo real para el VPE.

#### 1.2.2. Procedimiento de la RT-PCR basada en gel de agarosa (Zientara *et al.*, 1994)

La desnaturalización del ARN extraído debe llevarse a cabo antes de la RT-PCR, puesto que el genoma del VPE consiste en una doble hebra de ARN. Las secuencias de los cebadores de la PCR empleados son 5'-GTT-AAA-ATT-CGG-TTA-GGA-TG-3', que corresponde a la polaridad del ARN mensajero, y 5'-GTA-AGT-GTA-TTC-GGT-ATT-GA-3', que es complementario de la polaridad del ARN mensajero.

Todos los componentes necesarios para la transcripción inversa y la PCR se incluyen en el tubo de reacción que contiene el ARN desnaturalizado. Se lleva a cabo una RT-PCR de un solo paso incubando en un termociclador del siguiente modo: 45 minutos a 1 hora a 37–55°C, 5–10 minutos a 95°C; a continuación, 40 ciclos de: 94–95°C durante 1 minuto, 55°C durante 1–1,5 minutos, 70–72°C durante 2–2,5 minutos, seguidos de un paso de extensión final de 7–8 minutos a 70–72°C. El análisis de los productos de la PCR se realiza mediante electroforesis en gel de agarosa. Las muestras positivas para PE darán una banda de 1179 pares de bases que puede emplearse como molde en la reacción de secuenciación, utilizando independientemente los cebadores de la PCR, para obtener la secuencia de nucleótidos del segmento viral 7.

#### 1.2.3. Procedimiento de la RT-PCR en tiempo real (Agüero *et al.*, 2008)

Esta RT-PCR en tiempo real específica de grupo se ha empleado con buenos resultados en los Laboratorios de Referencia nacionales de los estados miembros de la Unión Europea (UE) que han participado en pruebas anuales de eficiencia llevadas a cabo durante el periodo 2009–2015. Asimismo, en un estudio internacional comparativo organizado en 2015 y auspiciado por la red de Laboratorios de Referencia de la OIE, se comprobó que se trataba de uno de los protocolos mejor situados en el ranquin:

##### a) Protocolo

La diana de esta prueba es el segmento 7 (VP7) del VPE y se describe en Agüero *et al.* (2008). Es capaz de detectar todos los tipos y cepas del VPE actualmente en circulación.

##### i) Extracción de ARN de muestras de sangre y de tejido

Existen kits comerciales fáciles de encontrar; el paso de extracción de ARN se puede llevar a cabo según los procedimientos especificados en cada kit.

- ii) Existen a la venta varios kits de RT-PCR en tiempo real de un solo paso que pueden emplearse en función de los requisitos locales o específicos de cada caso, del kit que se utilice y del equipo del que se disponga. A continuación se indican algunos pasos básicos descritos por Agüero *et al.* (2008). (En la Tabla 2 se indican las secuencias de cebadores y sonda).
- iii) La concentración de la reserva de cebador se diluye a una concentración de trabajo de 8  $\mu\text{M}$ , mientras que la sonda se diluye a una concentración de trabajo de 50  $\mu\text{M}$ .
- iv) Se añaden 2,5  $\mu\text{l}$  de cada solución de trabajo de cebador a 8  $\mu\text{M}$  (concentración final de 1  $\mu\text{M}$ ) a cada pocillo de la placa de PCR (o tubo o tira) que contenga muestras de ARN o controles positivo o negativo. La placa se deja sobre hielo.
- v) Se añaden a cada pocillo muestras de 2  $\mu\text{l}$  de ARN, tanto de la muestra problema como de los controles positivo y negativo.
- vi) Las muestras se someten a desnaturalización por calor a 95°C durante 5 minutos, seguida de un enfriamiento rápido sobre hielo durante 5 minutos más.
- vii) Se prepara un volumen adecuado de mezcla primaria para RT-PCR simple en tiempo real para la cantidad de muestras que deban analizarse siguiendo las instrucciones del fabricante. La sonda debe incluirse a una concentración final de 0,25  $\mu\text{M}$  (0,1  $\mu\text{l}$  de solución de trabajo de sonda, 50  $\mu\text{M}$  por muestra).
- viii) Se distribuyen 13  $\mu\text{l}$  de mezcla primaria a cada pocillo de la placa de PCR que contenga los cebadores desnaturalizados y el ARN.
- ix) La placa se sitúa en un termociclador en tiempo real programado con los siguientes tiempos:
  - 48°C x 25 minutos
  - 95°C x 10 minutos
  - 40 ciclos: 95°C x 15 segundos, 55°C x 35 segundos, 72°C x 30 segundos

Si se utilizan unos reactivos y un termociclador que permitan reacciones rápidas, puede aplicarse el siguiente programa:

48°C x 25 minutos  
95°C x 10 minutos  
40 ciclos: 97°C x 2 segundos, 55°C x 30 segundos

Los datos de fluorescencia se obtienen al final del paso de 55°C.

Nota: los tiempos y las temperaturas pueden variar y deben optimizarse para cada reactivo o kit empleado.

#### b) Interpretación de los resultados

La prueba no se considerará válida si se obtienen curvas de amplificación atípicas. En tal caso, deberá repetirse.

La prueba se considerará positiva cuando se obtenga una curva de amplificación típica y el valor de Ct (el número de ciclos de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) necesarios para que la señal de fluorescencia exceda el fondo) sea inferior o igual al umbral de Ct definido (35) en un máximo de 40 ciclos de PCR ( $C_t \leq 35$ ).

La prueba se considerará inconcluyente cuando se obtenga una curva de amplificación típica y el valor de Ct sea superior al umbral de Ct definido (35) en un máximo de 40 ciclos de PCR ( $C_t > 35$ ).

La prueba se considerará negativa cuando se obtenga una curva de amplificación horizontal que no cruce la línea umbral en un máximo de 40 ciclos de PCR.

#### c) Características de diagnóstico

- i) Determinación del valor umbral

El umbral para establecer un resultado positivo en este método analítico es menos de 35 ciclos de PCR ( $C_t \leq 35$ ).

El umbral para establecer un resultado negativo en este método analítico es de 40 ciclos de PCR.

Los resultados situados entre 35 y 40 ciclos de PCR se considerarán inconcluyentes ( $35 \leq Ct \leq 40$ ).

ii) Sensibilidad y especificidad para el diagnóstico

La especificidad (D<sub>Sp</sub>) y la sensibilidad (D<sub>Se</sub>) para el diagnóstico se calculan según el procedimiento detallado en el Capítulo 1.1.6. *Principios y métodos de validación de las pruebas de diagnóstico de las enfermedades infecciosas*.

Para estimar la D<sub>Se</sub> y la D<sub>Sp</sub> del método de la RT-PCR en tiempo real de Agüero, se analizó un total de 186 muestras que se sabía que eran negativas y 132 muestras que se sabía que eran positivas, cifras superiores a las necesarias (73) para realizar una estimación de la D<sub>Se</sub> y de la D<sub>Sp</sub> del 95% con un 5% de error. La D<sub>Se</sub> y la D<sub>Sp</sub> calculadas fueron del 97% y del 100%, respectivamente. Por lo tanto, se llega a la conclusión de que el número de muestras de resultado previamente conocido utilizadas para calcular estos parámetros del diagnóstico fue suficiente como para cumplir con los requisitos de la OIE.

d) **Reproducibilidad**

La reproducibilidad del método de la RT-PCR en tiempo real de Agüero según el estudio internacional comparativo citado anteriormente fue de al menos un 93,55%, e identificó correctamente todas las muestras positivas y negativas analizadas. Todos los laboratorios detectaron diluciones de muestras positivas de hasta al menos  $10^{-5}$ . En otros programas de comprobación de la eficiencia se han obtenido resultados similares.

Se pueden solicitar cepas de referencia de virus inactivados de los serotipos 1–9 al Laboratorio de Referencia de la OIE de España con el fin de llevar a cabo el método de detección por RT-PCR.

#### 1.2.4. Procedimiento de la RT-PCR en tiempo real (Guthrie et al., 2013)

a) **Protocolo**

El método analítico aquí descrito es una adaptación de Guthrie *et al.* (2013) y permite detectar todos los tipos y cepas conocidos del VPE actualmente en circulación. Esta prueba tiene como diana el segmento 7 (VP7) del VPE. El procedimiento indicado puede requerir alguna modificación para ajustarse a los requisitos de cada laboratorio o del kit de RT-PCR empleado.

i) Extracción de ARN de muestras de sangre y de tejido

Existen kits comerciales fáciles de encontrar; el paso de extracción de ARN se puede llevar a cabo según los procedimientos especificados en cada kit.

ii) Existen a la venta kits de RT-PCR en tiempo real. A continuación se indican algunos pasos básicos descritos por Guthrie *et al.* (2013), que pueden modificarse en función de los requisitos locales o específicos de cada caso, del kit que se utilice y del equipo del que se disponga.

iii) Se preparan soluciones reserva de mezcla de cebador y sonda a una concentración 25x a 5  $\mu$ M en el caso de los cebadores directo e inverso, y a 3  $\mu$ M en el caso de la sonda.

iv) Se añaden 5  $\mu$ l de las muestras de ARN, incluida la muestra problema y los controles positivos y negativo, a los pocillos correspondientes de la placa de PCR (o tubo o tira).

v) Las muestras se someten a desnaturalización por calor a 95°C durante 2 minutos, y se dejan sobre hielo durante al menos 3 minutos.

vi) Se prepara un volumen adecuado de mezcla primaria para RT-PCR simple en tiempo real para la cantidad de muestras que deban analizarse siguiendo las instrucciones del fabricante. Se incluye 1  $\mu$ l de solución primaria de mezcla de cebador y sonda 25x (del paso iii anterior) en la mezcla primaria para obtener una concentración final en cada pocillo de 200 nM para cada cebador y 120 nM para la sonda.

vii) Se distribuyen 20  $\mu$ l de mezcla primaria a cada pocillo de la placa de PCR que contenga el ARN desnaturalizado.

- viii) La placa se sitúa en un termociclador en tiempo real programado para la transcripción inversa y la amplificación o detección por fluorescencia del ADNc, según indiquen los fabricantes.

El siguiente perfil térmico se indica a modo de ejemplo:

48°C x 10 minutos

95°C x 10 minutos

40 ciclos: 95°C x 15 segundos, 60°C x 45 segundos

Nota: los tiempos y las temperaturas pueden variar y deben optimizarse para cada reactivo o kit empleado.

#### b) Interpretación de los resultados

**Nota:** los valores de corte propuestos que determinan si un resultado es positivo/ambiguo/negativo deben validarse o ajustarse para cada laboratorio en concreto según los reactivos y equipo que se utilicen.

Las muestras se clasificarán como “positivas para el VPE” si la fluorescencia normalizada para la prueba de la RT-PCR en tiempo real para el VPE supera un umbral de 0,1 en un máximo de 36 ciclos de PCR en todas las réplicas de una muestra.

Las muestras se considerarán “inconcluyentes para el VPE” si la fluorescencia normalizada para la prueba de la RT-PCR en tiempo real para el VPE supera un umbral de 0,1 en 36 a 40 ciclos de PCR en cualquier réplica de una muestra.

Las muestras se clasificarán como “muestras en las que no se ha detectado ácido nucleico del VPE” si la fluorescencia normalizada para la prueba del VPE no supera un umbral de 0,1 en un máximo de 40 ciclos de PCR en todas las réplicas de una muestra y si la fluorescencia normalizada obtenida con el control interno positivo no supera un umbral de 0,1 en un máximo de 33 ciclos de PCR.

#### c) Características del diagnóstico

- i) Determinación del valor umbral

El umbral para establecer un resultado positivo en este método analítico es menos de 36 ciclos de PCR ( $Ct \leq 35$ ).

El umbral para establecer un resultado negativo en este método analítico es de 40 ciclos de PCR.

Los resultados situados entre 36 y 40 ciclos de PCR se considerarán inconcluyentes.

- ii) Sensibilidad y especificidad del diagnóstico

La DSe y la DSP de la RR-PCR en tiempo real para la detección de ácido nucleico del VPE en muestras de sangre completa se estimaron por comparación con el aislamiento del virus empleando un modelo de clase latente bayesiano de doble prueba y doble población que permite dependencia condicional (correlación) entre los resultados de la prueba. Para representar casos sospechosos de PE se empleó un total de 503 muestras de sangre equina, correspondientes cada una a un solo caballo con pirexia y uno o más signos clínicos característicos de la PE. También se obtuvieron muestras de sangre de dos poblaciones sanas independientes de caballos (de 503 y 98 caballos cada una, respectivamente) no vacunados contra la PE y con muy poca probabilidad de haber estado expuestos a una infección natural por el VPE; estas muestras se utilizaron para representar casos negativos a la PE.

La mediana de la especificidad de la prueba para el diagnóstico superó el 99,9%.

La mediana de la sensibilidad de la prueba para el diagnóstico superó el 97,8%.

#### d) Reproducibilidad

En el estudio internacional comparativo citado anteriormente, se observó que el método de la RT-PCR en tiempo real con sonda FRET de Guthrie tenía una sensibilidad superior al 88,1% y una especificidad del 100%, y que identificó correctamente todas las muestras



positivas y negativas analizadas. Todos los laboratorios detectaron diluciones de muestras positivas de hasta al menos  $10^{-5}$ .

**Tabla 2.** Comparación de los métodos de RT-PCR en tiempo real de Agüero et al. (2008) y de Guthrie et al. (2013)

	<b>Agüero et al., 2008</b>	<b>Guthrie et al., 2013</b>
<b>Diana</b>	Específico de grupo (VP7)	Específico de grupo (VP7)
<b>Cebadores (5'-3')</b>	CCA-GTA-GGC-CAG-ATC-AAC-AG	AGA-GCT-CTT-GTG-CTA-GCA-GCC-T
	CTA-ATG-AAA-GCG-GTG-ACC-GT	GAA-CCG-ACG-CGA-CAC-TAA-TGA
<b>Sonda (5'-3')</b>	FAM-GCT-AGC-AGC-CTA-CCA-CTA-MGB	FAM-TGC-ACG-GTC-ACC-GCT-MGB
<b>Temperatura de hibridación</b>	55°C	60°C
<b>Número de ciclos para la amplificación</b>	40	40
<b>Sensibilidad analítica (LOD)</b>	Dilución a $10^{-5}$ de una suspensión vírica de la cepa de referencia AHSV-4 con un título de $10^{6.3}$ DICT <sub>50</sub> /ml, que corresponde a un Ct de $34,3 \pm 0.5$ ( $10^{1.3}$ DICT <sub>50</sub> /ml)	Dilución a $3,02 \times 10^{-6}$ de muestras de sangre positivas para el VPE, con un Ct de 35,71
<b>Especificidad diagnóstica</b>	100%	99,9%.
<b>Sensibilidad diagnóstica</b>	97%	97,8%.

### 1.3. Tipificación del VPE

Hasta hace poco, la prueba de la VN ha sido el método de elección para la tipificación, así como el método de referencia para identificar VPE aislados del campo empleando antisueros específicos de tipo (Verwoerd, 1979). Esta técnica tarda 5 o más días en dar resultados. El desarrollo de RT-PCR basada en gel específica de tipo (Maan et al., 2011; Sailleau et al., 2000), así como de la RT-PCR en tiempo real en la que se emplean sondas (Koekemoer, 2008) que tienen por objetivo el Seg-2 del VPE para la identificación y diferenciación de genotipos del VPE, aporta métodos rápidos de tipificación de los VPE en muestras de tejido y en sangre. Estos métodos se pueden utilizar para aumentar considerablemente la rapidez y la fiabilidad de la detección y la identificación (en comparación con las pruebas de VN) de los nueve serotipos del VPE. Más recientemente, Bachanek-Bankowska et al., 2014, Weyer et al., 2015 han desarrollado RT-PCR en tiempo real específicas de tipo basadas en el uso de sondas Taqman con grupo MGB.

No obstante, la variación genética que puede aparecer con el tiempo en el genoma del VPE, en concreto en la región que codifica la proteína VP2, lugar para el cual deben diseñarse cebadores/sondas específicos para las pruebas de tipificación, hace difícil que se puedan detectar todas las variantes genéticas de cada serotipo mediante este tipo de técnica. Por tanto, aunque existen métodos moleculares que pueden tipificar rápidamente el VPE en muchas muestras de campo positivas, la VN debe mantenerse como prueba de referencia para serotipar las cepas del VPE.

## 2. Pruebas serológicas

Se ha demostrado que los ELISA de bloqueo indirectos y de competición en los que se usa o bien antígeno soluble de VPE o proteína recombinante VP7 (Hamblin et al., 1990; Laviada et al., 1992; Maree & Paweska, 2005; Wade Evans et al., 1993) son buenos métodos para la detección de anticuerpos reactivos frente al grupo de VPE, sobre todo en investigaciones a gran escala (Rubio et al., 1998). Estas dos pruebas han sido reconocidas por la Comisión Europea (2002). El ELISA de bloqueo de competición también se puede utilizar para analizar animales salvajes puesto que no es preciso emplear una anti-globulina específica de especie. Se ha adaptado una prueba de inmunotransferencia para la determinación de anticuerpos anti-PE (Laviada et al., 1992), que es especialmente adecuado para pequeños números de sueros. Se ha utilizado mucho la prueba de la fijación del complemento (CF), pero algunos sueros son anti-complementarios, especialmente los de burro y cebra.

## 2.1. Enzimoimmunoanálisis de bloqueo

La técnica del ELISA de bloqueo de competición tiene por objetivo detectar anticuerpos específicos contra el VPE, y es aplicable a cualquier especie equina. La VP7 es la principal proteína antigénica de la estructura molecular del VPE y se conserva en los nueve serotipos del VPE. En esta prueba, se utiliza un MAb dirigido contra la VP7, lo cual permite una alta sensibilidad y especificidad. Además, también permite analizar especies distintas del caballo (como asnos, cebras, etc.), evitando así el problema de especificidad que en ocasiones surge cuando se emplean los ELISA indirectos. El antígeno recombinante de la VP7 es no infeccioso, lo cual aporta un alto nivel de seguridad (Comisión Europea, 2002).

El principio de esta prueba es bloquear la reacción específica que tiene lugar entre la proteína VP7 recombinante absorbida en una placa de ELISA y un MAb conjugado contra la VP7. Los anticuerpos contra el VPE presentes en una muestra de suero problema bloquearán esta reacción. Así pues, una disminución en la cantidad de color indica la presencia de anticuerpos contra el VPE en la muestra de suero.

Está a la venta el ELISA de bloqueo de competición. La reproducibilidad de la prueba se determinó en un estudio internacional de competencia interlaboratorio (Durán-Ferrer *et al.*, 2018).

### 2.1.1. Procedimiento analítico

- i) *Fase sólida*: Recubrir las placas de ELISA de 96 pocillos con 50–100 ng de VP7 recombinante de VPE-4 diluida en tampón carbonato/bicarbonato, pH 9,6. Incubar toda la noche a 4°C
- ii) Lavar las placas tres veces con PBS 0,1x que contenga NaCl 0,135 M y Tween 20 al 0,05% (v/v) (solución de lavado). Tocar suavemente las placas con un material absorbente para eliminar los posibles residuos del lavado
- iii) *Muestras problema*: Las muestras de suero a analizar, y sueros control positivos y negativos (si no vienen listos para su uso en el kit), se diluyen a 1/5 en diluyente que contenga NaCl 0,35 M, Tween 20 al 0,05%; y Kathon al 0,1% , a razón de 100 µl por pocillo. Se incuban 1 hora a 37°C.
- iv) Lavar las placas cinco veces con PBS 0,1x que contenga NaCl 0,135 M y Tween 20 al 0,05% (v/v) (solución de lavado). Tocar suavemente las placas con un material absorbente para eliminar los posibles residuos del lavado
- v) *Conjugado*: Se distribuyen 100 µl/pocillo de MAb anti-VP7 conjugado a peroxidasa de rábano a la dilución óptima en un diluyente adecuado. Es posible que el MAb y el diluyente estén incluidos en los kits comerciales. Se incuban 30 minutos a 37°C.
- vi) Se lavan las placas como se describe en el paso iv.
- vii) *Sustrato/cromógeno*: se añaden 100 µl/pocillo de solución de sustrato/cromógeno, por ejemplo, ABTS (ácido 2,2'-azino-di-[3-etil- benzotiazolina]-6-sulfónico) a una concentración de 5 mg/ml diluido a 1/10 en tampón fosfato/citrato 0,1 M, pH 4, que contenga H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> al 0,03%, y se incuban 10 minutos a temperatura ambiente.  
La aparición de color se detiene añadiendo 100 µl/pocillo de SDS al 2% (p/v). Pueden utilizarse otros sistemas de cromógeno (como la tetrametil benzidina).
- viii) Se leen las placas a 405 nm.
- ix) *Validación del ensayo*: control positivo inferior a 0,2 y control negativo superior a 1,0.
- x) *Interpretación de los resultados*: se determina el porcentaje de bloqueo (BP) de cada muestra aplicando la siguiente fórmula:

$$BP = \frac{Abs(\text{Control Neg}^-) - Abs(\text{muestra})}{Abs(\text{Control Neg}^-) - Abs(\text{control Pos}^+)} \times 100$$

Las muestras que presenten un valor de BP inferior al 45% se considerarán negativas a anticuerpos contra el VPE. Las que presenten un valor de BP superior al 50% se considerarán positivas a anticuerpos contra el VPE. Las muestras con valores de BP de entre el 45% y el 50% se considerarán dudosas y deberán volver a analizarse. Si vuelve a obtenerse el mismo resultado, se tomará una nueva muestra y se analizará 2 semanas después.

## 2.2. Enzimoimmunoanálisis indirecto

Para la determinación de anticuerpos contra el VPE se ha usado como antígeno<sup>2</sup> la proteína VP7 recombinante con un alto grado de sensibilidad y especificidad (Laviada *et al.*, 1992; Maree & Paweska, 2005). Otras ventajas de este antígeno son su estabilidad y su falta de infectividad. El conjugado empleado en este método es un anticuerpo anti gamma-globulina de caballo conjugado a peroxidasa de rábano que reacciona con suero de caballos, mulos y asnos. El método descrito por Maree & Paweska (2005) emplea proteína G como conjugado que también reacciona con suero de cebra.

### 2.2.1. Procedimiento analítico

- i) *Fase sólida*: Recubrir las placas de ELISA de 96 pocillos con VP7 recombinante de VPE-4 diluida en tampón carbonato/bicarbonato, pH 9,6. Incubar toda la noche a 4°C.
- ii) Lavar las placas cinco veces con agua destilada que contenga Tween 20 al 0,01% (v/v) (solución de lavado). Tocar suavemente las placas con un material absorbente para eliminar los posibles residuos del lavado.
- iii) Bloquear las placas con PBS, pH 7,2 + leche desnatada al 5% (p/v), 200 µl/pocillo, durante 1 hora a 37°C.
- iv) Retirar la solución de bloqueo y limpiar suavemente las placas con un material absorbente.
- v) *Muestras problema*: Las muestras de suero problema, y los controles de suero positivo y negativo, se diluyen 1/25 en PBS + leche desnatada al 5% (p/v) + Tween 20 al 0,05% (v/v), 100 µl por pocillo. Se incuban 1 hora a 37°C. Para la titulación, se añaden diluciones seriadas a la mitad desde 1/25 (100 µl por pocillo), poniendo un suero en cada columna de la placa, dos columnas por suero, y se hace lo mismo con los controles positivos y negativos. Se incuba 1 hora a 37°C.
- vi) Se lavan las placas como en el paso (ii).
- vii) *Conjugado*: Se depositan 100µl/pocillo de anticuerpos anti gamma-globulina de caballo conjugados con peroxidasa de rábano y diluidos en PBS + leche al 5% + Tween 20 al 0,05%, pH 7,2. Se incuban 1 hora a 37°C.
- viii) Se lavan las placas como en el paso (ii).
- ix) *Cromógeno/Sustrato*: Se añaden 200 µl/pocillo de solución de cromógeno/sustrato (10 ml de DAMB [ácido 3-(dimetilamino) benzoico] 80,6 mM+ 10 ml de TBTH [3-metil-2-benzotiazolinona hidrazona]1,56 mM+ 5 µl de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>). Después de unos 5–10 minutos, el desarrollo del color se detiene por adición de 50 µl de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 3N (antes de que el control negativo se empiece a colorear). También se pueden usar otros cromógenos, como ABTS, tetrametil benzidina u ortofenildiamina.
- x) Se leen las placas a 600 nm (o a 620 nm)
- xi) *Interpretación de los resultados*: Se calcula el valor de corte añadiendo 0,06 al valor del control negativo (0,06 es la desviación estándar derivada de un grupo de 30 sueros negativos). Las muestras problema que den valores de absorbancia menores que el corte se consideran negativas. Las muestras problema que den valores de absorbancia mayores que el corte + 0,15 se consideran positivas. Las muestras con valores intermedios de absorbancia se consideran dudosas y se requiere una segunda técnica para confirmar el resultado.

## 2.3. Fijación de complemento

La CF se ha empleado mucho en el pasado, pero actualmente se utiliza menos y se ha sustituido en muchos laboratorios por el ELISA como técnica de detección sistemática. Esta sustitución progresiva se debe a la mayor sensibilidad y grado de estandarización del ELISA, así como al hecho de que una cantidad considerable de sueros tienen actividad anti-complementaria. No obstante, la prueba de la CF es una herramienta útil en zonas endémicas para la demostración y titulación de anticuerpos IgM específicos de grupo contra el VPE, sobre todo tras una infección o vacunación reciente.

---

2 El antígeno puede solicitarse al Centro de Investigación en Sanidad Animal (CISA), España. El tiempo de espera para la entrega es de unos 4–6 meses.

### 2.3.1. Reactivos

- i) Solución salina tamponada con Veronal que contiene un 1% de gelatina (VBSG).
- ii) Las muestras de suero, libres de eritrocitos, deben ser inactivadas por calor: el suero de caballo a 56°C, el de cebra a 60°C y el de asno a 62°C, durante 30 minutos.
- iii) El antígeno es un extracto en sacarosa/acetona de encéfalo de ratón infectado por VEP. El antígeno control es encéfalo de ratón no infectado, extraído del mismo modo. En ausencia de un suero estándar internacional, el antígeno debe titularse frente a un suero control positivo preparado localmente. En la prueba, se utilizan de cuatro a ocho unidades. El antígeno también se puede obtener mediante inoculación del virus en un cultivo celular adecuado (véase el apartado B.1. anterior).
- iv) El complemento es un suero normal de cobaya.
- v) La hemolisina es un suero de conejo hiperinmune contra eritrocitos de oveja (SRBC).
- vi) Los SRBC se obtienen por punción aséptica de la vena yugular y se conservan en solución de Alsever<sup>3</sup> o en citrato sódico.
- vii) El sistema hemolítico (HS) se prepara diluyendo la hemolisina hasta contener dos dosis hemolíticas y usando esto para sensibilizar a los SRBC lavados. Los SRBC se estandarizan a una concentración del 3%.
- viii) Sueros control: Se obtiene localmente un suero control positivo y se valida. Como suero control negativo se utiliza suero de un caballo sano negativo a anticuerpos.

### 2.3.2. Procedimiento analítico

- i) La reacción se lleva a cabo en placas de microtitulación de 96 pocillos de fondo redondeado en un volumen final de 100 µl/pocillo, o en tubos si se emplea la macro-técnica, a 4°C durante 18 horas.
- ii) Todos los sueros, muestras y controles se diluyen a 1/5 en VBSG y 25 µl de cada suero se añaden por duplicado. SE prepara una serie de diluciones a la mitad de cada suero a partir de 1/5 y hasta 1/180.
- iii) Se añaden 25 µl del antígeno diluido según la titulación previa.
- iv) Se añaden 25 µl del complemento diluido según una titulación previa.
- v) Se incuba a 4°C durante 18 horas.
- vi) 25 µl de HS se añaden a todos los pocillos de la placa de microtitulación.
- vii) La placa se incuba 30 minutos a 37°C.
- viii) A continuación, las placas se centrifugan a 200 **g**, y a cada pocillo se asigna una puntuación de presencia de hemólisis. Se emplean sueros, complemento, antígeno y HS control.
- ix) Los resultados se leen empleando hemólisis en el 50% como punto final. La inversa de la dilución más alta de suero que fije específicamente complemento con el antígeno de la CF será considerado el título.
- x) Un título de 1/10 o superior es positivo, e inferior a 1/10, negativo.

## 2.4. Neutralización de virus

El anticuerpo específico para un serotipo se puede detectar mediante la utilización de la VN (House *et al.*, 1990). Esta prueba puede tener un valor adicional en la vigilancia y transmisión epidemiológicas, principalmente en zonas endémicas donde es probable que haya múltiples serotipos.

### 2.4.1. Procedimiento analítico de la VN

- i) A partir de una dilución inicial de 1/5, se preparan diluciones seriadas a la mitad de los sueros problema en una placa de microtitulación de 96 pocillos de fondo plano y grado cultivo celular, empleando medio de cultivo como diluyente. Para cada muestra se emplean dos pocillos a cada dilución. En cada lote de análisis deben incluirse también sueros control, positivo y negativo. A cada pocillo se añade un volumen igual (por ejemplo, de 25 µl) de una reserva del VPE que contenga 100 DICT<sub>50</sub> (dosis infectiva en el 50% de los cultivos tisulares expuestos).

---

<sup>3</sup> 20,5 g de dextrosa (114 mM), 7,9 g de citrato sódico 2 H<sub>2</sub>O (27 mM), 4,2 g NaCl (71 mM), H<sub>2</sub>O hasta 1 litro. Ajustar el pH con ácido cítrico 1 M.

- ii) Las mezclas suero/virus se incuban 60 minutos a 37°C con un 5% de CO<sub>2</sub> y un 95% de humedad antes de añadir a cada pocillo problema 0,1 ml de una suspensión de células Vero (200.000 células/ml).
- iii) Se prepara una titulación por retroceso de la reserva de virus para cada prueba usando cuatro pocillos por dilución decimal, con 25 µl por pocillo. Las placas problema se incuban a 37°C, con un 5% de CO<sub>2</sub>, y con un 95% de humedad, durante 4–5 días, hasta que la titulación por retroceso indique que el virus reserva contiene 30–300 DICT<sub>50</sub>.
- iv) Tras una incubación de 4-5 días, la prueba se lee mediante microscopio invertido. Se puntúan los pocillos en función de la presencia o ausencia de ECP. La presencia de ECP en los pocillos con muestra de suero indica que el suero problema no contiene anticuerpos neutralizantes específicos contra el virus de la prueba y que el virus no se ha neutralizado, y por lo tanto se ha producido lisis celular con la consiguiente destrucción de la capa celular.  
Por el contrario, la ausencia de ECP en los pocillos que contienen la muestra de suero indica que el suero problema contiene anticuerpos neutralizantes específicos contra el virus de la prueba que permiten neutralizar el virus, y por lo tanto la capa celular se ha mantenido intacta.
- v) Como alternativa, las placas se fijan y se tiñen con una solución de cristal violeta al 0,15% (p/v) en glutaraldehído al 2% (v/v) y se lavan. Como alternativa, se pueden fijar con etanol y teñirlas con fucsina básica al 1%.
- vi) El título del suero a punto final del 50% se calcula por el método de Sperman–Kärber y se expresa como log<sub>10</sub> negativo.

## C. REQUISITOS PARA LAS VACUNAS

### 1. Antecedentes

#### 1.1. Fundamentos y uso previsto del producto

Las vacunas vivas atenuadas poli o monovalentes contra PE que están basadas en la selección de macrófagos genéticamente estables que producen macropelículas de lisis en cultivos de células Vero se han utilizado para el control del VPE en África y otros (Erasmus, 1976; Sánchez-Vizcaíno, 2004). Se comercializan vacunas polivalentes.

A principios de los años 1990 se produjo comercialmente una vacuna monovalente inactivada contra el VPE (de serotipo 4) basada en la purificación e inactivación del virus con formalina, pero ya no está disponible en la actualidad (House *et al.*, 1992). Se han utilizado en distintas combinaciones para inmunizar caballos vacunas de subunidad contra el VPE basadas en las proteínas de la cápsida externa VP2 y VP5, más la proteína de la cápsida interna VP7, derivadas de baculovirus recombinantes que funcionaban como vectores de expresión simples y duales (Martinez *et al.*, 1996). También se evaluó la eficacia protectora de la VP2 en una vacuna de subunidad (Scanlen *et al.*, 2002). No obstante, estas vacunas no se comercializan.

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

Actualmente, solo se comercializan las únicas vacunas que se comercializan contra la PE son las vivas atenuadas (polivalentes o monovalentes). Las directrices para la producción de vacunas veterinarias se indican en el capítulo 1.1.8. *Principios de producción de vacunas veterinarias*. Las normas dadas aquí y en el capítulo 1.1.8 pretenden ser de carácter general y pueden suplementarse con requisitos nacionales y regionales.

### 3. Vacuna viva atenuada contra la peste equina

#### 3.1. Características del inóculo

##### 3.1.1. Características biológicas

El inóculo de virus se prepara a partir de VPE genéticamente estable tomado de grandes placas de lisis seleccionadas en células Vero con bajo nivel de pases. Se liofiliza una gran cantidad de este antígeno y se guarda a –20°C como reserva de antígeno para la siembra.

### 3.1.2. Criterios de calidad

Por técnicas apropiadas debe demostrarse que el virus de inóculo está libre de virus, bacterias y micoplasmas contaminantes. Se debe confirmar la identidad del serotipo del virus de inóculo.

## 3.2. Método de fabricación

### 3.2.1. Procedimiento

Al principio de una fase de producción, se producen antígenos de trabajo en cultivos celulares de células BHK-21 o Vero a partir de la reserva de antígeno de inóculo. Se comprueba la esterilidad, pureza e identidad de los antígenos de trabajo, que deben contener un mínimo de  $1 \times 10^6$  unidades formadoras de placas (UFP)/ml del virus infeccioso.

### 3.2.2. Requisitos para los sustratos y los medios

Los cultivos de células Vero se cultivan en frascos rotatorios usando en el medio suero bovino irradiado con rayos gamma. Una vez los cultivos llegan a ser confluentes, el medio se elimina y las células se siembran con los antígenos de trabajo. Tras 1 hora, se añade a los cultivos medio de mantenimiento. La incubación prosigue durante 2–3 días a 37°C. Cuando el ECP está avanzado, se recogen tanto las células como el medio líquido sobrenadante. Los productos del mismo serotipo se agrupan y se guardan a 4°C.

### 3.2.3. Control durante el proceso

Se comprueba la esterilidad del material recogido de los serotipos individuales y se comprueba la infectividad mediante titulación de formación de placas en cultivos de células Vero. El título mínimo aceptable es de  $1 \times 10^6$  UFP/ml.

Finalmente, se preparan dos vacunas polivalentes mezclando volúmenes iguales de los serotipos 1, 3, 4 y 2, 6, 7, 8 respectivamente. Los serotipos 5 y 9 no se incluyen en las formulaciones de las vacunas. También se puede preparar un tipo monovalente. Tras la adición de un estabilizador apropiado, la vacuna se distribuye en volúmenes de 1,0 ml en viales de vidrio y se liofiliza.

### 3.2.4. Pruebas en lotes de producto final

#### i) Esterilidad

Después de la liofilización, se seleccionan al azar cinco frascos de vacuna y se comprueba su esterilidad mediante métodos aceptados internacionalmente. Las pruebas de esterilidad y ausencia de contaminación en los materiales biológicos de uso veterinario se indican en el capítulo 1.1.9.

#### ii) Inocuidad

La inocuidad de una vacuna se comprueba mediante inoculación de la vacuna reconstituida en ratones (0,25 ml, por vía intraperitoneal), cobayas (1,0 ml, por vía intraperitoneal), y un caballo (5,0 ml, por vía subcutánea). Todos los animales se observan a diario durante 14 días. La temperatura rectal del caballo se toma dos veces al día durante 14 días y nunca debe superar los 39°C.

#### iii) Potencia del lote

La potencia depende en gran medida de la concentración de virus en la vacuna.

La dosis inmunizante mínima para cada serotipo es de alrededor de  $1 \times 10^3$  UFP/dosis. El título de infectividad del producto final se analiza por titulación de placas en cultivo de células Vero y debe contener al menos  $1 \times 10^5$  UFP/dosis. El caballo utilizado en la prueba de inocuidad se utiliza también para determinar la inmunogenicidad de una vacuna.

Se toman muestras de suero el día de la vacunación y 21 días después, y se comprueba si contiene anticuerpos neutralizantes contra cada serotipo por la prueba de reducción de placas usando diluciones seriadas a la mitad y unas 100 UFP de virus. El caballo debe desarrollar un título de anticuerpos neutralizantes de al menos 20 contra un mínimo de tres de los cuatro serotipos presentes en la vacuna tetravalente.

### 3.3. Requisitos para la autorización

No existe ninguna directriz descrita para las vacunas contra la PE. No obstante, sí existe una en la UE para el virus de la lengua azul aplicable en circunstancias excepcionales, que probablemente podría aplicarse también al virus de la PE. Esta directriz incluye los requisitos mínimos para la autorización, en circunstancias excepcionales, de la producción de vacuna para uso en emergencias contra el virus de la lengua azul (Reglamento CE N°726/2004, en concreto, los Artículos 38, 39 y 43 del mismo, y el Artículo 26 de la Directiva 2001/82/EC), incluidas medidas para facilitar la rápida inclusión de serotipos víricos nuevos o distintos.

## 4. Vacunas desarrolladas mediante la ingeniería genética

### 4.1. Vacunas existentes y sus ventajas

Ninguna comercializada. Se han descrito vacunas experimentales de subunidades, véase el apartado C.1.1, *Fundamento y uso previsto del producto*).

### 4.2. Requisitos especiales para las vacunas desarrolladas mediante ingeniería genética, si las hay

Ninguno.

## BIBLIOGRAFÍA

AGÜERO M., GÓMEZ-TEJEDOR C., ANGELES CUBILLO M., RUBIO C., ROMERO E. & JIMÉNEZ-CLAVERO A. (2008). Real-time fluorogenic reverse transcription polymerase chain reaction assay for detection of African horse sickness virus. *J. Vet. Diagn. Invest.*, **20**, 325–328.

ARADAIB I.E. (2009). PCR detection of African horse sickness virus serogroup based on genome segment three sequence analysis. *J. Virol. Methods*, **159**, 1–5.

BACHANEK-BANKOWSKA K., MAAN S., CASTILLO-OLIVARES J., MANNING N.M., MAAN N.S., POTGIETER A.C., DI NARDO A., SUTTON G., BATTEN C. & MERTENS P.P. (2014). Real-time RT-PCR assays for detection and typing of African horse sickness virus. *PLoS One*, **9** (4), e93758.

BAYLIS M., MELLOR P.S. & MEISWINKEL R. (1999). Horse sickness and ENSO in South Africa. *Nature*, **397**, 574.

BREMER C.W., DUNGU-KIMBENGA B. & VILJOEN G.J. (1998). Detection of African horsesickness virus in Zebra by RT-PCR and the development of different methods for confirming AHSV specificity of RT-PCR products. Proceedings of the Eighth International Conference on Equine Infectious Diseases, Dubai, 23–26 March 1998. R & W Publications (Newmarket) Ltd, Newmarket, UK.

COETZER J.A.W. & GUTHRIE A.J. (2005). African horsesickness. *In: Infectious Diseases of Livestock*, Second Edition. Coetzer J.A.W. & Tustin R.C., eds. Oxford University Press, Cape Town, 1231–1246.

DURÁN-FERRER M., AGÜERO M., ZIENTARA S., SMITH S., POTGIETER C., RUEDA P., SASTRE P., MONACO F., VILLALBA R., TENA-TOMÁS C., BATTEN C., FROST L., FLANNERY J., GUBBINS S., LUBISI B.A., SÁNCHEZ-VIZCAÍNO J.M., EMERY M., STURGILL T., OSTLUND E. & CASTILLO-OLIVARES J. (2018). Assessment of reproducibility of a VP7 Blocking ELISA diagnostic test for African horse sickness. *Transbound. Emerg. Dis.*, doi: 10.1111/tbed.12968.

ERASMUS B.J. (1976). A new approach to polyvalent immunisation against African horse sickness. *In: Proceedings of the Fourth International Conference on Equine Infectious Diseases*, Lyon, France, September 1976. Princeton, N.J. Veterinary Publications, USA, 401–403.

EUROPEAN COMMISSION (2002). Commission decision of 21 February 2002 amending Annex D to Council Directive 90/426/EEC with regard to the diagnostic tests for African horse sickness. *Off. J. European Communities*, **L53**, 37–42.

FERNÁNDEZ-PINERO J., FERNÁNDEZ-PACHECO P., RODRÍGUEZ B., SOTELO E., ROBLES A., ARIAS M. & SÁNCHEZ-VIZCAÍNO J.M. (2009). Rapid and sensitive detection of African horse sickness virus by real-time PCR. *Res. Vet. Sci.*, **86**, 353–358.

- GRUBMAN M. & LEWIS S. (1992). Identification and characterisation of the structural and non-structural proteins of African horse sickness virus and determination of the genome coding assignments. *Virology*, **186**, 444–451.
- GUTHRIE A.J., MACLACHLAN N.J., JOONE C., LOURENS C.W., WEYER C.T., QUAN M., MONYAI M.S. & GARDNER I.A. (2013). Diagnostic accuracy of a duplex real-time reverse transcription quantitative PCR assay for detection of African horsesickness virus. *J. Virol. Methods*, **189**, 30–35.
- HAMBLIN C., GRAHAM S.D., ANDERSON E.C. & CROWTHER J.R. (1990) A competitive ELISA for the detection of group-specific antibodies to African horse sickness virus. *Epidemiol. Infect.*, **104**, 303–312.
- HOUSE C., MIKICIUK P.E. & BERNINGER M.L. (1990). Laboratory diagnosis of African horse sickness: comparison of serological techniques and evaluation of storage methods of samples for virus isolation. *J. Vet. Diagn. Invest.*, **2**, 44–50.
- HOUSE J., LOMBARD M., HOUSE C., DUBOURGET P. & MEBUS C. (1992). Efficacy of an inactivated vaccine for African horse sickness serotype 4. *In: Bluetongue, African Horse Sickness and Related Orbiviruses: Proceedings of the Second International Symposium*, Walton T.E. & Osburn B.I., eds. CRC Press, Boca Raton, Florida, USA, 891–895.
- KOEKEMOER J.J. (2008). Serotype-specific detection of African horsesickness virus by real-time PCR and the influence of genetic variations. *J. Virol. Methods*, **154**, 104–110.
- LAVIADA M.D., ARIAS M. & SANCHEZ-VIZCAINO J.M. (1993). Characterization of African horse sickness virus serotype 4-induced polypeptides in Vero cells and their reactivity in Western immunoblotting. *J. Gen. Virol.*, **74**, 81–87.
- LAVIADA M.D., ROY P. & SANCHEZ-VIZCAINO J.M (1992). Adaptation and evaluation of an indirect ELISA and immunoblotting test for African horse sickness antibody detection. *In: Bluetongue, African Horse Sickness and Related Orbiviruses: Proceedings of the Second International Symposium*. Walton T.E. & Osburn B.I., Eds. CRC Press, Boca Raton, Florida, USA, 646–650.
- LAVIADA M.D., SANCHEZ-VIZCAINO J.M., ROY P. & SOBRINO F. (1997). Detection of African horsesickness virus by the polymerase chain reaction. *Invest. Agr. SA.*, **12**, 97–102.
- MAAN N.S., MAAN S., NOMIKOU K., BELAGANAHALLI M.N., BACHANEK-BANKOWSKA K. & MERTENS P.P.C. (2011). Serotype-specific primers and gel-based RT-PCR assays for 'typing' African horse sickness virus: identification of strains from Africa. *PLoS One*, **6** (10), e25686.
- MAREE S. & PAWESKA J.T. (2005). Preparation of recombinant African horse sickness virus VP7 antigen via a simple method and validation of a VP7-based indirect ELISA for the detection of group-specific IgG antibodies in horse sera. *J. Virol. Methods*, **125**, 55–65.
- MARTINEZ J., DIAZ-LAVIADA M., ROY P., SANCHEZ C., VELA C., SANCHEZ-VIZCAINO J.M. & CASAL I. (1996). Full protection against AHSV in horses induced by baculovirus-derived AHS virus serotype 4 VP2, VP5 and VP7. *J. Gen. Virol.*, **77**, 1211–1221.
- MARTINEZ-TORRECUADRADA J., LANGEVELD J., MELOEN R. & CASAL I. (2001). Definition of neutralizing sites on African horse sickness virus serotype 4 VP2 at the level of peptides. *J. Gen. Virol.*, **82**, 2415–2424.
- O'DELL, N., ARNOT, L. JANISCH, C.E. & STEYL, J.C.A. (2018). Clinical presentation and pathology of suspected vector-transmitted African horse sickness in South African domestic dogs from 2006 to 2017. *Vet. Rec.* **182**, 715. doi:10.1136/vr.104611
- OIE (World Organisation for Animal Health) (2010). African horse sickness. *In: Atlas of Transboundary Animal Diseases*, Fernandez P.J. & White W.R., eds. OIE, Paris, France, 12–18.
- OURA C. (2018). A possible role for domestic dogs in the spread of African horse sickness virus. *Vet. Rec.*, **182**, 713–714.
- QUAN M., LOURENS C.W., MACLACHLAN N.J., GARDNER I.A. & GUTHRIE A.J. (2010). Development and optimisation of a duplex real-time reverse transcription quantitative PCR assay targeting the VP7 and NS2 genes of African horse sickness virus. *J. Virol. Methods*, **167**, 45–52.



- RODRIGUEZ-SANCHEZ B., FERNANDEZ-PINERO J., SAILLEAU C., ZIENTARA S., BELAK S., ARIAS M. & SANCHEZ-VIZCAINO J.M. (2008). Novel gel-based and real-time PCR assays for the improved detection of African horse sickness virus. *J. Virol. Methods*, **151**, 87–94.
- ROY P., HIRASAWA T., FERNANDEZ M., BLINOV V.M. & SANCHEZ-VIZCAINO RODRIGUEZ J.M. (1991). The complete sequence of the group-specific relationship to bluetongue virus. *J. Gen. Virol.*, **72**, 1237–1241.
- RUBIO C., CUBILLO M.A., HOOGHUIS H., SANCHEZ-VIZCAINO J.M., DIAZ-LAVIADA M., PLATEAU E., ZIENTARA S., CRUCIERE C. & HAMBLIN C. (1998). Validation of ELISA for the detection of African horse sickness virus antigens and antibodies. *Arch. Virol. (Suppl.)*, **14**, 311–315.
- SAILLEAU C., HAMBLIN C., PAWESKA J. & ZIENTARA S. (2000). Identification and differentiation of nine African horse sickness virus serotypes by RT-PCR amplification of the serotype-specific genome segment 2. *J. Gen. Virol.*, **81**, 831–837.
- SAKAMOTO K., PUNYAHOTRA R., MIZUKOSHI N., UEDA S., IMAGAWA H., SUGIURA T., KAMADA M. & FUKUSHO A. (1994). Rapid detection of African horsesickness virus by the reverse transcriptase polymerase chain reaction (RT-PCR) using the amplicon for segment 3 (VP3 gene). *Arch. Virol.*, **36** (1–2), 87–97.
- SANCHEZ-VIZCAINO J.M. (2004). Control and eradication of African horse sickness with vaccine. *In: Control of Infectious Diseases by Vaccination*, Schudel A. & Lombard M., eds. *Developments in Biologicals*, **119**, 255–258. S. Karger AG, Basel, Switzerland.
- SCANLEN M., PAWESKA J., VERSCHOOR J. & DIJK A. (2002). The protective efficacy of a recombinant VP2-based African horsesickness subunit vaccine candidate is determined by adjuvant. *Vaccine*, **20**, 1079–1088.
- STONE-MARSCHAT M., CARVILLE A., SKOWRONEK A. & LAEGREID W.W. (1994). Detection of African horse sickness virus by reverse transcription PCR. *J. Clin. Microbiol.*, **32**, 697–700.
- VAN NIEKERK M., VAN STADEN V., VAN DIJK A.A. & HUISMANS H. (2001). Variation of African horsesickness virus nonstructural protein NS3 in southern Africa. *J. Gen. Virol.*, **82**, 149–158.
- VENTER M., NAPIER G. & HUISMANS H. (2000). Cloning, sequencing and expression of the gene that encodes the major neutralisation-specific antigen of African horsesickness virus serotype 9. *J. Virol. Methods*, **86**, 41–53.
- VERWOERD D.W., HUISMANS H., ERASMUS B.J. (1979). Orbiviruses. *In: Comprehensive Virology*, Fraenkel-Conrat H., Wagner R.R., eds. Plenum Press, London, UK, Vol. **14**, 285–345.
- WADE-EVANS A., WOOLHOUSE T., O'HARA R. & HAMBLIN C. (1993). The use of African horse sickness virus VP7 antigen, synthesised in bacteria, and anti-VP7 monoclonal antibodies in a competitive ELISA. *J. Virol. Methods*, **45**, 179–188.
- WEYER C.T., JOONE C., LOURENS C.W., MONYAI M.S., KOEKEMOER O., GREWAR J.D., VAN SCHALKWYK A., MAJIWA P.O., MACLACHLAN N.J. & GUTHRIE A.J. (2015). Development of three triplex real-time reverse transcription PCR assays for the qualitative molecular typing of the nine serotypes of African horse sickness virus. *J. Virol. Methods*, **223**, 69–74.
- WILLIAMS C.F., INOUE T., LUCUS A.M., ZANOTTO P.M. & ROY Y.P. (1998). The complete sequence of four major structural proteins of African horse sickness virus serotype 6: evolutionary relationship within and between the orbivirus. *Virus Res.*, **53**, 53–73.
- ZIENTARA S., SAILLEAU C., MOULAY S. & CRUCIERE C. (1994). Diagnosis of the African horse sickness virus serotype 4 by a one-tube, one manipulation RT-PCR reaction from infected organs. *J. Virol. Methods*, **46**, 179–188.

\*  
\* \*

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

**NB:** ADOPTADO POR PRIMERA VEZ EN 1991. ÚLTIMAS ACTUALIZACIONES ADOPTADAS EN 2019.